

# ANÁLISE DE PROTEOMAS

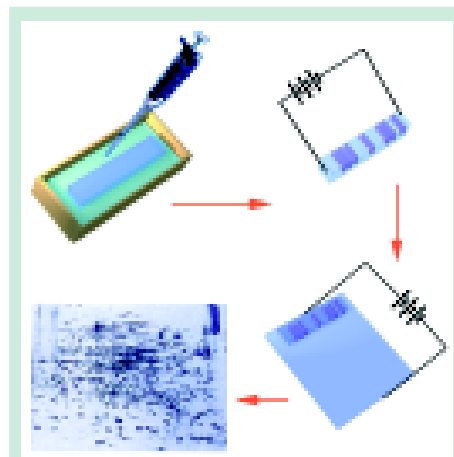
O despertar da era pós-genômica

**P**roteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contida no DNA das células. O termo proteína vem do grego *proteios* e significa “a mais importante”. De fato, as proteínas compõem um conjunto de moléculas indispensáveis para todos os seres vivos do planeta. Elas são as biomoléculas mais abundantes e ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais, receptores celulares, etc. Devido a essa diversidade de funções, as proteínas exercem papel fundamental em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica e reprodução. Do ponto de vista comercial, bilhões de dólares são gerados anualmente por indústrias que trabalham com proteínas, como as farmacêuticas e alimentícias. Já se discute até o uso de proteínas em eletrônica e computação de maneira rotineira no futuro.

## Genomas e Proteomas

Nos últimos vinte anos, a Bioquímica sofreu uma verdadeira revolução, principalmente devido aos espetaculares avanços na área de Biologia Molecular, que vem disponibilizando uma incrível gama de informações moleculares sobre os sistemas biológicos. Destaca-se a enorme quantidade de seqüências de DNA fornecida pelos projetos de sequenciamento total de genomas. Hoje já são conhecidas as seqüências completas dos genomas de microorganismos como *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. Espera-se, para o começo do próximo século, a seqüência total do genoma humano.

A partir das seqüências de DNA dos genes, pode-se deduzir a seqüência de aminoácidos das proteínas por eles codifi-



**Figura 1**-Eletroforese bidimensional.

O gel de IPG é incubado com a solução contendo a amostra e, posteriormente, submetido a um campo elétrico para a focalização isoeletrica ou primeira dimensão. As proteínas focalizadas são, então, submetidas a uma segunda dimensão, que as separará de acordo com suas massas moleculares. Após coloração, o perfil bidimensional pode ser visualizado.

### Marcelo Valle de Sousa

Professor Adjunto e Coordenador do CBSP  
CBSP - Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília  
musousa@unb.br

### Wagner Fontes

Professor Adjunto e Pesquisador do CBSP  
CBSP - Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília  
wagnerf@unb.br

### Carlos André Ornelas Ricart

Professor Adjunto e Pesquisador do CBSP  
CBSP - Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas  
Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília  
ricart@unb.br  
Fotos cedidas pelos autores



**Figura 2**-Equipamento de eletroforese bidimensional.

ínas. Do mesmo modo, o estudo do genoma não permite saber que proteínas estão expressas realmente em uma determinada célula em um dado momento. Dentro desse contexto, torna-se importante o estudo em larga escala das proteínas por meio de projetos de análise de proteomas.

PROTEOMA é um termo relativamente novo, que significa o conjunto de PROTEÍNAS expressas por um genOMA. O genoma de um organismo, como por exemplo o de um ser humano, é praticamente constante, independente de qual das diferentes células (excetuando-se óvulos e espermatozoides) está sendo analisada ou de variações no meio ambiente. Por outro lado, o proteoma de um neurônio será bastante diferente do proteoma de um linfócito do mesmo indivíduo, já que as diferenças morfológicas e funcionais entre as duas células são reflexo do conjunto de proteínas produzidas por cada uma. O mesmo tipo de célula pode apresentar diferentes proteomas em resposta a estímulos externos como a ação



**Figura 3**-Espectrômetro de massa do tipo *electrospray triple-quadrupole*, dedicado ao estudo de proteínas e proteomas.

de drogas, poluição ou mesmo estresse nervoso. O proteoma é, portanto, o resultado da expressão de um conjunto de genes e das modificações pós-traduccionais das proteínas produzidas em resposta a condições ambientais definidas.

### Métodos Utilizados

Nos projetos de proteomas, um dos objetivos primários é separar e visualizar o máximo de proteínas possível de uma fonte, permitindo que sejam catalogadas computacionalmente e estudadas por técnicas analíticas. Atualmente a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é o método mais eficiente de separação simultânea de centenas ou milhares de proteínas (Figuras 1 e 2). Pode-se dizer que a eletroforese bidimensional é o “coração” da análise de proteomas. Em qualquer tipo de separação eletroforética, moléculas que possuam cargas, migram sob a influência de um campo elétrico. A velocidade de migração dependerá de fatores como tamanho, forma e carga elétrica. No caso da eletroforese bidimensional, as proteínas são submetidas a dois processos (duas dimensões) consecutivos de separação baseados em propriedades diferentes das proteínas. Assim, durante a primeira dimensão, denominada focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas em um gel de poliacrilamida que forma um gradiente de pH e migram até atingirem uma posição estacionária onde possuam carga líquida zero (ponto isoeletrico).

Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida que separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares. Como os parâmetros usados na primeira dimensão (ponto isoeletrico) e na segunda dimensão (massa molecular) são independentes, uma grande resolução é atingida. Mais de 8.000 proteínas podem ser separadas em um único gel bidimensional. A eletroforese bidimensional foi desenvolvida há mais de 20 anos, porém seu uso em análise de proteomas esteve limitado até há pouco tempo devido à baixa reprodutibilidade dos géis obtidos e à inexistência de métodos sensíveis o bastante para identificar as proteínas separadas. O surgimento da técnica de gradientes imobilizados de pH (IPG) permitiu uma reprodutibilidade muito maior nos géis bidimensionais, enquanto que avanços recentes nas técnicas de microsequenciamento automático e espectrometria de massa de proteínas permitiram que proteínas em quantidades da ordem de femtomoles ( $10^{-15}$  Mol) pudessem ser identificadas.

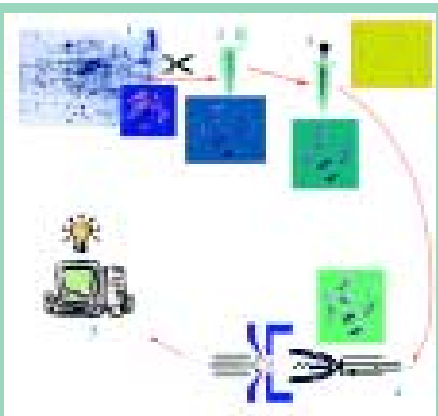
A identificação de uma proteína é muito

facilitada se sua sequência for conhecida e estiver depositada em bancos de dados de sequências, os quais podem ser acessados via Internet. A sequência parcial de aminoácidos proveniente de uma mancha da eletroforese bidimensional pode ser usada para fazer uma busca nos bancos de dados e identificar a proteína. Uma abordagem ainda mais moderna e sensível faz uso da espectrometria de massa de proteínas.

A espectrometria de massa é uma metodologia que permite a determinação da massa molecular de compostos com altíssima precisão. Apenas no início da década de 80, a espectrometria de massa começou a ser mais aplicada em determinações de massas moleculares de proteínas. Com o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais especializados para proteínas (Figura 3), a espectrometria de massa tornou-se ferramenta revolucionária na química de proteínas moderna. A espectrometria de massa vem permitindo a identificação de proteínas por uma metodologia denominada “peptide mass fingerprinting” (Figura 4). Esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina) produzindo fragmentos denominados peptídios. As massas desses peptídios são então determinadas com grande acuidade (0,1-0,5 Da) por espectrometria de massa. As massas obtidas formam uma espécie de impressão digital (“peptide mass fingerprinting”) da proteína. Softwares especiais permitem comparar o “peptide mass fingerprinting” da proteína que queremos identificar com os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados. Se a sequência da proteína problema estiver no banco de dados ela será imediatamente identificada.

A espectrometria de massa também pode ser usada para sequenciar pequenas regiões dos peptídios. O uso das pequenas sequências obtidas em conjunto com as informações de massas moleculares constitui uma poderosa técnica de identificação de proteínas conhecida como “sequence tag”.

Os dados de análise de proteomas são armazenados na forma de Mapas de Referência ou Mapas de Proteomas, os quais são obtidos por “scanning” dos géis bidimensionais corados e análise das imagens por meio de programas especiais. Assim, a posição das manchas e a intensidade dos sinais são calculadas para quantificação, determinação de ponto isoeletrico e massa molecular. Os Mapas de Proteomas indicam também a descrição das proteínas já identificadas pelas técnicas descritas anteriormente. Uma lista de Mapas de Proteomas está disponível na WWW no sítio WORLD-2DPAGE no endereço URL: <http://expasy.hcuge.ch/ch2d/2d-index.html>.



**Figura 4**-Identificação de proteínas por espectrometria de massa. Uma mancha proteica de um gel bidimensional (1) é cortada e transferida para um tubo onde sofre digestão proteolítica (2). Os peptídeos resultantes são separados de sais e outras micromoléculas (3) e aplicados no espectrômetro de massa (4). As massas dos peptídeos são usadas para fazer buscas em bancos de dados por métodos computacionais, resultando na identificação da proteína (5).

