



**MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# **Electroforese Bidimensional no Cancro Colo-rectal em Hipóxia e Normóxia**

## **Optimização de Procedimento para MALDI-TOF/TOF**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Filomena Botelho (Universidade de Coimbra).

Miguel Quesado da Rocha

---

2012



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.



*“True science teaches, above all, to doubt and to be ignorant. “*

*Miguel de Unamuno*



## ***Agradecimentos***

*A conclusão da dissertação final de mestrado, marca o fim de mais uma etapa muito importante da minha vida e, como é próprio, devo lembrar e agradecer as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para que tudo chegasse a um bom termo:*

*À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela orientação, disponibilidade e dedicação demonstrados ao longo do desenvolvimento desta dissertação, pelas críticas e conselhos na revisão do manuscrito e principalmente pela partilha do conhecimento e experiência científica, amizade e confiança.*

*Às Mestres Margarida Abrantes e Mafalda Laranjo, o meu sincero obrigado por todo tempo dispendido, pela disponibilidade, boa disposição e principalmente paciência. Por serem mais que a minha base de aprendizagem e a minha referência, amigas genuinamente preocupadas com o bem-estar e camaradagem de todos os que de alguma forma cruzaram destinos no serviço de biofísica do IBILI.*

*À mestre Salomé Pires, um muito obrigado pela disponibilidade sempre demonstrada, principalmente na cultura de células. Também um exemplo de trabalho, dedicação e simpatia.*

*À Cláudia Caridade, aos mestres Casalta, Catarina, Ana Brito, Rita, Sara e Fernando por todo o apoio, cooperação e amizade.*

*À Daniela, à Licas, à Mónica, à Vanessa, ao Pedro, à Camila, à Laura, à Patrícia, ao Carlos e ao Marcos pelo companheirismo e boa disposição diárias.*

*Um especial agradecimento a Marta e a Rita por todas as refeições que me prepararam ao longo deste ano e claro, por todo o apoio, amizade e companhia.*

*Ao Doutor Bruno Manadas e ao grupo do CIIMAR e IPATIMUP que lecionaram o curso de proteómica do Porto, por toda a ajuda imprescindível prestada para a concretização deste projecto.*

*A todos os meus amigos, principalmente aos que me acompanharam diariamente ao longo destes últimos 5 anos: Alexandre Sousa, Miguel Amaral, João Martins, Ricardo Morgado e Rui Pinheiro.*

*À Natália por todo o apoio e paciência demonstrada principalmente pelas sextas em que deambolou por Coimbra enquanto esperava por mim.*

*E por último, o mais sentido vai claro para a minha família, principalmente para os meus pais, irmãos e para o pequeno Francisco. Que sempre me apoiaram e suportaram do início ao fim.*



***Resumo***



O carcinoma colo-rectal é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado nos homens e o segundo nas mulheres em todo o mundo. Em Portugal, é o segundo mais incidente, logo a seguir ao cancro da próstata nos homens e ao da mama nas mulheres. A hipóxia tumoral, estado de reduzida pressão parcial de oxigénio nos tecidos, constitui uma das principais causas de resistência ao tratamento anti-tumoral. Esta condição está fortemente associada à propagação, progressão maligna e à resistência terapêutica nos tumores sólidos malignos, tornando-o um indicador de um mau prognóstico. Assim, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos adaptativos das células tumorais a este tipo de microambiente.

O objectivo deste trabalho consiste na optimização de um método de separação de proteínas para desenvolvimento de um método não invasivo de diagnóstico da hipóxia tumoral que forneça a informação necessária para melhor compreender a resposta tumoral à hipóxia e estabelecer um plano de tratamento.

Inicialmente prepararam-se extractos de proteínas de três linhas celulares diferentes de carcinoma colo-rectal humano (WiDr, C2BBE1 e LS1034) em condições de hipóxia e normóxia. Posteriormente, recorrendo a técnicas de separação que sofreram um longo e complexo processo de optimização separaram-se as proteínas pela sua carga, através de focagens isoeléctricas e peso molecular por electroforeses bidimensionais (2D). A informação obtida com estas metodologias, permite traçar um perfil de expressão protéica de modo a estudar as características adaptativas das células à hipóxia. Os resultados sugerem que todo o processo até a obtenção dos *spots* que representam a expressão das proteínas está optimizado e ainda permite afirmar que de facto há uma resposta celular a este microambiente tumoral com diminuída pressão parcial de oxigénio. É ainda possível verificar através da análise de resultados,

que as linhas celulares provenientes do cólon (WiDr e C2BBe1) apresentam uma menor expressão de proteínas em ambientes de hipóxia e que a linha celular proveniente do ceco (LS1034) aumenta a expressão protéica sob as mesmas condições.

## ***Abstract***



Colorectal cancer is the third most commonly diagnosed cancer in men and the second in women worldwide. In Portugal, is the second most incident right after prostate cancer in men and breast in women. The tumor hypoxia state of reduced oxygen partial pressure in tissues is a major cause of resistance to anti-tumor treatment, which is strongly associated with cell proliferation, malignant progression and therapeutic resistance in malignant solid tumors, making it an indicator of poor prognosis. Therefore, it is extremely important to understand the adaptive mechanisms of tumor cells to this type of microenvironment.

The aim of this work is the optimization of a separating proteins method to develop a noninvasive tumor hypoxia diagnosis technique that provides important information to better understand the tumor response to hypoxia and establish a treatment plan. Initially were prepared proteins extracts from three different cell lines of human colorectal cancer (WiDr, C2BBe1 and LS1034) in normoxic and hypoxic conditions. Subsequently, by separation techniques that suffer a long and complex optimizing procedure, the proteins were separated by its charge, through isoelectric focusing and molecular weight by two dimensional electrophoresis (2DE). Information obtained with these methods, allows a profile of protein expression in order to study the adaptive characteristics of the cells to hypoxia. The results suggest that the entire process to obtain the spots representing the expression of proteins is completely optimized allowing the guarantee that in fact there is a cellular response to this tumor microenvironment poor in oxygen. It is also possible to see through the results that the cell lines from colon (WiDr and C2BBe1) have a lower expression of proteins in hypoxic environments and that the cell line from the cecum (LS1034) increases protein expression under the same conditions.



## ***Abreviaturas***



<b>ACN</b>	acetonitrilo
<b>Apaf-1</b>	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
<b>APC</b>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>ATP</b>	<i>adenosine triphosphate</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumine</i>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin dependent kinase</i>
<b>CHCA</b>	$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
<b>DCC</b>	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
<b>DHB</b>	ácido 2,5-dihidroxibenzóico
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribuncleic acid</i>
<b>DTT</b>	<i>Ditiotreitol</i>
<b>EI</b>	<i>Electron ionization</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>FT-ICR</b>	<i>Fourier transform ion cyclotron</i>
<b>HIF-1</b>	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid cromatography</i>
<b>IPG</b>	<i>immobilized pH gel</i>
<b>IV</b>	infravermelho
<b>KRAS</b>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>LDI</b>	<i>Laser desorption/ionization</i>
<b>MALDI</b>	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MAS</b>	<i>Accelarator mass spectrometry</i>
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i>

<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>Pg-P</b>	glicoproteína-P
<b>pI</b>	ponto isoelétrico
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinoditol 3-kinase</i>
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigénio
<b>PSD</b>	<i>Post source decay</i>
<b>QIT</b>	<i>Quadropole ion-trap</i>
<b>RIPA</b>	<i>Radio-Immunoprecipitation assay</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell park memorial institute</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfata</i>
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TOF</b>	<i>time-of-flight</i>
<b>u</b>	massa atómica unificada
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

## ***Índice de Figuras***



<b>Figura 1.</b> Representação da regulação do HIF sob condições de hipóxia e normóxia (Robinson, Baumgardner, & Otto, 2011). .....	45
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do papel do HIF-1 $\alpha$ e os seus produtos em tumores com regiões de hipóxia (Ke & Costa, 2006).....	47
<b>Figura 3.</b> Estrutura geral dos aminoácidos comuns, adaptado de (Angstadt et al., 2002).....	48
<b>Figura 4.</b> Esquema geral de funcionamento de um espectrómetro de massa (Gross, 2004). ....	52
<b>Figura 5.</b> Interação entre o feixe de laser, a matriz (Ma) e a amostra sólida (M), levando a formação de moléculas de analito protonadas (MH <sup>+</sup> ). .....	56
<b>Figura 6.</b> Esquema de um TOF linear (Flamini & Traldi, 2010). .....	63
<b>Figura 7.</b> Curva padrão elaborada para a quantificação de proteína pelo método de BCA. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.....	94
<b>Figura 8.</b> Curva padrão elaborada para a quantificação de proteína pelo 2-D Quant Kit GE Healthcare. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.....	95
<b>Figura 9.</b> PROTEAN <sup>®</sup> i12 <sup>™</sup> IEF Cell - célula de focagem.....	97
<b>Figura 10.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação I. Corado com Coomassie. ....	97
<b>Figura 11.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação II. Corado com Coomassie. ....	97
<b>Figura 12.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação II. Corado com prata. ....	98
<b>Figura 13.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação II. Corado com Sypro Ruby.....	98

<b>Figura 14.</b> Representação da evolução das tensões durante a focagem isoelectrica de três amostras de WiDr em condições de normóxia com o tampão de rehidratação II. ....	99
<b>Figura 15.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à lane 1 do gráfico da figura 13. ....	99
<b>Figura 16.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à lane 2 do gráfico da figura 13. ....	100
<b>Figura 17.</b> Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à lane 3 do gráfico da figura 13. ....	100
<b>Figura 18.</b> Representação da evolução das tensões durante a focagem isoelectrica de duas amostras de LS1034 em condições de normóxia – Lane 10 e hipóxia – Lane 11 com o tampão de rehidratação II. ....	100
<b>Figura 19.</b> Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de normóxia – Lane 10. Corado com prata. ....	101
<b>Figura 20.</b> Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia (2h) – Lane 11. Corado com prata. ....	101
<b>Figura 21.</b> Representação da evolução das tensões durante a focagem isoelectrica de duas amostras de C2BBe1 em condições de normóxia – lane 6 e hipóxia (2h) – lane 7. ....	101
<b>Figura 22.</b> Gel 2D da linha celular C2BBe1 correspondente à lane 6 em condições de normóxia. Corado com prata. ....	102
<b>Figura 23.</b> Gel 2D da linha celular C2BBe1 correspondente à lane 7 em condições de hipóxia (2h). Corado com prata. ....	102
<b>Figura 24.</b> Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de normóxia. Corado com prata. ....	103
<b>Figura 25.</b> Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia 2h. Corado com prata. ....	103
<b>Figura 26.</b> Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia 48h. Corado com prata. ....	103
<b>Figura 27.</b> Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de normóxia. Coloração com prata. ....	103

**Figura 28.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de hipóxia 2h. Coloração com prata.  
..... 103

**Figura 29.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de hipóxia 48h. Coloração com prata.  
..... 103

**Figura 30.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Corado com prata. .... 104

**Figura 31.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de hipóxia 2h. Corado com prata. .... 104



## ***Índice de tabelas***



<b>Tabela 1</b> – Representação de algumas matrizes e suas principais características. ....	60
<b>Tabela 2</b> Breve comparação de algumas características de analisadores de massa. ....	62
<b>Tabela 3.</b> Composição do tampão de rehidratação I. ....	82
<b>Tabela 4.</b> Composição do tampão de rehidratação II. ....	82
<b>Tabela 5.</b> Composição do tampão de equilíbrio. ....	84
<b>Tabela 6.</b> Resultados da quantificação de extractos de proteínas recorrendo ao <i>kit</i> BCA das três linhas celulares de carcinoma colorectal utilizando três tampões diferentes. ....	93
<b>Tabela 7.</b> Resultados da quantificação de extractos de proteínas recorrendo ao <i>2-D Quant kit GE Healthcare</i> das três linhas celulares de carcinoma colorectal. ....	95



## ***Índice***



## **I. Introdução**

1.	<i>Carcinoma colo-rectal</i> .....	38
2.	<i>Fisiopatologia da hipóxia</i> .....	40
2.1	Mecanismos adaptativos da célula à hipóxia.....	43
2.2	Alterações genómicas e proteómicas .....	45
3.	<i>Proteínas – propriedades e métodos de separação</i> .....	47
3.1	Carga e propriedades químicas dos aminoácidos e proteínas.....	48
3.2	Separação de Proteínas.....	49
4.	<i>Espectrometria de Massa</i> .....	51
4.1	Fontes de Ionização.....	54
4.1.1	MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) .....	55
4.1.2	Matrizes.....	59
4.2	Analísadores de Massa.....	61
4.2.1	TOF (Time-of-flight).....	62
4.3	Aplicações MALDI-TOF .....	64
4.3.1	Proteómica e Sequenciação de Proteínas.....	64
4.3.2	Identificação de Proteínas.....	66
II.	Objectivos.....	6
III.	Materiais e Métodos .....	7
1.	<i>Cultura de células</i> .....	75
2.	<i>Preparação dos extratos de proteínas</i> .....	77
2.1	Quantificação de Proteína – método de BCA.....	79
2.2	Quantificação de Proteína – 2-D Quant Kit GE Healthcare .....	80
3.	<i>Primeira dimensão – Focagem Isoeléctrica (IEF)</i> .....	80
3.1	Rehidratação das tiras de gel ( <i>strips</i> ):.....	81
3.1.1	Procedimento Experimental – Rehidratação das Strips.....	81
3.1.2	Procedimento Experimental – Focagem Isoeléctrica.....	83
4.	<i>Segunda Dimensão – SDS-PAGE</i> .....	84
4.1	Procedimento Experimental .....	85
5.	<i>Detecção de proteínas no géis 2-DE</i> .....	86
5.1	Procedimento Experimental .....	87
	Resultados.....	73
1.	<i>Preparação das amostras/Quantificação</i> .....	93
2.	<i>Focagem isoeléctrica – Rehidratação das strips</i> .....	96

3.	<i>Primeira Dimensão – Focagem Isoelétrica</i> .....	98
4.	<i>Segunda Dimensão – Electroforese bidimensional (2D)</i> .....	102
IV.	Discussão.....	<u>9105</u>
V.	Conclusão e Perspectivas Futuras.....	117
VI.	Bibliografia.....	121

## ***I. Introdução***



## **1. Carcinoma colo-rectal**

O cancro caracteriza-se como um crescimento e divisão descontrolados de uma população celular, ultrapassando os limites normais impostos pelo tecido envolvente. Para além do tecido de onde provém, estas células podem entrar na corrente sanguínea e linfática distribuir-se, localizar-se e dividir-se à distância com formação de novas colónias num processo designado por metastização (Dalerba et al., 2007).

