

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RICARDO SHINITI OKA HORIUCHI

“ANÁLISE PROTEÔMICA DA REGIÃO LOMBAR DA MEDULA
ESPINHAL DE RATOS DURANTE O PERÍODO PÓS-NATAL.”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Ricardo Shiniti Oka Horiuchi

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

H782a

Horiuchi, Ricardo Shiniti Oka

Análise proteômica da região lombar da medula espinhal de ratos durante o período pós-natal / Ricardo Shiniti Oka Horiuchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: José Camillo Novello.

Co-orientador: Francesco Langone

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

1. Proteoma. 2. Medula espinhal. 3. Neonatal. I. Novello, José Camillo. II. Langone, Francesco, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(pbg/ib)

Título em inglês: Proteomic analysis of the lumbar region of the rats spinal cord during postnatal period.

Palavras-chave em inglês: Proteome; Spinal cord; Neonatal.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: José Camillo Novello, Cláudio Chrysostomo Werneck, Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga.

Data da defesa: 27/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 27 de junho de 2008

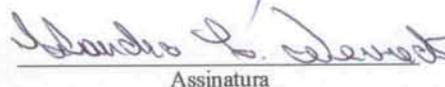
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO



Assinatura

Prof. Dr. CLAUDIO CHRYSOSTOMO WERNECK



Assinatura

Prof. Dr. CLAUDIA HERRERA TAMBELI

Assinatura

Prof. Dr. TOMOMASA YANO

Assinatura

Prof. Dr. MARIA CECILIA F. DE ARRUDA VEIGA



Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado intitulada "Análise proteômica da região lombar da medula espinhal de ratos durante o período pós-natal".

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(x) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1415-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Ricardo Shiniti
ALUNO: RICARDO SHINITI OKA HORIUCHI

José Camillo Novello
Orientador: JOSÉ CAMILLO NOVELLO

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Nome:

Função:

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

Dedico,

À minha mãe Luzia Nahoyo Oka Horiuchi;

Ao meu pai Junichi Horiuchi;

À minha avó Marie Oka

Aos meus irmãos Rodrigo e Renato

À Grace

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Camillo Novello, pela oportunidade e orientação dada desde a iniciação científica.

Ao Prof. Francesco Langone, pela oportunidade e pelas orientações durante o projeto de mestrado.

Aos Profs. Sérgio Marangoni, Cláudio Chrysostomo Werneck e Carlos Amílcar Parada pela participação no exame de qualificação.

À Profa. Iscia Lopes Cendes pelo laboratório e equipamentos disponibilizados. Ao Marcelo Jun Murai pela ajuda nas análises.

Ao Daniel Martins de Souza (Java) pelas inúmeras e valiosas sugestões desde a iniciação científica até o mestrado.

Ao André (Rice) pelas ajudas constantes durante a execução dos experimentos e pela pronta ajuda.

Aos companheiros do laboratório: Hugo, Erich, Karina e Bruno.

Às técnicas do laboratório Nathalia Katauchi e Dayane Pires pelo apoio técnico.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram para o desenvolvimento do projeto.

À minha mãe grande incentivadora e modelo para tudo que faço.

À minha avó que sempre foi um modelo para mim,

Ao meu Tio Kyoshi, minha tia Satian, meus primos Thiago e Denise pelo incentivo.

ÍNDICE

1	Introdução	1
1.1	Sistema Nervoso	1
1.2	Proteoma	4
1.3	Eletroforese de Duas Dimensões Em Gel de Poliacrilamida (2DE)	6
1.4	Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massas	11
2	Objetivos	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	Materiais e Métodos	16
3.1	Animais	16
3.2	Procedimentos Cirúrgicos	16
3.3	Extração de Proteínas	17
3.3.1	Extração de proteínas para eletroforese de duas dimensões detectadas com <i>Coomassie Blue Colloidal</i> e Nitrato de Prata	17
3.3.2	Extração de proteínas para eletroforese de duas dimensões detectadas com Cy5Dye	18
3.3.3	Quantificação de Proteínas	18
3.4	2DE e detecção das proteínas	18
3.4.1	Procedimentos para 2DE	18
3.4.1.1	Focalização isoelétrica (IEF)	18
3.4.1.2	Tratamento das tiras de poliacrilamida de gradiente imobilizado	19
3.4.1.3	SDS-PAGE	20

3.4.2	Detecção de proteínas pós-eletroforese	20
3.4.2.1	Coloração por Nitrato de Prata	20
3.4.2.2	Coloração por <i>Coomassie Blue Colloidal</i>	21
3.4.3	Detecção de proteínas pré-eletroforese	22
3.4.3.1	Detecção das proteínas marcadas com fluoróforos Cy5 TM	22
3.5	Análise quantitativa da expressão protéica	22
3.5.1	Análise da expressão protéica de géis corados com Nitrato de Prata ou <i>Coomassie Blue Colloidal</i>	22
3.5.2	Análise da expressão das proteínas marcados com fluoróforos Cy5 TM DIGE fluors Cy5	23
3.6	Identificação das proteínas diferencialmente expressas	23
3.6.1	Espectrometria de massas	23
3.6.2	Investigação de proteínas em banco de dados públicos	25
4	Resultados e Discussão	26
4.1	Estabelecimento do protocolo experimental	26
4.1.1	Preparação das amostras	26
4.1.2	Isoeletrofocalização das proteínas	28
4.1.3	Quantidade de proteínas	29
4.1.4	Métodos de detecção de proteínas	31
4.2	Análise do proteoma diferencial do neurodesenvolvimento	32
4.2.1	Perfil proteômico por 2DE	32
4.2.1.1	Análise proteômica dos períodos P0 e P21 por 2DE corados por	32

	nitrato de prata	
4.2.1.2	Análise proteômica dos períodos P0, P2, P4 e P7 por 2DE corados com CBC	35
4.2.1.3	Análise proteômica dos períodos P0, P2, P4 e P7 por 2DE utilizando fluoróforos Cy5Dye™ DIGE	37
4.2.1.4	Análise proteômica dos períodos P4 e P21 por 2DE corados com CBC	41
4.3	Identificação das proteínas	44
4.3.1	Spot 1 - Proteína Xlas	46
4.3.2	Spot 2 – Vimentina	48
4.3.3	Spot 3 – GFAP	52
4.3.4	Spot 5 – Neurofilamento de cadeia leve (NF-L)	55
4.3.5	Spot 11- Subunidade beta da ATPase transportadora de H ⁺	59
4.3.6	Spot 12- Neuromodulina (GAP-43)	62
4.3.7	Spot 19- Proteína reguladora da proteína G (RGS14)	65
4.3.8	Spot 23 – Cadeia 2B de tubulina beta (T beta-15)	68
4.4	Considerações Finais	71
5	Conclusões	74
6	Perspectivas Futuras	76
7	Referências Bibliográficas	77

RESUMO

Conhecer os mecanismos que regem a embriogênese e a maturação do sistema nervoso é de grande interesse para todos os diferentes ramos da neurociência. Durante o desenvolvimento dos mamíferos sabe-se que ocorrem fenômenos que levam à definição do número de neurônios e refinamento das conexões sinápticas, que tem características próprias nas diferentes regiões do sistema nervoso e podem diferir também quanto a sua duração. Após o nascimento, diversos sinais neurais e bioquímicos podem modificar significativamente a organização morfológica e funcional dos circuitos da medula espinhal, período que podemos considerar como crítico.

Tendo em vista esses fatores, o trabalho visou analisar o proteoma, complemento protéico completo do genoma, da região lombar da medula espinhal de rato em busca de proteínas envolvidas com o processo de neurodesenvolvimento. Amostras de medula de rato foram coletadas em diferentes tempos de vida, abrangendo o dia do nascimento (P0), com dois (P2), quatro (P4), sete (P7) e vinte e um (P21) dias de vida e comparadas utilizando-se a eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida e identificação por espectrometrias de massas. Os perfis proteômicos obtidos permitiram identificar proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de P4 e P21. Destas, cinco foram mais expressas em amostras de P4: XLas, fragmento da cadeia beta da ATP sintase transportadora de H⁺, a cadeia 2B da tubulina beta e a neuromodulina; e três foram mais expressas nas amostras de P21: GFAP, neurofilamento de cadeias polipeptídicas leve e reguladora da proteína G. Estes resultados indicam que há uma expressão protéica diferencial e que são as

prováveis proteínas envolvidas no processo de desenvolvimento pós-natal da medula espinhal.

ABSTRACT

To know the mechanisms that govern the embryogenesis and the maturing of the nervous system is of great interest for all the different branches of the neuroscience. During the development of the mammals one is known to take place phenomena that lead to the definition of the number of neurons and refinement of the synaptic connections, which has characteristics own in the different regions of the nervous system and which duration can also differ as for his duration. After the birth, several neurons signs and biochemical can modify significantly the morphological and functional organization of the circuits of the spinal cord, period that we can consider like critic.

In mind these factors, the work aimed to analyses the proteome, the genome complete protein complement, of the lumbar region of the spinal cord of rat in search of proteins wrapped with the process of neurodevelopment. Samples of rat's spinal cord were collected in different times of life, including the day of the birth (P0), with two (P2), four (P4), seven (P7) and twenty one (P21) days of life and compared by two dimensional gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. The proteomics profiles obtained allowed to identify proteins differently expressed between the samples of P4 and P21. Of this, five were more expressed in samples of P4: XLas, H⁺ transporting ATP synthase beta chain (fragment), Tubulin beta-2B chain and the neuromodulin; and three were more expressed in the samples of P21: GFAP, Neurofilament light polypeptide and Regulator of G-protein signaling 14. These results indicate that there is a differential protein expression and which are the probable proteins wrapped in the process of native-powders development of the spinal cord.

LISTA DE ABREVIATURAS

2DE	Eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida
CB	Coomassie Blue
CBC	Coomassie Blue Colloidal
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
Da	Dalton
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DTT	Dithiothreitol
EM	Espectrômetro de Massas
IEF	Isoeletrofocalização
KDa	KiloDalton
HCCA	Ácido α – ciano -4 hidrocínâmico
MALDI-TOF	Do inglês: <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i> - Ionização Desaborção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo
MS	Do inglês: Mass Spectrometry - Espectrometria de massa
m/z	Relação massa/carga
NP	Nitrato de Prata
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (Poliacrilamide Gel Electrophoresis)
pI	Ponto Isoelétrico
PMF	Do inglês: <i>Petide mass fingerprint</i> . Impressão digital de peptídeos
rpm	Rotações por minuto
PCD	Do inglês: Programmed cell death. Morte celular programada.
PSA	Persulfato de amônio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N – Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
Vhr	Vtagem/hora
VhT	Vtagem/hora total

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Nervoso

O conhecimento dos mecanismos que regem a embriogênese do sistema nervoso e sua maturação durante o período pós-natal é de grande interesse para todos os diferentes ramos da neurociência.

Nos mamíferos sabe-se que o desenvolvimento do sistema nervoso inicia-se com a formação da placa neural no embrião e, embora sua organização esteja praticamente concluída ao final do período intra-uterino, sua maturação continua após o nascimento (Eyre et al., 2000; Buss et al., 2007). Essa maturação tem características próprias nas diferentes regiões do sistema nervoso e pode diferir também quanto à sua duração. Durante esse período ocorrem fenômenos de neuroplasticidade que levam à definição do número de neurônios envolvidos nos diferentes circuitos neurais e ao refinamento das conexões sinápticas nas diferentes regiões do sistema nervoso (Avossa et al., 2003; Bem Ari, 2001; O'Donovan et al., 1998; Feller, 1999).

Também durante a etapa pós-natal os neurônios são extremamente sensíveis aos sinais provenientes do meio interno, do microambiente tissular e dos órgãos-alvo (Oppenheim, 1991; Caleo, 2002; Avossa, 2003). A morte celular programada é também ainda freqüente nesta fase e ocorre em determinadas populações de neurônios (Buss & Oppenheim, 2006). Além disso, a sobrevivência, a maturação e organização funcional dos mesmos são especialmente dependentes da expressão de moléculas neurotróficas, neurotransmissores e elementos da matriz extracelular, bem como dos seus

receptores protéicos (Levi-Montalcini, 1987; Cellerino & Maffei, 1996; Pizzorusso & Maffei, 1996; Keller-Peck et al, 2001). Estes fenômenos podem ser observados particularmente durante a maturação pós-natal da medula espinhal (Greensmith et al., 2000; Lowrie & Vrbová, 1992). No decorrer da primeira semana após o nascimento tem lugar na medula espinhal a definição dos circuitos neurais. Estes envolvem fenômenos relacionados à morte e sobrevivência de motoneurônios e interneurônios, à eliminação e consolidação de conexões sinápticas e ao acoplamento celular através de junções abertas (Banks & Noakes, 2002; Sanes & Lichtman, 1999). Além disso, o número de neurônios espinhais motores e sensoriais é determinado por sua interação com os respectivos alvos periféricos (Hamburger, 1958; Tanaka & Landmesser, 1986; Hollyday & Hamburger, 1976).

A medula espinhal é uma região complexa e altamente organizada do sistema nervoso. A mesma é sede do processamento de informações relacionadas a importantes funções orgânicas. Tal processamento envolve a transmissão de informações sensoriais somáticas e viscerais para o cérebro e a integração destas informações com aquelas provenientes de várias regiões do sistema nervoso a fim de garantir o adequado controle das vísceras e da motricidade somática (Jessel, 2000). Esse processamento ocorre em circuitos neurais que ocupam posições específicas na medula espinhal dos mamíferos. Essas posições são definidas durante a embriogênese, porém, conforme já referimos, a integração funcional desses circuitos se faz através do refinamento das conexões neuronais durante o imediato período pós-natal. Este pode ser considerado como o período crítico de neuroplasticidade da medula, pois os sinais neurais e bioquímicos que aferem a ela podem modificar

significativamente a organização morfológica e funcional dos seus circuitos. De fato, o período crítico de neuroplasticidade é definido como um período de tempo durante o qual as informações provenientes do meio ambiente, e também do meio interno, exercem grande influência no desenvolvimento adaptativo pós-natal do sistema (Hensch, 2005; Ohno et al, 2005).

A medula espinhal é dividida, macroscopicamente, em 4 regiões denominadas cervical, torácica, lombar e sacral. Seu calibre não é uniforme, pois apresenta duas intumescências nas regiões cervical e lombar. Essas intumescências correspondem às áreas em que fazem conexão com a medula como as raízes nervosas que formam o plexos nervosos braquial e lombosacral, as quais inervam os membros superiores e inferiores, respectivamente (Machado, 2000). A investigação dos mecanismos envolvidos da maturação morfofuncional dessas regiões é de grande interesse, pois tem relevantes implicações neurobiológicas e neuroclínicas. Em particular, é especialmente importante o melhor conhecimento da expressão coordenada, temporal e espacialmente, das proteínas envolvidas na maturação estrutural e funcional dos circuitos neurais medulares.

Os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares que compõem este cenário ainda não estão totalmente elucidados. Os avanços alcançados na era da genômica, inclusive em ratos, geraram uma grande quantidade de dados sobre o número e seqüência dos genes. Por outro lado, estas informações também levaram os pesquisadores a concluir que conhecer a seqüência do DNA não é suficiente para compreender completamente os mecanismos das diferentes funções orgânicas, bem como das suas patologias

(Pandey & Mann, 2000). Na atual era pós genômica, a busca está em conseguir traduzir as seqüências de DNA em informações que permitam compreender o funcionamento das células, os tecidos e os organismos. Assim, um dos principais objetivos é caracterizar a função das proteínas codificadas pelos genes de um dado organismo e em determinadas condições, fisiológicas ou experimentais, bem como a elucidação das vias bioquímicas nas quais elas estão envolvidas. Atualmente, este objetivo tornou-se possível alcançar com o advento de novas ferramentas para o estudo da expressão de proteínas e a criação de bancos de dados com informações estruturais e funcionais destas e de seus respectivos genes (Husi & Grant 2001).

1.2 Proteoma

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez por Wilkins (1995), entendido como sendo o complemento protéico completo do genoma. Podemos considerá-lo como uma “fotografia” da expressão protéica de uma célula, de um tecido, de um órgão, ou mesmo de um organismo, num determinado momento numa condição específica. Podemos dizer que existe apenas um genoma para um organismo, mas há um número muito grande de proteomas. As proteínas estão envolvidas em todos os processos biológicos e podem ser consideradas as moléculas mais importantes para o desenvolvimento e a homeostase dos organismos (Aebersold, 2003).

Contudo, na mesma proporção em que as proteínas são ricas em informações, elas são também difíceis de serem analisadas devido ao seu dinamismo, alterando-se frente a diferentes condições e estímulos,

diferentemente do genoma que comporta-se relativamente estável (Wilkins et. al., 1995; Wilkins et. al., 1999)

Nos anos 70 foi desenvolvida a técnica de eletroforese em duas dimensões para o estudo de proteínas, a qual se baseava na sua separação em um gel de poliacrilamida (O'Farrel, 1975; Pandey & Mann, 2000). Essa técnica é única, pois possibilita a separação simultânea de milhares de proteínas em um único experimento. Além disso, permite a detecção de modificações pós traducionais, que não podem ser preditas com a seqüência genômica (López, 2006).

Nos anos 90, a automação dos métodos de sequenciamento automático de genes possibilitou o desenvolvimento dos bancos de dados genômicos, que representaram uma rica fonte de informações para o avanço das análises proteômicas (Wilkins et. al., 1997; López, 2006). Desta forma, a associação das informações derivadas da genômica e a proteômica permitiram um avanço significativo na compreensão de um grande número de fenômenos biológicos.

Neste contexto é importante destacar que a proteômica fornece dados complementares essenciais aos obtidos na genômica, pois permite a caracterização da estrutura, função e expressão dos produtos finais dos genes, bem como das funções complexas de sinalização e regulação fisiológica (Ong & Pandey, 2001; Nee, 2002; Aebersold & Mann, 2003).

1.3 Eletroforese de Duas Dimensões Em Gel de Poliacrilamida (2DE)

De fato, ainda não temos uma plataforma de alta capacidade para analisar simultaneamente todas as diversas propriedades das proteínas, contudo, a análise protéica baseada em 2DE, em cromatografias, com posterior análise em um espectrômetro de massas é o método mais desenvolvido e versátil existente, que permite uma abordagem de boa parte das características das proteínas como pI, massa molecular, hidrofobicidade e modificações pós traducionais (Rabilloud, 2002).

A eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2DE) tem sido o método mais utilizado para obter perfis proteômicos, mesmo com o surgimento de novas abordagens como as denominadas “*shotgun proteomics*” (Nesvizhskii & Aebersold 2005; Old 2005). A maior vantagem da 2DE consiste na possibilidade de separar uma grande quantidade de proteínas – ao redor de 2000 – presentes em uma dada amostra utilizando apenas um mesmo gel (Zhu, et al., 2003).

A técnica de separação de proteínas baseada na 2DE consiste na focalização isoelétrica (IEF) das proteínas, na qual são separadas em um gradiente de pH até o ponto estacionário, ou ponto isoelétrico (pI), no qual adquirem carga total zero (1ª Dimensão). Após esta etapa, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular (MW) através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) (2ª Dimensão) (O’Farrel, 1975; Zhu, et al., 2003). O resultado da 2DE é um perfil no qual cada proteína está alocada em um ponto ou “*spot*” no gel. Cada *spot* contém múltiplas cópias da proteína correspondente, sendo que a intensidade

e a área de cada *spot* podem fornecer dados quantitativos sobre a expressão da mesma. Assim, a alta resolução da eletroforese 2DE provém do fato de que a separação das proteínas depende de parâmetros diferentes na primeira e segunda dimensão, *pI* e massa molecular, respectivamente (Ong & Pandey, 2001). Desta forma, é possível determinar o perfil global de proteínas em uma amostra distinguindo-as em proteínas ácidas, básicas, de alto peso ou baixo peso molecular.

