



# ESPECTROMETRIA de massa de proteínas

O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica

## Ricardo Bastos Cunha

Prof. Dr., Núcleo de Proteômica,  
Centro Brasileiro de Serviços e Pesquisas  
em Proteínas; Divisão de Química Analítica  
Instituto de Química  
Universidade de Brasília  
Brasília/DF  
rbcunba@umb.br

## Mariana de Souza Castro

Profª. Dra., Núcleo de Proteômica,  
Centro Brasileiro de Serviços e  
Pesquisas em Proteínas  
Universidade de Brasília  
Brasília/DF  
mcastro@umb.br

## Wagner Fontes

Prof. Dr., Núcleo de Proteômica,  
Centro Brasileiro de Serviços e  
Pesquisas em Proteínas  
Universidade de Brasília  
Brasília/DF  
wagnerf@umb.br

A química de proteínas tem passado por um novo período de grandes avanços tecnológicos e científicos. Com a conclusão do seqüenciamento dos genomas de vários organismos, inclusive o da espécie humana, a pesquisa envolvendo proteínas ganhou novo fôlego e entramos em uma nova fase conhecida como pós-genômica, em virtude da sua estreita relação com os dados produzidos pelas pesquisas genômicas. Essa fase tem-se caracterizado pelo domínio de um novo método analítico empregado no estudo de proteínas: a espectrometria de massa, simbolizada por MS — do nome em inglês *mass spectrometry*.

### Princípios da espectrometria de massa

A espectrometria de massa é um método de determinação precisa de massas molares. Há várias décadas, esse método vem-se consolidando como ferramenta insubstituível para a determinação de estruturas químicas, principalmente de compostos orgânicos pequenos e voláteis. Durante a década de 1980, foram desenvolvidos novos mecanismos de ionização em espectrômetros de massa para moléculas grandes e polares como peptídios e proteínas, até então impossíveis de serem analisados por essa técnica, o que permitiu que vários problemas bioquímicos pudessem ser resolvidos.

Um espectrômetro de massa é formado basicamente de duas partes: o sistema de ionização das moléculas, responsável por vaporizá-las e carregá-

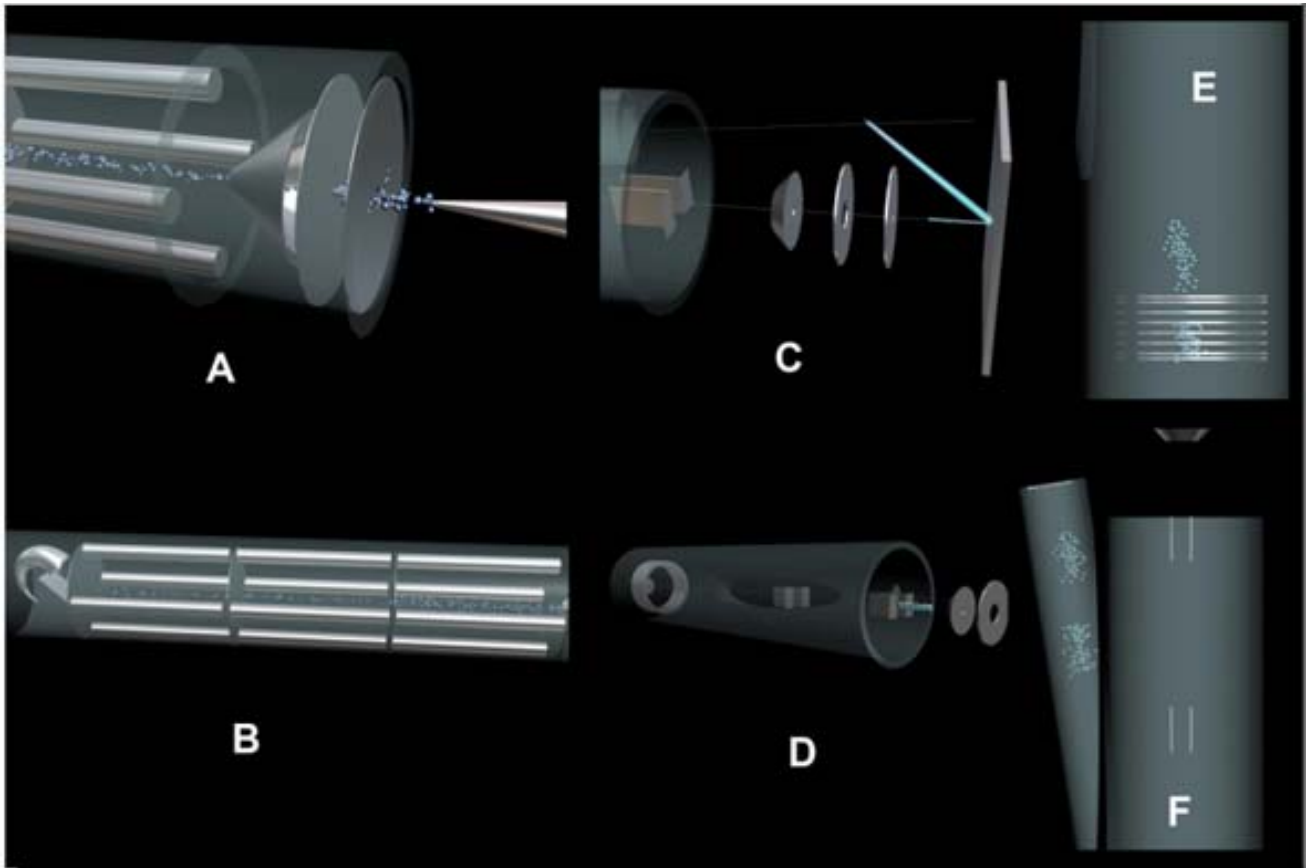
las eletricamente, e o analisador de massa — o espectrômetro de massa propriamente dito — que separa os íons resultantes de acordo com a massa. Atualmente, duas técnicas de ionização (Figura 1), que se complementam e se sobrepõem, dominam a análise de proteínas: a dessorção a *laser* e a eletropulverização.