O carcinoma colo-rectal é um dos tipos de tumor mais comum no mundo ocidental. É o carcinoma do aparelho digestivo com maior incidência a nível mundial e o segundo tipo de tumor responsável por maior taxa de mortalidade nos EUA (Kufe *et al.*, 2003). Em Portugal é líder como principal causa de morte por cancro (Fontelonga e Davide, 2009).

O carcinoma colo-rectal provém de um processo de alteração de várias fases ao nível do código genético, no entanto, também a dieta, o estilo de vida e outros factores ambientais, estão intimamente ligados ao risco deste tipo de cancro (Arnold *et al.*, 2005). Populações com uma dieta rica em gorduras, calorias, álcool e carne mas pobre em cálcio e folato tornam-se mais predispostas que populações com uma dieta pobre em gorduras e rica em fibras. O consumo de álcool e tabaco também se crê que são um factor etiológico relevante nesta patologia e, em 25% dos casos, há um histórico familiar associado à doença (de la Chapelle, 2004).

O carcinoma colo-rectal está associado a um processo evolutivo numa sequência de estadios, que vão desde pequenas lesões e pequenos tumores benignos (pólipos adenomatosos) até cancros malignos (carcinomas) mais ou menos avançados. Desta forma é possível caracterizar o cancro numa sequência de estadios, começando no

estadio 0 ou carcinoma in situ (TisN0M0), quando o tumor apenas afecta a mucosa do intestino, ao estadio IV, quando já existem metástases à distância (Watson, 2006).

O carcinoma colo-rectal tem origem nas células epiteliais do cólon ou recto do tracto gastrointestinal. Normalmente resulta de mutações na via de sinalização do Wnt que, artificialmente, aumentam a actividade de sinalização. As mutações podem ser hereditárias ou adquiridas e têm normalmente origem no gene APC-C (*adenomatous polyposis coli*) localizado no cromossoma 5, responsável pela produção da proteína APC (Calvert *et al.*, 2002). Esta proteína funciona como um “travão” à acumulação de  $\beta$ -catenina, ou seja, sem aquela proteína, a  $\beta$ -catenina acumula-se em níveis exagerados e transloca-se para dentro do núcleo da célula onde se vai ligar ao DNA. Este processo resulta na transcrição de genes normalmente importantes para a renovação e diferenciação de células estaminais que, inapropriadamente expressas, podem originar células tumorais. Para além da defeituosa via de sinalização Wnt-APC- $\beta$ -catenina, é necessário que ocorram outras mutações na célula para que esta se torne tumoral. A proteína p53, codificada pelo gene TP53, normalmente monitoriza a divisão celular e elimina células com defeito na via de sinalização Wnt (Suzuki *et al.*, 2010).

Existem outras proteínas apoptóticas como o TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) e a DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) que, por mutações genéticas ficam incapazes de exercer as suas funções. Em pelo menos metade dos casos de carcinoma colo-rectal foi detectada uma mutação que desactiva a TGF- $\beta$ . Vários estudos revelam ainda que em muitos outros casos em que a TGF- $\beta$  permanece impune a qualquer mutação, há uma proteína sua derivada, a SMAD, que desactivada, resulta no mesmo fim.

A DCC no carcinoma colo-rectal, normalmente, apresenta uma deleção no segmento do cromossoma que o codifica (Yang, Sales, Fuller, Seifalian, & Winslet, 2009).

O carcinoma colo-rectal pode ainda ser derivado da produção descontrolada de oncogenes (genes relacionados com o aparecimento de tumores malignos ou benignos). Por exemplo, os genes responsáveis por codificar proteínas como a KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e PI3K, (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), que normalmente estimulam a divisão celular em resposta a factores de crescimento, podem sofrer mutações que resultam numa exagerada proliferação celular. A ordem de acontecimentos também pode constituir um factor importante na progressão da lesão. Uma mutação primária na KRAS, normalmente apenas dá origem a uma hiperplasia limitada mas, se ocorrer após uma mutação da APC, geralmente progride para um tumor. Quanto a PI3K, em condições normais é inibida pela PTEN (um supressor tumoral) que por vezes é afectada e desactivada por uma mutação (Laurent-puig et al., 2009; Lie et al., 2008).

## **2. Fisiopatologia da hipóxia**

As trocas de gases, nutrientes e metabolitos através das paredes dos capilares, são processos essenciais para a sobrevivência e crescimento celular. O oxigénio constitui um elemento fundamental para que se mantenha a homeostase dos tecidos e a sua concentração é mantida numa gama muito restrita de valores, de modo a diminuir o risco de dano por hiperóxia (excesso de oxigénio) e por falha metabólica por oxigenação insuficiente (hipóxia) (Semenza, 2001).

Pode-se então definir hipóxia, como uma redução agressiva da pressão parcial de oxigénio ( $pO_2$ ) que caracteriza várias condições patofisiológicas, como é o caso da doença vascular isquémica, do enfarte do miocárdio, do acidente vascular cerebral, da insuficiência respiratória, assim como do cancro. A tolerância a níveis reduzidos de oxigénio difere consoante o tipo de célula e actividade metabólica subjacente, assim como aos mecanismos intrínsecos de adaptação do tecido (Chen, Cairns, Papandreou, Koong, & Denko, 2009).

A  $pO_2$  característica das células em hipóxia é inferior a 10mmHg, que provoca acidose metabólica, depleção de ATP e, conseqüentemente, quebra no fornecimento de energia. Na fosforilação oxidativa, maior fonte de produção de ATP, o valor da  $pO_2$ , medida *in vitro*, varia entre os 0,5 e os 10mmHg, dependendo do tipo de célula. O normal funcionamento do ciclo celular, também é afectada para valores de  $pO_2$  compreendidos entre os 0,2 e 1mmHg, podendo induzir alterações na transcrição, nos mecanismos pós-transcripcionais ou pós-translacionais. O resultado desta condição pode ser a proliferação maligna, a morte celular programada (apoptose), a diminuição do metabolismo anaeróbio, a angiogénese tumoral, a diferenciação celular e necrose (Hockel & Vaupel, 2001).

As células tumorais com diferentes níveis de hipóxia podem mostrar resistência às terapêuticas comuns, ao mesmo tempo que mantêm a capacidade de proliferar. Estudos clínicos e experimentais indicam que a hipóxia tem um papel fundamental em 50-60% dos tumores sólidos (Chan, Milosevic, & Bristow, 2007). A hipóxia nos tumores resulta de um desequilíbrio entre a taxa de consumo e o fornecimento de  $O_2$  às células, que pode comprometer as funções biológicas. É uma consequência patofisiológica de distúrbios da função e estrutura da microcirculação e de condições

de deterioração da difusão. O facto da hipóxia estar fortemente associada à propagação dos tumores, à progressão maligna e à resistência a terapia, torna-a um assunto central no tratamento e fisiologia do tumor (Hockel & Vaupel, 2001). Vários factores estão associados a origem da hipóxia, como é o caso da perfusão (hipóxia aguda), da difusão (hipóxia crónica) e da anemia (hipóxia anémica). Elevadas altitudes e doenças pulmonares também podem estar na origem da hipóxia (Hockel & Vaupel 2001; Vaupel & Harrison, 2004).

Nos tumores podemos encontrar três tipos de hipóxia distintos. A hipóxia crónica assim como a anóxia (ausência de  $O_2$ ) deriva do aumento das distâncias de difusão, resultantes da expansão tumoral, uma vez que a difusão limitada de  $O_2$  através do interstício tumoral dá origem a regiões de hipóxia para distâncias superiores a  $150\mu m$  dos vasos) (Chan et al., 2007). A hipóxia crónica também pode surgir pela deterioração da geometria de difusão, por exemplo, a favor da corrente vs. contra corrente na rede da microcirculação tumoral. Consoante o tumor aumenta em extensão, a hipóxia crónica desenvolve-se, de tal modo que o aporte sanguíneo é insuficiente para oxigenar toda a massa tumoral (Vaupel & Harrison, 2004a).

A hipóxia aguda, é caracterizada pela falta de vascularização tumoral, que provoca um aumento da pressão intratumoral e pode levar a mudanças intermitentes na corrente sanguínea, conduzindo a uma falta aguda de nutrientes e  $O_2$ . A microcirculação tumoral apresenta várias anomalias, como uma desorganizada rede vascular, dilatações, formas alongadas e tortuosas, falta de receptores físico/farmacológicos, delineação incompleta dos tumores, ausência de regulação de fluxo e estases intermitentes. A hipóxia aguda deve-se assim, a uma instabilidade

funcional vascular ou por compressão dos vasos sanguíneos, agravada pelo aumento da pressão do fluido intersticial (Shetty, Jeong, & Shim, 2012).

A hipóxia anémica é causada pela redução da capacidade de transporte de O<sub>2</sub> no sangue. Estudos experimentais demonstraram que o fornecimento de O<sub>2</sub> aos tumores é maioritariamente reduzido, sendo a hipóxia intensificada para níveis de hemoglobina abaixo dos 10-12g/dl. Isto acontece essencialmente em casos em que a baixa capacidade de transporte de O<sub>2</sub> coincide com as baixas taxas de perfusão (Vaupel & Harrison, 2004a). A microcirculação tumoral pode ainda ser perfundida transitoriamente apenas por plasma, o que leva à rápida indução de hipóxia pois, nestas condições, apenas uma pequena quantidade de células na zona arterial terminal é oxigenada de forma adequada (Vaupel & Harrison, 2004a).

A presença de um microambiente hipóxico no cancro está directamente relacionada com o aumento da invasibilidade tumoral, metastização e resistência à quimioterapia e radioterapia. É também um indicador de prognóstico pouco animador (Stewart et al., 2009).

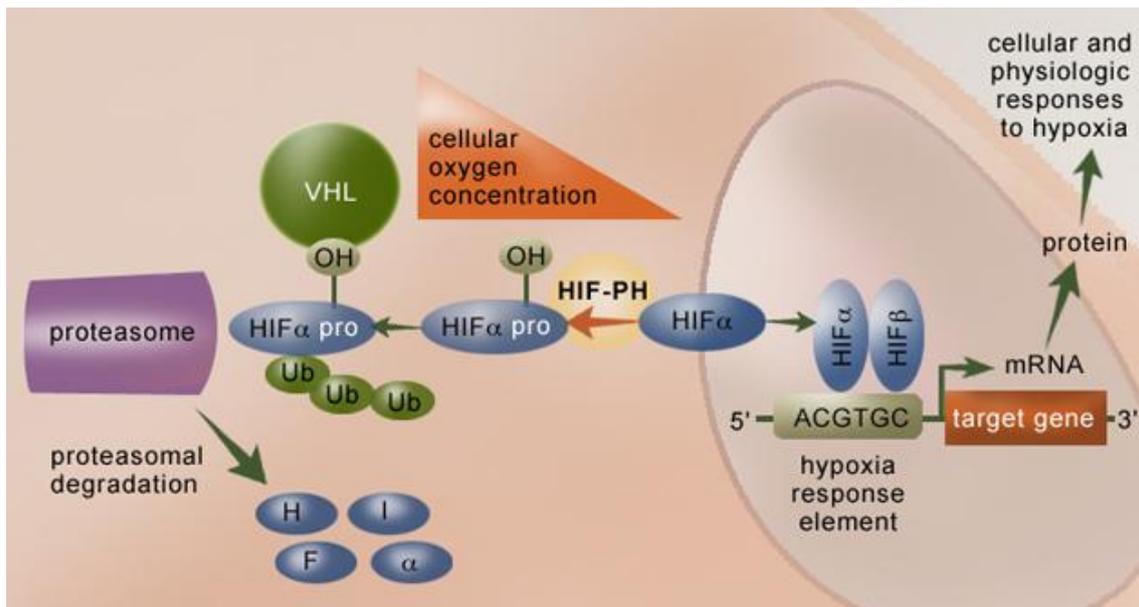
## **2.1 Mecanismos adaptativos da célula à hipóxia**

A homeostase do O<sub>2</sub> e o desenvolvimento de resposta à hipóxia é essencialmente regulado pelo factor de transcrição indutor de hipóxia-1 (HIF-1). Este factor é responsável por regular a expressão genética face à redução de pressão de O<sub>2</sub>. Os genes envolvidos neste mecanismo adaptativo são, por exemplo, o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), a maioria dos genes reguladores da via glicolítica (responsáveis pela adaptação metabólica à hipóxia) e os genes envolvidos na

manutenção do pH baixo (anidrase carbónica-IX). O HIF-1 é um factor de transcrição heterodimérico, constituído por uma subunidade HIF-1 $\beta$  e uma subunidade HIF-1 $\alpha$  (Hyseni & Groep, 2011).

O HIF-1 é regulado pela expressão dependente da pressão parcial de O<sub>2</sub> da subunidade alfa (HIF-1 $\alpha$ ). Em condições normais de oxigénio a proteína HIF-1 $\alpha$  apenas pode ser encontrada no mRNA do gene. Esta proteína tem papel fundamental nos mecanismos adaptativos das células oncológicas à hipóxia e a sua sobreexpressão está directamente ligada a mortalidade de doentes diagnosticados com tipos severos de cancro (Saramäki *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2010). Há outros estímulos capazes de regular o HIF-1 $\alpha$  para além da pressão parcial de O<sub>2</sub>, como os metais de transição, o óxido nítrico, o stresse mecânico e os factores de crescimento. Outra proteína estruturalmente relacionada com o HIF, é o HIF-2 $\alpha$  que também pode regular genes responsáveis pela indução de hipóxia. Ambas as proteínas são expressas em tumores, mas as suas diferenças funcionais, a sua distribuição tecidular e o papel que desempenham nos tumores humanos continua a ser objecto de estudo.

Em condições de normóxia, o HIF-1 $\alpha$  é degradado por proteossomas num processo denominado por ubiquitinação. Já em condições de hipóxia, esta proteína não interage com a proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (pVHL) e acumula-se na célula, possibilitando a dimerização do HIF-1 $\beta$ . Desta interacção resulta uma elevada regulação de vários factores angiogénicos, como é o caso do VEGF. A figura 1 representa a regulação do HIF sob estas duas condições (Marignol *et al.* 2008).