Por outro lado, é importante considerar que mesmo separando uma quantidade grande de proteínas, a 2DE não é suficiente para determinar todas elas em virtude das modificações pós-traducionais que as proteínas podem sofrer (Gygi et al, 2000). Além disso, a 2DE apresenta algumas limitações com relação à detecção de classes específicas de proteínas, como as muito ácidas ($pI < 3.5$), as muito básicas ($pI > 9.0$), as pequenas (< 6000 Da), as muito hidrofóbicas, as muito grandes (> 120000 Da) e aquelas de baixa expressão, cuja quantidade é inferior ao limite de detecção com *Coomassie Blue* (CB) (100 ng) ou nitrato de prata (0,2ng) (Binz, et. al.,1999; Bienvenut et. al.,1999). A detecção com *Coomassie Blue Coloidal* (CBC) é baseada na ligação das moléculas do corante com as proteínas, as quais possuem uma afinidade muito maior do que com o gel de poliacrilamida, razão pela qual o *background* não fica tão impregnado com o corante e não ocorre saturação, o que permite a visualização dos *spots*. Algo que já não ocorre ao utilizar o método de detecção com nitrato de prata (NP), na qual apresenta uma falta de linearidade e a geração de coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas, devido a saturação (Dunn, 2003)

Conforme referido, a detecção das proteínas separadas pela 2DE pode ser feita através dos métodos específicos de coloração pós-eletroforese com CBC ou NP (Miller et al., 2006). Ambos os procedimentos de coloração são simples e foram tornados compatíveis para as análises por espectrometria de massas (EM), necessárias para a identificação das proteínas (Rabilloud, 1994; Miller et al., 2006), ou também por métodos pré eletroforéticos, que consistem em marcações com fluoróforos (DIGE, SYPRO e DEEP PURPLE) e radioativas.

O método DIGE (Difference Gel Electrophoresis) consiste na ligação das proteínas com os fluoróforos CyDye, baseado na ligação covalente do grupo ester reativo do fluoróforo com o grupo amino epsilon da lisina, sem alterar o seu pI e aumentando a massa em 450Da devido ao fluoróforo. Há uma marcação de 3 a 5% das proteínas totais, por isso é chamada de "minimal labelling", que possui uma capacidade de detecção de 125 pg de proteínas.

A técnica desenvolvida por Unlu *et. al.* (1997) é baseada na marcação de diferentes amostras com fluoróforos com carga, massa e espectro distintos que podem ser separados em um mesmo gel de duas dimensões. Os fluoróforos comumente usados são o Cy2, Cy3 e o Cy5, que permitem marcar duas amostras diferentes, mais o padrão interno, que é amostra de referência que contém quantidades iguais das amostras a serem analisadas (figura 1). O padrão interno que permite uma comparação com alta acurácia entre as diferentes amostras, chegando a 95% de confiabilidade (Alban *et. al.*, 2003).

Em uma análise proteômica, imagens de diferentes géis, de diferentes amostras são comparadas. Devido a variações experimentais entre os géis, é necessário realizar replicatas para que as diferenças observadas possam ser

consideradas como significantes e reais, o que demanda bastante tempo na análise de imagens. O padrão interno elimina o problema da variação inter-gel e permite uma comparação estatística confiável entre as amostras (Marouga et. al., 2005).

A marcação das proteínas com o *Sypro* e *Deep Purple* possibilita uma sensibilidade de até 1ng, contudo há a necessidade de uma posterior coloração para que as proteínas detectadas possam ser removidas e identificadas no espectrômetro de massas.

As marcações radioativas possibilitam uma sensibilidade de até 0,001ng contudo a análise no espectrômetro de massas fica comprometida, pois é necessário outro tipo de detecção posterior para visualizar as proteínas, procedimento que não garante a eficiência da identificação devido à baixa quantidade de proteínas presentes no gel.

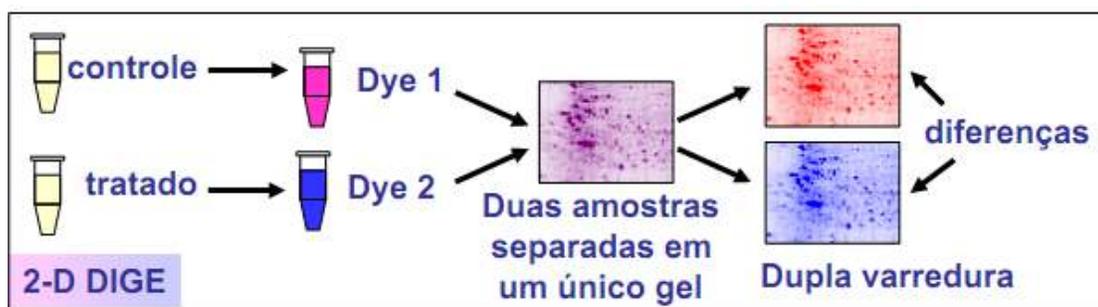


Figura 1: Esquema geral da detecção de proteínas com o uso de fluoróforos Cy5Dye.

Após a detecção das proteínas o gel é digitalizado e, utilizando-se programas computacionais especializados, podem ser realizadas análises quantitativas e qualitativas da expressão protéica através do registro da densidade óptica de toda a imagem do gel. Esta imagem permite a determinação da MW e do pI aparentes dos *spots*, os quais podem então ser removidos do gel e processados para identificação por MS (figura 2) (Marengo, 2004).

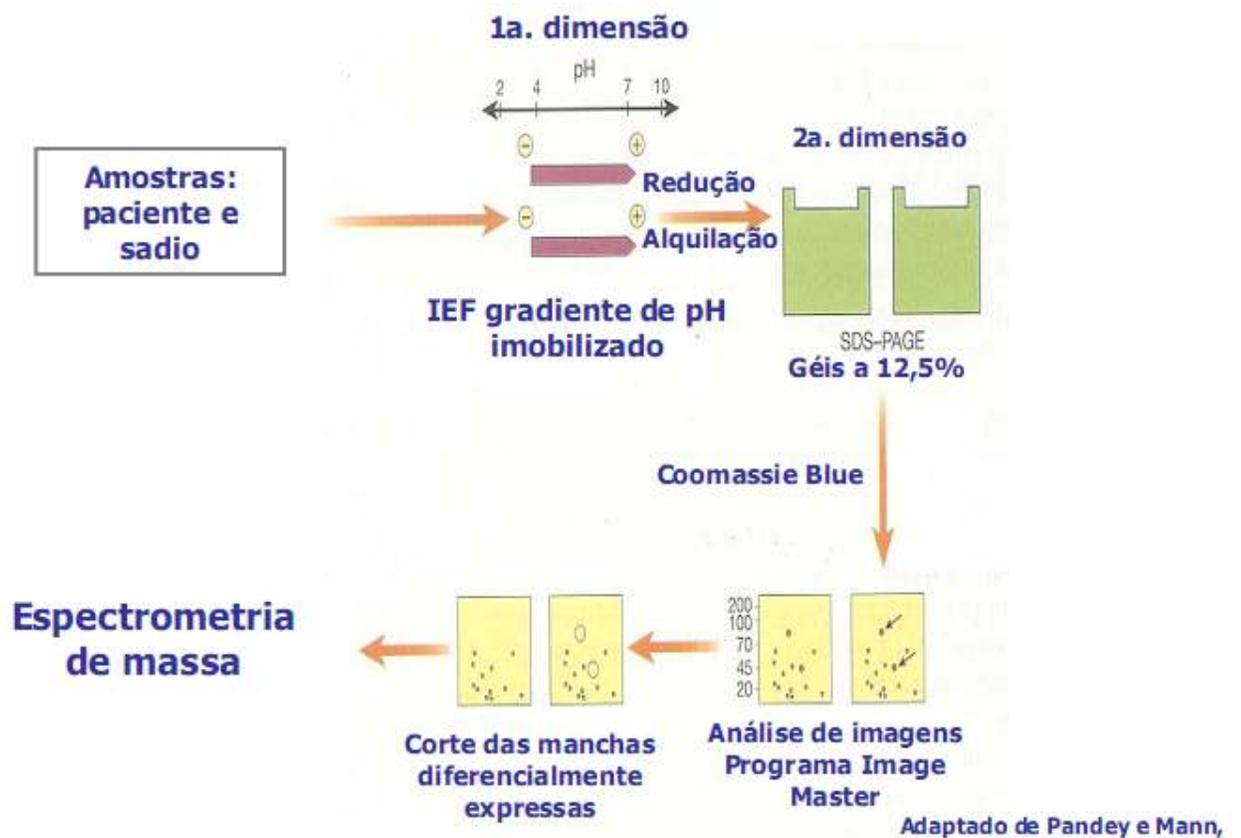


Figura 2 - Esquema geral dos passos da eletroforese de duas dimensões (Adaptado de Pandey & Mann, 2000)

1.4 Identificação de Proteínas por Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas pode ser comparado a uma sofisticada balança capaz de medir individualmente e com grande exatidão a massa de átomos e moléculas.

A utilização da espectrometria de massa em larga escala na área da bioquímica só foi possível devido ao desenvolvimento de técnicas sofisticadas de ionização branda que não causavam fragmentação excessiva. John B. Feen e Koichi Tanaka desenvolveram os métodos de ionização denominados ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*), respectivamente, pelos quais receberam o prêmio Nobel de química de 2002. Estes métodos permitem a ionização de diferentes moléculas, entre elas peptídeos e proteínas, que possuem tamanho relativamente grande e não são resistentes ao calor. Tal metodologia permitiu identificar peptídeos e proteínas que quando submetidas a outros processos de ionização não mantinham a sua forma intacta (Aebersold & Mann, 2003; Wysocki et al., 2005; Siuzdak, 1994).

Os espectrômetros de massas são compostos por três partes principais: a fonte de ionização, o analisador e o detector (Siuzdak, 1994). Em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF, a ionização emprega o método MALDI, na qual a amostra a ser analisada é solidificada no interior de uma matriz ácida, a qual é capaz de absorver energia em uma faixa do espectro de UV e dissipá-la termicamente. Esse processo causa a vaporização da matriz e

consequentemente da amostra, permitindo assim o lançamento dos íons gerados na amostra para a fase gasosa. A análise dos íons assim obtidos é feita através do analisador que utiliza o método TOF (*Time of Flight*). Segundo este método, os íons são submetidos a um forte campo elétrico que os forçam entrar rapidamente no analisador, com uma velocidade que depende da relação massa/carga (m/z) (Mann et al., 2001; Wysocki et al., 2005). Assim que os íons passam pelo analisador, são recolhidos pelo detector (multiplicador de elétrons) que coleta os íons, descarregando-os e produzindo dessa maneira uma corrente elétrica proporcional ao teor do componente da amostra, em função da relação m/z que é convertida em um espectro de massas. No espectrômetro MALDI é possível operar no modo linear ou no reflectron (Karas, 1998).

Na investigação proteômica, cuja detecção das proteínas é inicialmente realizada através de 2DE, os *spots* de interesse removidos individualmente, as proteínas nele contidas são submetidas à digestão trípica *in gel* e, a seguir levadas ao espectrômetro de massas. Através da relação m/z dos peptídeos, obtidos pela digestão da proteína, é feita a identificação de uma característica única da proteína denominada *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), na qual a proteína é identificada de acordo com um padrão de fragmentação previsível, utilizando, por exemplo, a tripsina, enzima que cliva sempre na porção C-terminal dos aminoácidos de lisina e arginina, resultando em um conjunto de peptídeos com massas únicas, que podem ser considerados como uma espécie de “impressão digital” (Pappin et. al., 1993; Corthals et. al, 1999; Aebersold & Goodlett, 2001; Thiede et. al., 2005) (Figura 3). Assim, embora

algumas diferentes proteínas possam um alto grau de similaridade na estrutura primária, muitas regiões de sua seqüência peptídica são únicas.

Finalmente, através de uma clivagem *in silico* a partir de bancos de dados de seqüências peptídicas é possível comparar os dados obtidos experimentalmente e identificar a proteína em questão (Henzel et al., 2003)

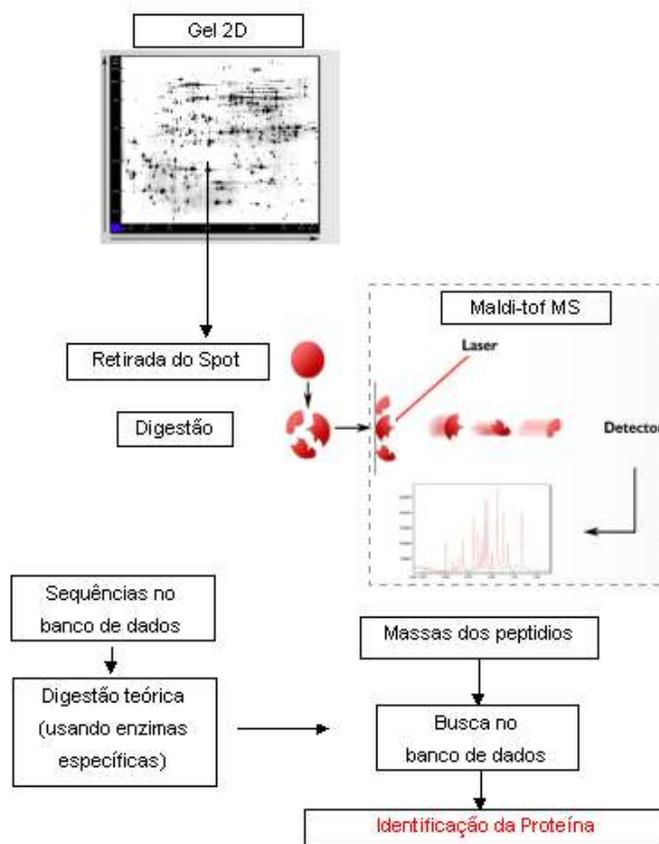


Figura 3 – Esquema da técnica de identificação de proteínas “*Peptide Mass Fingerprinting*”.

Assim, a abordagem proteômica baseada na técnica de espectrometria de massas representa uma ferramenta analítica poderosa para o estudo da expressão protéica que ocorre no sistema nervoso, especialmente com a finalidade de investigar suas alterações durante o desenvolvimento e/ou durante processo degenerativos e regenerativos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma análise proteômica comparativa da medula espinhal (intumescência) de ratos *Wistar* durante o período pós-natal, e identificar as proteínas com possível ação no processo de neurodesenvolvimento através das técnicas de eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no período pós-natal P0, P2, P4 e P7 por eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massas, utilizando a técnica DIGE.

b) Caracterizar as proteínas diferencialmente expressas no período de vida pós-natal P4 e P21 por eletroforese de duas dimensões e espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratas prenhes foram recebidas do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (Unicamp) com 15 dias de gestação. As mesmas foram mantidas em gaiolas plásticas, numa sala com controle de temperatura entre $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de 50% e ciclo de 12 horas claro/12h escuro, dentro de estantes ventiladas (Alesco modelo 9902.001). As ratas receberam ração padrão para roedores e água filtrada ad libitum. Um grupo de filhotes foi separado da mãe para experimentação após 6 horas (idade P0) do nascimento e os demais após 2 (P2), 4 (P4), 7 (P7) e 21 (P21) dias.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

Previamente ao procedimento cirúrgico, os animais nas idades P0, P2, P4 e P7 foram anestesiados por hipotermia (Rogério et al. 2002). Os animais com idade P21 foram anestesiados com uma mistura de quetamina e cloridrato de xilazina, nas doses de 100mg/kg e 10mg/kg (i.p.), respectivamente.

Em seguida, os ratos foram posicionados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos, M90). A pele dorsal foi incisada e retirada para expor o dorso do animal. A musculatura presente sobre as vértebras foi removida com auxílio de um bisturi e realizada, cuidadosamente, a laminectomia das vértebras torácicas, lombares e sacrais para exposição da medula espinhal. A região da intumescência lombar, (T12 a S1) foi dissecada, depositada em tubos *ependorf*, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-70°C) até o processamento (**Figura 4**).

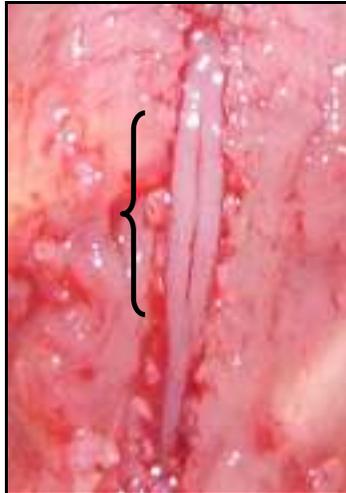


Figura 4: Região da intumescência lombar da medula espinhal de rato delimitada pela chave.

3.3 Extração das Proteínas

3.3.1 Extração de proteínas para eletroforese de duas dimensões detectadas com *Coomassie Blue Colloida I*(CBC) e Nitrato de Prata

Os espécimes foram processados individualmente. Utilizando-se de um pistilo para tubo *ependorf* cada espécime foi macerado em meio a uma solução de extração, contendo uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4% (m/v), DTT 70mM e inibidor de protease 1% (v/v) (Sigma P8340). A seguir, o macerado foi submetido à centrifugação a 12000rpm em centrífuga refrigerada (Eppendorf 54415 C) durante 15 minutos e o sobrenadante coletado (Gorg,1998 ; Fountoulakis et. al, 2002; Deshane et al., 2004).

3.3.2 Extração de proteínas para eletroforese de duas dimensões detectadas com CyeDye

Os espécimes foram processados individualmente. Utilizando-se de um pistilo para tubo *ependorf* cada espécime foi macerado em meio a uma solução de extração, contendo uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris-HCl 30mM, em um pH 8.5, submetidas à centrifugação a 12000 rpm na centrífuga refrigerada (Eppendorf 54415 C) durante 15 minutos e o sobrenadante coletado (Ettan DIGE User manual – Amersham Biosciences, 2002).

3.3.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o método descrito por Bradford (1976), baseada em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para determinar a concentração da amostra. Após esta quantificação as amostras destinadas à detecção com NP ou CBC foram aliquotadas para focalização isoeletrica das proteínas. Aquelas destinadas à detecção com CyeDYe-Dige foram submetidas à marcação das proteínas com os fluoróforos.

3.4. 2DE e detecção das proteínas

3.4.1 Procedimentos para 2DE

3.4.1.1 Focalização Isoelétrica (IEF)

A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi conduzida em tiras de poliacrilamida desidratadas de 18 cm com gradiente imobilizado de pH (IPG -

Immobilized pH Gradient) – 3 a 10 não-linear. As amostras foram solubilizadas em um tampão de reidratação contendo uréia 8M, CHAPS 4% (m/v), DTT 70mM, anfólito 2% (v/v) (IPG Buffer , pH 3-10 não linear, *Amersham GE Healthcare*) e azul de bromofenol 0.002% (m/v). As tiras IPG foram reidratadas em um suporte (*strip holder*) de tamanho correspondente a elas. A solução foi aplicada no suporte e a tira colocada sobre o tampão com a face contendo o gel para baixo. Sobre estas, 2mL de óleo mineral (*Dry strip cover fluid*) foram aplicadas a fim de evitar a cristalização da uréia. A reidratação seguiu a uma temperatura constante de 20° C durante 12 horas. Imediatamente a seguir, foi iniciada a focalização isoelétrica que ocorreu em três etapas: 500V por uma hora, 1000V por uma hora e 8000V até acumular 70KVh. Ao final da focalização as tiras foram conservadas à temperatura de -70° C antes de iniciar a segunda dimensão da eletroforese.

3.4.1.2 Tratamento das tiras de poliacrilamida de gradiente imobilizado

O tratamento das tiras de poliacrilamida permite a transição das proteínas previamente separadas pelo ponto isoelétrico (primeira dimensão) para a segunda dimensão da eletroforese em gel contendo SDS.