### Dessorção a *laser*

A palavra dessorção (*desorption*, em inglês) refere-se ao fenômeno de retirada de substâncias adsorvidas ou absorvidas por outras. No caso da espectrometria de massa, a proteína — ou a mistura protéica ou peptídica — em estudo é misturada a uma matriz ácida e irradiada com um feixe de *laser*, cuja energia causa a dessorção da molécula. A matriz ácida transfere prótons para as moléculas de proteína, fazendo que fiquem ionizadas positivamente. A dessorção das moléculas de matriz e de proteína faz que elas passem para o estado gasoso. Estar na forma ionizada e no estado gasoso é condição para que uma molécula possa ser analisada por espectrometria de massa. A principal técnica empregada na análise de proteínas baseada no fenômeno da dessorção a *laser* é conhecida como MALDI — sigla em inglês para *matrix-assisted laser desorption ionization*.

### Eletropulverização

Na ionização por eletropulverização, a proteína é dissolvida em uma solução acidificada a qual é pulverizada em uma agulha metálica — ou um



**Figura 1** - Técnicas de ionização e tipos de analisadores de massa: A) eletropulverização (ESI), mostrando a agulha de pulverização, os filtros iniciais que impedem a progressão de partículas não-ionizadas e o início de um sistema de quadrípulos; B) quadrípulos em um sistema de triplo quadrípolo, esquematizando partículas conduzidas ao detector à esquerda; C) dessorção a laser (MALDI) ilustrando um pulso de laser incidindo sobre a amostra aplicada na placa retangular e gerando partículas ionizadas. À esquerda das partículas são mostrados filtros eletrônicos que impedem a passagem de partículas não-ionizadas para o analisador TOF; D, E e F) analisador tipo TOF no modo refletor (*reflectron*), apresentando todo o tubo de vácuo com os íons no início da trajetória (D), a mudança de trajetória no refletor (E) e a chegada ao detector após o refletor – acima, no tubo estreito (F)

capilar de vidro revestido de metal — submetida a intenso campo elétrico, o que causa sua ionização. Uma corrente de gás inerte flui no sentido contrário ao da pulverização, o que causa sua dessolvatação. A proteína, já ionizada e no estado gasoso, é atraída para dentro do espectrômetro de massa, onde é analisada. O termo ESI — sigla em inglês para *electrospray ionization* — é comumente empregado para designar tal técnica.

### Analisadores de massa

Os principais analisadores de massa (Figura1) que acompanham os sistemas de ionização descritos são:

- **tempo de voo** — abrevia-se como TOF, sigla em inglês para *time-of-flight* — sistema em que moléculas

ionizadas e aceleradas são lançadas em um tubo sob vácuo e sem campo elétrico para medida do seu tempo de voo até um detector. Esse tempo de voo é proporcional à massa molar da molécula. Este analisador é usualmente associado à dessorção a laser; mas pode também ser utilizado com eletropulverização;