**Figura 1.** Representação da regulação do HIF sob condições de hipóxia e normóxia (Robinson, Baumgardner, & Otto, 2011).

A hipóxia pode influenciar de duas maneiras as células tumorais. Pode prejudicar o crescimento ou até causar a morte celular (a diminuição da proliferação pode levar as células à apoptose ou à necrose) ou então adoptar o papel inverso e promover a progressão maligna e a resistência à terapia. O aumento da progressão maligna e da resistência ao tratamento anti-cancerígeno manifesta-se através de alterações proteómicas e genómicas induzidas pela hipóxia no interior das células tumorais (Mcdermott & George, 2010).

## 2.2 Alterações genómicas e proteómicas

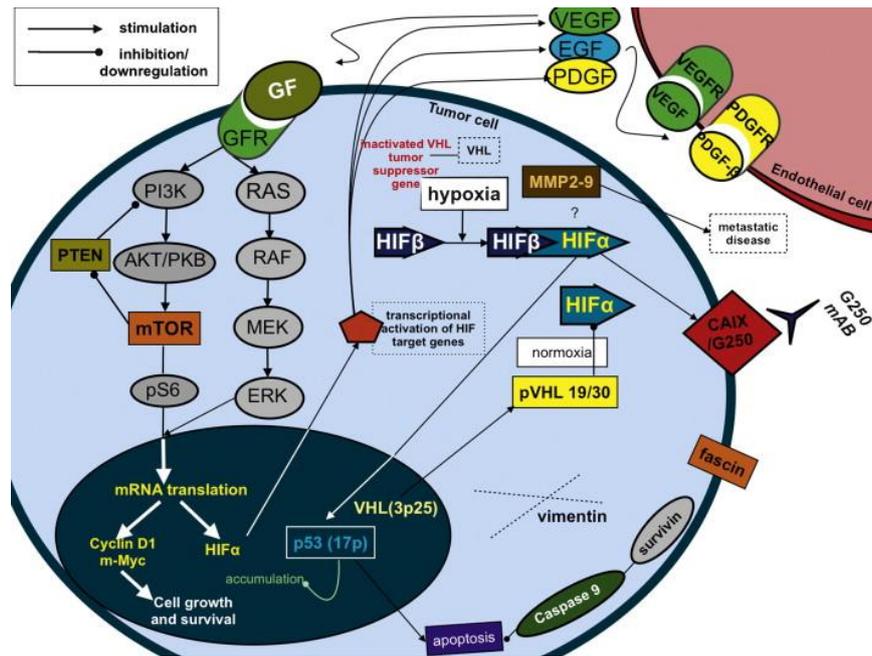
O desenvolvimento da agressividade tumoral, tem em conta as alterações proteómicas, assim como as mutações dos oncogenes e/ou genes supressores tumorais. Este estado caracterizado pela carência de oxigénio induz instabilidade genómica e aumenta a variabilidade genética, favorecendo as variações com

adaptação favorável à sobrevivência sob condições de hipóxia. Por exemplo, as variantes com baixa capacidade para induzir a apoptose ou que possuam elevado potencial angiogénico, prevalecem sob as que não estão adaptadas e que, tendencialmente, se expandem na selecção clonal. Esta relação directa entre a expansão de clones celulares com as mutações proteómicas e genómicas adaptativas, é o principal factor de agravamento do estado de hipóxia nos tumores uma vez que induz a progressão maligna e a metastização (Vaupel & Harrison, 2004a).

Vários estudos recentes indicam que o stresse hipóxico continuado ou intermitente induz alterações na expressão genética, que resulta em mudanças no proteoma das células tumorais. Estas, por sua vez, levam a um aumento da estase através de atrasos ou paragem no ciclo celular, diferenciação, apoptose ou necrose.

A paragem do ciclo celular, induzida pela hipóxia na fase G1/S pode ser efectuada pela mediação do HIF-1 $\alpha$  na activação de inibidores de cinases dependentes de ciclina (CDK), como a p21 e a p27. A p53 não parece ter qualquer papel neste tipo de resposta, contudo um aumento desta proteína, sob condições de hipóxia pode activar a apoptose através da Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) e da caspase-9 (*cyteine-rich aspartate proteases*) (Fonseca et al. 2004).

O factor de transcrição HIF-1 $\alpha$  é o maior responsável pela adaptação das células ao stresse causado pela hipóxia. Tem a capacidade de activar mais de 30 genes que expressam produtos envolvidos na distribuição de O<sub>2</sub> (como a eritropoetina), na angiogénese (como o VEGF), na preservação de energia (como os transportadores de glicose – GLUTs) e noutras funções fundamentais para a sobrevivência, proliferação e metastização das células tumorais, tal como está representado na figura 2 (Goda et al., 2003).



**Figura 2** Representação esquemática do papel do HIF-1 $\alpha$  e os seus produtos em tumores com regiões de hipóxia (Ke & Costa, 2006).

### 3. Proteínas – propriedades e métodos de separação

As proteínas têm a seu cargo, uma variedade surpreendente de funções essenciais ao organismo humano. São responsáveis por funções dinâmicas como a catálise de transformações químicas, transporte de oxigénio e nutrientes, controlo metabólico e até contracção muscular (Jones & Thornton, 1996).

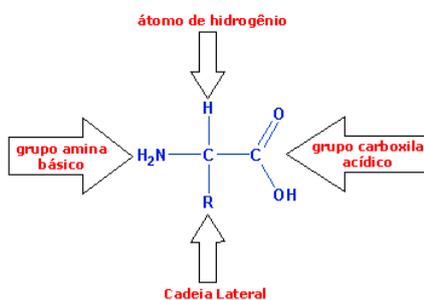
Uma classe importante de proteínas dinâmicas, são as enzimas que catalizam reacções químicas, convertendo um substrato num produto no sítio activo da enzima. Quase todas as milhares de reacções químicas no organismo humano requerem uma enzima específica catalizadora. Numerosas características genéticas são expressas através da síntese de enzimas, que catalizam reacções que estabelecem o fenótipo. Muitas doenças genéticas, resultam da produção descontrolada de enzimas ou de uma

alteração específica da sua sequência de aminoácidos (Mildvan, 1997). O transporte é outra das funções desempenhadas pelas proteínas. A hemoglobina e a mioglobina são exemplos uma vez que transportam oxigénio no sangue e músculos respectivamente (Gardner, 2005). As funcionalidades são inúmeras, muitas hormonas são proteínas ou péptidos, como a insulina, outras participam na contração muscular, como a miosina e a actina e até na defesa do organismo encontramos proteínas como as imunoglobulinas e interferão que protegem o corpo contra infecções bacterianas e virais.

O entendimento do funcionamento normal e das patologias nos organismos requer um entendimento claro das propriedades das proteínas (Angstadt et al., 2002).

### 3.1 Carga e propriedades químicas dos aminoácidos e proteínas

Os aminoácidos tem uma estrutura geral que os caracteriza, como a que está representada na figura 3.



**Figura 3.** Estrutura geral dos aminoácidos comuns, adaptado de (Angstadt et al., 2002).

Em comum, todos têm no centro um átomo de carbono (C), que se liga um grupo ácido carboxílico, um grupo amina e um átomo de hidrogénio covalentemente ligado. O átomo de carbono está ainda ligado a um grupo químico específico, designado por R e denominado por cadeia lateral que define especificamente cada um dos 20 aminoácidos. A figura 3, retrata a forma ionizada de um aminoácido comum numa solução de pH 7.

Os grupos carboxílicos e amínicos, conferem características básicas ou ácidas, consoante o pH do meio e sua ionização. A dissociação protónica de um ácido é caracterizada por uma constante de dissociação ( $K'_a$ ) e o seu valor de  $pK'_a$ :

$$pK'_a = \log_{10} \left( \frac{1}{K'_a} \right)$$

Os aminoácidos cujo grupo R contém átomos de nitrogénio (lisina e arginina) são os básicos, uma vez que apresentam valores de  $pK'_a$  relativamente altos e funcionam como bases a pH fisiológico. Enquanto que os aminoácidos cujas cadeias laterais contém um grupo ácido carboxílico têm um valor de  $pK'_a$  relativamente baixo e são considerados aminoácidos ácidos. Em pH fisiológico estão negativamente carregadas e predominantemente na sua forma desprotonada (Angstadt et al., 2002).

### **3.2 Separação de Proteínas**

A separação de proteínas pode-se realizar consoante a sua carga, peso molecular ou afinidade com um substrato.

Relativamente à separação pela carga, existem métodos como a electroforese, que consiste na dissolução das proteínas numa solução tampão e na indução de corrente. Consoante a relação do pH do tampão com o pI (ponto isoeléctrico) da

proteína, esta move-se através do cátodo ou do ânodo ou permanece estacionária ( $\text{pH} = \text{pI}$ ). Para tal, recorre-se a géis polimerizados (por exemplo, de poliacrilamida) ou papel. Uma amostra de proteína é administrada, aplica-se um campo eléctrico e as proteínas carregadas migram em direcção ao pólo oposto (Lord, 2003).

Uma técnica electroforética com grande resolução, é a focagem isoeléctrica, onde um intervalo definido de valores de  $\text{pI}$  é utilizado para estabelecer um gradiente de  $\text{pH}$  através de um campo eléctrico aplicado. As proteínas carregadas migram pelo gradiente até atingir uma região de  $\text{pH}$  igual ao seu valor de  $\text{pI}$  permanecendo estacionárias (Slebos et al., 2008).

Outro método utilizado na separação de proteínas pela carga é a cromatografia por troca iónica que recorre a resinas que consistem em materiais insolúveis (como a agarose, poliacrilamida, celulose e vidro) com grupos carregados. A separação é conseguida através da interacção das proteínas com as resinas de forma isocrática ou por aplicação de gradiente (Angstadt et al., 2002).

Para além destas a electroforese capilar é também uma técnica capaz de separar com eficiência as proteínas. Basicamente, um longo tubo capilar é preenchido com meio de electroforese, a amostra é injectada numa banda estreita perto do ânodo e as proteínas separam-se pela sua mobilidade em direcção ao polo negativo (Jiang et al., 2003).

Tal como foi referido, a separação de proteínas também se pode fazer por peso molecular. A electroforese em gel de poliacrilamida e na presença de um detergente é uma das técnicas conhecidas. Esta técnica consiste na adição de um detergente comum, o SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) a um gel de poliacrilamida. Este detergente, permite a estabilização das proteínas na sua forma desnaturada formando um micela

em volta de toda a cadeia polipéptidica. A carga inerente aos polipeptídeos é conferida pelas negativamente carregadas moléculas do SDS. As proteínas negativamente carregadas começam assim a migrar pelo gel de poliacrilamida em direcção ao ânodo. A poliacrilamida actua como uma rede molecular e as proteínas são separadas consoante o seu tamanho. As proteínas maiores ficam então retidas mais cedo e as mais leves ficam depositadas no fundo do gel. Existem outras técnicas que permitem a separação das proteínas pelo peso molecular, como a ultracentrifugação que basicamente consiste na aplicação de uma força centrífuga que move as proteínas na direcção da força a uma velocidade dependente da sua massa. Através de um sistema óptico apropriado é possível detectar a velocidade e obter o coeficiente de sedimentação que consiste numa medida qualitativa da massa molecular (Angstadt et al., 2002).

Outra técnica bem conhecida, é o HPLC ( do inglês *high-performance liquid chromatography*), que recorre a diferentes tipos de fases estacionárias em colunas, uma bomba que actua sobre a fase móvel e os componentes da amostra, um detector capaz de fornecer tempos de retenção dos componentes da amostra e as contagens da área que reflectem a quantidade de cada analito que passa através do detector (Angstadt et al., 2002).

#### **4. Espectrometria de Massa**

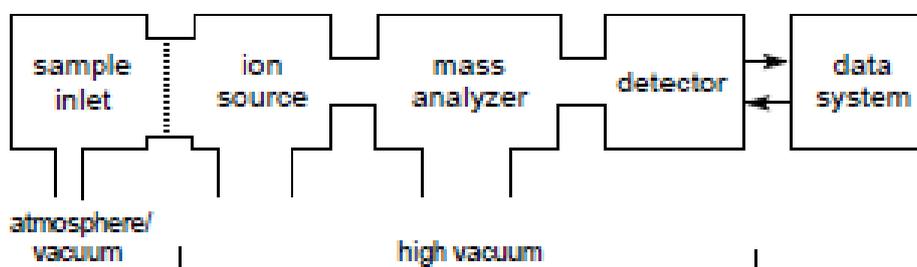
Nas últimas duas décadas, a espectrometria de massa tornou-se uma das técnicas mais preponderantes na química analítica e na análise de (macro)moléculas biológicas. Assumiu uma relevância comparável às mais tradicionais técnicas de

electroforese e técnicas de separação líquida, na identificação de compostos (Williams & Burinsky, 2001).

O espectrómetro de massa permite ao seu utilizador determinar a massa molar de compostos electricamente carregados ou iões previamente formados. Estes iões são seleccionados de acordo com a razão massa-carga ( $m/z$ ), sendo  $m$  a massa em u (massa atómica unificada), definida como 1/12 da massa de um átomo do isótopo  $^{12}\text{C}$ , o qual foi designado como 12 u por convenção (Moraes et al., 2003; Gross, 2004).

Esta evolução foi despoletada pela descoberta de novas técnicas que geram iões estáveis provenientes das moléculas de interesse e ao desenvolvimento associado a essas fontes de iões.

Na figura 3, está representado um diagrama da funcionalidade básica de um espectrómetro de massas.



**Figura 4** Esquema geral de funcionamento de um espectrómetro de massa (Gross, 2004).

Como se verifica no esquema da figura 4, a análise de um composto obedece a alguns passos: a introdução da amostra, a ionização das moléculas, a passagem por um analisador de massa que separa os iões formados de acordo com a razão  $m/z$  e um detector que capta os iões e transforma o sinal em corrente eléctrica onde a magnitude do sinal eléctrico em função da  $m/z$  é convertida por um processador de dados e dá origem a um espectro de massa correspondente (Schiller et al., 2004; Yergey et al., 2002).