As tiras de poliacrilamida foram tratadas para redução das pontes dissulfeto durante 8 minutos empregando-se uma solução contendo Tris-HCl pH 8.8 50mM, uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 2% (m/v). Após este tratamento as tiras foram transferidas para uma segunda solução durante 12 minutos. Esta solução continha os mesmos componentes da primeira solução, substituindo-se o DTT 2% por Iodoacetamida 2,5% para alquilar as proteínas e prevenir sua reoxidação durante a eletroforese,

3.4.1.3 SDS-PAGE

A segunda dimensão da 2DE foi realizada em um gel homogêneo de poliacrilamida 12,5% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

As tiras de poliacrilamidas previamente equilibradas foram colocadas sobre a superfície de um gel vertical homogêneo de poliacrilamida de dimensões (180mm x 160mm x 1mm) e seladas com agarose 0,5% (m/v) a 70° C. O gel foi preparado com uma solução de Acrilamida/Bis-Acrilamida (37,5:1; m/m) em uma concentração de 12,5% (m/v), Tris HCl pH 8.8, SDS 0,1% (m/v), persulfato de amônio 0,05% (m/v) e TEMED 0,05% (v/v).

A corrida eletroforética foi realizada com o sistema SE-600 (*Amersham GE Biosciences*) com refrigeração interna Multitemp II (*Amersham GE Healthcare Biosciences*), a um temperatura constante de 20° C, em uma solução Tris–HCl 25mM, Glicina 192mM e SDS 0,1% (m/v). Na primeira etapa, a voltagem foi mantida em 60V durante 30 minutos para que as proteínas penetrassem ao mesmo tempo no gel. Na segunda etapa, uma amperagem fixa de 30mA foi aplicada até a frente de corrida visualizada pelo corante azul de bromofenol chegar ao final do gel, o que durou cerca de 3 a 4 horas.

3.4.2 Detecção de proteínas pós-eletroforese

3.4.2.1 Coloração por Nitrato de Prata

O método de coloração por impregnação por NP empregado corresponde a uma modificação do protocolo original de Blum et al., (1987). Finalizada a segunda dimensão, o gel foi fixado em uma solução contendo,

metanol 50 % (v/v) e 10% de ácido acético (v/v) por 12h; lavado três vezes com uma solução 50% de etanol por 20 minutos; colocado em uma solução contendo 0,02% de Tiosulfato de sódio durante 1 minuto; seguido de mais três lavagens de 20 segundos com água deionizada; incubado na solução de nitrato de prata contendo 0,2% de Nitrato de prata, 0,02% de Formaldeído (37%) durante 20 minutos; realizado mais três lavagens de 20 segundos com água deionizada para então ser revelado com a solução reveladora contendo, 3% de carbonato de sódio (m/v), 0,05% de formaldeído (v/v), e 0,0005% de tiosulfato de sódio durante 3 a 5 minutos; o gel foi lavado novamente com água deionizada e então colocada em uma solução 10% de ácido acético durante 5 minutos para cessar a reação (Shevchenko et. al,1996; Yan et. al, 2000).

3.4.2.2 Coloração por *Coomassie Blue Colloidal*

Finalizada a segunda dimensão, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com CBC, baseado no método descrito por Candiano et al. (2004). Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora (etanol 30% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v) por 5 horas no mínimo; lavagem com água deionizada por três vezes; solução corante (ácido fosfórico 10% (v/v), sulfato de amônio 10% (m/v), metanol 20% (v/v), coomassie blue G 250 0,12% (m/v), mantida sob agitação constante por 72 horas. O excesso de corante foi removido com uma lavagem de água deionizada por 1 hora.

3.4.3 Detecção de proteínas pré-eletroforese

3.4.3.1 Detecção das proteínas marcadas com fluoróforos CyDye™

Previamente à 2DE, as proteínas foram marcadas de acordo com a técnica DIGE (*Difference Gel Electrophoresis*). A separação das amostras foi realizada em dois géis, mantendo uma razão de 400pmol de fluoróforo/50ug de proteínas. Um gel continha as amostras de medula espinhal P0 (50ug) marcada com fluoróforo Cy3, P2 (50ug) marcada com fluoróforo Cy5 e o padrão interno composto pelas amostras P0, P2, P4 e P7 (50ug no total) marcado com o fluoróforo Cy2, totalizando 150ug de proteínas no gel. O segundo gel continha as amostras de medula espinhal P4 (50ug) marcada com fluoróforo Cy3, P7 (50ug) marcada com fluoróforo Cy5 e o padrão interno composto pelas amostras P0, P2, P4 e P7 (50ug no total) marcado com o fluoróforo Cy2, totalizando 150ug de proteínas no gel. A reação dos fluoróforos com as proteínas ocorreu durante 30 minutos no escuro e em gelo e então 10mM de lisina foi adicionado para cessar o processo. Os passos seguintes da 2DE foram os mesmos usados para os géis corados com NP e CBC, conforme previamente descrito.

3.5 Análise quantitativa da expressão protéica

3.5.1 Análise da expressão protéica de géis corados com Nitrato de Prata ou Coomassie Blue Colloidal

As imagens dos géis foram adquiridas e digitalizadas, em resolução de 300dpi (tons de cinza) utilizando-se um scanner específico (SharpeScanner JX)

para a aquisição de imagem por transmitância. As imagens obtidas foram armazenadas em formato TIFF (8bits) para análise no software Melanie 5.0 (Genebio), específico para análise de géis 2DE para a detecção, quantificação, calibração do pI, da massa molecular dos *spots* e comparação dos diferentes mapas 2DE corados com comassie blue colloidal. O uso do programa permitiu detectar diferenças de expressão de proteínas através do teste estatístico one way ANOVA (ANalysis Of VAriance) entre os grupos de géis, para a seleção dos *spots* diferencialmente expressos.

3.5.2 Análise da expressão das proteínas marcadas com fluoróforos CyeDye™ DIGE fluors CyeDye

Os géis foram digitalizados com o uso do *scanner Thyphoon 9400* e analisados no *software Decyder*. Para a detecção e quantificação dos *spots*, o *matching* inter-gel foi realizado com o programa *Differential In-gel Analysis* (DIA), e para análise dos *spots* com significância estatística baseada no teste one way ANOVA (ANalysis Of VAriance), foi utilizado o programa *Biological Variation Analysis* (BVA), ambos módulos do programa *DeCyder* versão 5.01 (Amersham Biosciences).

3.6 Identificação das proteínas diferencialmente expressas

3.6.1 Espectrometria de massas

De acordo com o protocolo de Schevchenko et al, 1996, os *spots* diferencialmente expressos dos géis corados com CBC foram extraídos do gel manualmente, lavados com uma solução de acetronitrila 50% (v/v) e

bicarbonato de amônio 25 mM por 10 minutos, repetida 2 vezes para descoloros. Foi feita uma lavagem dos *spots* com água deionizada por 10 minutos e então cortados em fragmentos de aproximadamente 1mm³. Estes foram em seguida desidratados com acetonitrila 100% por duas vezes de 10 minutos e submetidas à secagem no equipamento *Speed Vac Plus* por 40 minutos. A reidratação foi feita com uma solução de bicarbonato 50mM e 12,5ng/ul de tripsina, incubada no gelo por 40 minutos para então uma incubação à 37° C por 12 horas.

Após o processo de digestão trípica as amostras foram coletadas e transferidas para outro tubo. Uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v) foi adicionada ao tubo com os fragmentos, com a função de bloquear a ação da tripsina, sonicadas duas vezes de 20 minutos e então somadas às coletadas primeiramente. A solução contendo os peptídeos foi concentrada, submetida à secagem no equipamento *Speed Vac Plus* até permanecer com aproximadamente 10ul de volume final.

Os peptídeos resultantes da ação trípica foram concentrados em Zip Tips C18 (Millipore®). A amostra foi solubilizada em uma matriz HCCA (espécie química capaz de ionizar a amostra perante agente ionizador), aplicada diretamente na placa de MALDI (Corthals et. al, 1999).

A análise foi realizada com o Espectrômetro de Massas da Applied Biosystems Voyager™ DE-PRO MALDI-TOF. Os parâmetros utilizados foram: 1- Voltagem: aceleração da voltagem 20000V; grid 70%; guide wire 0.05; delay time 95nsec; 2- Aquisição do espectro: 100 tiros de laser por espectro; 850 a 4500 Da de alcance de massas; 3- Intensidade Manual do Laser: 1640 - 1740. Para a

calibração do equipamento foi utilizado uma padrão comercial 4700 Cal Mix (Applied Biosystems)

3.6.2 Investigação de proteínas em banco de dados públicos

As informações obtidas a partir dos espectros de massas dos peptídeos foram comparadas com as disponíveis no banco de dados Swiss-Prot (www.expasy.ch), empregando-se o programa MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) para identificação de proteínas (BAIROCH et al., 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento do protocolo experimental

Na etapa inicial do trabalho foi necessária estabelecer o conjunto de parâmetros como extração de proteínas, tempo de focalização isoeletrica, tipo de coloração para que os perfis 2DE apresentassem boa resolução e reprodutibilidade dos espécimes. Diferentes métodos de extração de proteínas, protocolos de IEF, quantidade de proteínas e métodos de detecção foram utilizados como descritos a seguir, para estabelecer um protocolo.

4.1.1 Preparação das amostras

A análise proteômica das medulas espinhais foi planejada com a montagem de um *pool* (n=3) para cada período de vida analisado (Kunz *et. al*, 2005), visando minimizar variação individual dos ratos analisados e evidenciando as diferenças de expressão em comum.

Com a padronização do método de lise química, baseado no protocolo de Fountoulakis (2002) e Deshane (2004), foi feita uma comparação nos métodos mecânicos de extração. Três amostras no mesmo período pós-natal (P7) foram analisadas, um processado com pistilo para *ependorf*, outro com o homogeneizador Polytron e com nitrogênio líquido com o cadinho e o almofariz. Em relação ao homogeneizador Polytron verificou-se a necessidade de um grande volume para a homogeneização e a perda de material decorrente da espuma formada pela agitação das lâminas. Já com o maceramento com nitrogênio líquido não foi muito eficiente, pois uma parte da amostra era perdida no almofariz e no cadinho. Por isso a escolha pelo processamento das

amostras com o pistilo, que apresentou a menor perda de material e conseguiu homogeneizar bem a amostra (**Figura 5**).

A solução de proteínas foi submetida à centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante coletado e quantificado pelo método de Bradford.

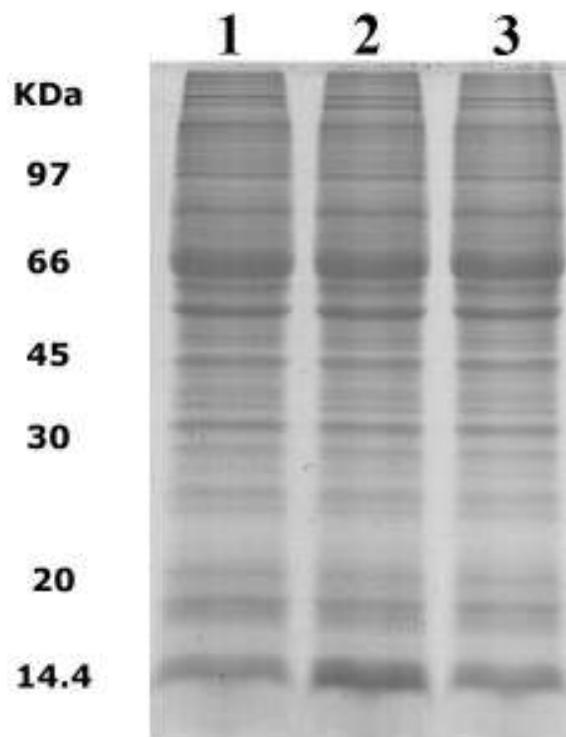


Figura 5: Nas canaletas 1, 2 e 3 foram aplicadas amostras de medula espinhal com sete dias de vida, que foram processadas separadamente em um gel de poliacrilamida de 12,5% contendo SDS.

4.1.2 Isoeletrofocalização das proteínas

Cada proteína possui seu ponto isoelétrico, no qual a soma de suas cargas intrínsecas é igual a zero (pI). Para que as proteínas das amostras fossem imobilizadas em seus respectivos pls, foi necessário testar tempos diferentes de isoeletrofocalização. O ponto ideal encontrado, variando o tempo de focalização baseado nos experimentos realizados por Kunz et. al. (2005) (figura 6), foi de 12h de reidratação a uma temperatura constante de 20°C, seguida de três etapas: 500V por uma hora, 1000V por uma hora e 8000V até obter um acúmulo de 70KVh.

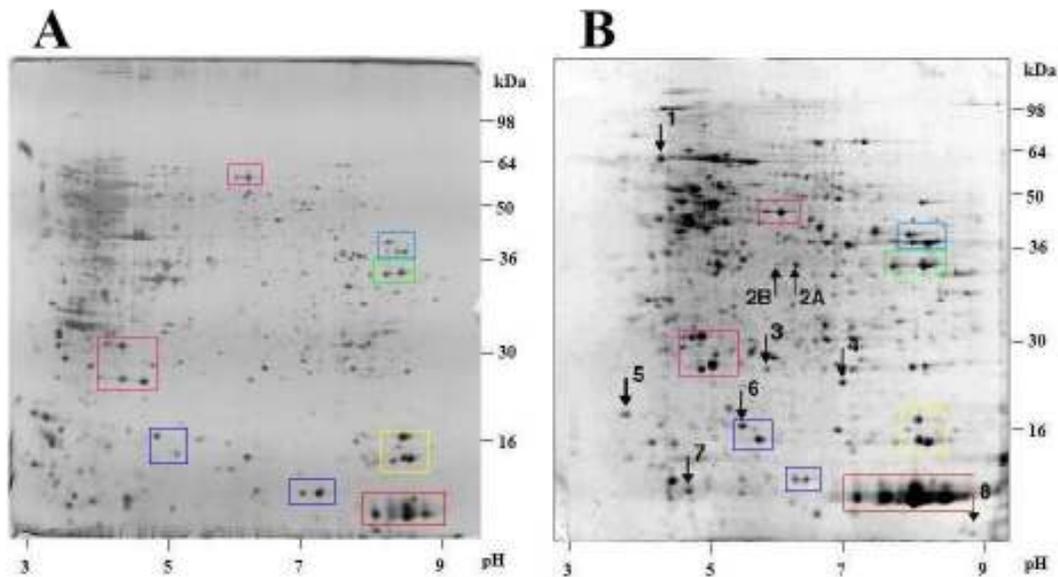


Figura 6: Perfis 2DE de medula espinhal. O gel A foi obtido neste trabalho utilizando-se um *pool* de 100ug de proteínas de medula espinhal (n=3) de animais na idade P0 separado por 2DE de 12,5% de poliacrilamida corado com NP. O gel B corresponde aos obtido por Kunz et al. (2005) utilizando um *pool* de 300ug de proteínas de medula espinhal de animais (n=3) na idade P4 separado em gel bidimensional de 12,5% de poliacrilamida corado com CBC. As caixas coloridas evidenciam os mesmos conjuntos de proteínas representados nos diferentes géis.

4.1.3 Quantidade de proteínas

A identificação de proteínas foi extremamente dependente da quantidade disponível no perfil 2DE. A quantidade encontrada, que não saturava o gel e que não influenciava negativamente no processo de isoeletrofocalização, foi de 650ug (figura 7).

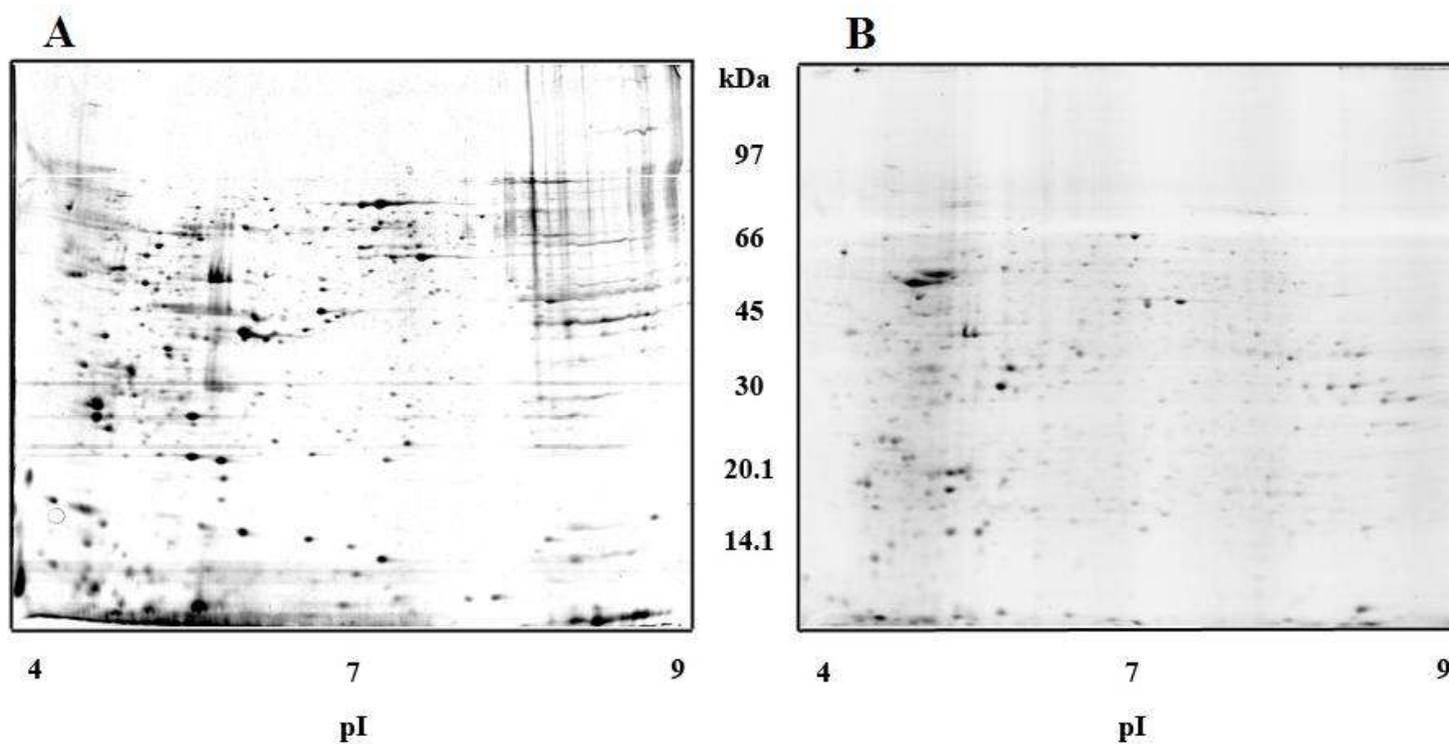


Figura 7: Perfis 2DE de medula espinhal. O gel A foi obtido neste trabalho utilizando-se um *pool* de 650ug de proteínas de medula espinhal (n=3) de animais na idade P4 separado por 2DE de 12,5% de poliacrilamida corado com CBC. O gel B foi obtido utilizando-se um *pool* de 300 ug de proteínas de medula espinhal (n=3) de animais na idade P4 separado por 2DE de 12,5% de poliacrilamida corado com CBC.

4.1.4 Métodos de detecção das proteínas

Os métodos mais comumente utilizados para a detecção de proteínas em 2DE são: a impregnação por NP e o CB. A detecção com NP foi uma estratégia inicialmente usada para verificar a diferença de expressão devido a sua sensibilidade, que não necessitava de grandes quantidades de amostras aplicadas no gel. Entretanto, a compatibilidade com o EM se mostrou um limitante para a identificação das proteínas de média e pouca abundância (Kim et. al., 2004; Gigy et. al., 2000), bem como a questão da quantificação visto que detecção por impregnação por NP não oferece uma relação de abundância de proteínas como a do CBC. Além disso, ocorre a saturação da detecção, na qual o gel é impregnado pelo NP, causando uma interferência, que dificulta a quantificação das proteínas separadas (Smales et. al., 2003).