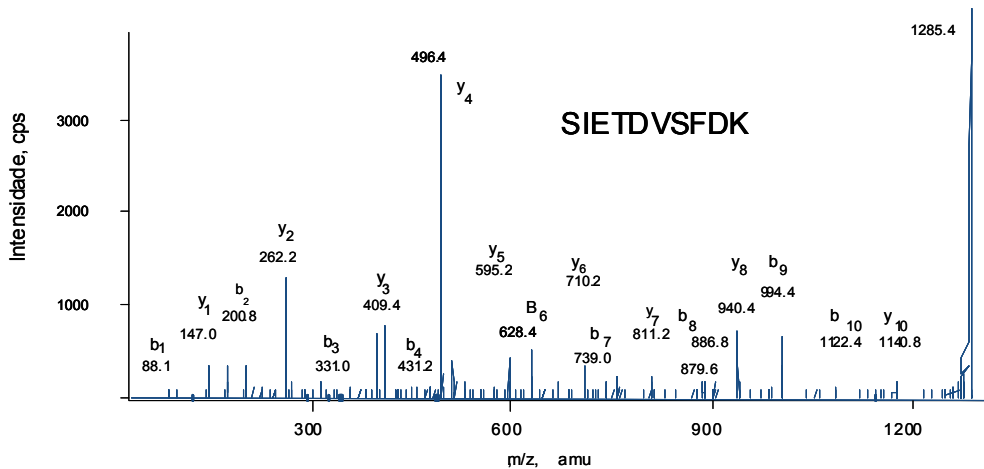
- **quadrípolo**, que utiliza a condução de moléculas ionizadas entre quatro cilindros metálicos conectados a fontes de radiofrequência para fazer que determinados grupos de íons cheguem ao detector. Esse analisador geralmente é usado com eletropulverização, mas pode estar associado também à dessorção a laser.

- **aprisionamento de íons** — abrevia-se como IT, sigla em inglês para *ion trap* — em que as moléculas também são conduzidas para dentro de um compartimento onde exis-

te um forte campo eletromagnético. Diferentemente do quadrípolo, nesse sistema os íons não são perdidos em sua trajetória rumo ao detector. Ao contrário, eles são aprisionados no compartimento onde existe campo eletromagnético e liberados um a um. Esse analisador associa-se tanto à eletropulverização quanto à dessorção a laser.

### APLICAÇÕES

A espectrometria de massa é uma técnica capaz de determinar massas molares de forma muito precisa em experimentos rápidos (poucos minutos). Essas informações possibilitam a resolução de diversos problemas em química de proteínas, tais como: checagem da correção de uma seqüência de aminoácidos, identificação de proteínas, determinação da



**Figura 2** - Seqüenciamento por espectrometria de massa (CID-MS/MS). O espectro de MS/MS é rico em informações de seqüência. A diferença de massa entre os diversos picos pode auxiliar na dedução da seqüência do peptídeo, uma vez que as ligações preferencialmente clivadas pelo processo CID são as peptídicas. Espera-se obter, em um espectro de MS/MS, picos correspondentes às fragmentações da cadeia peptídica em diferentes posições, determinando as séries A, B, C, X, Y e Z, cujas massas auxiliam na dedução da seqüência do peptídeo. Na figura, foram ilustradas as séries B e Y, correspondentes aos fragmentos provenientes da fragmentação apenas das ligações peptídicas

fidelidade e homogeneidade de proteínas recombinantes, identificação de complexos protéicos não-covalentes, detecção de doenças genéticas, identificação de modificações químicas em proteínas, determinação de glicosilações — adição de açúcares à molécula de proteína — e fosforilações — adição de fosfatos à molécula de proteína —, seqüenciamento de proteínas e peptídios etc. As possibilidades de aplicação da espectrometria de massa não se esgotam aqui. Existem vários outros usos dessa nova tecnologia relacionados à biotecnologia e a áreas correlatas. Aplicações que envolvem análise de carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos estão se tornando rotina também. A seguir são relacionadas algumas aplicações da espectrometria de massa em química de proteínas.

### Determinação precisa da massa molar de proteínas

A espectrometria de massa é uma das técnicas analíticas mais precisas existentes. Conseguem-se facilmente 5 ou 6 algarismos significativos nas medidas de massa molar, com erros que podem chegar a apenas 0,001 % em equipamentos de alta resolução. A título de compara-

ção, na eletroforese em gel, técnica ainda muito utilizada para separação de misturas protéicas e medidas de massas molares de proteínas, conseguem-se erros de no mínimo 5 %. A precisão dos espectrômetros de massa é tanta que é possível distinguir duas moléculas de 10.000 u que diferem entre si pela presença de apenas 1 carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) na molécula — o carbono-12 ( $^{12}\text{C}$ ) é o isótopo mais abundante na natureza. A espectrometria de massa é, portanto, entre todas as técnicas existentes, a que possibilita a determinação mais precisa da massa molar de proteínas e peptídios.

### Checagem da pureza de proteínas e peptídios

O estado de pureza de proteínas e de peptídios é um aspecto extremamente importante em química de proteínas. A checagem dessa pureza pode ser feita utilizando-se a espectrometria de massa. De maneira geral, a existência de um pico único em espectros de MALDI ou no espectro reconstruído de ESI indica a presença de apenas uma forma molecular. A presença de dois ou mais picos demonstra a existência de isoformas ou de contaminantes.

A checagem de pureza por espectrometria de massa é um mé-

todo consideravelmente mais sensível e, devido a sua grande precisão, bem mais fidedigno que outros métodos existentes, como a cromatografia líquida — HPLC, sigla em inglês para *high performance liquid chromatography* — e a eletroforese.