Para que a técnica seja devidamente executada, é necessário obedecer a dois requisitos básicos. As moléculas, que normalmente se encontram em estado líquido ou em estado sólido condensado, têm impreterivelmente de passar para a fase gasosa. Uma vez neste estado, o gás é transferido para o vácuo de um analisador de massa; em segundo, as moléculas neutras têm de adquirir carga para migrarem e serem detectadas pelo analisador de massa (Schiller et al., 2004; Yergey et al., 2002).

Há duas técnicas que se encontram na linha da frente da espectrometria de massa, ESI – *Electrospray Ionization* e MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*. Ambas as técnicas resolveram o problema da passagem da forma condensada para a fase gasosa e ambas ionizam as amostras, mas de modos completamente diferentes. Apesar de partilharem o mesmo propósito e de serem simultaneamente criadas em 1988, o seu desenvolvimento foi independente (Banerjee & Mazumdar, 2012; Blaum, 2006; El-aneed, Cohen, & Banoub, 2009).

A base da estrutura macromolecular e da função dos sistemas biológicos, o papel do DNA e proteínas em particular, sofreu uma grande evolução nos últimos 30 anos. Tornou-se claro que para desvendar os detalhes da sua estrutura, era necessário um desenvolvimento acentuado de uma técnica analítica mais sensível e específica. A espectrometria de massa veio colmatar essa lacuna e marcar um grande e importante passo na análise de macromoléculas. É também importante referir, que tanto o ESI como o MALDI são provenientes de princípios desenvolvidos *a priori*, como o campo de desorção e a desorção por feixes de partículas, bem como a ionização química na fase gasosa. Os novos mecanismos de ionização recuperaram alguns princípios de análise de massa tais como o *time-of-flight* (TOF), que tinha sido desacreditado dado o seu baixo desempenho. Mais recentemente uma infinidade de espectrómetros de

massa têm sido comercializados, para além dos TOF (*Time-of-flight*), há os espectrómetros QIT (*Quadrupole Ion-Trap*), os FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron*), espectrómetros *orbitrap*, entre outros (Blaum, 2006; El-aneed et al., 2009).

As técnicas avançadas em espectrometria de massas diferem principalmente no modo de ionização das amostras. É nesse aspecto que o MALDI e o ESI se distinguem, comparativamente com as técnicas mais clássicas, como o EI (*electron ionization*). Ao contrário desta, as novas técnicas dispõem do que é necessário para uma análise e identificação rotineira de proteínas, peptídeos ou açúcares (Banerjee & Mazumdar, 2012; El-aneed et al., 2009).

#### **4.1 Fontes de Ionização**

O surgimento de novas técnicas de ionização a partir da década de 80, despoletou uma revolução na análise e identificação de macromoléculas. A ionização por ESI-MS (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) e a ionização por MALDI-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*) estendeu a espectrometria de massa a quase todos os tipos de moléculas. Ambas as técnicas possuem a particularidade de utilizarem fontes brandas de ionização, possibilitando a formação de iões de baixa energia e, conseqüentemente, permitem a ionização de moléculas de baixa massa molecular até biomoléculas com massas acima de 1 milhão de Daltons (El-aneed et al., 2009; Gogichaeva, Williams, & Alterman, 2007).

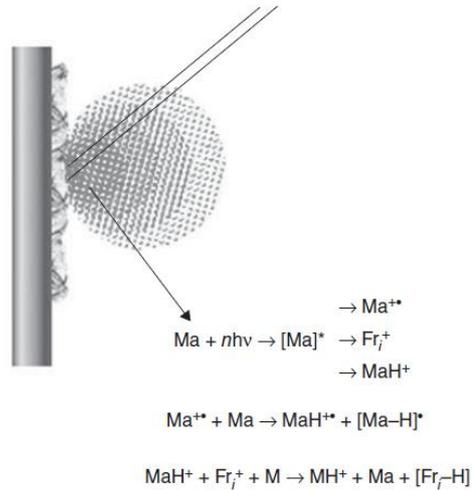
O MALDI foi desenvolvido por Michael Karas, Franz Hillenkamp e seus colaboradores em 1985. Pela mesma altura Tanaka, John Fenn e seus colaboradores introduziram o ESI que lhes valeu o Nobel da Química em 2002. A atribuição do Nobel

a estes investigadores gerou uma grande controvérsia. Apesar de serem os primeiros a ionizar grandes biomoléculas em estado sólido ou viscoso, a sua técnica raramente foi empregue. Muitos consideram injusto a atribuição de tão distinto título, admitindo que Karas e Hillenkamp seriam os verdadeiros merecedores. A inclusão de uma matriz orgânica tornou o seu método muito mais sensível e com melhores resultados e por isso mesmo, o MALDI é actualmente a fonte de ionização para espectrometria por excelência (El-aneid et al., 2009).

#### **4.1.1 MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**

O princípio do MALDI é um caso especial de LDI (Laser Desorption/Ionization) em que se emprega um tipo particular de preparação da amostra. De um modo geral, as amostras para MALDI-MS consistem em moléculas diluídas, incorporadas numa matriz (geralmente um ácido orgânico) absorvente de luz, de baixa massa molecular. As moléculas da matriz são ressonantemente excitadas por um pulso de laser com comprimento de onda próximo do ultravioleta (UV) e, conseqüentemente, um determinado volume da matriz e as moléculas do analito passam para o estado gasoso altamente energético criado pela excitação electrónica das moléculas da matriz ao absorver a energia do laser. A matriz tem um máximo de absorção perto do comprimento de onda do IV (infravermelho).

A ionização ocorre através da transferência de carga das moléculas da matriz para o composto, que fica na forma de  $MH^+$ , como é demonstrado na figura 5 (Flamini & Traldi, 2010).



**Figura 5** Interação entre o feixe de laser, a matriz (Ma) e a amostra sólida (M), levando a formação de moléculas de analito protonadas (MH<sup>+</sup>).

Os iões formados são impulsionados para o analisador de massas *time-of-flight* (TOF). Utilizando como referência a distância, os iões são separados consoante o tempo que demoram a atingir o detector. A energia potencial de uma partícula carregada num campo eléctrico está relacionada com a carga da partícula e com a força do campo eléctrico:

$$E_p = zU \quad (1)$$

onde  $E_p$  corresponde à energia potencial,  $z$  é a carga da partícula e  $U$  é a diferença de potencial eléctrico.

Quando a partícula carregada é acelerada no tubo TOF, a sua energia potencial é convertida em energia cinética:

$$E_k = \frac{1}{2} mv^2 \quad (2)$$

Como a energia potencial é convertida em energia cinética, podem-se igualar as equações (1) e (2):

$$E_p = E_k \quad (3)$$

$$zU = \frac{1}{2} mv^2 \quad (4)$$

A velocidade  $v$  da partícula carregada após acelerada não irá sofrer qualquer alteração uma vez que se move num tubo de TOF livre de campo. A sua velocidade pode ser calculada desde que se conheça a distância ( $d$ ) de vôo do ião e o tempo ( $t$ ) pode ser medido através de um conversor.

Sendo assim:

$$v = \frac{d}{t} \quad (5)$$

Substituindo o valor de  $v$  na (5) em (4):

$$zU = \frac{1}{2} m \left( \frac{d}{t} \right)^2 \quad (6)$$

Colocando a equação em função do tempo  $t$ , ficamos com:

$$t = \frac{d}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (7)$$

Como os factores  $\frac{d}{\sqrt{2U}}$ , em princípio, não se alteram quando um grupo de iões é analisado, podemos simplificar para:

$$t = k \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (8)$$

onde  $k$  corresponde a uma constante que representa factores relacionados com as definições e características do instrumento. Podemos verificar em (8), de forma simplificada, como o TOF dos iões varia apenas consoante a razão massa-carga ( $m/z$ ) (Flamini & Traldi, 2010).

Uma das características do MALDI-MS que o tornam tão promissor na análise de amostras biológicas, é a sua capacidade de detectar biomoléculas em misturas complexas com uma concentração relativamente alta de sais, soluções tampão e outras espécies. Esta característica confere-lhe a capacidade de estudar proteínas e

peptídeos no soro, no líquido cefalo-raquídeo, no sangue, em extractos de tecidos e em linhas celulares. Contudo, as contaminações das amostras muitas vezes interferem na cristalização da matriz/analito e origina o alargamento dos picos por fragmentação e formação de aductos, reduzindo a sensibilidade e a precisão dos resultados.

A introdução dos métodos de ionização MALDI, no final da década de 80 causou uma verdadeira revolução na espectrometria de massa tal como já havia referido. Actualmente, recorre-se a esta técnica na análise de polímeros sintéticos, complexos organometálicos e compostos orgânicos de interesse ambiental. No entanto, a maior expansão ocorreu na bioquímica, na biologia molecular, na petroquímica e vem até crescendo na área dos alimentos (Yates, 2001).

A grande adesão a esta técnica em tão diversas áreas deve-se a algumas características da técnica que a tornam tão útil, desejada e única. Uma dessas características é detectabilidade de quantidades ínfimas de compostos. Há registos que mostram que apenas é necessário 42 zeptomoles ( $10^{-21}$  moles que corresponde aproximadamente a 25000 moléculas) de peptídeos para serem detectados por MS. Outra característica é que é necessário um reduzido volume de amostra. O MALDI pode utilizar apenas 50 nanolitros de amostra para ser analisada, ainda menos que o exigido para ESI, que necessita de cerca de  $1\mu\text{L}$ . Fornece ainda a possibilidade de interfaceamento com técnicas de separação. Os excelentes resultados obtidos através do MALDI devem-se muito ao seu acoplamento a outras técnicas. Por exemplo, na análise do proteoma, é necessário alguns procedimentos de alto desempenho, como a separação protéica por electroforese bidimensional (2D) para que milhares de proteínas sejam analisadas numa única experiência. Isto exige qualidade em todas as fases do processo (separação, quantificação, digestão e identificação) para se obterem

conclusões. Outra característica é o reduzido tempo de análise, o que é uma das grandes vantagens do MALDI, pois são necessários poucos segundos para analisar uma amostra. Esta particularidade é um factor muito importante na realização de projectos em grande escala, como os estudos do proteoma, onde é necessário identificar um grande número de proteínas (Dass, 2007).

#### **4.1.2 Matrizes**

A matriz é a chave do funcionamento do MALDI e o principal factor de distinção para com as outras técnicas de espectrometria de massa. A maioria das matrizes desenvolvidas são de baixa massa molecular, como é o caso do ácido sinápico.

Uma matriz de MALDI tem de obedecer a dois propósitos principais. Em primeiro lugar, é necessário que seja capaz de absorver a energia dos fotões provenientes do laser e ser capaz de a transferir como energia de excitação para o sistema. Em segundo lugar, funciona como solvente da amostra, reduzindo as forças intermoleculares e impedindo a agregação das moléculas do analito. Há quatro características desejáveis e que uma matriz deve possuir para se obter resultados fidedignos, nomeadamente, forte poder de absorção de radiação no comprimento de onda do laser, boa compatibilidade com o analito, baixa temperatura de sublimação para que instantaneamente se crie uma pressão alta na pluma durante a emissão do pulso de laser e que seja capaz de participar numa reacção fotoquímica que permite que as moléculas da amostra sejam protonadas ou desprotonadas com alta eficiência.

Para uma optimização de resultados, a matriz é escolhida consoante os compostos que serão analisados de acordo com a tabela seguinte (Gross, 2004).

Tabela 1 – Representação de algumas matrizes e suas principais características.

<i>Matriz</i>	<i>Massa (Da)</i>	<i>Solventes</i>	<i>Laser <math>\lambda</math> (nm)</i>	<i>Aplicações</i>
<b>Ácido 3-amino-4-hidroxibenzoico</b>	153	ACN, água	337	Oligossacarídeos
<b>Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB)</b>	154	ACN, água, metanol, acetona, clorofórmio	337	Oligossacarídeos, péptidos, nucleótidos, oligonucleótidos
<b>Ácido 5-hidroxi-2-metoxibenzoico</b>	168	ACN, água	226, 337	Lípidos
<b>Ácido 2[4-hidroxifenilazo] benzoico (HABA)</b>	242	ACN, água, metanol	266, 337	Proteínas, lípidos
<b>Ácido cinâmico</b>	148	ACN, água	337, 355	Péptidos, lípidos e nucleótidos
<b>Ácido <math>\alpha</math>-ciano-4-hidroxicinâmico</b>	189	ACN, água, etanol, acetona	337, 355	Péptidos, lípidos, nucleótidos
<b>2,6-dihidroxiacetofenona</b>	152	ACN, água	337, 355	Proteínas, oligonucleótidos

Nota: ACN - acetonitrilo

As três categorias de matrizes encontradas até ao momento capazes de serem aplicadas na análise de vários tipos de moléculas por MALDI, incluem as matrizes orgânicas sólidas, os líquidos iônicos e os materiais inorgânicos. As primeiras são as mais comuns e possuem um anel aromático capaz de absorver luz. Entre estas, o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e o ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) são os mais versáteis. Uma vasta gama de compostos pode ser analisada com estas duas matrizes. O maior problema em recorrer a matrizes orgânicas no estado sólido é a distribuição heterogênea das moléculas do analito e da matriz após a evaporação do solvente da matriz. Esta heterogeneidade pode dar origem a variações no sinal do analito (Jaskolla, Lehmann, & Karas, 2008).

Os líquidos iônicos são formados por uma mistura equimolar de uma matriz sólida tradicional, como a CHCA e a DHB, com uma base orgânica (como por exemplo, a butilamina). Estes pares catião/anião permitem uma preparação homogênea da amostra, aumentando a reprodutibilidade e a intensidade do sinal (Carolina, 2008).

Um progresso semelhante ocorreu com a utilização de materiais inorgânicos como alguns metais (cobre, cobalto, alumínio, manganês e tungsténio), óxidos de metais e grafite. Estes materiais são dispersos num líquido não volátil (como o glicerol ou líquido de parafina). A grafite, o carbono activo, os nanotubos de carbono, os fulerenos e a sílica texturizada também podem ser utilizadas como matrizes de MALDI (Kinumi, Saisu, Takayama, & Niwa, 2000).

Para o desenvolvimento de novos compostos que possam funcionar como matrizes aplica-se o método de tentativa e erro, e as propriedades que distinguem as bem sucedidas das outras continua a ser algo obscuro. Resumidamente, a matriz tem de ser capaz de absorver determinados comprimentos de onda e de rapidamente passar para a fase gasosa. Para além disso, é conveniente que seja capaz de ionizar as moléculas da amostra incorporadas sem que as aqueça de mais. Também é importante que a matriz seja suficientemente estável para que ao ponto de não se evaporar quando está sob condições de vácuo. Outro factor muito importante na obtenção de espectros de MALDI é a concentração relativa da amostra incorporada na matriz e, como vários utilizadores desta técnica afirmaram, é imprescindível procurar bons *spots* na amostra (Crank, 2009).