A medida que, teoricamente, todos os *spots* detectados por CBC são identificáveis através de EM, sendo que são necessários alguns picomoles dos peptídeos ou proteína (Jungbluc & Thiede, 1997), além da quantificação mais precisa, optamos por utilizar este método de coloração, baseado no protocolo descrito por Candiano *et. al.* (2004), com algumas alterações, como descrito na seção de materiais e métodos, que resultaram em um aumento da resolução e reprodutibilidade dos géis.

4.2 Análise do proteoma diferencial do neurodesenvolvimento

4.2.1 Perfil proteômico por 2DE

4.2.1.1 Análise proteômica dos períodos P0 e P21 por 2DE corados por nitrato de prata.

Durante as três primeiras semanas de vida pós-natal, a medula espinhal é extremamente sensível aos sinais provenientes do meio interno e dos órgãos alvo. Com o objetivo de observar as diferenças de expressão desse período determinado como crítico no processo de desenvolvimento, foi obtido o perfil 2DE de medula espinhal de ratos Wistar aplicando-se um *pool* de 100ug de proteínas extraídas da região lombar de animais com idades P0 e P21. Estes géis foram corados por impregnação com NP conforme descrito em materiais e métodos. Foi observado que o perfil global das proteínas apresentava um grande conjunto de proteínas em comum e algumas diferencialmente expressas, conforme evidenciadas na **Figura 8**

Medula - Rato - 3-10NL - Acril. 12,5% - AgNO₃

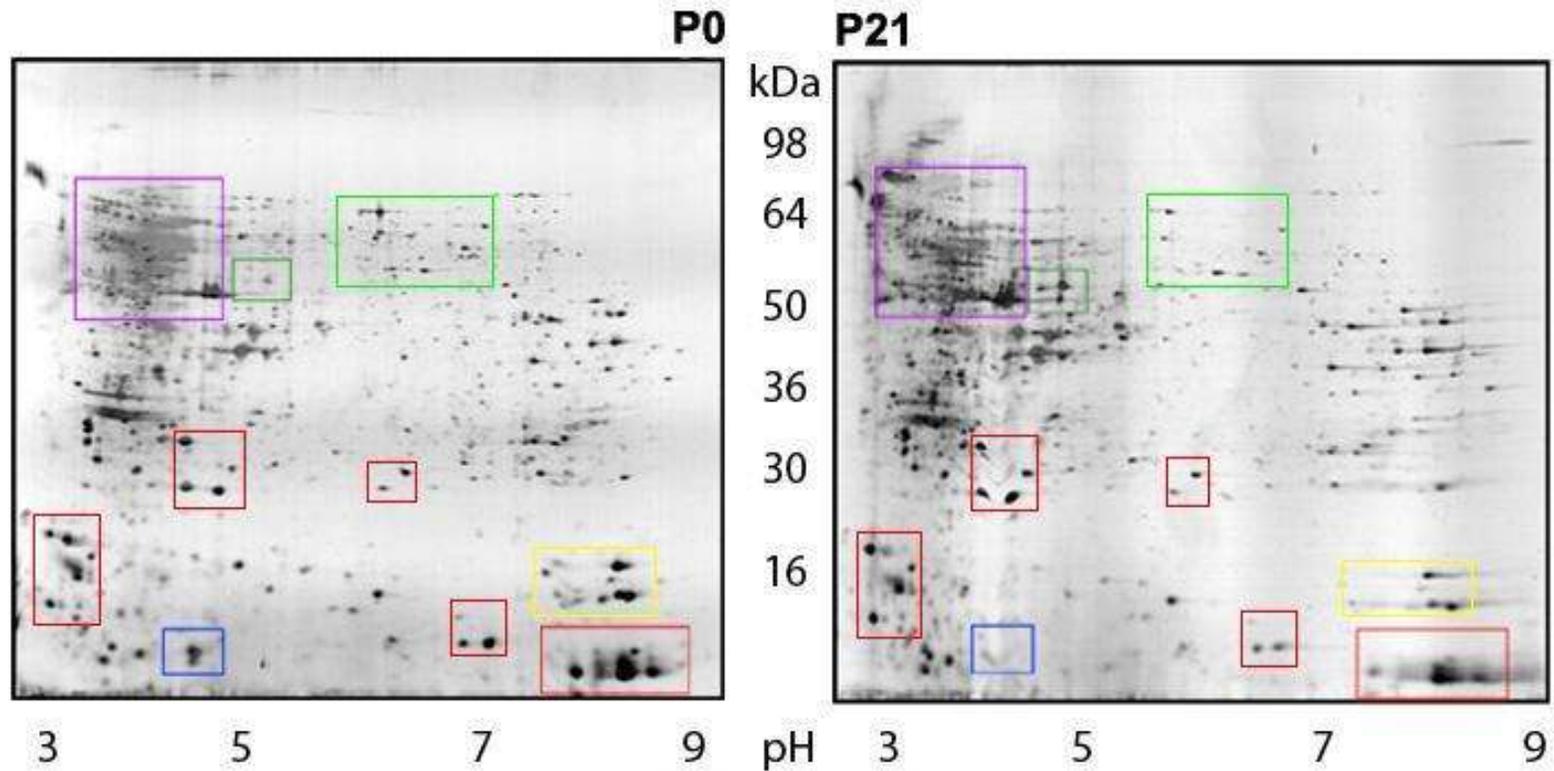


Figura 8: Pool de 100ug de proteínas de medula espinhal (n=3) no período P0 e P21 separados em perfis 2DE de 12,5% de poliacrilamida corado com NP. As caixas coloridas evidenciam os conjuntos de proteínas diferencialmente expressas.

Os géis corados com NP apresentaram algumas proteínas diferencialmente expressas, entretanto este método de detecção apresenta uma menor compatibilidade com o EM, fato que impossibilitou a identificação das mesmas, bem como sua quantificação (Figura 7). Contudo, de acordo com a imagem do gel obtida por Kunz et. al. (2005) (Figura 6 B), nossos resultados mostram que o processo de extração, resolução, focalização e separação das proteínas foi satisfatório. A comparação dos géis por nós obtidos permitiu observar a presença de grupos de proteínas com características de massa molecular e pI semelhantes às detectadas por Kunz et. al. (2005). Nossa opção por realizar a detecção de proteínas com NP neste experimento, que foi destinado à padronização da extração e do tempo de focalização das proteínas, se deu em virtude da sensibilidade de detecção de proteínas. Apesar deste método ser cerca de 50 vezes mais sensível que CBC, a detecção das proteínas com NP apresenta uma faixa dinâmica de linearidade (*linear dynamic range*) inferior à métodos de detecção, tais como CBC.

A comparação das amostras de medula nos períodos P0 e P21 possibilitou a observação de algumas proteínas diferencialmente expressas, indicando que o período considerado crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso apresenta realmente alterações em seu padrão de expressão protéica. Contudo, era de interesse verificar o que ocorria também em um período mais restrito, justamente a primeira semana de vida no qual diversos processos de estabelecimento de conexões e definições do número de neurônios ocorriam. Desta forma, após a definição da padronização da extração e do tempo de focalização das proteínas, a etapa seguinte do nosso

trabalho consistiu na detecção de proteínas de amostras de medula de ratos nas idades P0, P2, P4 e P7 utilizando perfis 2DE corados com CBC.

4.2.1.2 Análise proteômica dos períodos P0, P2, P4 e P7 por 2DE corados com CBC

Conforme verificado no item 4.2.1.1, o período considerado crítico para o desenvolvimento apresentou proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de medula de animais em idade P0 e P21. Observado esse fato, partimos para uma análise de um período mais restrito dentro dessas três semanas de vida pós-natal. Realizamos uma análise 2DE de medulas durante a primeira semana de vida, visto que esta representa uma fase primordial para a definição dos neurônios envolvidos na estruturação dos circuitos neurais, na qual ocorrem fenômenos de neuroplasticidade, que levam à definição do número de neurônios envolvidos nas redes neurais e refinamento das conexões. Um perfil proteômico 2DE das amostras de medula espinhal nas idades P0, P2, P4 e P7 foi obtido aplicando-se 300ug de proteínas até acumular cerca de 70kVh na focalização isoeletrica.

Conforme as análises dos géis (Figura 9) realizadas pelo programa Melanie 5.0 (Genebio), não foram detectadas diferenças significativas de expressão das proteínas nos géis corados CBC das diversas idades investigadas.

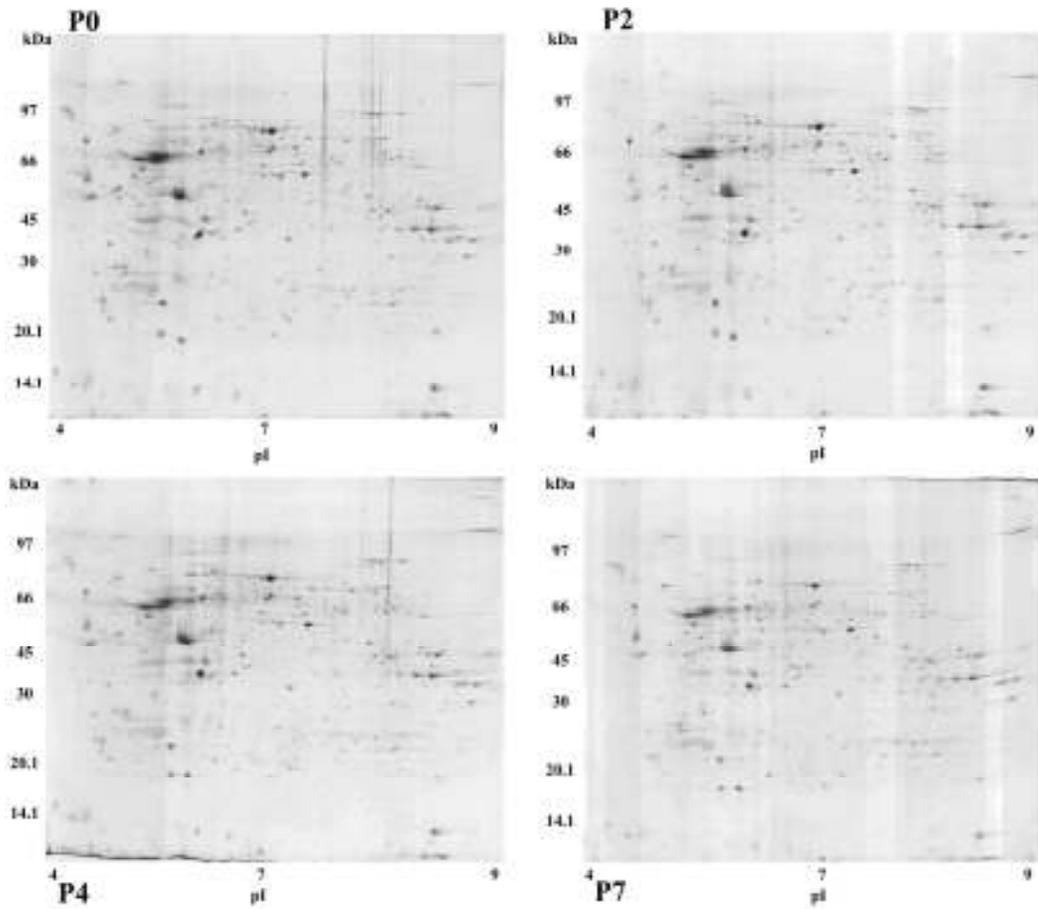


Figura 9: *Pool* de 300ug de proteínas de medula espinhal (n=3) nas idades P0, P2, P4 e P7 separadas em perfis 2DE de 12,5% de poliacrilamida corados por CBC.

4.2.1.3 Análise proteômica dos períodos P0, P2, P4 e P7 por 2DE utilizando fluoróforos CyxDye™ DIGE

Em virtude da análise dos perfis 2DE corados com CBC não terem evidenciado diferenças significativas na expressão das proteínas nas idades P0, P2, P4 e P7 decidimos utilizar a técnica de marcação de proteínas com os fluoróforos CyxDye – DIGE (Figura 10). Esta metodologia possui uma sensibilidade de detecção de até 125pg de uma única proteína presente na amostra (DIGE User manual – Amersham Biosciences).

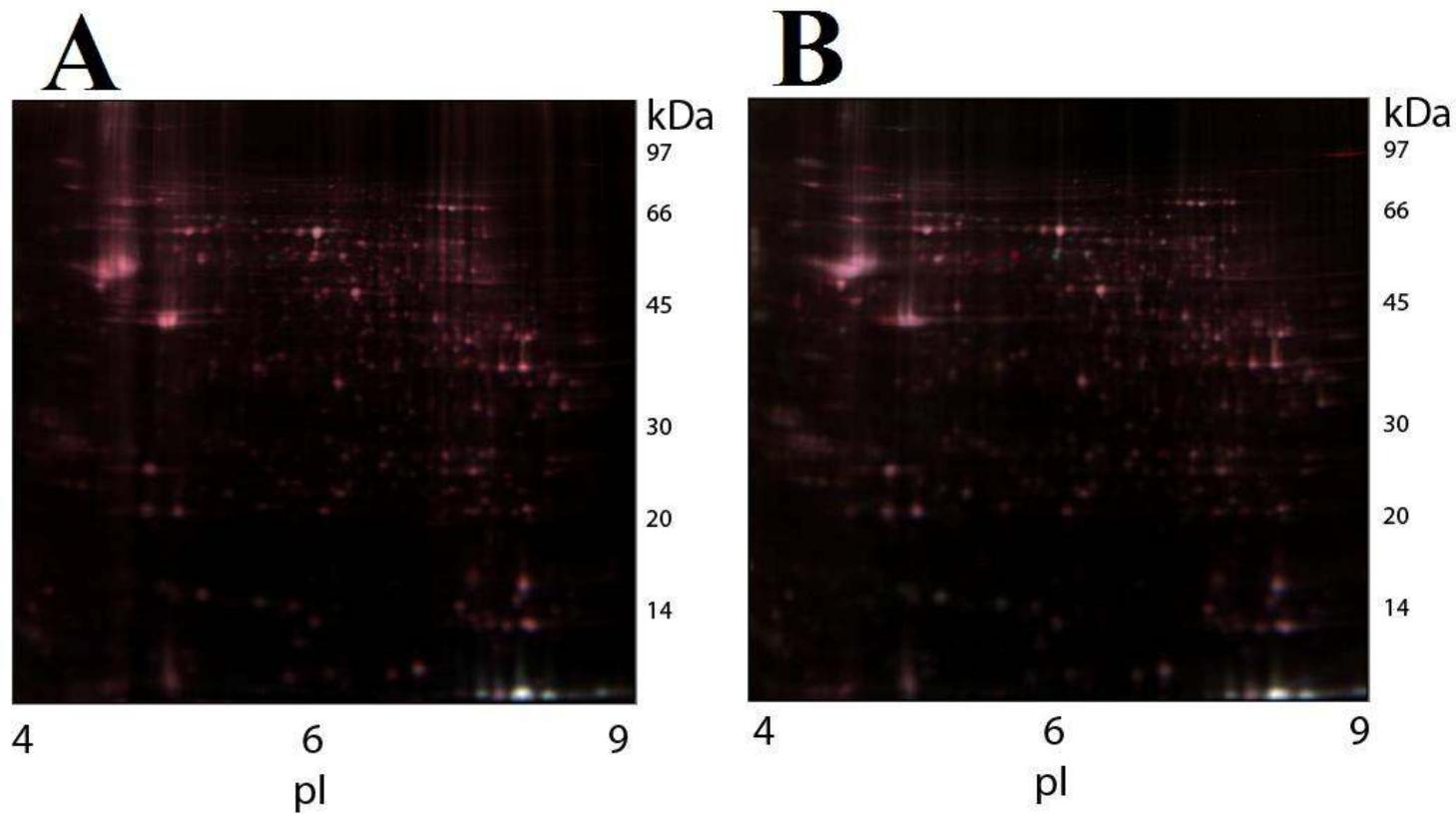


Figura 10 : A - Perfil 2DE das proteínas de medula espinhal de ratos nas idades P0 e P2 marcadas com fluoróforos Cy3 e Cy5 respectivamente, utilizando-se tiras de poliacrilamida de 18 cm com gradiente imobilizado de pH de 3 a 10 não linear. B - Perfil 2DE das proteínas de medula espinhal de ratos nas idades P4 e P7 marcadas com fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente, utilizando-se tiras de poliacrilamida de 18 cm com gradiente imobilizado de pH de 3 a 10 não linear.

O gel A, contendo as amostras P0 e P2 e padrão interno composto por todas as amostras (P0, P2, P4 e P7) teve a IEF mantida até haver um acúmulo de 70kVh, que durou aproximadamente 36h. O mesmo protocolo foi utilizado para o gel B, que continha as amostras P4 e P7 e padrão interno composto por todas as amostras (P0, P2, P4 e P7).

Os *spots* foram detectados, inicialmente, com uma sensibilidade padrão. Posteriormente, esta sensibilidade foi refinada no programa *Differential In-gel Analysis (DIA)* para eliminar artefatos que não representavam *spots* reais. Assim, com a sensibilidade padrão, foram detectados 1477 *spots* e após o refinamento da mesma o número final *spots* obtido foi de 483, sendo 482 *spots* considerados similares em ambas as amostras P4 e P7 (**Figura 11**). O único spot diferencialmente detectado mostrava-se aumentado na amostra P7. Contudo, sua análise através do programa *Biological Variation Analysis (BVA)* mostrou que tal aumento não foi estatisticamente significativo (**Figura12 e Figura 13**).

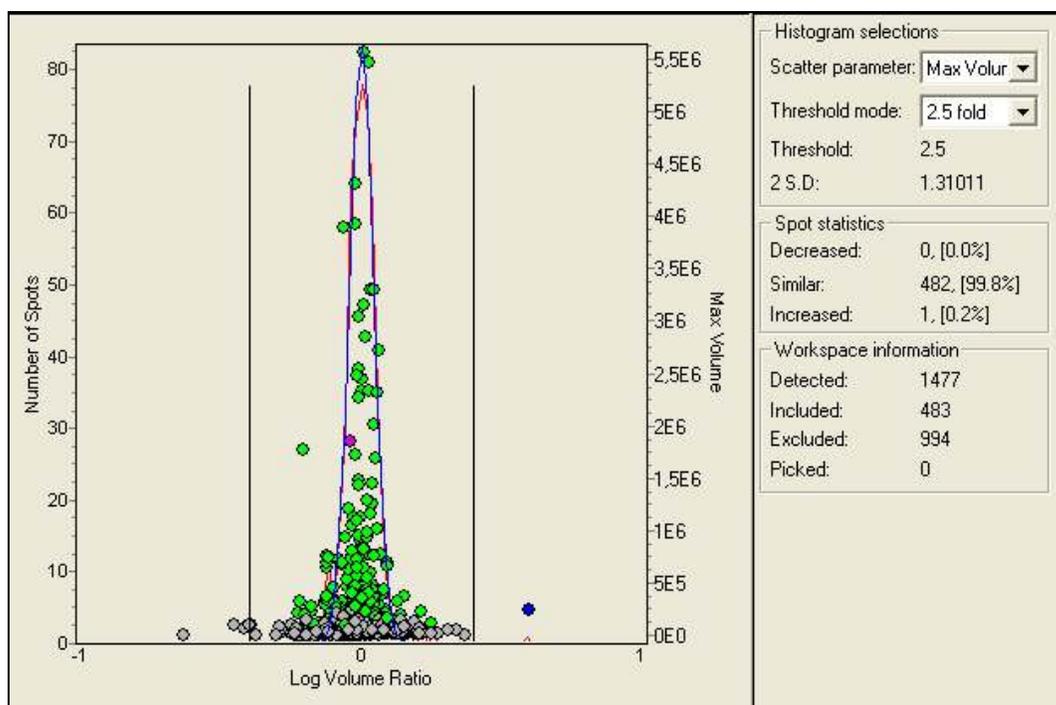


Figura 11: Gráfico obtido pelo *software DIA – DeCyder* mostrando o número de *spots* detectados e a relação entre os mesmos nas diferentes amostras. Note a presença no gráfico do símbolo azul que representa o único *spot* diferencialmente detectado entre as amostras das idades P4 e P7.