### Identificação de isoformas protéicas

Isoformas protéicas são proteínas que têm a mesma função, mas são codificadas por genes distintos e apresentam pequenas diferenças em sua seqüência. Por exemplo, o fator de transformação beta (TGF- $\beta$ ) existe em três versões ou isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, e TGF- $\beta$ 3), cada uma delas é capaz de disparar uma cascata de sinalização que começa no citoplasma e termina no núcleo da célula. Essas isoformas são bastante difíceis de separar pelos métodos usuais utilizados na purificação de proteínas. Sua presença pode ser demonstrada por meio da espectrometria de massa, desde que suas massas molares sejam distintas. A ocorrência de um pico único cromatográfico que produza dois picos distintos e próximos em um espectro de massa sugere a presença de isoformas protéicas, que pode ser confirmada por meio de técnicas de identificação de proteínas (ver adiante).

### Confirmação da seqüência completa de aminoácidos

Se a massa molar calculada a partir de uma seqüência de aminoácidos de uma proteína ou peptídeo, determinada experimentalmente, for igual àquela determinada por espectrometria de massa, pode-se concluir que a seqüência em questão está correta. Cabe ressaltar que a existência de aminoácidos isobáricos, ou seja, aminoácidos que possuem a mesma massa molar ou massas molares muito próximas —

cuja diferença é inferior ao erro da medida —, deixa certa dúvida a respeito da seqüência correta. Porém, a comparação com seqüências similares ou mesmo com a seqüência do gene pode minimizar essas dúvidas.

### **Confirmação da correção da expressão de proteínas recombinantes**

A tecnologia de DNA recombinante é hoje muito utilizada na indústria da biotecnologia. Trata-se de uma série de procedimentos usados para juntar-se (recombinar) segmentos de DNA com determinado objetivo biotecnológico. A correção da expressão de proteínas recombinantes pode ser avaliada por meio da determinação exata de suas massas molares utilizando-se espectrometria de massa. Essa técnica pode ser utilizada no controle de qualidade da fidelidade da expressão gênica e pureza do material obtido, uma aplicação particularmente útil para a indústria da biotecnologia.

### **Determinação de modificações pós-traducionais**

A maioria das proteínas, após ser sintetizada — ou seja, traduzida —, sofre modificações pós-traducionais. Uma das maneiras mais comuns em que uma proteína é modificada é pelo processo de glicosilação, no qual oligossacarídeos são ligados a sítios específicos da cadeia polipeptídica. Mais de 60 % das proteínas naturais são glicosiladas. Açúcares ligados à estrutura de proteínas podem auxiliar no enovelamento correto da proteína, servir de epitopos de reconhecimento de anticorpos, servir como uma capa de proteção contra a ação de proteases ou exercer um papel na localização e na orientação de proteínas da membrana celular, apenas para citar alguns exemplos. A espectrometria de massa tem sido extensivamente utilizada para determinação do conteúdo de carboidratos em glicoproteínas, para localização de sítios de glicosilação e até para determinação de estruturas

glicídicas.

A fosforilação de uma proteína é uma das mais importantes modificações pós-traducionais com efeito direto na atividade celular. A maioria dos processos metabólicos em uma célula eucariótica são regulados em certos pontos pela fosforilação de uma ou mais proteínas-chave. A regulação da transcrição genética, a progressão do ciclo celular, a proliferação, a divisão e a diferenciação celular, a dinâmica citoesquelética e a estocagem e recuperação de energia são todos processos dependentes de fosforilação. A identificação de sítios específicos de fosforilação é uma etapa importante em direção ao entendimento das vias de sinalização intracelulares. Cada vez mais esse trabalho tem sido conduzido por meio da espectrometria de massa.

Os aminoácidos que são normalmente fosforilados são a serina, a treonina e a tirosina, embora fosforilações em resíduos de histidina e ácido aspártico também sejam descritas. Se a seqüência completa de aminoácidos da proteína fosforilada for conhecida, os sítios de fosforilação podem ser determinados simplesmente analisando-se a mistura peptídica obtida de um digesto enzimático por espectrometria de massa. Os peptídios com massa de 98 u — resultante da adição de  $H_3PO_4$  — acima do esperado pela seqüência estão fosforilados.