## **4.2 Analisadores de Massa**

Um analisador de massa é um aparelho capaz de separar espécies, como átomos, moléculas ou aglomerados, de acordo com a sua massa. A separação deve ser independente da conformação química das espécies. Todos os analisadores de massa actualmente em uso têm como princípio base o electromagnetismo o que os torna

dependentes da aceleração de iões para obter a separação. É por isso necessário o seu acoplamento a uma fonte de iões como já foi referido anteriormente. Posto isto, o analisador separa os iões provindos da sua fonte de acordo com a sua  $m/z$ . São vários os analisadores de massa recorrentemente utilizados em espectrometria de massa. O TOF é o mais comum, no entanto são conhecidos outros como o filtrador de massa quadrupolo (Q), o QIT (*Quadrupole Ion-trap*), os espectrómetros *orbitrap*, os FT ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron*) e ainda a técnica AMS (*Accelerator Mass Spectrometry*). A tabela seguinte, contém uma breve descrição das características principais de cada analisador (Desiderio & Nibbering, 2009).

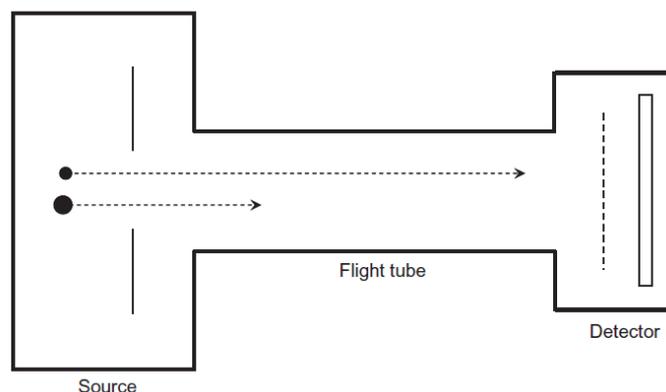
**Tabela 2** Breve comparação de algumas características de analisadores de massa.

<b>Analisador</b>	<b>TOF</b>	<b>Sector</b>	<b>Q filter</b>	<b>QIT</b>	<b>Orbitrap</b>	<b>FTICR</b>	<b>Acelerador</b>
<b>Resolução</b>	Alta	Muito alta	Média	Alta	Muito alta	Muito alta	Muito alta
<b>Precisão</b>	Alta	Muito alta	Baixa	Média	Muito alta	Muito alta	Muito alta
<b>Variação <math>m/z</math></b>	Muito alta	Média	Baixa	Média	Baixa	Média	Muito baixa
<b>Sensibilidade</b>	Alta	Alta	Alta	Alta	Média	Média	Alta
<b>Velocidade</b>	Rápido	Lento	Média	Média	Média	Média	Lento
<b>Fonte de iões</b>	Pulsada/ contínua	Contínua	Contínua	Pulsada/ contínua	Pulsada/ Contínua	Pulsada/ contínua	Contínua
<b>Manuseio</b>	Fácil	Média exigência	Fácil	Fácil	Média exigência	Exigente	Muito exigente

#### 4.2.1 TOF (Time-of-flight)

Um analisador de massa TOF, separa os iões de acordo com a diferença de tempo entre o sinal de partida e o pulso gerado quando o ião atinge o detector, isto é, o tempo de voo.

O princípio do analisador TOF foi pela primeira vez publicado por Stephens em 1964. Um esquema representativo é mostrado na figura seguinte.



**Figura 6** Esquema de um TOF linear (Flamini & Traldi, 2010).

Antes de mais, para que a técnica seja bem aplicada, é necessário definir correctamente o sinal de partida. Os analisadores TOF estão bem preparados para se adaptarem as fontes de iões pulsadas como o MALDI. Os iões criados directamente na fase gasosa, são utilizados como ponto de partida para a medição do tempo de vô. A placa da amostra é apresentada com um potencial positivo ou negativo, que normalmente varia dos 5 a 30kV e os iões são acelerados em direcção ao potencial da terra. Quando abandonam a região de aceleração, os iões com a mesma carga idealmente possuem a mesma energia cinética, variando apenas a sua velocidade consoante a sua massa. Posteriormente, os iões pairam sobre uma região livre de campos até ao detector. A diferença de tempo entre o sinal de partida e o pulso gerado quando atingem o detector define o tempo de vô ( $t_{TOF}$ ). Quanto mais rápido ou leve for o ião, mais depressa ele atinge o detector e conseqüentemente, menor é o seu tempo de vô. O espectro obtido pode ser então convertido num espectro de massa. Não é necessário conhecer exactamente os potenciais e as distâncias

percorridas pelo espectômetro, uma vez que a conversão tempo/massa é feita por calibração com iões de massas já conhecidas.

Fontes contínuas de iões, como o ESI, podem ser acopladas a analisadores TOF por aceleração ortogonal (ao-TOF). Em ao-TOF, os iões gerados pela fonte entram no analisador TOF perpendicularmente ao seu eixo principal. O potencial de aceleração é, inicialmente, definido como zero e o pulso inicial é gerado instantaneamente consoante o potencial aumenta e os iões são acelerados para a região de vôo.

Quando os iões são formados de forma pulsada, como no MALDI, o pulso de extração do TOF pode ser coordenado com a fonte de ionização e todos os iões formados podem ser detectados.

A resolução, é o principal problema dos analisadores TOF lineares, uma vez que é afectada por diversos factores que alteram a distribuição da energia dos iões com a mesma  $m/z$ . O tempo de pulso de extracção que desloca os iões no tubo de vôo, a distribuição espacial destes iões quando recebem este pulso e a variação da energia cinética que os iões recebem na ionização são alguns exemplos desses factores. O aumento da distância de tempo de vôo ajuda a melhorar a resolução e o aumento da tensão de aceleração ajuda a melhorar a sensibilidade. Por isso mesmo, os aparelhos possuem um tubo até 2 metros de comprimento e uma tensão até 20 kV (Ekman, Silberring, Westman-Brinkmalm & Kraj, 2009).

### **4.3 Aplicações MALDI-TOF**

#### **4.3.1 Proteómica e Sequenciação de Proteínas**

Define-se proteomica, como o estudo da estrutura e função das proteínas. Com a descoberta de todo o genoma humano e terminado todos esse projecto, a bioquímica

e a biologia molecular direccionaram todos os seus estudos para a proteómica e farmacogenómica. Nos últimos anos, o MALDI-MS tornou-se uma ferramenta muito útil e popular na proteómica, fornecendo informação sobre a sequenciação de proteínas, a identificação e as modificações pós-transcripcionais. Apesar da maioria dos estudos se focar em compostos solúveis em água, o MALDI-MS também se aplica em proteínas hidrofóbicas. Para tal, o MALDI possui a vantagem de tolerar uma considerável quantidade de sais e detergentes, permitindo que as proteínas sejam directamente caracterizadas sem purificação prévia, o que pode ser muito difícil e demorado.

A sequenciação directa de proteínas por MALDI é possível até para péptidos de baixa massa molecular. A utilização de várias proteases para digerir uma proteína em pequenas cadeias de péptidos tornou-se uma técnica poderosa na sequenciação de porções da proteína. A sequenciação de péptidos em escada e a sequenciação por espectrometria de massa são os principais métodos para a sequenciação de proteínas.

Chait et al utilizaram enzimas para digerir o terminal aminoácido dos péptidos, para demonstrar a sequenciação em escada do péptido. A carboxipeptidase-Y é utilizada para remover um aminoácido de cada vez a partir do terminal-C, não formando picos adicionais. No entanto, esta técnica requer a purificação do péptido, tornando a preparação da amostra num processo muito demorado. Para além disso, é um processo pouco preciso, uma vez que um aminoácido que é removido rapidamente pode ser seguido por um que é removido lentamente.

Na sequenciação por MALDI, utiliza-se uma endoprotease específica, como a tripsina ou a quimiotripsina, dependendo da proteína que se pretende estudar. O propósito desta técnica, é isolar o precursor iónico desejado e fragmentá-lo nos seus

produtos iónicos. É possível analisar tanto o produto dos iões, bem como isolar e fragmentar um produto particular de um ião (Jungblut & Thiede, 1997; Lay, 2002).

#### **4.3.2 Identificação de Proteínas**

Com a descoberta quase por inteiro do genoma de organismos eucariontes, incluindo o humano, as atenções viraram-se para o mapeamento das proteínas e péptidos e o MALDI-MS adquiriu papel de destaque entre as mais variadas técnicas de espectrometria, dada a sua alta sensibilidade. Acoplada a instrumentos TOF (*Time-of-flight*) a decadência pós fonte (PSD – *Post Source Decay*) é a técnica mais utilizada na obtenção de informação estrutural para a identificação de proteínas por mapeamento de péptidos (Gogichaeva *et al.*, 2007).

Como o MALDI é um método de ionização suave, por vezes, enfrentam-se limitações ao nível da fragmentação de iões precursores, que impossibilita o estudo estrutural do analito. Contudo, o ião correspondente pode sofrer fragmentação espontânea na região livre de campo do espectrómetro, mais conhecida por *Post Source Decay* (PSD). Há dois factores que podem explicar tal fenómeno. Primeiro, alguns iões precursores poderiam possuir excesso de energia após o processo de dessorção a laser e em segundo lugar, mais colisões podem ocorrer entre os iões precursores, fruto da colisão com a nuvem densa inicial do analito dessorvido e os compostos da matriz. Os fragmentos dos iões resultantes do PSD não podem ser observados no MALDI-TOF linear porque os fragmentos viajam à mesma velocidade que os precursores iónicos. Contudo, podem ser detectados num TOF-MS com um campo curvado onde podem separar e concentrar todos os iões fragmentados. Para que isto seja possível, ajusta-se a tensão para valores mais baixos para separar e

concentrar todos os iões de fragmentação. Os espectros resultantes podem formar, em conjunto, um espectro PSD. Os valores de massa dos péptidos obtidos, bem como o peso molecular dos iões precursores, são posteriormente colocados numa base de dados previamente gerada pela clivagem de proteínas com enzimas específicas. A identificação é realizada consoante as proteínas que melhor coincidem com os dados colocados. Bier et al., listaram vários motores de busca para identificação de proteínas *on-line*. Como é óbvio, este tipo de análise é sempre dependente da informação sobre sequências protéicas disponíveis na base de dados (El-aneid *et al.*, 2009).

A fragmentação por decaimento pós fonte (PSD) ocorre principalmente em ligações peptídicas, mas o espectro de PSD são geralmente muito complicados de analisar dada a presença de pontes dissulfito entre os resíduos de cisteína e aos picos criados pela perda de pequenas moléculas neutras, como moléculas de água, de treoninas, de serinas e a amónia, resíduos de lisinas e de argininas. Embora o espectro MALDI-PSD seja raramente capaz de fornecer informação relativa à fragmentação completa dos péptidos, a sequência marcada obtida em PSD pode ser utilizada para reconstruir a sequência peptídica para a identificação da proteína dada a especificidade de algumas sequências de aminoácidos. A probabilidade de uma proteína ter um certo aminoácido em cada posição é aproximadamente de 1 para 20; portanto, as hipóteses de uma sequência específica de 5 aminoácidos apenas é de cerca de 1 em 3 milhões. Para além disso, o facto de o grupo carboxil do terminal-C estar marcado com o isótopo  $^{18}\text{O}$  durante a digestão protéica, ou a acilação do terminal-N dos iões fragmentados, simplificam a interpretação espectral (Jungblut & Thiede, 1997; Lay, 2002)

## ***II. Objetivos***



A hipóxia é uma condição que influencia a resposta à terapêutica dos tumores sólidos. O desenvolvimento de um método não invasivo de diagnóstico da hipóxia tumoral pode fornecer informação de extrema importância para prever a resposta tumoral à terapêutica e até mesmo ajustar o plano de tratamento.

O objectivo deste projecto de investigação é caracterizar o proteoma do carcinoma colo-rectal em condições de hipoxia e normóxia com vista a esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes a esta condição e também identificar possíveis marcadores proteicos do estado de oxigenação deste tumor.

Assim, o principal objectivo do trabalho que conduziu a esta dissertação foi a optimização de um procedimento de electroforese bidimensional para separação do proteoma de linhas celulares humanas deste tipo de tumor com vista a possibilitar posterior identificação por MALDI-TOF/TOF. Para este fim o primeiro objectivo foi a preparação de extractos de proteínas de três linhas celulares de adenocarcinoma colo-rectal humano (WiDr, C2BBE1 e LS1034) cultivadas em condições de hipóxia e normóxia, adequados à separação bidimensional. O segundo objectivo consistiu na optimização de um procedimento de focagem isoeléctrica adequado às amostras em causa e posterior separação por peso molecular em SDS-PAGE. Finalmente, pretendeu-se optimizar o procedimento de coloração dos géis obtidos adequado à recolha dos *spots* para posterior identificação.



### ***III. Materiais e Métodos***



A existência de regiões de hipóxia em tumores sólidos, como o carcinoma colo-rectal, condiciona o efeito da quimio e da radioterapia (Cairns *et al.*, 2006). Como tal, o desenvolvimento de técnicas capazes de caracterizar a hipóxia pode constituir um importante acréscimo à avaliação pré-tratamento. Vários trabalhos documentam que o estado de oxigenação dos tumores é uma condição que influencia o genótipo e o fenótipo, nomeadamente, a diferente expressão de genes ligados ao transporte de oxigénio, à angiogénese, à degradação de proteínas e às alterações pós-transcripcionais que resultam em alterações no proteoma (Vaupel & Harrison, 2004b).

Constituindo objectivo deste trabalho a optimização de um procedimento de electroforese bidimensional para a separação do proteoma de células de carcinoma colo-rectal cultivadas em condições de normóxia e hipóxia com vista à posterior identificação das proteínas com expressão diferencial, procedeu-se à realização das metodologias descritas de seguida.

## **1. Cultura de células**

Para a realização deste trabalho utilizaram-se três linhas celulares humanas de carcinoma colo-rectal: C2BBE1, LS1034 e WiDr.