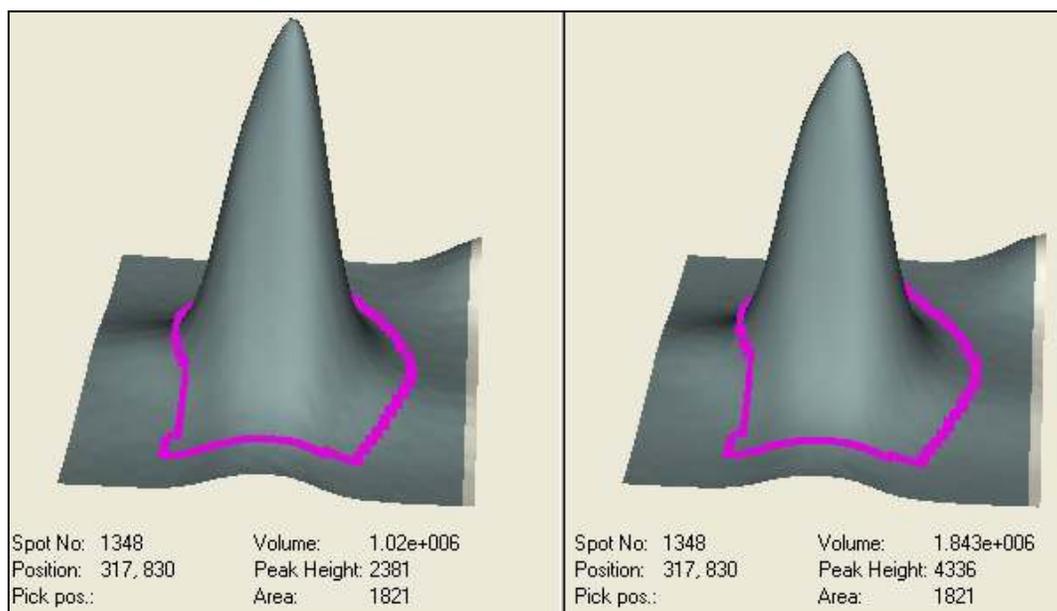


Figura 12: Imagem tridimensional do único *spot* detectado pelo *software DeCyder* diferencialmente expresso. Os valores de volume dos *spots* nas amostras de P4 e P7 não foram estatisticamente significativos.

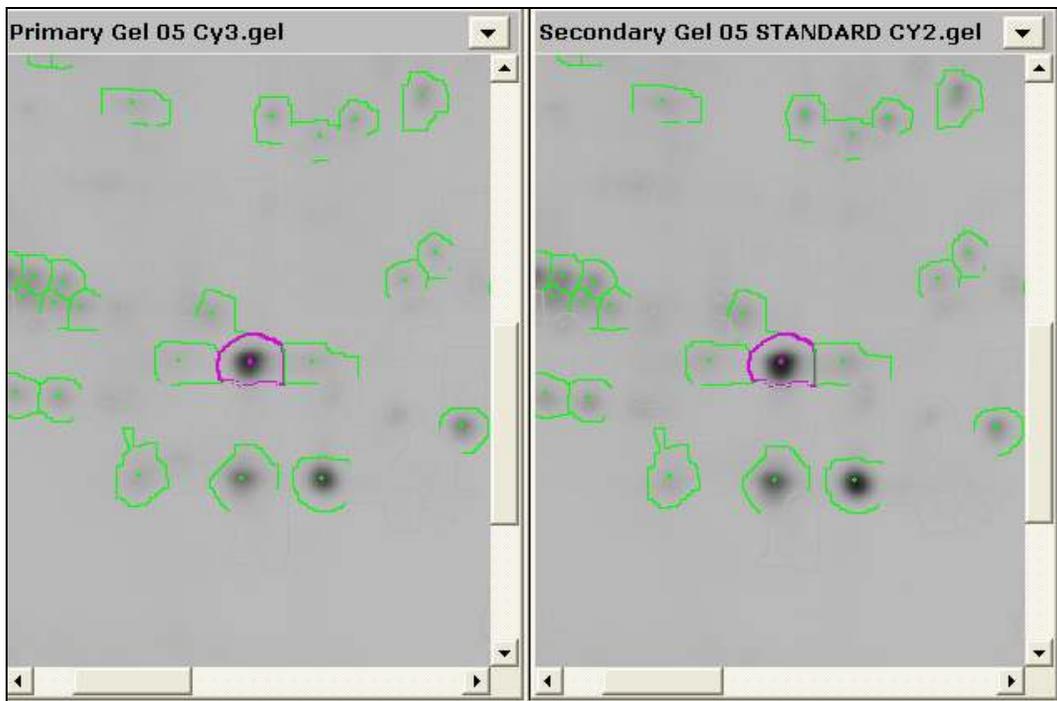


Figura 13: Spot da proteína diferencialmente expressa visualizado no *software DeCyder*, com valor estatisticamente não-significativo das amostras de P4 e P7.

4.2.1.4 Análise proteômica dos períodos P4 e P21 por 2DE corados com CBC

Como vimos acima (ítems 4.2.1.2 e 4.2.1.3), a análise da expressão de proteínas da medula lombar de ratos com idade P0 a P7 não revelou alterações visíveis por 2DE durante a primeira semana de vida desses animais. Em virtude disto passamos investigar se haveriam diferenças significativas na expressão das mesmas entre as idades P4 e P21 (desmame). Estas duas idades correspondem a dois períodos com diferenças na plasticidade e maturação morfofuncional.

Os perfis 2DE foram obtidos a partir de um *pool* de 650ug de proteínas dos extratos protéicos da medula lombar de 3 animais em P4 e P21. A análise

realizada pelo programa Melanie 5.0 detectou 613, 625 e 636 *spots* (média de 624 *spots*) nos respectivas réplicas dos géis correspondentes à idade P4 e 618, 631 e 645 *spots* (média de 631 *spots*) nas respectivas réplicas dos géis correspondentes à idade P21. Após a análise dos perfis 2DE através do programa Melanie, foram seleccionados 30 *spots* considerados diferencialmente expressos nas idades P4 e P21. Dentre as réplicas de géis obtidos foram escolhidos aqueles que apresentavam melhor resolução para remoção dos *spots* e destes então foram retirados os *spots* do gel para a identificação das proteínas por MS do tipo MALDI-TOF. Puderam ser identificadas com sucesso 8 proteínas dentre as 30 seleccionadas (26,6%) (**Figura 14**). As proteínas detectadas no gel tinham características de pI entre 4 e 9 e massa molecular entre 10 e 100kDa.

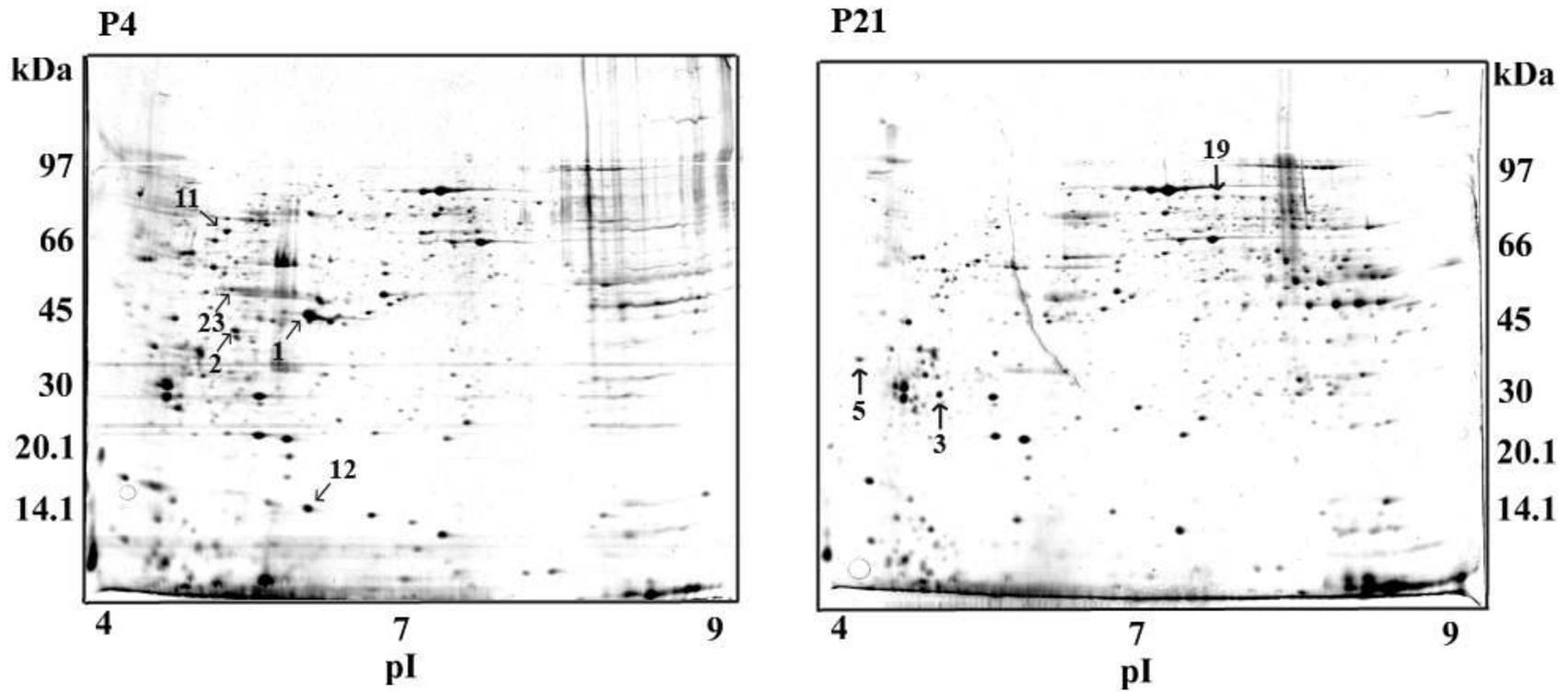


Figura 14: Perfil 2DE protéico de amostras de medula em idade P4 e em idade P21 detectadas com o método de CBC, separadas em gel 12,5% de poliacrilamida.

4.3 Identificação das proteínas

O espectro de massas de cada *spot* gerou informações a respeito das massas dos peptídeos que compõem a proteína em análise. Com o uso do programa MS-FIT, foi feita uma busca no banco de dados Swiss Prot (<http://www.expasy.ch/sprot>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) para a identificação das proteínas presentes nos *spots* selecionados.

As proteínas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, empregando a técnica de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*), correspondem a 5 diferentes categorias, conforme mostra a **Tabela 1**. É interessante notar que entre as 8 proteínas identificadas, 4 pertencem à categoria de proteínas estruturais (*spots* 2, 3, 5 e 23) e apenas 1 pertence às demais diferentes categorias: proteína G (*spot* 1), proteínas de transporte (*spot* 11), fator de crescimento (*spot* 12) e proteínas com atividade GTPase (*spot* 19), respectivamente.

Tabela 1: Proteínas identificadas por EM do tipo MALDI-TOF, com pI, massa molecular e número de acesso no banco de dados Swiss Prot.

Spot	Provável proteína	Código de acesso Swiss Prot	pI	MM (kDa)	Cobertura da Proteína (%)	Peptide Matches
PROTEÍNA G						
1	XLas protein (Fragment).- Rattus norvegicus (Rat)	Q792H3	6.21	38003	16%	17/59
ESTRUTURAL						
2	Vimentin	P31000	5.06	53602.0	9%	5/40
3	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP)	P47819	5.35	49943.5	33%	13/18
5	Neurofilament light polypeptide	P19527	4.63	61204.6	28%	12/52
23	Tubulin beta-2B chain	Q3KRE8	4.79	49963.6	14%	8/25
TRANSPORTE						
11	H+ transporting ATP synthase beta chain, mito (fragment)	A28701	4.91	50770.5	35%	12/159
FATOR DE CRESCIMENTO						
12	Neuromodulin	P07936	4.61	23603.5	17%	6/49
ATIVIDADE GTPase						
19	Regulator of G-protein signaling 14	O08773	7.14	59.942	23%	12/84

4.3.1 Spot 1 – Proteína XLas

A análise do spot 1 permitiu a identificação da proteína XLas (número de acesso no Swiss Prot – Q792H3), que corresponde à maior variante da subunidade α da proteína G heterotrimérica (**Figura 15**) (Kehlenbach & Huttner, 1994).

Esta proteína é predominantemente encontrada, associada à membrana plasmática de certas células neuroendócrinas envolvidas nos processos de transdução de sinal (Klemke et. al., 2000; Pasolli et. al., 2000). Além disso, sua expressão é detectada no neuroepitélio de embrião de ratos a partir da idade E10 (10 dias de vida embrionária) (Ilacopetti, *et al*, 1994). A XLas é capaz de ativar a adenilil ciclase, que por sua vez ativa a sinalização intracelular para desencadear o aumento das mitoses nas células neuroepiteliais e neuroblastos. Estes fatos sugerem seu envolvimento nos processos de diferenciação neural e neurogênese (Klemke et. al., 2000). Sabe-se também que outros processos como migração celular, de crescimento e sinaptogênese do sistema nervoso são relacionadas à proteína XLas (Chang et. al., 1988; Horgan et. al., 1995). Nossos resultados estão de acordo com estes dados da literatura, já que a expressão da XLas foi maior nos animais com idade P4 quando comparada á dos animais com idade P21. O tecido neural da medula lombar dos ratos em idade P4 encontra-se ainda em franca maturação estrutural e funcional, ao passo que na idade P21 tais processos ainda estão em processo de finalização.

Spot 1: XLas (fragmento)

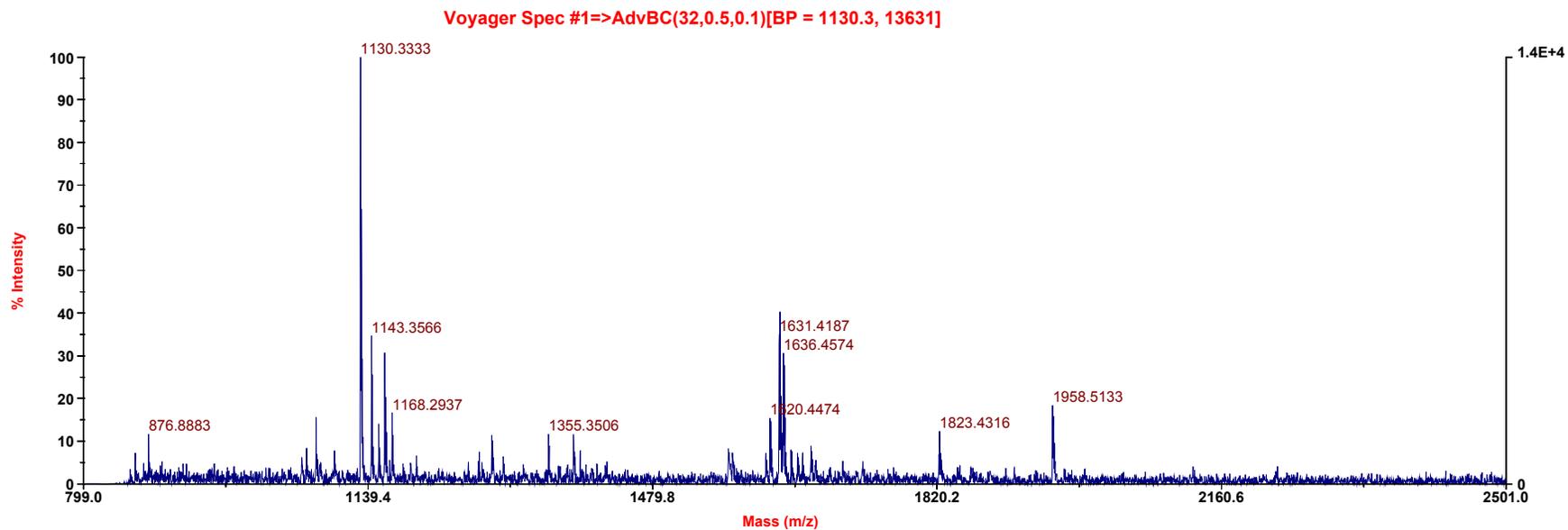


Figura 15: Espectro da massas dos peptídeos do spot 1 obtidos no EM do tipo MALDI-TOF.

4.3.2 Spot 2 - Vimentina

A análise das informações obtidas no EM (**Figura 16**) possibilitou identificar 5 peptídeos da Vimentina, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI (figura), utilizando-se o programa MS-FIT, (número de acesso no Swiss Prot – P31000) como sendo a proteína contida no spot 2. A vimentina é um filamento intermediário de classe III do citoesqueleto, encontrada em várias células não epiteliais, e é considerada uma das fosfoproteínas mais proeminentes em células de origem mesenquimal, incluindo-se os fibroblastos (Korgun et al., 2007). A fosforilação/desfosforilação da vimentina é responsável pela regulação da organização do citoesqueleto (Inagaki et. al., 1987,1996). Fato particularmente observável durante o processo de divisão celular, no qual os filamentos estão sendo dinamicamente reorganizados (Oguri et al., 2006;).

Na estruturação do citoesqueleto durante a divisão celular ou no decorrer de outros processos de plasticidade celular, a vimentina interage com outras proteínas do próprio citoesqueleto. Tais interações têm a finalidade de conferir estabilidade à estrutura da célula, pois são os polímeros mais adequados para manter a integridade da sua morfologia devido à sua plasticidade e capacidade de suportar tensões (Janmey et. al.,1991).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central a vimentina tem expressão proeminente nas células da glia, mas também é expressa em neurônios jovens (Menet et al., 2003). Tal expressão parece estar relacionada com os processos de neurogênese, crescimento de neuritos e estabelecimento das primeiras sinapses entre os neurônios diferenciados. É razoável supor que durante o período imediatamente pós-natal ainda ocorrem fenômenos de neuroplasticidade. Neste sentido, a presença de *spots* de vimentina mais

intensos nos géis obtidos de medulas de ratos nas idades P4 em comparação com aqueles dos ratos na idade P21, dão suporte a essa hipótese. Vale considerar que, até onde pudemos investigar, esta é a primeira investigação sobre expressão diferencial da vimentina no sistema nervoso de ratos durante o desenvolvimento pós-natal.

Além disso, sabe-se também que, após uma lesão no sistema nervoso central de ratos adultos ocorre aumento da expressão de vimentina nos astrócitos (Ridet et al., 1997; Pencalet et al., 2006). Vale destacar que esta é um dos principais componentes dos filamentos intermediários dos astrócitos, juntamente com o GFAP (Privat, 2003; Bignami & Dahl, 1976; Dahl, 1981). De fato, a resposta astrocitária pós-lesão do sistema nervoso central é a principal manifestação do tecido neural relacionada aos processos homeostáticos e de plasticidade regenerativa (Hatten et al., 1991; Ridet et al., 1997).