### Aplicações Biotecnológicas

A existência de Mapas de Proteomas disponíveis na Internet permite que pesquisadores de todo o mundo, trabalhando em diversos assuntos envolvendo expressão de proteínas, tais como efeito de fármacos, condições patológicas, diferenciação celular, comparação de variedades da mesma espécie e respostas celulares a estímulos externos diversos, possam identificar mais facilmente as proteínas expressas ou reprimidas, precisando para isso apenas obter o perfil bidimensional das proteínas de seu sistema nas mesmas condições dos Mapas de Referência disponíveis.

Hoje, já se vislumbra uma enorme gama de aplicações a partir do conhecimento detalhado dos proteomas, principalmente em medicina, agropecuária e biotecnologia. Por exemplo, a comparação de expressão de cepas patogênicas e não patogênicas de microorganismos pode ajudar no desenvolvimento de métodos diagnósticos e de agentes terapêuticos. A análise de proteomas acoplada à técnicas de “knockout” de genes pode demonstrar os efeitos metabólicos da proteína nocauteada e verificar se outros genes são co-regulados. De fato, mais de 1000 proteínas já foram

classificadas em conjuntos de proteínas co-estimuladas (“stimulons”) ou co-reguladas (“regulons”). Torna-se, portanto, muito importante o emprego da análise de proteomas no estudo do efeito de fármacos sobre células para verificar que proteínas são afetadas além da proteína-alvo. Outra possibilidade da análise de proteomas é a comparação de tecidos humanos normais e doentes. No caso de câncer, várias proteínas marcadoras já foram identificadas por análise de proteomas.

### Situação no Brasil

Projetos de análise de proteomas estão sendo considerados altamente estratégicos neste momento em que se inicia a “Era Pós-Genômica” e estão recebendo pesados apoios de governos de países como Estados Unidos, Dinamarca, França, Alemanha, Inglaterra, Japão e Austrália. Centros para análise de proteomas foram ou estão sendo criados nesses países. Países emergentes como Coreia do Sul, Taiwan, Índia, África do Sul e outros já estão também realizando financiamentos de projetos proteômicos.

No Brasil, apesar do próprio conceito de proteomas ser pouco conhecido pela comunidade científica e órgãos financiadores, projetos proteômicos começam a ser realizados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas/Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas em Proteínas da Universidade (CBSP/LBQP) da Universidade de Brasília (UnB). O CBSP/LBQP vem-se dedicando nos últimos anos à identificação de proteínas por análise de aminoácidos, sequenciamento automático e espectrometria de massa, tendo adquirido o “know-how” necessário para trabalhos em proteomas. Atualmente, estão sendo iniciados projetos de análise de proteomas do veneno da aranha marrom (*Loxosceles*), em colaboração com a Dra. Katia Barbaro, do Instituto Butantan, e da jararaca da Amazônia (*Bothrops atrox*), em colaboração com o Dr. Paulo Buhnrhein e o pesquisador Jorge Luis López Lozano, do Instituto de Medicina Tropical de Manaus (Figura 5). Essas pesquisas, cujos financiamentos estão sendo solicitados junto a programas de apoio científico e tecnológico nacionais, objetivam a comparação de proteomas de venenos de populações com diferentes toxidades e a identificação de proteínas de interesse biotecnológico e farmacológico. Outro projeto do LBQP/CBSP é a análise de proteomas de leucócitos humanos após o trauma, em colaboração com o Dr. Belchor Fontes, do Hospital das Clínicas de São Paulo. Após o trauma, até mesmo em casos pouco graves, alguns pacientes desenvolvem falência múltipla de órgãos, chegando à morte quase sempre. Assim, leucócitos de



**Figura 5**- Aplicação da análise de proteomas no estudo comparativo de venenos. A gravidade dos acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops atrox* das regiões de Manaus e da Fronteira Brasil-Colômbia são diferentes. O mesmo ocorre com diferentes espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*. O estudo comparativo desses proteomas pode levar à identificação de proteínas de interesse biotecnológico e farmacológico.

pacientes com e sem falência múltipla de órgãos pós-trauma serão comparados a nível de proteomas, com o objetivo de identificar marcadores moleculares relacionados com essa condição. Diversas outras idéias já estão sendo discutidas para novos projetos. Até mesmo coordenadores de projetos genoma nacionais já demonstram grande interesse em interagir com a equipe do LBQP/CBSP em futuros trabalhos pós-genômicos.

A análise de proteomas possui muitas outras aplicações além das citadas neste artigo e a demanda de trabalhos nessa área certamente crescerá exponencialmente no Brasil nos próximos anos. O atendimento dessa demanda vai depender muito do apoio continuado a grupos de pesquisa em proteínas e proteomas.

### Referências Bibliográficas

- Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in practice*. VCH, Germany.
- Roepstorff, P. (1997). Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 6-13.
- Wilkins, M.R., Williams, K.,L., Appel, R.D. and Hochstrasser, D. (Eds.) (1997). *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag, Germany.