A linha celular WiDr provém do cólon de uma doente de 78 anos, diagnosticada com carcinoma colo-rectal. Esta linha celular apresenta uma morfologia epitelial e sabe-se que é mutada no codão 273 do gene *TP53* que origina a substituição do

aminoácido arginina por histidina na proteína p53 (Pellegrino, Milstien, Needy, Browne, & Petricciani, 1979).

A linha celular LS1034 foi isolada do ceco de um doente de etnia caucasiana, 54 anos de idade. Tal como a linha WiDr possui uma mutação no gene *TP53*, mas neste caso na posição 245 que se traduz na substituição da glicina por serina. É também caracterizada por uma mutação no gene APC e sobrepresa uma proteína de efluxo, a glicoproteína-P (Pg-P), associada à resistência à quimioterapia (Casalta-Lopes *et al.*, 2011; Suardet *et al.*, 1992).

As células da linha C2BBe1 são um clone da linha celular C2BBe1 obtido por diluição limitante. A última provém do cólon de um doente de 72 anos, caucasiano, também diagnosticado com carcinoma colo-rectal. O clone foi seleccionado com base na homogeneidade morfológica e na localização apical exclusiva da proteína vilina. As células C2BBe1 formam uma monocamada polarizada com borda em escova apical (BB) morfológicamente comparável à do cólon humano. Quando atingem a confluência, estas células expressam características de diferenciação enterócita (Basson, Modlin, & Madrit, 1992; Peterson & Mooseker, 1992).

As três linhas celulares foram fornecidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC). No momento da sua recepção foram descongeladas e propagadas em cultura aderente a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> (incubadora HeraCell150).

As linhas celulares C2BBe1 e WiDR foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma D-5648) suplementado com 100µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 5% de soro bovino fetal (Sigma F7524) e 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina, Gibco 15240).

A linha celular LS1034 foi propagada com o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado com 100µM de piruvato de sódio (Gibco 11360), 5% de soro bovino fetal (Sigma F7524) e 1% de antibiótico (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina; Gibco 15140-122).

As células das três linhas celulares foram cultivadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> de área de crescimento até atingirem uma confluência de cerca de 90%. A subcultura foi realizada de 4 em 4 dias.

Para a realização de subcultura foi necessário destacar as células dos frascos de cultura. Para isso as culturas celulares foram incubadas com 2mL de uma solução tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante 5 a 10 minutos para que ocorra a separação celular. De seguida, para inactivar a tripsina adicionaram-se 5mL de meio de cultura e centrifugou-se a suspensão celular obtida a 200G durante 5 minutos. Os pellets obtidos foram suspensos num volume apropriado de meio e distribuídos por novos frascos de cultura numa razão de 1:3.

## **2. Preparação dos extratos de proteínas**

Para estudar o proteoma do carcinoma colo-rectal nas diferentes linhas celulares começou-se por preparar extractos celulares de proteínas. Desta forma, o meio dos frascos celulares confluentes foi descartado e em seguida lavou-se com PBS (*Phosphate buffered saline*) 1X, repetindo-se o procedimento três vezes. Após as lavagens com esta solução tampão, adicionaram-se 300µL de um tampão de lise ao frasco de cultura e com o auxílio de raspadores, soltaram-se as células da superfície do

frasco e colocou-se a suspensão celular num microtubo da *ependorf*. Utilizaram-se vários tampões de lise diferentes no sentido de obter a maior e mais pura quantidade de proteína. As soluções utilizadas foram a solução de RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) suplementada com Complete, Mini (Roche 11836153001; um *cocktail* de inibidores de proteases), solução MIX, solução GUY e TCA (ácido tricloroacético).

Nos extractos preparados com solução RIPA e Complete, Mini; MIX e GUY, fez-se vórtex e sonicaram-se as amostras 10 vezes, durante 1 a 2 segundos cada uma, a uma amplitude de 35% de um sonicador *Vibra Cell* da *Sonic and Materials inc. USA*, modelo: VC50 de 240V, 50W e 20KHz. De seguida, centrifugaram-se as amostras a 14000G, a 4°C durante 15 minutos e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo.

Nos extratos preparados com TCA 20% também se fez vórtex e sonicaram-se as amostras do mesmo modo. Contudo, de forma a otimizar a remoção de substâncias indesejáveis e concentrar a amostra em proteína, seguiu-se para a precipitação com a acetona. Para tal, adicionou-se a acetona a -20°C num volume 4x superior ao volume da amostra. Fez-se um pouco de vórtex e incubaram-se as amostras a -80°C durante 30 minutos. Terminado o tempo de incubação, centrifugaram-se as amostras durante 15 minutos a 14000G e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante de modo a que o *pellet* permanecesse intacto no fundo do microtubo. Por fim, esperaram-se 30 minutos com os microtubos abertos para que a acetona evaporasse e em seguida ressuspendeu-se o *pellet* em tampão de rehidratação e fez-se vórtex até ficar completamente solubilizado.

Todos os extratos foram congelados a -80°C.

## 2.1 Quantificação de Proteína – método de BCA

Para a determinação da proteína pelo método de BCA do *kit Pierce*, começou-se por se descongelar as amostras e fazer um pouco de vórtex.

Preparou-se o reagente RIPA numa diluição de 1:9 e o reagente de BCA numa diluição de 50A:1B (A diz respeito ao *BCA Protein Assay Reagent A (Pierce)* e o B a *Copper(II) sulfate solution (Sigma-Aldrich)*)

Em seguida, preparou-se a curva padrão (BSA – *Pierce*) a partir da solução stock de 2mg/ml de albumina de soro bovino e as amostras numa diluição de 1:9. Adicionaram-se os reagentes nas quantidades indicadas no *kit* numa placa de 96 poços e agitou-se durante 30 segundos. A placa foi então incubada a 37°C, durante 30 minutos e mediu-se a absorvância a 570nm na ELISA (Biotek® Synergy HT). Pela Lei de Beer-Lambert, que estabelece a relação linear entre a concentração do material atravessado e a absorvância dentro de um determinado limite através da equação:

$$\frac{I_1}{I_0} = e^{-\alpha lc}$$

( $I_1$  – intensidade da luz uma vez atravessando o meio;  $I_0$  – intensidade da luz incidente;  $\alpha$  – coeficiente de absorção;  $l$  – distância que a luz atravessa no objecto;  $c$  – concentração da substância absorvente no meio) calcularam-se as concentrações para cada valor de absorvância. Todas as amostras foram novamente guardadas a -80°C após utilização.

## **2.2 Quantificação de Proteína – 2-D Quant Kit GE Healthcare**

Nos extratos preparados com TCA 20% e ressuspendidos em tampão de rehidratação, utilizou-se o 2-D Quant Kit da GE Healthcare, essencialmente por ser compatível com a ureia e a tiourea. Antes de tudo, preparou-se o reagente de cor, misturando o reagente de cor A e o reagente de cor B numa diluição de 100A:1B, consoante o volume requerido. Posto isto, preparou-se a curva padrão através da solução standard de BSA (Pierce) e os microtubos com a amostra previamente descongelada. Em seguida, adicionaram-se os reagentes nas respectivas quantidades descritas no protocolo *standard* do *kit* e transferiram-se 200 $\mu$ L do conteúdo de cada microtubo para uma placa de 96 poços. A placa incubou durante 15 a 20min à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância a 480nm na ELISA (Biotek® Synergy HT). Pela lei de Beer-Lambert calcularam-se as concentrações para cada valor de absorvância. Contudo, ao contrário da maioria dos métodos de quantificação de proteína, neste *kit* a concentração é inversamente proporcional à absorvância. As amostras foram novamente guardadas a -80°C até posterior utilização.

## **3. Primeira dimensão – Focagem Isoelétrica (IEF)**

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Esta propriedade é influenciada pela força iónica, da natureza do tampão utilizado e qualquer outro soluto presente no meio, mas nunca da concentração da proteína. O ponto isoelétrico é atingido por uma técnica conhecida como focagem isoelétrica (electrofocagem). Esta

técnica consiste numa separação eletroforética, segundo a qual as proteínas são ordenadas de acordo com as diferenças dos seus pontos isoelétricos. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migram até encontrar a faixa de pH referente ao seu pI de modo a que fiquem com uma carga total neutra. Atingindo esse ponto, a migração é imediatamente interrompida no gel.

### **3.1 Rehidratação das tiras de gel (*strips*):**

As tiras de IPG (do inglês *immobilized pH gel*) foram obtidas comercialmente à GE *Healthcare* e à Bio-Rad na forma desidratada com diversos gradientes de pH e tamanhos devendo ser rehidratadas antes da focagem isoelétrica. Para a utilização destas tiras é possível misturar as amostras à solução de rehidratação ou aplicá-las sobre a tira com o recurso de *sample cups*. O primeiro procedimento foi o utilizado neste estudo, permite a aplicação de uma maior quantidade de proteínas, minimizando a precipitação durante a entrada no gel e simultaneamente evita a manipulação exigida pelo segundo procedimento.

#### **3.1.1 Procedimento Experimental – Rehidratação das Strips**

Para o procedimento da rehidratação das *strips* foram utilizadas duas concentrações de proteína, 75 e 100µg. A proteína foi diluída em tampão de rehidratação já com o agente redutor ditioneitol (DTT) (Sigma 43815) até perfazer 125µL (volume colocado nas fendas da bandeja de rehidratação). Adicionou-se ainda 3µL (1,5% v/v) de *IPG buffer* e 2,4µL (1,2% v/v) de *DeStreak Reagent* (GE 17-6003-18). Por fim colocaram-se as amostras num agitador rotativo durante 30 min.

A composição do primeiro e segundo tampão de rehidratação que se utilizou está representada nas tabelas 3 e 4:

**Tabela 3.** Composição do tampão de rehidratação I.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Final</b>
Ureia	6M
Tioureia	1,5M
CHAPS	3%
Azul de bromofenol	-----
DTT(adicionar antes de usar)	60mM

**Tabela 4.** Composição do tampão de rehidratação II.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Final</b>
Uréia	7M
Tioureia	2M
CHAPS	2%
Azul de bromofenol	-----
DTT(adicionar antes de usar)	60mM

**Nota:** Dissolver em H<sub>2</sub>O milli-Q e o DTT deve ser adicionado apenas momentos antes do uso.

Uma vez preparadas as amostras para as *strips*, foram colocados 125µL nos corredores de suporte da *PROTEAN® i12™* IEF Cell previamente lavado com SDS 10% (*sodium dodecyl sulfate*) e água milli-Q. As *strips* com gradiente de pH de 3-10 e com 7cm de comprimento foram descongeladas durante 10 a 15 minutos. Removeram-se as películas de plástico das *strips* (sempre pelo lado ácido) e colocaram-se sobre as

amostras. O lado do gel fica sempre em contacto com as amostras e as strips têm que ser colocadas com os respectivos pólos de acordo com o suporte da *IEF Cell*. Posteriormente é adicionado ainda, 1mL de óleo mineral (BioRad 163-2129) sobre cada *strip* para evitar a cristalização da ureia. Em seguida, colocou-se o suporte na *IEF Cell* e programou-se a rehidratação *overnight* durante 12 horas, 50V e 20°C.

### 3.1.2 Procedimento Experimental – Focagem Isoelétrica

Terminada a rehidratação, colocaram-se dois *Electrode Weaks* (BioRad 1646031) humedecidos com 50µL de água milli-Q entre cada eléctrodo e *strip*, sobre os filamentos de condutividade eléctrica para remoção de sais. A corrida é realizada em quatro passos programados (S1-S4) do seguinte modo:

Programa: Rehidratação, activa, 50 V, 12 horas

S1: 250 V, 30 min

S2: rampa linear, 2h, 4000V

S3: rampa linear, 15000V/h

S4: 500V/h

Após a focagem isoelétrica, as strips são incubadas em 2,5mL de tampão de equilíbrio com DTT durante pelo menos 15 minutos e, posteriormente, em 2,5mL de tampão de equilíbrio com iodocetamida (Merck L59087244) durante o mesmo período de tempo. O tampão de equilíbrio utilizado apresenta a composição descrita na tabela 5.

**Tabela 5.** Composição do tampão de equilíbrio.

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração</b>
Tris-HCl, pH 8.8	50mM
Glicerol	30%
SDS	2%
Azul de Bromofenol	-----

**Nota:** Dissolver em H<sub>2</sub>O milli-Q.

#### **4. Segunda Dimensão – SDS-PAGE**

A electroforese 2-D é um método muito eficaz e utilizado na análise de complexos proteicos. Esta técnica separa as proteínas de acordo com duas propriedades independentes em dois passos distintos. Na primeira dimensão ou focagem isoelectrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com a sua carga (pI); na segunda dimensão as proteínas são separadas de acordo com o seu peso molecular num gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A completa desnaturação e dissociação das proteínas tratadas com DTT resulta na disrupção da estrutura tridimensional pela redução das pontes dissulfito, no desdobramento e consequente complexação com o SDS. O SDS é um detergente aniónico que confere carga negativa às proteínas permitindo a sua separação consoante o seu peso molecular através do eléctrodo positivo do gel de poliacrilamida. Cada *spot* visível no gel corresponde a uma proteína ou grupo de proteínas da amostra e informações como o seu ponto isoelectrico e o seu peso molecular (massa molecular relativa), podem ser obtidas. A tensão aplicada resulta na migração das proteínas a diferentes

velocidades ao longo do gel. As proteínas de menores dimensões migram mais rápido através do gel, depositando-se no fundo, enquanto as de maior dimensão migram mais lentamente, ficando no topo do gel.

#### **4.1 Procedimento Experimental**

Inicialmente montou-se o sistema de vidros e verificou-se a existência de fugas ao colocar água destilada no espaço entre os vidros. Enquanto isso, preparou-se a solução dos géis de acrilamida a 10%. Testada a montagem do sistema, retirou-se toda a água e secou-se bem para adicionar a solução dos géis até cerca de 1cm do topo com a ajuda de uma pipeta de *pasteur* ou uma micropipeta de 5mL. Em seguida, adicionou-se um pequeno volume de isopropanol apenas para eliminar algumas bolhas de ar e uniformizar o topo do gel e aguardou-se até que o gel polimerizasse. Terminado este processo retirou-se e secou-se todo o isopropanol, lavou-se o topo do gel e colocaram-se as *strips* previamente humedecidas em tampão de electroforese 1x sobre o topo dos géis, com a ponta acídica virada para a esquerda e com a face de plástico encostada ao vidro maior do sistema de electroforese. Em seguida, adicionou-se uma solução de agarose 0,5% (Sigma A2790) aquecida e esperou-se que arrefecesse e solidificasse de modo a retirar todas as bolhas de ar e manter a *strip* em contacto com o gel. Posto isto, colocaram-se os suportes dos géis na tina de electroforese da Bio-Rad, adicionou-se o tampão de electroforese 1x, iniciando-se o processo de separação, com uma primeira fase a 80V até que as proteínas efectuem a passagem da *strip* para o gel (cerca de 20min) e em seguida a 150V até que a linha de azul de bromofenol alcançasse o fundo do gel (cerca de 1h30m).