É conhecida também a capacidade da vimentina de interagir com moléculas sinalizadoras tais como ATF2 (*activating transcription factor*) e STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) envolvidas nos processos de fosforilação (Paramio & Jorcano, 2002; Lindwall & Kanje, 2005). Perlson et al., (2005) evidenciaram um importante papel da vimentina na sinalização retrógrada em neurônios sensitivos dos gânglios das raízes dorsais relacionada com processos regenerativos desencadeados pela lesão no nervo ciático em ratos adultos (Perlson et al., 2005). Neste contexto, a maior expressão de vimentina nos ratos com idade P4 por nós observada parece ser contraditória, já que a regeneração axonal nos ratos dessa idade após secção de um nervo periférico é muito deficiente se comparada com a dos ratos na idade P21. Contudo, a baixa capacidade regenerativa nos animais P4 parece

ser decorrente, principalmente, do reduzido aporte de fatores neurotróficos, fato que determina a morte neuronal e, conseqüentemente, a baixa regeneração axonal (Lewin & Barde, 1996). Pode ser que esses fatores sejam necessários para a fosforilação/ativação da vimentina após a lesão tal como ocorre em animais adultos (Perlson et. al., 2005). Contudo, em concordância com o que afirmamos acima, não existem estudos sobre o comportamento da expressão/fosforilação de vimentina no tecido neural de ratos neonatos após axotomia periférica. Assim, a maior expressão de vimentina na idade P4 por nós observada deve estar primariamente relacionada com o processo plásticos e de maturação que estão em curso nessa idade na medula dos animais.

Spot 2: Vimentina

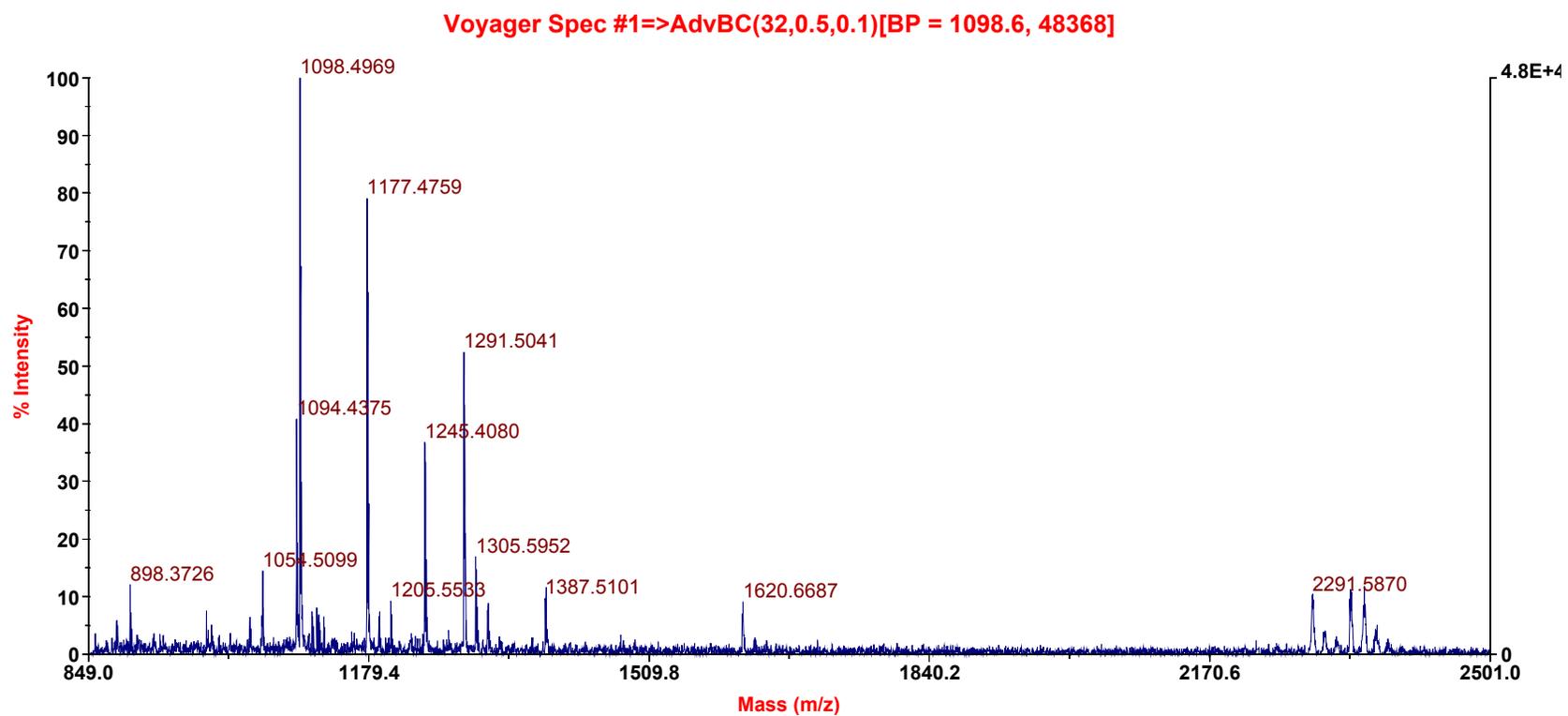


Figura 16: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do *spot* 2 da medula espinhal de rato em P4.

4.3.3 Spot 3 - GFAP

A análise das informações obtidas no EM (**Figura 17**) possibilitou identificar com alta confiabilidade 18 peptídeos da proteína acida fibrilar glial (GFAP - *Glial Fibrillary Acid Protein*), nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, utilizando-se o programa MS-FIT, (número de acesso no Swiss Prot – P47819) como sendo a proteína contida no spot 3.

Os filamentos intermediários possuem uma estrutura terciária altamente conservada, uma α hélice helicoidal com o domínio lateral por uma cabeça N-terminal não helicoidal e uma cauda com domínio C-terminal (Chen & Liem, 1994). A GFAP, que é um filamento intermediário de classe III, é considerada um marcador celular característico para distinguir os astrócitos de outras células da glia durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e também na idade adulta (Reeves et. al., 1989).

A maturação do sistema nervoso central depende dos processos de desenvolvimento e organização do citoesqueleto da células da glia e dos neurônios. Durante estes processos há uma alta expressão dos filamentos intermediários de classe III, que normalmente formam homopolímeros, mas também heteropolímeros, como ao que se dá a associação da GFAP com a vimentina (Van den Heuvel et al., 1987; Eng et. al., 2000). Contudo, em astrócitos maduros, a vimentina é substituída pela GFAP. Além disso, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central há também um gradual aumento de expressão da GFAP e diminuição da nestina, evidenciando que a composição dos filamentos intermediários se modifica com o tempo (Tanguy et. al., 2000). Além disso, a expressão da GFAP aumenta durante o período pós-

natal, bem como após lesões, conforme já considerado anteriormente (Eng et. al., 2000).

Nossos dados confirmam o reportado na literatura considerando que pudemos detectar uma maior expressão de GFAP em animais com idade P21 em comparação com os animais com idade P4. Além disso, esta observação é coerente com o fato de haver menor expressão de vimentina nos animais mais jovens, inversamente do que ocorre com a expressão da GFAP, conforme discutido anteriormente.

Spot 3: GFAP

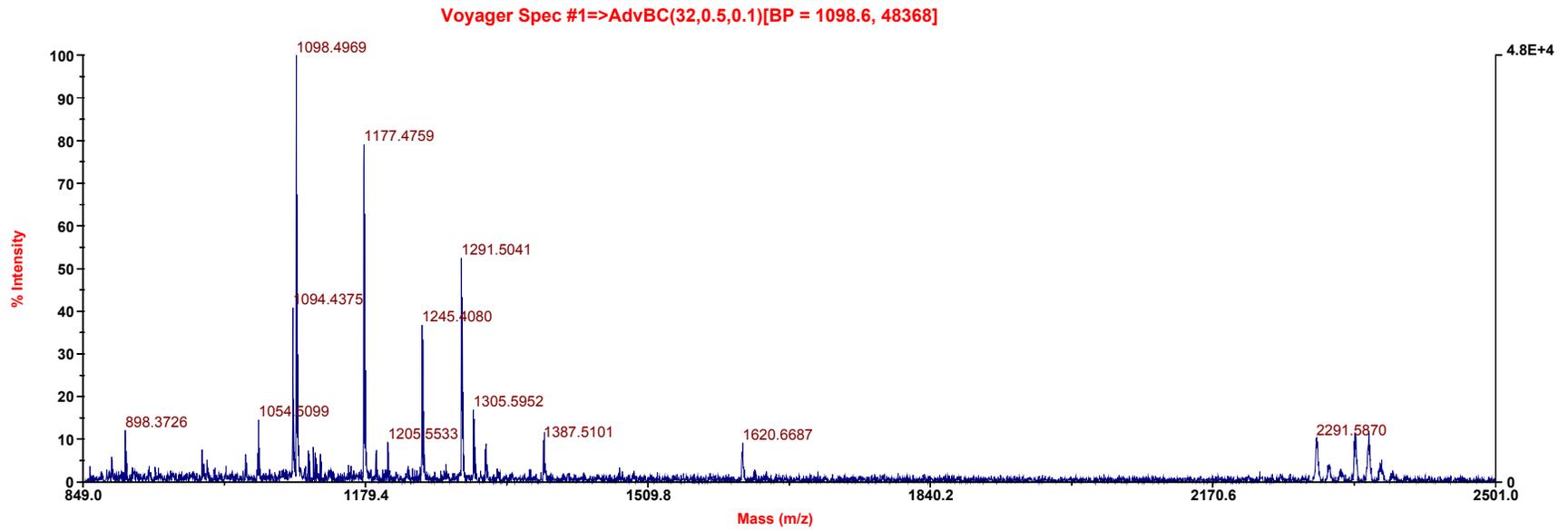


Figura 17: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do *spot* 3 da medula espinhal de rato em P21.

4.3.4 Spot 5 – Neurofilamento de cadeia leve (NF-L)

A análise das informações obtidas no EM (**Figura 18**) possibilitou identificar 12 peptídeos da proteína NF-L, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, utilizando o programa MS-FIT, (número de acesso no Swiss Prot – P19527), como sendo a proteína contida no spot 5.

O citoesqueleto neuronal consiste na interação de três polímeros: microfilamentos de actina (MF), microtúbulos (MT) e filamentos intermediários (IF). Em relação aos MF e MT sabe-se que são estruturas dinâmicas que desempenham papéis chave tanto na função como no desenvolvimento neural, nos processos migratórios, no crescimento axonal, na plasticidade sináptica e no transporte intracelular (Lariviere & Julien, 2003).

Já os IF são expressos em neurônios adultos que podem ser de cinco tipos: neurofilamentos de cadeia leve (NF-L), média (NF-M) e pesada (NF-H), periferina e α -internexina. O neurofilamento de cadeia leve (NF-L) é um filamento intermediário citoplasmático encontrado em neurônios maduros que, juntamente com os neurofilamentos de cadeia média (NF- M) e pesada (NF- H), está envolvido nos processos de manutenção e crescimento celular. A composição e localização desses neurofilamentos se altera progressivamente durante as fases de desenvolvimento e maturação do sistema nervoso (Kaplan et. al., 1990; Leake et al., 1999; Thyagarajan et. al., 2007). Os neurofilamentos são componentes críticos para a manutenção do calibre neural e da integridade estrutural dos neurônios (Lazarides, 1980; Nixon & Sihag, 1991; Vaidya et al., 2000).

Por outro lado, é interessante notar que em animais cujos genes para os neurofilamentos foram inativados não mostraram graves defeitos de

formação no sistema nervoso (Lariviere & Julien, 2003), sugerindo que eles não seriam essenciais durante a axogênese.

Contudo, mesmo com esses dados, foi verificado que nesses animais, há uma perda de mais de 20% de axônios motores devido a ausência das proteínas NF, mostrando que a sua presença facilita o crescimento axonal. Visando verificar o envolvimento nesses processos de crescimento axonal, Zhao et. al. (1994) e Jacomy et. al. (1999) criaram, respectivamente, camundongos transgênicos para os NFs e mutantes que não expressavam NF-L. Eles observaram que para compensar a ausência de NF-L, o animais expressavam cerca de duas vezes mais os microtúbulos axonais, sendo que estes juntamente com os NF e os microfilamentos são responsáveis pela formação do citoesqueleto axonal.

Recentemente, estudos realizados por Kang et. al. (2006) mostraram que a expressão do NF-L é aumentada após uma transecção cirúrgica dos tratos cortico-espinais, o que indica provavelmente um redirecionamento dos filamentos intermediários para a participação nos processos de regeneração, alongação e manutenção do calibre axonal.

O NF-L é considerado como a principal subunidade reguladora dos neurofilamentos e a sua expressão é maior em animais adultos quando comparada à dos animais jovens. Também foi observado que uma deficiência na expressão de NF-L provoca uma redução na arborização dendrítica (Zhang et. al., 2002)

Desta forma, os nossos dados indicam que a expressão do NF-L está aumentada nas medulas de animais em idades P21. Fato provavelmente

relacionado com a necessidade de manutenção do calibre, alongação e crescimento neuronal já que o animal está em processo de desenvolvimento.

Spot 5: Neurofilamento de cadeia polipeptídica leve

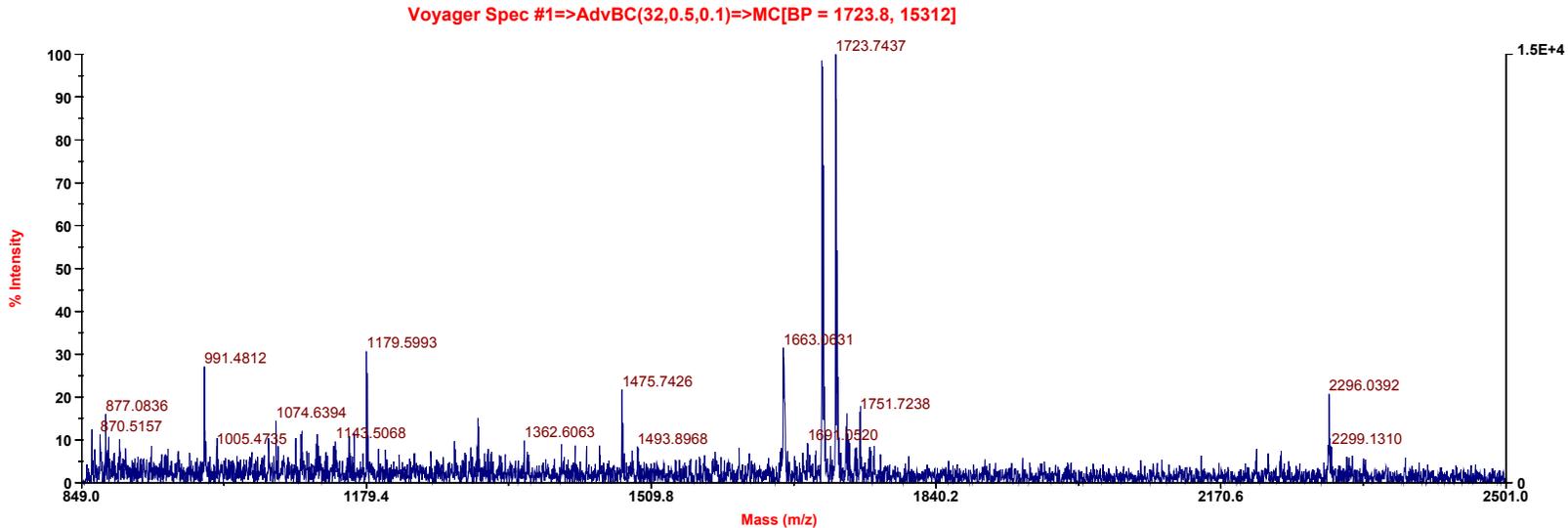


Figura 18: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do *spot* 5 da medula espinhal de rato em P21

4.3.5 Spot 11- Subunidade beta da ATPase transportadora de H⁺ (Precursor)

A análise no EM (**Figura 19**) possibilitou identificar 20 peptídeos da subunidade beta da ATPase transportadora de H⁺, conhecida também como complexo V, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, utilizando o programa MS-FIT (número de acesso no Swiss Prot – P10719).

A ATPase transportadora de H⁺ é uma enzima mitocondrial envolvida no metabolismo e nas vias energéticas, sendo responsável pela catálise da síntese de ATP durante o processo de fosforilação oxidativa; pelo transporte de H⁺ na atividade da ATP sintase; na hidrolase; pelo transporte de íons (Fillingame, 1997; Wang & Oster, 1998; Meyer et. al., 2007).

Durante o processo de desenvolvimento do sistema nervoso os motoneurônios estão em processo de estabelecimento das conexões com os seus alvos (músculos), processo de fundamental importância para a gênese funcional do sistema nervoso (López-Fanarraga et. al., 2007). Em uma situação de ausência de estabelecimento dessas conexões, é constatada um comprometimento nos processos regenerativos do sistema nervoso central frente a uma lesão periférica, visto que há uma carência de fatores tróficos decorrente da junção neuromuscular (Banks & Noakes, 2002)

Estudos realizados por Kang et. al. (2006) mostraram que uma transecção dos tratos corticoespinhais acarreta em um aumento da subunidade beta da ATPase mitocondrial, o que pode indicar uma maior necessidade energética envolvida nos processos regenerativos.

De acordo com nossos resultados, o maior nível de expressão da subunidade beta da ATPase mitocondrial foi observada em amostras de

medula espinhal de animais em idade P4 do que aquelas em idade P21, provavelmente pelo período de desenvolvimento do sistema nervoso central, em franca maturação. Contudo a capacidade de regeneração e sobrevivência dos neurônios desses animais frente a uma lesão periférica é menor justamente pela falta do estabelecimento das conexões dos neurônios e seus alvos.

De acordo com nossos resultados, foram observados maiores níveis de expressão da subunidade beta da ATPase mitocondrial em amostras provenientes de animais em idade P4 do que aquelas de animais em idade P21. Isso pode sugerir que a proteína é requerida durante o período pós-natal para a consolidação das conexões, para a intensa atividade de síntese para o desenvolvimento do sistema nervoso e geração de potenciais de ação.

Spot 11: Fragmento da cadeia beta da ATP sintase transportadora de H⁺

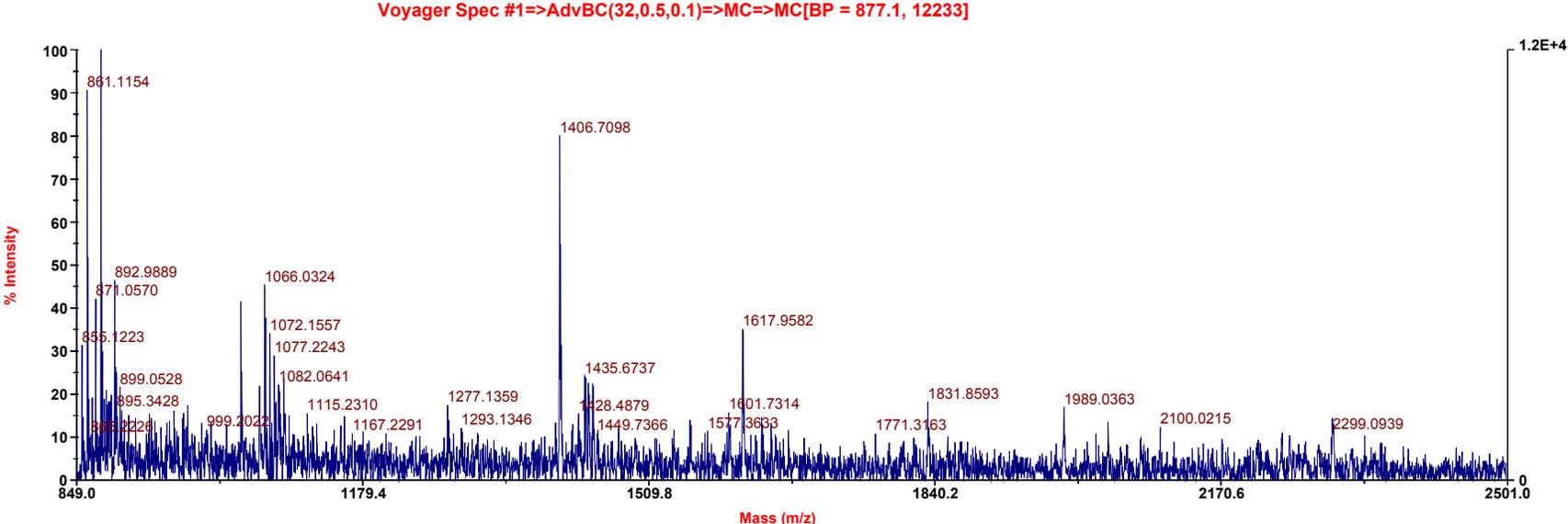


Figura 19: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do spot 11 da medula espinhal de rato em P4

4.3.6 Spot 12- Neuromodulina (GAP-43)

A análise no EM (**Figura 20**) possibilitou identificar 12 peptídeos da Neuromodulina, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, utilizando o programa MS-FIT, (número de acesso no Swiss Prot – P07936).