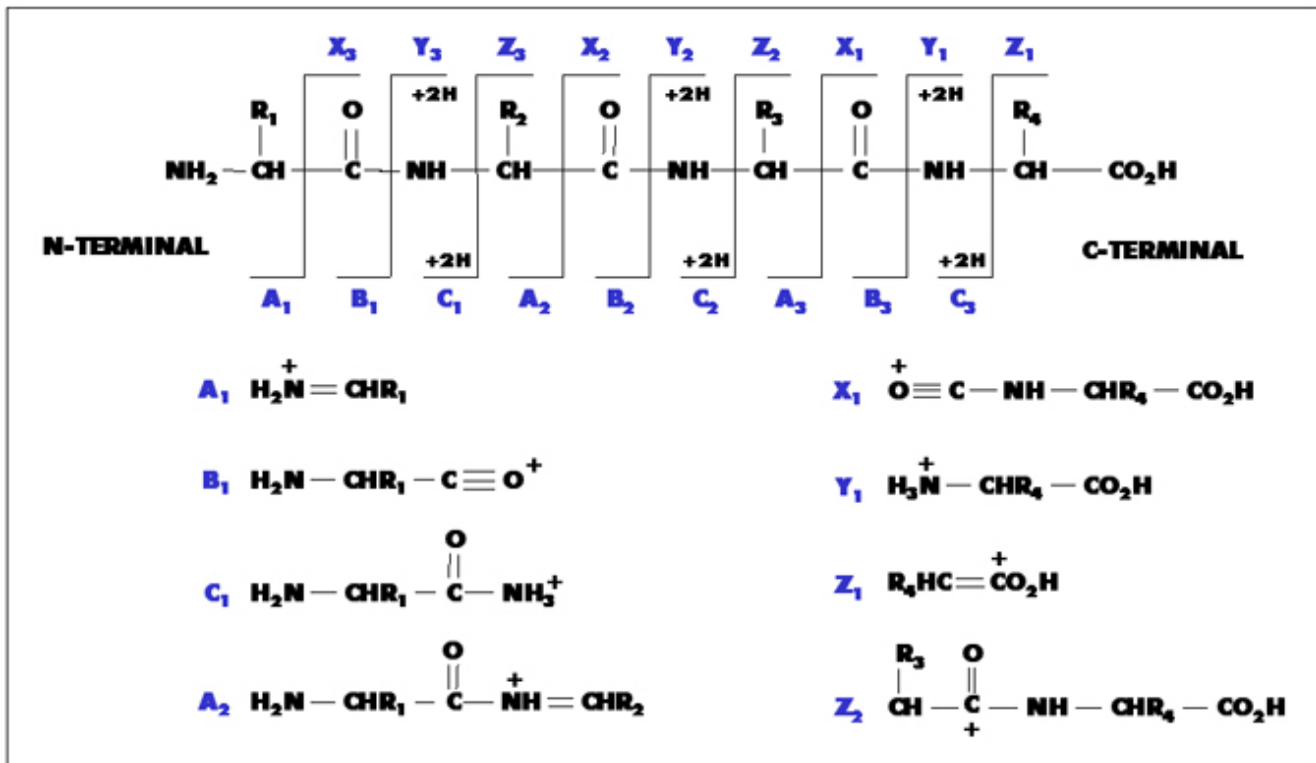
### **Seqüenciamento de proteínas por MS/MS**

Trabalhos de seqüenciamento por espectrometria de massa são conduzidos normalmente em equipamentos conjugados, ou seja, que possuem pelo menos dois analisadores de massa. Tais equipamentos associam dois analisadores de massa em série e, por isso, a técnica é conhecida como MS/MS — por alusão à espectrometria de massa (MS, sigla em inglês para *mass spectrometry*) seguida de outra espectrometria de massa. Equipamentos típicos de MS/MS incluem espectrômetros de eletropulve-

rização com triplo quadrupolo ou com um quadrupolo e um analisador TOF (Q-TOF), equipamentos do tipo aprisionamento de íons (*ion trap*) e equipamentos com ionização do tipo MALDI com dois analisadores TOF (MALDI-TOF-TOF).

Nesse tipo de análise, uma amostra de peptídio puro ou mesmo uma mistura de peptídios obtidos por digestão enzimática é injetada no espectrômetro de massa. No caso mais complexo de mistura de peptídios, um peptídio de interesse é selecionado no 1º filtro de massa, introduzido e acelerado em uma câmara de colisão, onde existe uma corrente gasosa de um gás inerte, como nitrogênio ultrapuro. As colisões entre as moléculas do íon peptídico e do gás inerte provocam a fragmentação da cadeia polipeptídica. Esse fenômeno é chamado de dissociação induzida por colisão — CID, sigla em inglês para *collision induced dissociation*. As ligações mais lábeis são justamente as ligações peptídicas, seguidas pelas demais ligações da cadeia principal. Assim, um espectro dessa fragmentação é rico em informações de seqüência (Figura 2). Existe uma nomenclatura para descrever os diversos fragmentos peptídicos passíveis de serem obtidos por CID-MS/MS (Figura 3), que auxilia na interpretação dos espectros de MS/MS.