**Figura 7.** Sistema de electroforese da Bio-Rad com tina e fonte de alimentação - Mini-PROTEAN® System.

## 5. Detecção de proteínas no géis 2-DE

As técnicas de detecção de proteínas aplicadas nos géis de electroforese devem possuir alguns requisitos básicos, tais como, alta sensibilidade, boa reprodutibilidade e baixa toxicidade. Para além disso, os métodos de detecção devem ser compatíveis com as actuais ferramentas de análise proteómica. Desde que a electroforese bidimensional (2D) se tornou a principal técnica de separação e isolamento de proteínas para caracterização por espectrometria de massa, é essencial que a técnica de coloração seja compatível com esta tecnologia.

Para a detecção de proteínas no géis 2D, os métodos mais comuns e os que se utilizaram, foram o azul de Coomassie, a coloração com prata e um corante de fluorescência, o *Sypro Ruby* (Sigma S4942).

O princípio da coloração com prata, é semelhante à obtenção de uma fotografia. A matriz do gel com as proteínas separadas é saturada com os iões  $\text{Ag}^+$ . Estes iões vinculam-se preferencialmente a aminoácidos com características básicas de proteínas

na superfície da matriz do gel e os íões que não se ligam a nenhum aminoácido, têm de ser removidos. As proteínas ficam visíveis, quando os íões  $\text{Ag}^+$  são reduzidos ao seu estado elementar  $\text{Ag}$  e as proteínas coradas desenvolvem a típica cor acastanhada (Wait, Harry, Westbrook, Wheeler, & Dunn, 2000).

A coloração com Coomassie funciona por ligação directa com os aminoácidos básicos e com as cadeias aromáticas dos aminoácidos das proteínas. Não interage com o fundo da matriz, descartando assim qualquer tipo de reacção química. Contudo, é necessário remover o excesso de Coomassie antes da análise por espectrometria de massa (Winkler, Denker, Wortelkamp, & Sickmann, 2007).

A coloração com *Sypro Ruby* é um método por fluorescência e permanente. É um composto de ruténio com um complexo orgânico que se liga não covalentemente às proteínas. Para se visualizarem as proteínas, é necessário excitá-las utilizando luz UV com um comprimento de onda de 302nm ou com luz visível com comprimento de onda de 470nm.

## **5.1 Procedimento Experimental**

Inicialmente, retiraram-se cuidadosamente os géis da tina e do sistema de vidros da electroforese, marcaram-se com um pequeno corte diagonal no topo do lado esquerdo do gel (lado ácido) para que sirva de referência, e lavou-se brevemente com água.

Para a coloração com Coomassie, prepararam-se duas soluções. Uma com 0,25% de *Coomassie Brilliant Blue G* (Sigma B-0770), 50% de Metanol (Sigma 32213) e 10% ácido acético (Merck 100066) e outra com 0,02% de *Coomassie Brilliant Blue G*, 5% de

sulfato de alumínio hidratado (Sigma **368458**), 10% de etanol e 2% de ácido fosfórico (Sigma **310271**). Deixaram-se os géis embebidos nestas soluções, com leve agitação, por aproximadamente 2 horas. Em seguida, preparou-se uma solução de 25% de metanol e 5% de ácido acético para remover o excesso de Coomassie da primeira solução de coloração e uma com 10% de etanol e 2% de ácido fosfórico com o mesmo propósito para a segunda solução de coloração. Fizeram-se sucessivas lavagens, cerca de 5 a 6 durante 15 minutos cada uma e deixou-se *overnight* nesta solução até remover o excesso de corante.

Para a coloração com prata, começou-se por colocar o gel com agitação suave e embebido numa solução de 25% de metanol e 5% de ácido acético *overnight* para fixação das proteínas. Terminado este passo, descartou-se a solução e adicionou-se uma solução de 50% de etanol. Deixou-se a agitar durante 10 minutos e em seguida trocou-se a solução por uma de 30% de etanol, onde ficou também por 10 minutos a agitar. Terminado o tempo, a solução foi novamente descartada e substituída por uma de 0,2g/L de tiosulfato de sódio (Sigma A2790), onde se deixaram os géis por apenas 1 minuto em agitação. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com água ultra pura, de 10 minutos cada uma. Posteriormente, adicionou-se uma solução de 2,0g/L de nitrato de prata (Merck 3013308) e deixou-se a agitar durante 20 minutos. Por fim, substituiu-se a solução anterior por uma que continha 30g/L de carbonato de sódio anidro (Sigma 71345), 10 mg/L de tiosulfato de sódio e 0,7mL/L de formaldeído 37% (Sigma 252549) e deixou-se a agitar até o surgimento dos *spots* de proteínas. Para parar a reacção, descartou-se a solução anterior e deixou-se a agitar durante 1 minuto numa solução com 50g/L de Trizma Base (Sigma T1503) em 2,5% de ácido acético.

Na coloração com *Sypro Ruby*, começou-se por colocar os géis numa solução de 50% metanol e 7% ácido acético durante 30 minutos e terminado o tempo, substituiu-se por uma nova solução com a mesma composição e deixou-se a agitar durante o mesmo período de tempo. Posto isto, descartou-se a solução anterior, adicionou-se 60mL de *Sypro Ruby gel stain* e deixou-se a agitar *overnight*. Por último, substituiu-se a solução por uma de 10% de metanol e 7% de ácido acético e deixou-se a agitar por 30 minutos. Terminado o tempo, lavou-se bem o gel em água. Posteriormente o gel foi revelado recorrendo ao equipamento *Typhoon™ FLA 9000 da GE Healthcare* com o filtro LPB (510LP) e um comprimento de onda de 510 nm.



## ***Resultados***



Os procedimentos descritos no capítulo anterior materiais e métodos, foram realizados com o objectivo de otimizar um procedimento que permita avaliar o efeito da hipóxia nas alterações proteómicas de linhas celulares de carcinoma colo-rectal.

## 1. Preparação das amostras/Quantificação

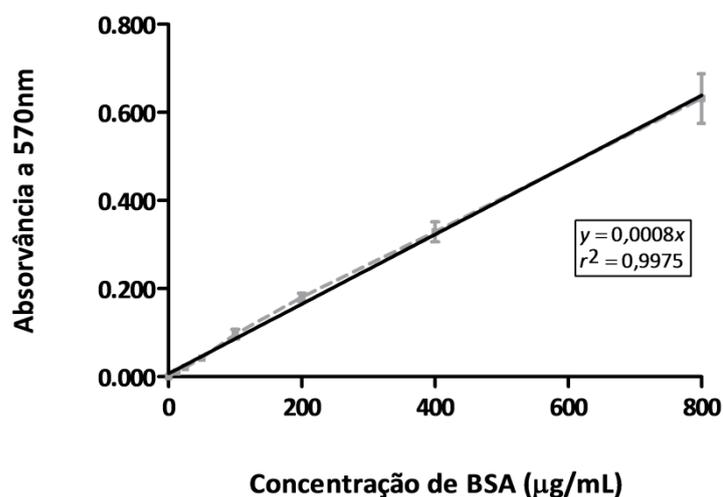
Inicialmente, tal como foi descrito no capítulo anterior, foi necessário preparar as amostras e realizar extratos de proteína que seriam posteriormente quantificados. Para tal, recorreram-se a vários tampões e metodologias na extracção de proteína, como o tampão RIPA, o tampão GUY, o tampão MIX e a extracção com TCA e precipitação com acetona.

Na extracção com RIPA, GUY e MIX utilizou-se o mesmo procedimento, variando apenas a solução tampão. Fez-se uma primeira avaliação à sua eficácia com uma quantificação de proteína que forneceu os resultados descritos na tabela 6.

**Tabela 6.** Resultados da quantificação de extractos de proteínas recorrendo ao *kit* BCA das três linhas celulares de carcinoma colorectal utilizando três tampões diferentes.

Amostras	Tampão	[Proteína] ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	V_75ug (ul)
Widr	RIPA	5,431	13,810
CaCo	RIPA	11,163	6,719
LS1034	RIPA	4,222	17,764
Widr	MIX	6,430	11,664
CaCo	MIX	7,123	10,529
LS1034	MIX	5,190	14,451
Widr	GUY	11,670	6,427
CaCo	GUY	12,678	5,916
LS1034	GUY	7,345	10,211

Um exemplo de uma curva de calibração obtida para a quantificação de proteína pelo método de BCA é apresentada na figura 7.



**Figura 7.** Curva padrão elaborada para a quantificação de proteína pelo método de BCA. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.

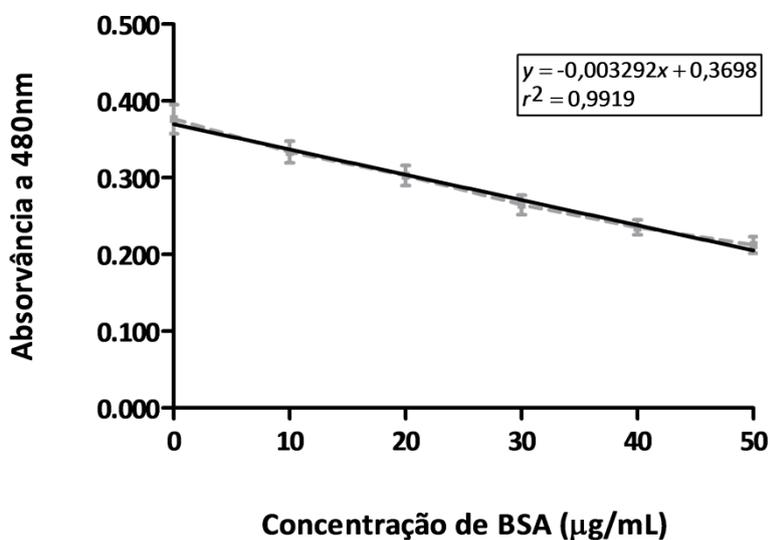
Na extração com TCA e precipitação com acetona, para além de se utilizar outra solução, neste caso o TCA a amostra é lavada com acetona antes de ser centrifugada e o pellet final é ressuscitado em tampão de rehidratação.

A eficácia da extração foi testada em primeiro lugar com o método do BCA e em seguida com o *2-D Quant Kit GE Healthcare* que forneceu os resultados representados na tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados da quantificação de extractos de proteínas recorrendo ao 2-D Quant kit GE Healthcare das três linhas celulares de carcinoma colorectal.

Amostras (linhas celulares)	Solução tampão	[Proteína] ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	V_75ug (ul)
WiDr	TCA 20%	32,865	2,28
WiDr	TCA 20%	19,136	3,92
CaCo	TCA 20%	28,227	2,66
CaCo	TCA 20%	28,253	2,65
LS1034	TCA 20%	16,366	4,58
LS1034	TCA 20%	30,512	2,46

A curva de calibração para a quantificação de proteína pelo 2-D Quant Kit GE Healthcare está representada na figura 8.



**Figura 8.** Curva padrão elaborada para a quantificação de proteína pelo 2-D Quant Kit GE Healthcare. Os resultados expressam a média e o erro padrão de 5 experiências independentes realizadas em duplicado.

Se compararmos todos os tampões na preparação da amostra (RIPA, MIX e GUY) com a extracção com TCA e acetona, verificamos um aumento da concentração de proteína para o último método e conseqüentemente, é necessário um menor volume de amostra para possuir os 75µg de proteína, quantidade estipulada como mínima para ser utilizada na focagem isoelectrica.

## **2. Focagem isoelectrica – Rehidrataçao das *strips***

Para determinar e separar as proteínas pelo seu ponto isoelectrico realizou-se a focagem isoelectrica. Tal como já foi referido, as proteínas são submetidas a um campo eléctrico e migram até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI, onde a sua carga total é neutra. Esta propriedade, depende da força iónica, da natureza do tampão utilizado e qualquer outro soluto presente no meio. Como as *strips* são comercializadas na forma desidratada, é necessário rehidratá-las antes de se prosseguir com a focagem isoelectrica. Para tal, as amostras são misturadas com a soluçao de rehidrataçao e aplicadas nas fendas da célula de focagem e as *strips* colocadas com a superfície do gel virada para baixo (em contacto com a amostra). Posto isto, inicia-se a rehidrataçao que consiste na aplicaçao de uma tensao de 50 V durante 12 horas através da **PROTEAN® i12™ IEF Cell** da Bio-Rad representada na figura 9.

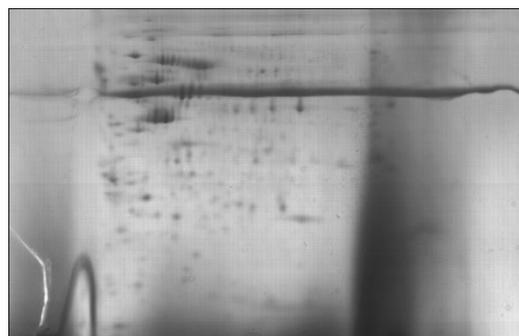


**Figura 9.** PROTEAN® i12™ IEF Cell - célula de focagem.

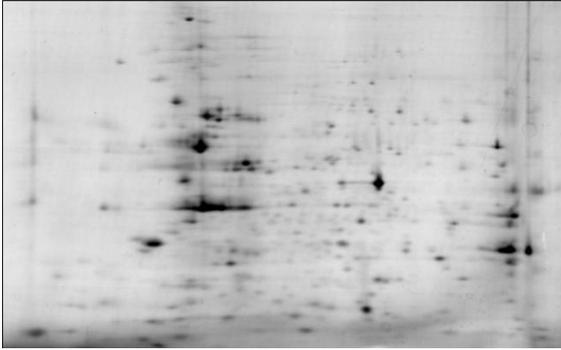
Para este procedimento, utilizaram-se dois tampões de rehidração com concentrações diferentes, tal como foi descrito na tabela 3 e na tabela 4 no capítulo dos materiais e métodos. O tampão de rehidração II utilizado é mais concentrado em ureia e tiourea. Nas figuras seguintes, estão representados géis 2D já corados, onde se utilizou o tampão de rehidração I e II. Os resultados revelam maior quantidade de *spots* para o géis da figura 11, 12 e 13 onde se utilizou o tampão de rehidração II.