Esta proteína, conhecida também como *growth-associated protein-43* (GAP-43), participa dos processos de diferenciação e regulação do crescimento neuronal no desenvolvimento do sistema nervoso (Skene, 1989; Benowitz & Routtenberg, 1997; Oestreicher et al., 1997). Além disso, sua expressão está aumentando durante os processos de regeneração neuronal após lesão (Meiri & Gordon-Weeks, 1990; Moss et al., 1990). De fato, a GAP-43 é um dos principais componentes do cone de crescimento dos axônios durante o desenvolvimento na regeneração axonal após lesão.

Durante o período de desenvolvimento embrionário o processo de alongação axonal é muito intenso, o que coincide com o período de maior expressão da GAP-43. Tal expressão diminui à medida que se estabelecem e se consolidam as conexões neurais. Estudos realizados por Kawasaki et. al. (2000) mostraram que a expressão da GAP-43 é mais intensa na substância branca da medula espinhal desde o 13º dia de desenvolvimento embrionário até o 7º dia pós-natal de ratos. Em particular, é bem conhecido que os motoneurônios espinhais exibem uma alta expressão de GAP-43 enquanto alongam seu axônio em direção ao território muscular. Esta, entra em declínio à medida que sinapses, ou junções neuromusculares, se estabelecem (Caroni & Becker, 1992; Benowitz & Routtenberg, 1997). Neste sentido, Sharp et. al. (2003) observaram que durante as primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal de ratos, quando aumenta a atividade locomotora dos animais, há

uma gradual diminuição da expressão da GAP-43 e da α tubulina. Concomitante, há o aumento da expressão das enzimas colina acetiltransferase (ChAT) e da acetilcolinatransferase, responsáveis pela síntese e degradação da acetilcolina, que é o mediador químico na junção neuromuscular. Desta forma, nossos dados estão de acordo com o reportado na literatura, considerando que houve uma maior expressão da GAP-43 em amostras de medula de ratos em idade P4 do que aquelas obtidas de ratos em idade P21.

Spot12: Neuromodulina

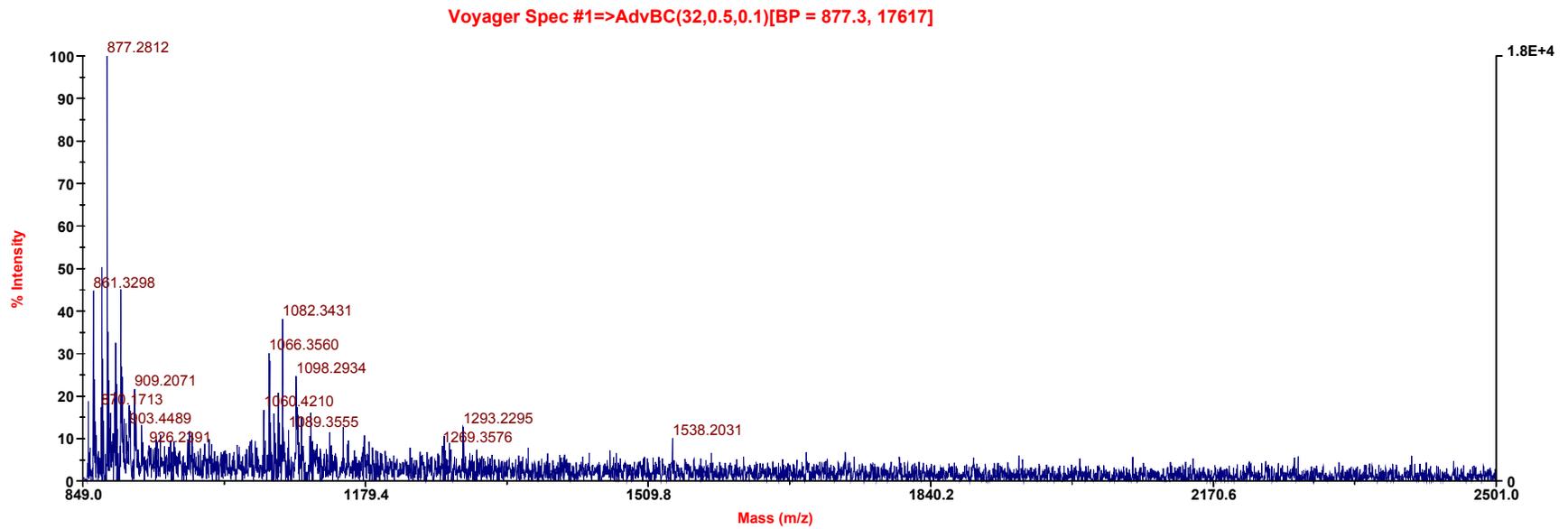


Figura 20: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do spot 12 da medula espinhal de rato em P21.

4.3.7 Spot 19- Proteína reguladora da proteína G (RGS14)

A análise no EM (**Figura 21**) possibilitou identificar 12 peptídeos da proteína reguladora da proteína G, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, (número de acesso no Swiss Prot - O08773), conhecida também conhecida pela sigla RGS14 (*Regulator of G-protein Signalling -14*).

A RGS14, integrante da sub-família D/R12 das proteínas RGS, é uma proteína que possui um segundo domínio G α (GoLoco) (Wilkie et. al., 2000), este que parece estar envolvido na inibição da transdução do sinal mediado pelo aumento da atividade GTPase da proteína G. Essa transdução ocorre pela interação da RGS14 com a subunidade alfa da proteína G levando, deste modo, à inativação da ligação da mesma com o GDP (Martin-McCaffrey et. al., 2005).

Segundo a literatura, inicialmente havia sido identificada como uma proteína do grupo *GTPase Activating Proteins* (GAP). Contudo, verificou-se também sua ação como uma proteína reguladora e multifacetada de transdução de sinal (Abramow-Newerly et. al., 2005; Rodríguez-Munoz et. al., 2007). Esta ação da proteína foi observada em vários processos reguladores, ainda não totalmente elucidados, que compõem a complexa rede de fatores intracelulares responsáveis por alterações no comportamento celular (Sierra et. al., 2000).

Além disso, em estudos recentes foram demonstrados que a RGS14 é essencial para a primeira divisão mitótica do rato durante o período embrionário. A sua ausência pode ser letal ao zigoto. Outra função descrita para essa proteína é a regulação da organização dos microtúbulos durante o período embrionário (Martin-McCaffrey et. al., 2005; Munoz et. al., 2007).

Já no sistema nervoso central, a expressão da RGS14 mostrou ser muito dinâmica, pois pode ser encontrada em uma grande variedade de tecidos e em diferentes níveis de expressão, o que sugere a sua importância nas funções em que ela atua.

Um alto nível de expressão pode ser observado no córtex cerebral, hipocampo, estriato, tálamo e substância negra. Por outro lado, um baixo nível de expressão é observado no coração, fígado, músculos esquelético e testículos (López-Aranda et. al., 2006). No córtex, a RGS14 foi associada com as células do tipo piramidais e não piramidais; também foi localizada nos astrócitos e não nos neurônios. Foi observada que a sua localização é exclusiva para os locais pós-sinápticos das sinapses excitatórias. Essa diversidade de locais e padrões de expressão protéica leva a acreditar que a RGS14 tenha possivelmente outra função além da via de sinalização da proteína G, em outras atividades celulares (López-Aranda et. al., 2006)

Já na medula espinhal de ratos, foi observada uma expressão diferencial da RGS14 em ratos submetidos à transecção cirúrgica dos tratos cortico-espinhais. Decorrente da lesão, 24h após, foi observado um aumento de expressão da RGS14, o que leva a acreditar que a proteína tem um papel no processo de homeostase e possível regeneração do tecido nervoso (Kang et. al., 2006). Deste modo, nossos dados estão de acordo com o reportado na literatura, sendo observado uma maior expressão da RGS14 em amostras de medula de ratos em idade P21 do que aquelas obtidas de ratos em idade P4.

Spot 19: Proteína reguladora da proteína G, sinalização 14 Regulator of G-protein signaling 14

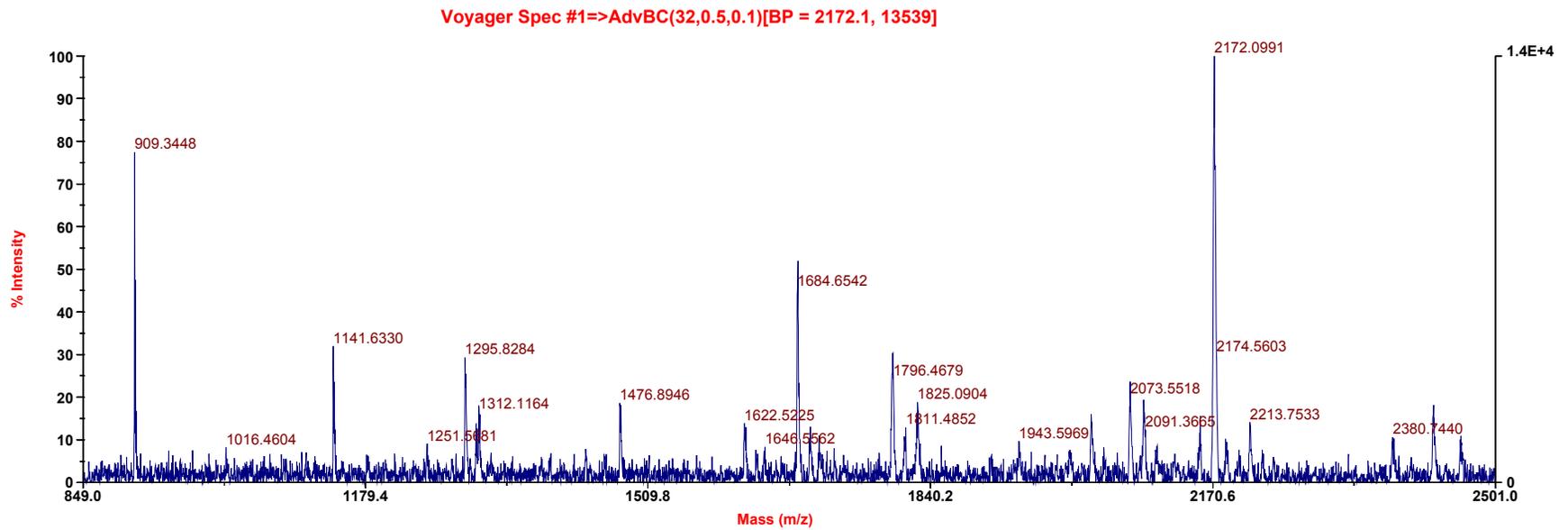


Figura 21: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do *spot* 19 da medula espinhal de rato em P21

4.3.8 Spot 23 – Cadeia 2B de tubulina beta (T beta-15)

A análise no EM (**Figura 22**) possibilitou identificar 8 peptídeos da cadeia 2B de tubulina beta, nos bancos de dados Swiss Prot e NCBI, utilizando o programa MS-FIT, (número de acesso no Swiss Prot – Q3KR8), conhecida também como T beta-15.

A proteína tubulina é um heterodímero composto por subunidades α e β , descrita como uma das principais constituintes do citoesqueleto, que pode ser encontrada nos neurônios do sistema nervoso central (Burgoyne, 1988). A tubulina é descrita como o principal composto dos microtúbulos presentes nas células neuronais (Ginzburg et. al., 1985; Matsumoto, 1997), nas quais desempenha um importante papel no crescimento dos neuritos (Silva et. al, 2002).

Durante o período de desenvolvimento celular, o citoesqueleto direciona o crescimento axonal, que pode apresentar em sua composição polímeros de microfilamentos, microtúbulos (tubulina) e os neurofilamentos. Sabe-se que os neurofilamentos participam da manutenção do calibre neural e da integridade dos neurônios (Lazarides, 1980; Nixon & Sihag, 1991; Vaidya et al., 2000), como descrito no item 4.3.4. Já os microtúbulos e microfilamentos são essenciais para o crescimento axonal e estes interagem entre si para estabilizar e organizar o citoesqueleto (Wylie et. Al, 1998; Dent & Kalil, 2001). Entretanto, ainda não há conhecimento sobre os mecanismos dinâmicos nos quais as tubulinas α e β interagem durante o processo de diferenciação neuronal (López-Fanarraga et. al., 2007).

Apesar de não ter conhecimento da interação das subunidades α e β das tubulinas, sabe-se mais sobre as proteínas que atuam sobre elas,

conhecidas como cofatores de tubulinas. Estas são proteínas requeridas nos processos de dobramento e formação dos heterodímeros (Tian *et. al.*, 1999); em processos de dissociação das tubulinas (Martin *et. al.*, 2000); em processos de degradação (Bartolini *et. al.*, 2005; Kortazar *et. al.*, 2006). Todos esses dados sugerem que há uma grande diversidade de associações que podem ocorrer entre os microtúbulos para os mais diversos processos, como o de plasticidade neural.

Em estudos realizados por Katsekos *et. al.* (2003) foi verificada a distribuição da proteína beta 2B tubulina no sistema nervoso central, na qual apresentou-se mais abundante durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, sendo que quase exclusivamente específica nos neurônios.

Nossos resultados evidenciaram uma maior expressão em amostras de medula espinhal de animais nas idades P4 do que aquelas obtidas de animais nas idades P21, fato observado provavelmente devido ao período no qual o sistema nervoso está em desenvolvimento, em franca maturação, dados que estão de acordo com a literatura.

spot 23: Cadeia 2B de tubulina beta

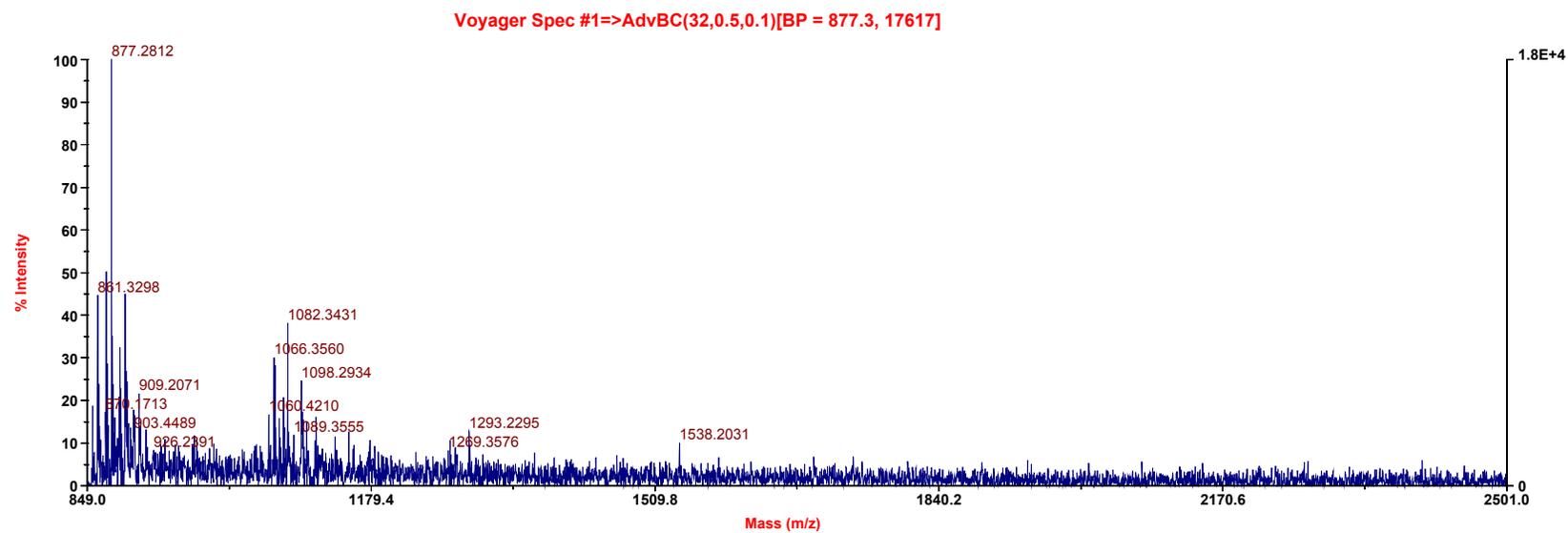


Figura 22: Espectro das massas dos peptídeos após digestão trípica do *spot 23* da medula espinhal de rato em P4

4.4 Considerações Finais

O presente estudo foi o primeiro que envolveu uma análise proteômica de medula espinhal de ratos durante o período pós-natal, considerado crítico para o neurodesenvolvimento.

A análise em perfis 2DE das amostras da porção lombar da medula espinhal de ratos neonatos permitiu observar o perfil protéico global e assim como as diferenças de expressão das proteínas em diferentes idades.

Sabe-se que a expressão de proteínas é extremamente dinâmica, e isso foi observado nas amostras de medula espinhal de ratos nas idades P4 e P21. Dos 30 *spots* diferencialmente expressos, obtivemos sucesso na identificação de 8 proteínas, mostraram estar envolvidas em diferentes processos homeostáticos.

Apesar da grande capacidade de separação de proteínas pela técnica baseada na 2DE e identificação pela EM, não foi possível identificar todas as proteínas diferencialmente expressas. Teoricamente, a identificação de todos os *spots* visualizados em um perfil 2DE corado com comassie blue colloidal é possível. Entretanto, uma série de fatores podem contribuir para o insucesso desta identificação, tais como: ligação irreversível da proteína com a malha de poliacrilamida do gel, a presença de contaminantes que dificultam o acesso da tripsina durante o processo de digestão protéica e as modificações na seqüência das proteínas que interferem na sua digestão enzimática e eluição dos peptídeos gerados, quando se utilizam as ponteiros ZipTip C18 (Galvani et. al., 2000).

Outro fator importante a ser considerado é a presença da prolina na região carboxílica, que impede a ação da enzima em qualquer resíduo de aminoácidos. Embora a tripsina clive a proteína entre os resíduos de lisina e arginina da região

C-terminal, a presença da prolina inibe significativamente o processo de digestão (Snyder, 2000). Além disso, a presença de resíduos ácidos em um dos lados potencialmente clivável da proteína também pode inibir a digestão da mesma (Wilkinson, 1986).

Desta forma, da mesma maneira que as proteínas básicas e hidrofóbicas, a sequência de aminoácidos pode-se apresentar como um obstáculo para a identificação das proteínas (Shevchenko et. al. 2000)

Limitações inerentes da própria técnica podem contribuir para a baixa eficiência na recuperação dos peptídeos oriundos dos *spots*. É difícil prever quantas proteínas podem estar presente em um único spot, visto que produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel. Estudos realizados por Gion et al. (2005) mostraram que 15,4 % dos *spots* identificados por EM correspondiam a uma mistura de proteínas. A presença de várias proteínas em um mesmo spot pode ocorrer devido a degradação proteolítica, e os fragmentos proteolíticos não geram fragmentos tripépticos suficientes para a análise por EM - MS/MS, constituindo outro fator que pode contribuir para o insucesso da identificação de uma proteína.