As vantagens do seqüenciamento por MS/MS em relação aos métodos químicos incluem a grande rapidez — um experimento de MS/MS pode ser feito em menos de 5 min, o mesmo trabalho em um seqüenciador automático pode demorar até dois dias —, o baixíssimo custo — enquanto o seqüenciamento químico utiliza diversos reagentes de alto custo, a técnica de MS/MS gasta praticamente somente nitrogênio — e a grande sensibilidade — seqüenciamento químico na ordem de picomol; MS/MS na ordem de femtomol. As desvantagens são a difícil interpretação dos espectros — os resultados não costumam ser tão claros como no seqüenciamento químico — e a grande dificuldade para se distinguir os aminoácidos isobáricos



**Figura 3** - Nomenclatura para descrever os diversos fragmentos peptídicos obtidos por CID. A figura mostra um tetrapeptídeo que pode ser clivado em 9 posições principais, podendo gerar 18 fragmentos diferentes, dependendo de que lado fica a carga positiva, uma vez que somente o fragmento carregado é detectado por espectrometria de massa. Quando, na fragmentação da cadeia polipeptídica, a carga positiva permanece no lado N-terminal da molécula, os íons são nomeados A<sub>n</sub>, B<sub>n</sub> e C<sub>n</sub>, dependendo se a quebra aconteceu nas ligações CH-CO, CO-NH ou NH-CH da cadeia principal, respectivamente, em que n é o número de cadeias laterais existentes no fragmento. De forma análoga, se a carga positiva permanecer na porção C-terminal da molécula os íons produzidos são designados por X<sub>n</sub>, Y<sub>n</sub> e Z<sub>n</sub>.

leucina e isoleucina. Aminoácidos que possuem massas molares muito próximas, tais como glutamina e lisina, fenilalanina e sulfóxido de metionina, bem como alguns aminoácidos e dipeptídios, ou mesmo dois dipeptídios, podem ser distinguidos em espectrômetros de massa mais precisos.

Atualmente, existem programas que selecionam automaticamente os peptídios de interesse para fragmentação, técnica chamada de CID dependente de dados (*data-dependent CID*), ou mesmo que permitem que todos os peptídios que entram no espectrômetro de massa sejam fragmentados ao mesmo tempo, método conhecido como multiplexação. Esses programas tornam o seqüenciamento por MS/MS completamente automatizável.

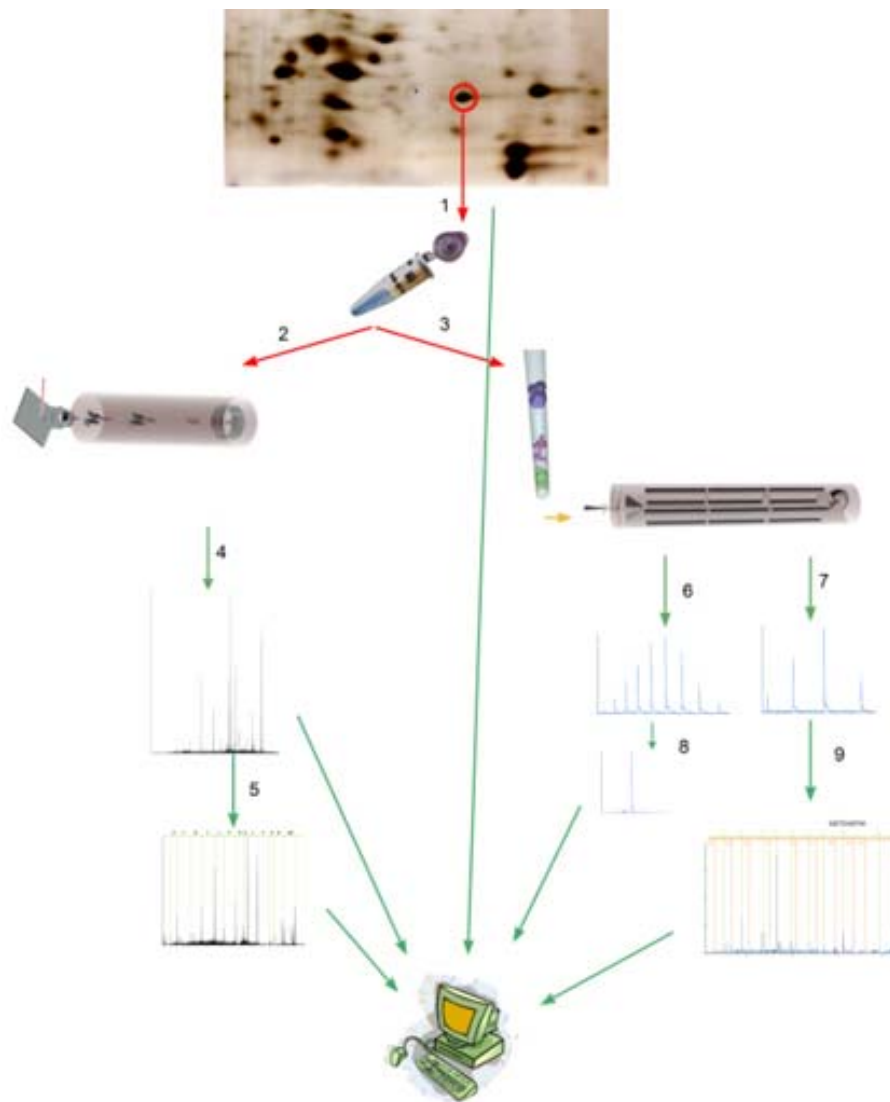
### Seqüenciamento de proteínas por espectrometria de massa usando o fenômeno do

### decaimento pós-fonte —*post-source decay (PSD)*

Na espectrometria de massa com ionização por dessorção a *laser* e análise por tempo de voo (MALDI-TOF), uma fração grande de íons do analito sofre deterioração durante o voo — *post-source decay (PSD)* — dentro do espectrômetro de massa, após o desligamento da fonte de *laser*. Dessa forma, o espectro obtido de peptídios de tamanho médio (até 2.800 u) é rico em informações de seqüência, apesar de o padrão de clivagem ser diferente daquele obtido por dissociação induzida por colisão. O mecanismo de ativação parece ser determinado por eventos de colisão entre os íons e as moléculas neutras, no campo de aceleração. Essa técnica de seqüenciamento ficou conhecida como PSD e só pode ser usada em equipamentos do tipo MALDI.

### Seqüenciamento escada

Uma estratégia alternativa de seqüenciamento é o chamado seqüenciamento escada (*ladder sequencing*), que consiste na formação de uma família de polipeptídios parcialmente fragmentados, cada um diferindo do próximo pela perda de um aminoácido. Esses peptídios-escada podem ser gerados por meio de métodos enzimáticos, como o uso de carboxipeptidases, ou químicos, como ácido clorídrico (HCl) diluído, ácido pentafluoropropiônico, ácido heptafluorobutírico ou mesmo a degradação de Edman, que utiliza a reação seletiva N-terminal com isotiocianato de fenila. A segunda etapa consiste na determinação precisa das massas dos vários polipeptídios degradados, por meio da espectrometria de massa. Essa mistura de peptídios pode ser analisada em conjunto, em uma única etapa, não necessitando ser separa-



**Figura 4** - Esquema geral para identificação de proteínas por espectrometria de massa. A partir de proteínas separadas por 2D-PAGE (eletroforese bidimensional) selecionam-se as manchas eletroforéticas de interesse e realizam-se a clivagem enzimática de tais proteínas (1). O digesto é submetido à análise por MALDI-TOF (2) para caracterização das massas dos peptídeos (4) e eventual fragmentação de algum peptídeo por PSD (5) ou análise por TOF-TOF para obtenção de fragmentos de seqüência (*sequence tags*). Outra alíquota do digesto pode ser submetida à cromatografia em fase reversa associada à espectrometria de massa por ESI (3), obtendo-se espectros com envelopes de cargas para peptídeos maiores (6), que podem ter a sua massa calculada por algoritmos de reconstrução (8), ou para peptídeos menores (7), que podem ser fragmentados por CID e ter sua seqüência determinada (9).

da previamente. Os aminoácidos em seqüência são identificados levando-se em conta a diferença de massa entre os sucessivos picos. As vantagens do seqüenciamento escada sobre os métodos químicos usuais são a rapidez — porque economiza uma corrida cromatográfica em cada ciclo — e o baixo custo por ciclo. As vantagens em relação a outros méto-

dos que utilizam espectrometria de massa incluem a maior facilidade na interpretação dos espectros e a extensão da seqüência, normalmente bastante superior no seqüenciamento escada. Essa técnica fornece melhores resultados em equipamentos do tipo MALDI, devendo-se evitar utilizá-la em equipamentos do tipo ESI, pois este produz uma família de

envelopes de carga, o que dificulta muito a interpretação dos resultados.

## Identificação de proteínas

A identificação de proteínas é um procedimento de capital importância na abordagem proteômica. Um dos procedimentos utilizados para identificar proteínas em bancos de seqüências sem a necessidade de seqüenciar a proteína em estudo é a chamada “impressão digital do mapa peptídico” (*peptide mass fingerprint*). Nesse método, é feita uma digestão enzimática ou química da proteína, *in vitro*, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídios obtidos. As massas molares desses fragmentos peptídicos são então comparadas com massas de peptídios provenientes de digestões teóricas, *in silico*, de proteínas depositadas em bancos de seqüências. A identificação é probabilística e a porcentagem de cobertura dos peptídios da amostra com relação à proteína pareada é um dos principais parâmetros de identificação (Figura 4).

Geralmente, o equipamento de escolha nesse caso é o MALDI-TOF. O método da impressão digital do mapa peptídico é praticamente infalível — e particularmente útil — na identificação de proteínas de espécies com genomas pequenos e completamente seqüenciados. Entretanto, o índice de insucesso na identificação aumenta à medida que se aumenta o número de registros confrontados no banco de dados utilizado na busca. Para proteínas isoladas de espécies cujo genoma não está seqüenciado, é necessário usar bancos de dados ampliados (sem restrição taxonômica). Nesse caso, é imperativo utilizar fragmentos de seqüência (*sequence tags*) para uma identificação mais confiável, geralmente obtidos em equipamentos do tipo MALDI-TOF-TOF.