Para contornar esses problemas, inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas visando melhorar a separação de proteínas e, conseqüentemente a eficiência na identificação das mesmas. A 2D-HPLC, cromatografia líquida bidimensional, utiliza em sua primeira dimensão uma coluna de troca iônica e outra de fase reversa na segunda dimensão, separando as proteínas em frações antes de passarem pelo processo de tripsinização (Wagner et al., 2000). Outra técnica consiste em realizar a primeira dimensão utilizando as fitas de acrílica

com gradiente de pH com uma faixa mais reduzida, e em seguida as fitas são cortadas e os peptídeos são recuperados e eluídos por cromatografia de fase reversa na segunda separação (Essader et al., 2005)

Tendo em vistas esses fatores, deve-se analisar em quais aplicações a análise proteômica com base em perfis 2DE deve ser utilizada. Apesar de não ser efetiva a identificação completa de todas as proteínas separadas, a técnica permite separar um grande número de proteínas de uma gama muito ampla o que é uma das suas maiores vantagens.

5. CONCLUSÕES

► A análise proteômica mostrou-se eficiente para separar um grande número de proteínas da porção lombar da medula espinhal de ratos em diferentes idades pós-natal.

► A melhor forma de observação de mudanças quantitativas na expressão protéica ou suas modificações pós-traducionais durante um processo biológico é a plataforma 2DE – MS.

► A análise proteômica do neurodesenvolvimento mostrou que há uma expressão diferencial de proteínas na medula espinhal em diferentes períodos de vida pós-natal.

► As proteínas identificadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, pela técnica de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) eram de diferentes classes: proteína G (1), proteínas de citoesqueleto (2), proteínas estruturais (2), proteínas de transporte (1), fator de crescimento (1) e proteínas de ativação GTPase (1).

► Uma maior expressão protéica na porção lombar da medula espinhal de ratos em P4 foi observada para 5 proteínas. XLas, fragmento da cadeia beta da ATP sintase transportadora de H⁺ e a cadeia 2B da tubulina beta, neuromodulina e vimentina.

Este aumento de expressão foi observado provavelmente devido ao período pós-natal recente no qual o animal se encontrava, onde o tecido neural da medula encontrava-se em franca maturação estrutural e funcional.

► Uma maior expressão protéica na porção lombar da medula espinhal de ratos em P21 foi observada para 3 proteínas. GFAP, neurofilamento de cadeias polipeptídica leve e reguladora da proteína G. Este aumento de expressão provavelmente foi devido a uma necessidade diferencial, algo que foi possível observar apenas no animal adulto, provavelmente devido ao seu crescimento e refinamento dos circuitos neurais.

6. Perspectivas Futuras

► Para os neurocientistas, o método é válido como ferramenta para estudar proteínas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do sistema nervoso e nas doenças neurodegenerativas. Há também a possibilidade de determinar as isoformas e as modificações pós-traducionais.

► Realizar uma análise proteômica do neurodesenvolvimento, acompanhada de um processo de lesão periférica, e depois com a administração de agentes neuroprotetores, visando observar diferenças de expressões protéicas.

► A perspectiva de análise das proteínas menos expressa é ampla, devido a grande sensibilidade dos métodos de detecção (DIGE), dos espectrômetros de massas e de outras estratégias para separação de proteínas como HPLC acoplado ao EM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOW-NEWERLY M.; ROY A.A., NUNN C.; CHIDIAC P. RGS proteins have a signalling complex: interactions between RGS proteins and GPCRs, effectors, and auxiliary proteins. **Cell Signal**. 2006 May;18(5):579-91. Epub 2005 Oct 13.

AEBERSOLD R. & GOODLETT, D. Mass Spectrometry in Proteomics; **Chemical Reviews**; Vol 101; 269-95, 2001.

AEBERSOLD R & MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** Mar 13;422 (6928):198-207, 2003.

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

BAIROCH A, APWEILER R, WU CH, BARKER WC, BOECKMANN B, FERRO S, GASTEIGER E, HUANG H, LOPEZ R, MAGRANE M, MARTIN MJ, NATALE DA, O'DONOVAN C, REDASCHI N, YEH LS. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res**. 2005 Jan 1;33(Database issue):D154-9.

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

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

BENOWITZ, L.I. & ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci.**, 20, 84–91, 1997.

BIENVENUT W.V.; SANCHEZ J.C.; KARMIME A.; ROUGE V.; ROSE K.; BINZ P.A.; HOCHSTRASSER D.F. Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during western blot. **Anal Chem.**;71(21):4800-7, 1999.

BIGNAMI A.; DAHL D. The astrocytic response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocytic-specific protein (GFAP) in mammalian and sub-mammalian vertebrates. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2:99–110, 1976.

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

BURGOYNE R.D.; CAMBRAY-DEAKIN M.A.; LEWIS S. A.; SARKAR S.; COWAN N.J. Differential distribution of tubulin isotypes in cerebellum. **EMBO J** 7:2311–19, 1998.

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

CALEO M.; MAFFEI L. Neurotrophins and Plasticity in the Visual Cortex. **Neuroscientist** 8 (1): 52-61, 2002.

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

CARONI P.; BECKER M.. The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF1, **J. Neurosci.** 12 3849–3861, 1992.

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

CHANG, K.-J.; PUGH, W.; BLANCHARD, S.G.; MCDERMED, J.; TAM, J.P. Antibody specific to the a subunit of the guanine nucleotide-binding regulatory protein G0: developmental appearance and immunocytochemical localization in brain, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85,4929-33. 1988.

CHIDIAC P.; ROY A.A. GTPASE-ACTIVATING PROTEINS FOR HETEROTRIMERIC G PROTEINS: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. Vol. 69: 795-827. **Recept. Channels** 9 135 , 2003.

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

DAHL D. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. **J Neurosci Res** 6:741–748, 1981.

DENT E. W. & KALIL K. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. **J Neurosci**. 21, 9757–9769, 2001.

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

DUNN, M. Proteome Analysis. Disponível em: <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1998/dunn.htm>> Acesso em: 26 de março de 2007

ENG L.F.; GHIRNIKAR R.S.; LEE Y.L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). **Neurochem Res**. Oct;25(9-10):1439-51, 2000.

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

HAMBURGER, V. Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. **Am. J. Anat.** 102: 365-409, 1958.

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

HOLLYDAY M; HAMBURGER V. **COMP NEUROL**. 1976 Dec 1;170(3):311-20, 1976.

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

FILLINGAME RH. Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. **J Exp Biol**. (Pt 2):217-24, 1997.

GINZBURG I.; TEICHMAN A.; DODEMONT H.J.; BEHAR L.; LITTAUER U.Z. Regulation of three beta-tubulin mRNAs during rat brain development. **EMBO J**. Dec 30;4(13B):3667-73, 1985.

GYGI, S.P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Curr Opin Chem Biol.** Oct;4(5):489-94, 2000.

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

HATTEN M.E.; LIEM R. K. H.; SHELANSKI M.L.; MASON C. A. Astroglia in CNS injury. **Glia** 16:779–789, 1991.

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

HENZEL W.J.; WATANABE C.; STULTS J.T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 14(9): 931-942, 2003.

HORGAN, A.M.; LAGRANGE, M.T.; COPENHAVER, P.F. A developmental role for the heterotrimeric G protein Goa in a migratory population of embryonic neurons. **Dev. Biol.**, 172, 640-653, 1995.

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

IACOPETTI, P.; BARSACCHI, G.; TIRONE, F.; MAFFEI, L.; CREMISI, F., Developmental expression of PC3 gene is correlated with neuronal cell birthday, **Mech. Dev.**, 47 127-137. 1994.

INAGAKI, M.; NISHI, Y.; NISHIZAWA, K.; MATSUYAMA, M.; SATO, C. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. **Nature** 328, 649–652, 1987.

INAGAKI, M.; MATSUOKA, Y.; TSUJIMURA, K. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. **Bioessays** 18, 481–487, 1996

INOKO, A.; SHIMA, H.; IZAWA, I.; ARIMURA, N. YAMAGUCHI, T.; INAGAKI, N.; KAIBUCHI, K.; KIKUCHI, K.; INAGAKI, M.; Vimentin-Ser82 as a memory phosphorylation site in astrocytes. **Genes to Cells** pp. 1365-2443, 2006.

JACOMY H.; ZHU Q.; BEAULIEU J.M.; JULIEN J.P. Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. **J Neurochem** 73:972–984, 1999.

JANMEY P.A.; EUTENEUER U.; TRAUB P.; SCHILIWA M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. **The journal of cell biology** 113 (1): 155-160, 1991.

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

JUNGBLUT P. & THIEDE B. Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev.** May-Jun;16(3):145-6, 1997.

KANG S.K.; SO H.H.; MOON Y. S.; KIM C. H. Proteomic analysis of injured spinal cord tissue proteins using 2-DE and MALDI-TOF MS. **Proteomics.** May;6(9):2797-812, 2006.

KAPFHAMMER J.P. & SCHWAB M.E. Increased expression of the growth-associated protein GAP-43 in the myelin-free rat spinal cord. Brain Research Institute, University of Zurich, Switzerland. **Eur J Neurosci.** Mar 1;6(3):403-11, 1994

KEHLENBACH R. H.; MATTHEY J.; HUTTNER W. B. XL alpha is a new type of G protein. **Nature.** 1994 dec 22-29; 372 (6508): 804-9. Erratum in: Nature 1995 may 18, 375 (6528): 253

KIM S. I.; VOSHOL H.; OOSTRUM J. V.; HASTINGS T. G.; CASCIO M.; GLUCKSMAN M. J. Neuroproteomics: Expression Profiling of the Brain's Proteomes in Health and Disease. **Neurochemical Research**, Vol. 29, No. 6, June, p. 1317–1331, 2004.

KAPLAN M.P.; CHIN S.S.; FLIEGNER K.H.; LIEM R.K.. Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain, **J. Neurosci.** 2735–2748, 1990.

Kehlenbach R.H.; Matthey J.; Huttner W.B. XL alpha s is a new type of G protein. **Nature.** 22-29;372(6508):804-9. Erratum in: Nature May 18;375(6528):253, 1995.

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

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

KLEMKE, M.; PASOLLI, A.H.; KEHLENBACH, R.H.; OFFERMANN, S.; SCHULTZ, G.; HUTTNER, W.B. Characterization of the extra-large G-protein α -subunit XL α s II. Signal transduction properties. **J. Biol. Chem.**, 275 (2000) 33633–33640.

KORGUN, E. T.; CAYLI, S.; ASAR, M.; DEMIR, R. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. **J Mol Hist.**, 38:253–260, 2007.

KORTAZAR D.; FANARRAGA M. L.; CARRANZA G.; BELLIDO J.; VILLEGAS J. C.; AVILA J.; ZABALA J. C. Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. **Exp. Cell Res**. 313(3):425–36, 2006.

KUNZ, S.; TEGEDER I.; COSTE O.; MARIAN C.; PFENNINGER A.; CORVEY C.; KARAS, M.; GEISLINGER G.; NIEDERBERGER E. Comparative proteomic analysis of the rat spinal cord in inflammatory and neuropathic pain models. **Neuroscience Letters**, 381, 289–293, 2005.

LARIVIERE RC, JULIEN JP. Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. **J Neurobiol**. 2004 Jan;58(1):131–48, 2004.

LAZARIDES E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. **Nature** 283:249–256, 1980.

LEAKE D.; ASCHWS, CANGER A.K.; SCHECHTER N. Gefiltinin zebrafish embryos: sequential gene expression of two neurofilament proteins in retinal ganglion cells. **Differentiation** 65:181–189, 1999.

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

LEWIN G.R.; BARDE Y.A. Physiology of the neurotrophins. **Annu Rev Neurosci.** 19:289-317, 1999.

LINDWALL C. & KANJE M. The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. **Exp Neurol.** 2005 Nov;196(1):184-94. Epub 2005 Aug 29

LÓPEZ-ARANDA M.F.; ACEVEDO M.J.; CARBALLO F.J.; GUTIÉRREZ A.; KHAN Z.U. Localization of the GoLoco motif carrier regulator of G-protein signalling 12 and 14 proteins in monkey and rat brain. **Eur J Neurosci.** Jun;23(11):2971-82, 2006.

LOPEZ-FANARRAGA M.; CARRANZA G.; BELLIDO J.; KORTAZAR D.; VILLEGAS J.C.; ZABALA J.C. Tubulin cofactor B plays a role in the neuronal growth cone. **J Neurochem.** 2007 Mar;100(6):1680-7. Epub 2007 Jan 8.

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

LOWRIE M.B & VRBOVÁ G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. **Trends Neurosci.** 15, pp. 80–84, 1992.

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

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

MARENGO E.; ROBOTTI E.; ANTONUCCI F.; CECCONI D.; CAMPOSTRINI N.; RIGHETTI P. G. Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. **Proteomics,** v. 5, p. 654-666, 2005.

MAROUGA R.; DAVID S.; HAWKINS E.. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Anal Bioanal Chem.** Jun;382(3):669-78. May 18, 2005.

MARTIN-MCCAFFREY L.; WILLARD F.S.; PAJAK A.; DAGNINO L.; SIDEROVSKI D.P.; D'SOUZA S.J. RGS14 is a microtubule-associated protein. **Cell Cycle.** Jul;4(7):953-60. Epub 2005 Jul 28, 2005.

MATSUMOTO A. Hormonally induced neuronal plasticity in the adult motoneurons.

Brain Res Bull. 44(4):539-47, 2005.

MEIRI K.F.; GORDON-WEEKS P.R.. GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly attached to the substrate and is a component of a membrane skeleton subcellular fraction. **J Neurosci** 10:256–266, 1999.

MENET V.; PRIETO M.; PRIVAT A.; GIMÉNEZ Y.; RIBOTTA M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Jul 22;100(15):8999-9004. Epub 2003 Jul 14.

MEYER B.; WITTIG I.; TRIFILIEFF E.; KARAS M.; SCHÄGGER H. Identification of two proteins associated with mammalian ATP synthase. **Mol Cell Proteomics.** 2007 Oct;6(10):1690-9. Epub 2007 Jun 17.

MILLER, I.; CRAWFORD, J.; GIANAZZA, E. Protein stains for proteomic applications: Which, when, why? **Proteomics**, v. 6, p. 5385-5408, 2006.

MOSS D.J.; FERNYHOUGH P.; CHAPMAN K.; BAIZER L.; BRAY D.; ALLSOPP T. Chicken growth-associated protein GAP-43 is tightly bound to the actin-rich neuronal membrane skeleton. **J Neurochem** 54: 729–736, 1990.

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

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

NIXON R.A. & SIHAG RK. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. **Trends Neurosci** 14:501–506, 1991.

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

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

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

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

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

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

OESTREICHER A.B.; DE GRAAN P.N.; GISPEN W.H.; VERHAAGEN J.; SCHRAMA L.H. B-50, the growth associated protein-43: modulation of cell morphology and communication in the nervous system. **Prog Neurobiol** 53:627-686, 1997

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

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

PARAMIO J.M. & JORCANO J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? **Bioessays**. 2002 Sep;24(9):836-44. Review.

PASOLLI H.A.; KLEMKE M.; KEHLENBACH R.H.; WANG Y.; HUTTNER W.B. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. **J Biol Chem**. Oct 27;275(43):33622-32, 2000

PENCALET P.; SERGUERA C.; CORTI O.; PRIVAT A.; MALLET J.; GIMÉNEZ Y RIBOTTA M. Integration of genetically modified adult astrocytes into the lesioned rat spinal cord. **J Neurosci Res**. Jan;83(1):61-7, 2006.

PERLSON E.; HANZ S.; BEN-YAAKOV K.; SEGAL-RUDER Y.; SEGER R.; FAINZILBER M. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. **Neuron**, 45(5):715-26, 2005.

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

PRIVAT, A. Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. **Glia** 43, 91–93, 2003.

QUADRONI M.; JAMES P. Proteomics and automation. **Electrophoresis**, 20, 664–677, 1999.

RABILLOUD, T.; VUILLARD, L.; GILLY, C.; LAWRENCE, J.J. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. **Cell Mol Biol**, 40(1):57-75, 1994.

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

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

REEVES S.A.; HELMAN L.J.; ALLISON A.; ISRAEL M.A. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1989 Jul;86(13):5178-82.

RIDET JL, MALHOTRA SK, PRIVAT A, GAGE FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci** 20:570–577, 1997.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, DE LA TORRE-MADRID E, GAITÁN G, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, GARZÓN J. RGS14 prevents morphine from internalizing Mu-opioid receptors in periaqueductal gray neurons. **Cell signal.** 2007 Dec;19(12):2558-71. Epub 2007 Aug 15.

ROGÉRIO F.; DE SOUZA QUEIROZ L, TEIXEIRA S.A.; OLIVEIRA A.L.; DE NUCCI G.; LANGONE F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. **Brain Res.** 2002 Feb 1;926(1-2):33-41. Erratum in: **Brain Res** 2002 Jun 21;941(1-2):150.

SANES & LICHTMAN. Development Of The Vertebrate Neuromuscular Junction. **Annu. Rev. Neurosci.** 1999. 22:389–442, 1999.

SCHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O ; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.** 68, 850-858, 1996.

SIERRA, D. A.; POPOV, S.; WILKIE, T. M. (2000). Regulators of G-protein signaling in receptor complexes. **Trends Cardiovasc. Med.** 10: 263–268.

SILVA J.S.; DOTTI C.G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. **Nat Rev Neurosci**; VOL. 3: P. 694–704, 2002.

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

SKENE J.H. Axonal growth-associated proteins. **Annu Rev Neurosci** 12:127–156, 1989.

TANAKA H & LANDMESSER L. T. Cell death of lumbosacral motoneurons in chick, quail, and chick-quail chimera embryos: a test of the quantitative matching hypothesis of neuronal cell death. **The Journal of Neuroscience**, 6(10): 2889-2899, 1986.

TIAN G.; BHAMIDIPATI A.; COWAN N.J.; LEWIS S.A. Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. **J Biol Chem.** Aug 20;274(34):24054-8, 1999.

THIEDE B.; WOLFGANG H.; KRAHA A.; MATTOWC J.; SCHMID M.; SCHMIDT F.; JUNGBLUT P. R. Peptide mass Fingerprinting. **Methods** 35, 237–247, 2005.

THYAGARAJAN A; STRONG M.J.; SZARO B.G. Post-transcriptional control of neurofilaments in development and disease. **Exp Cell Res.** 2007 Jun 10;313(10):2088-97. Epub 2007 Feb 27. Review.

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

VIDITA A; VAIDYA ; ROSE Z.; TERWILLIGER ; RONALD S. DUMAN. Alterations in Heavy and Light Neurofilament Proteins in Hippocampus Following Chronic ECS Administration. **Synapse** 35:137–143, 2000.

VAN DEN HEUVEL R.M.; VAN EYS G.J.; RAMAEKERS F.C.; QUAX W.J; VREE EGBERTS W.T.; SCHAART G; CUYPERS H.T; BLOEMENDAL H. Intermediate filament formation after transfection with modified hamster vimentin and desmin genes. **J Cell Sci.** Nov;88 (Pt 4):475-82, 1987

WANG H.; OSTER G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. **Nature**. 1998 Nov 19;396(6708):279-82.

WILKIE, T. M. G-protein signaling: satisfying the basic necessities of life. **Curr. Biol.**10: R853–856, 2000.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I., HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13, 19-50, 1995.

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

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

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

YAN, J. X.; WAIT, R.; BERKELMAN, T.; HARRY, R. A.; WESTBROOK, J. A.; WHEELER, C. H.; DUNN, M. J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis** 21, 3666-3672, 2000.

ZHANG Z.; CASEY D.M.; JULIEN J.P.; XU Z. Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L **J Comp Neurol.** 450(2):144-52, 2002.

ZHAO J.X.; OHNISHI A.; ITAKURA C.; MIZUTANI M.; YAMAMOTO T.H.H.; MURAI Y. Greater number of microtubules per axon of unmyelinated fibers of mutant quails deficient in neurofilaments: possible compensation for the absence of neurofilaments. **Acta Neuropathol (Berl)** 87:332–336, 1994.

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