## Mapeamento de interações moleculares

A palavra proteoma está normalmente associada ao conjunto de

proteínas expressas por um determinado tipo de célula em um determinado momento. Entretanto, esse conceito fornece apenas uma visão estática do processo biológico. De fato, as proteínas exercem suas funções como resultado de interações altamente dinâmicas com outras proteínas. A célula pode ser vista como uma série de “máquinas moleculares” interagindo umas com as outras. Essas máquinas moleculares são, na verdade, formadas por grandes complexos de proteínas. A modulação espacial e temporal dessas interações é o que efetivamente define as funções celulares, em termos moleculares. O número total de genes humanos não difere substancialmente do verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*, o que sugere que a complexidade fenotípica pode ser atribuída parcialmente à combinação contextual dos produtos genéticos e suas interações. A espectrometria de massa está sendo agora utilizada como uma ferramenta para explorar a dinâmica das interações entre proteínas.

Um método direto para estudar a interação proteína-proteína consiste na observação direta do complexo protéico por microscopia de força atômica e na determinação da constante de afinidade. Um método espectrométrico que vem ganhando prestígio nos últimos tempos é o chamado SELDI (sigla em inglês para *surface-enhanced laser desorption ionization*). Nele, a placa de MALDI é quimicamente modificada de forma a permitir a ligação de uma “molécula isca”, que agrupa em torno de si as proteínas que por ela têm afinidade, imobilizando-as também na placa. As proteínas não-ligantes são retiradas por lavagem da placa. A placa é então montada na fonte ionizadora de MALDI e as proteínas que interagiram com a “molécula isca” são analisadas por SELDI-TOF. Essa técnica tem sido sugerida para mapear epítomos de anticorpos, imobilizando-se o antígeno na placa de SELDI usando o anticorpo como “isca”. A proteína-alvo é então digerida e os peptídios que não estão ligados ao anticorpo são lavados. Os peptídios que formam o epítopo

podem então ser determinados por SELDI-TOF.

Um método alternativo para determinar interações protéicas é chamado espectrometria de massa de bioafinidade e consiste na análise direta do complexo em um espectrômetro de massa. Essa técnica parece estar ganhando espaço e se tornando uma ferramenta-padrão na determinação de interações proteína-proteína. Estudos recentes sugerem uma estratégia geral para a análise em larga escala de interações proteína-proteína usando a abordagem de co-precipitação/espectrometria de massa. Uma “etiqueta” de afinidade é expressa ligada diretamente a uma proteína-alvo. As proteínas-alvo são sistematicamente depositadas, juntamente com outras proteínas participantes do complexo protéico, em uma coluna de afinidade. O complexo é desfeito e as proteínas participantes do complexo são separadas por eletroforese em poliacrilamida — *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) — de uma dimensão. As proteínas são então extraídas do gel, digeridas com tripsina e identificadas por impressão digital do mapa peptídico (*peptide mass fingerprint*). A organização funcional do proteoma de uma levedura foi caracterizada usando tal método e 232 complexos multiprotéicos foram determinados, sugerindo novos papéis celulares para 344 proteínas.

## CONCLUSÕES

Enfim torna-se cada vez mais evidente a importância da espectrometria de massa em pesquisas envolvendo proteínas. No Brasil, apesar da existência de poucos pesquisadores que dominam a técnica, vários projetos encontram-se em desenvolvimento, permitindo um aprofundamento significativo em questões de interesse regionais e nacionais, como doença de Chagas, utilização de enzimas em processos industriais, peptídios biologicamente ativos, reprodução animal, pragas de lavouras, imunologia do trauma etc. A recém instalada Rede

Proteômica Nacional, que associa laboratórios em todo o País que trabalham com a abordagem proteômica, demandará de forma sistemática e crescente a utilização de espectrômetros de massa, cada vez mais precisos e versáteis. O parque instalado de equipamentos no Brasil já não pode ser considerado pequeno. Porém, o número de pesquisadores que utilizam, em algum momento de sua pesquisa, a espectrometria de massa de proteínas cresce de forma exponencial e, portanto, a oferta de equipamentos deve acompanhar essa demanda. De acordo com o estabelecido para a Rede Proteômica Nacional, laboratórios centrais, que já possuem equipamentos, pessoal treinado, programas de manutenção e experiência na área, fornecerão a infra-estrutura básica de equipamentos para os laboratórios-satélite, de forma que todos possam se beneficiar dos recursos existentes com o mínimo de desperdícios de insumos para o País.

## BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- Westermeier, R. & Naven, T. (2002) *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*, Ed. Wiley-VCH Verlag, Germany.
- Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1997) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Ed. Springer-Verlag, Germany.
- Simpson, R. J. (2003) *Proteins and Proteomics, a Laboratory Manual*, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Siuzdak, G. (1996) *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Ed. Academic Press, San Diego, USA.
- Sousa, M.V., Torres, F.A.G., Ricart, C.A.O., Fontes, W. & Silva, M.A.S. (2001) *Gestão da Vida? Genoma e Pós-Genoma*, Ed. Ao Livro Técnico, Rio de Janeiro, Brasil.