**Figura 11.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidração I. Corado com Coomassie.



**Figura 10.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidração II. Corado com Coomassie.



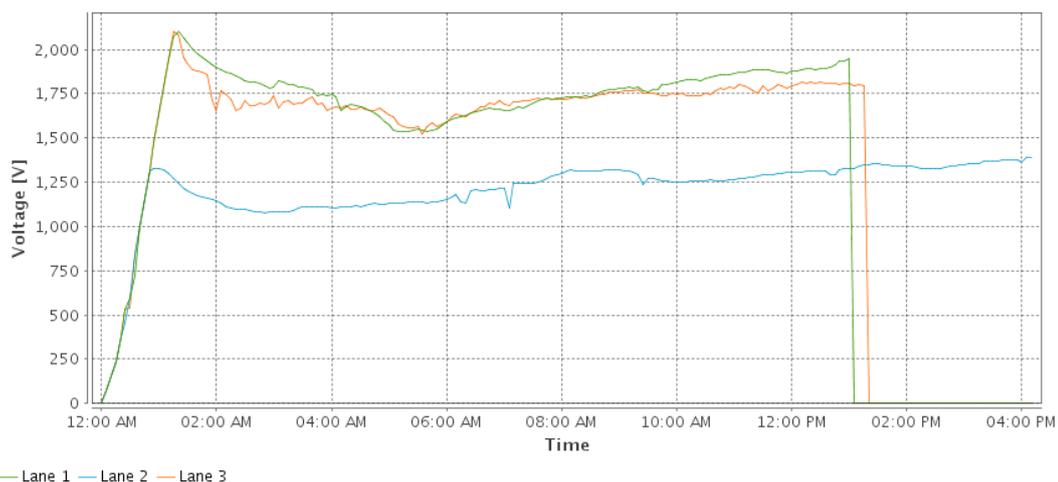
**Figura 13.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação II. Corado com prata.



**Figura 12.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia onde se utilizou o tampão de rehidratação II. Corado com *Sypro Ruby*.

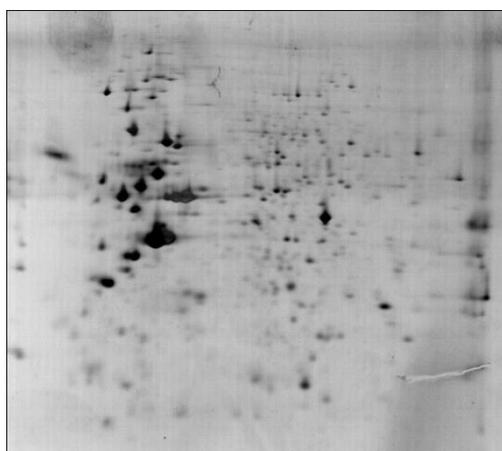
### 3. Primeira Dimensão – Focagem Isoeléctrica

A focagem isoelectrica tem início logo após a rehidratação das *strips*. Após a colocação dos humificados eléctrodos *weaks*, a **PROTEAN® i12™ IEF Cell** previamente programada inicia a focagem que tem uma duração variável consoante o valor de tensão que é capaz de atingir. O terceiro passo deste procedimento, descrito nos materiais e métodos como s3, apenas fica concluído quando a tensão total aplicada é igual a 15000V. Na figura seguinte, pode-se verificar a progressão da tensão e os respectivos géis fornecidos pela eletroforese 2D.

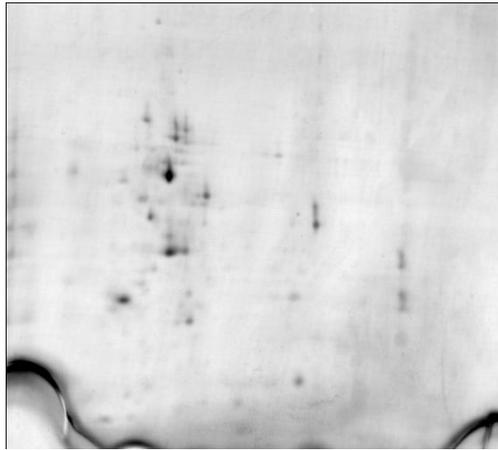


**Figura 14.** Representação da evolução das tensões durante a focagem isoeléctrica de três amostras de WiDr em condições de normóxia com o tampão de rehidratação II.

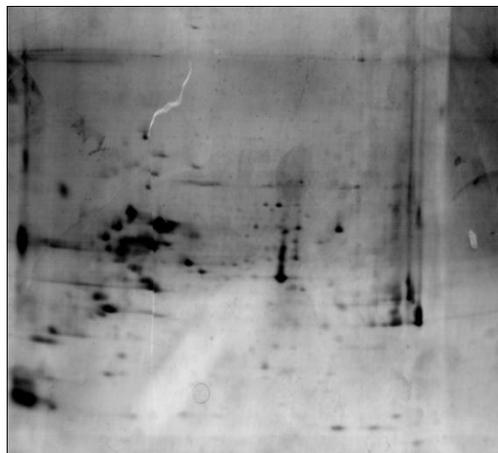
Como se pode verificar no gráfico representado na figura 14, duas amostras da linha celular WiDr atingiram entre 1500V e 2000V durante aproximadamente as 12 horas de focagem isoeléctrica, enquanto a terceira amostra, atingiu apenas 1250 V. Os respectivos géis de electroforese 2D estão a seguir representados nas figuras 15, 16 e 17. Verifica-se que as *Lanes 1 e 3* que atingiram valores de tensão mais altos, originaram uma maior quantidade de *spots* na faixa de pH entre 4 e 7.



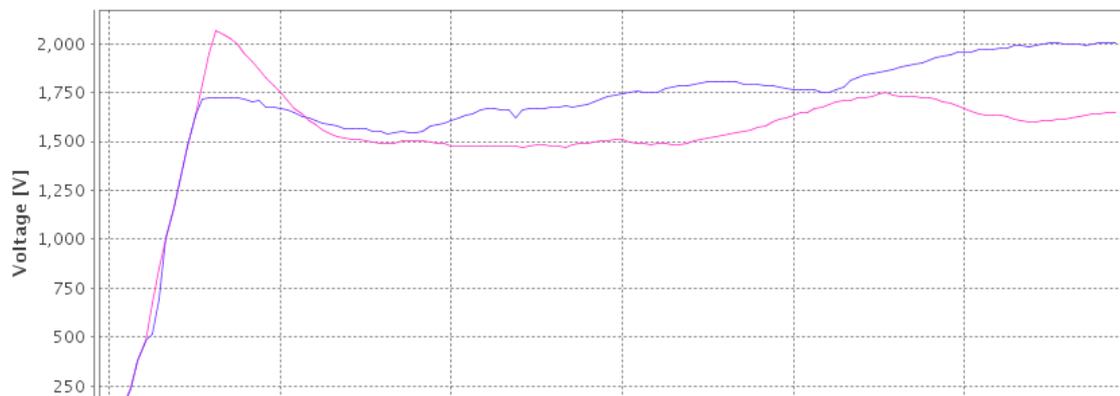
**Figura 15.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à *lane 1* do gráfico da figura 13.



**Figura 16.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à *lane* 2 do gráfico da figura 13.



**Figura 17.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Gel correspondente à *lane* 3 do gráfico da figura 13.



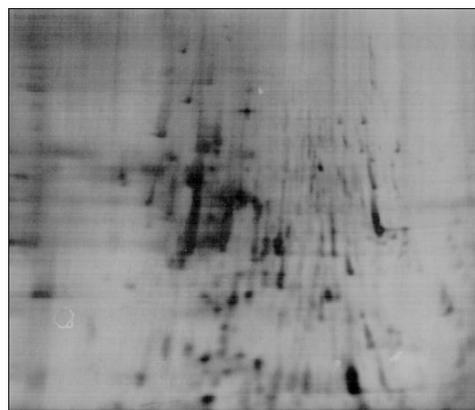
**Figura 18.** Representação da evolução das tensões durante a focagem isoelectrica de duas amostras de LS1034 em condições de normóxia – *Lane* 10 e hipóxia – *Lane* 11 com o tampão de rehidratação II.

— Lane 10 — Lane 11

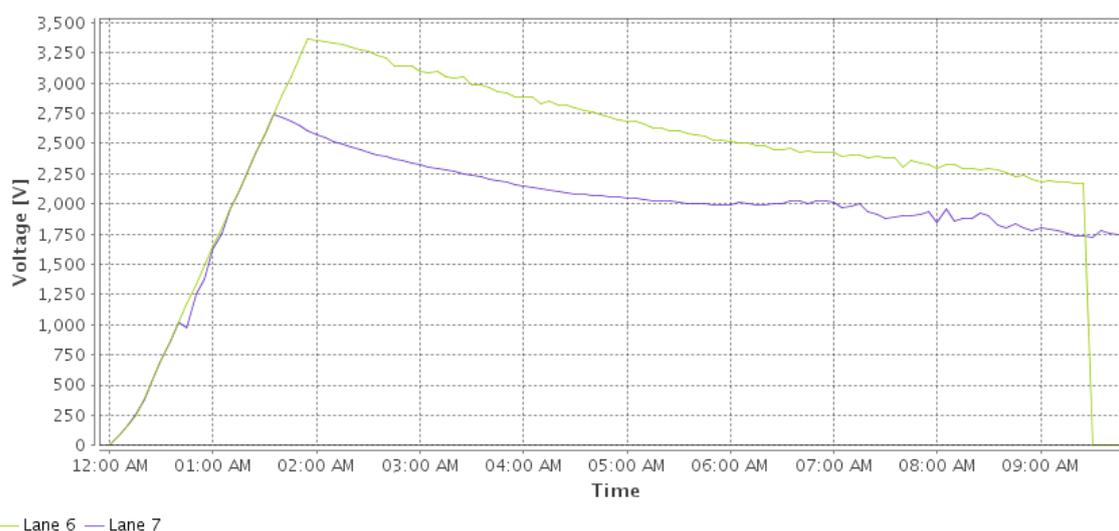
No gráfico representado na figura 18, é possível observar que ambas as amostras receberam tensões entre os 1500V e os 2000V. Para além disso, verifica-se que a *Lane 10* atingiu o último valor logo após 1 hora de focagem enquanto que a *Lane 11* apenas alcançou os 2000V no fim da focagem, ou seja, aproximadamente 12 horas depois. A eletroforese 2D forneceu os géis representados nas figuras 19 e 20. Ambas revelam muitos *spots* na faixa de pH entre 4 e 7.



**Figura 19.** Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de normóxia – *Lane 10*. Corado com prata.

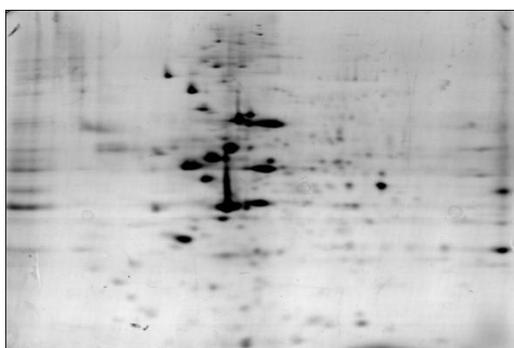


**Figura 20.** Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia (2h) – *Lane 11*. Corado com prata.

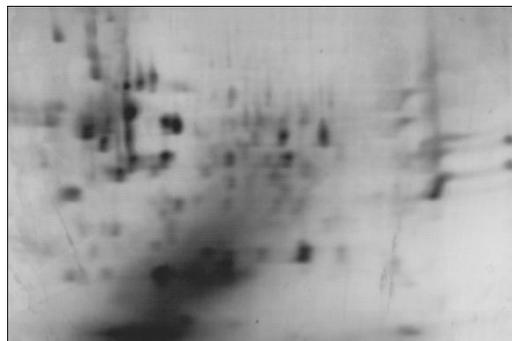


**Figura 21.** Representação da evolução das tensões durante a focagem isoeletrica de duas amostras de C2BBe1 em condições de normóxia – *lane 6* e hipóxia (2h) – *lane 7*.

Por observação do gráfico da figura 21, constata-se que a tensão ao longo das cerca de 10 horas de focagem isoelétrica, tomou sempre valores superiores a 1750 V. A *lane 6* referente a amostra de C2BBe1 em condições de normóxia atingiu os 3250 V 2 horas após o início da focagem, decrescendo até aos 2250 V perto do fim. Já a *lane 7*, correspondente a mesma linha celular mas em condição de hipóxia, registou um máximo de 2750 V 1 hora e 30 minutos depois do início da corrida, decrescendo até aos 1750 V até ao fim deste processo. A electroforese 2D originou os seguintes géis representados nas figuras 22 e 23 que revelam muitos *spots* e bem resolvidos.



**Figura 22.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 correspondente à *lane 6* em condições de normóxia. Corado com prata.

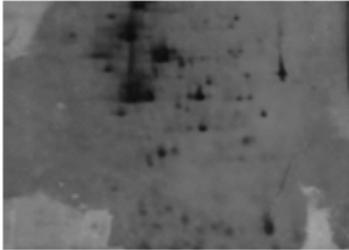


**Figura 23.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 correspondente à *lane 7* em condições de hipóxia (2h). Corado com prata.

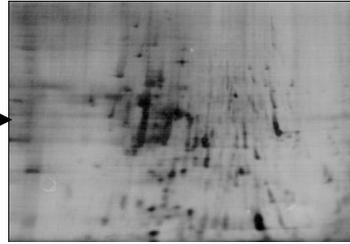
#### **4. Segunda Dimensão – Electroforese bidimensional (2D)**

Terminada a focagem isoelétrica, as *strips* são retiradas da célula de focagem e incubadas em tampão de equilíbrio com DTT e iodoacetamida. Em seguida, as *strips* são colocadas sobre o topo dos géis e inicia-se a electroforese 2D no sistema da Bio-Rad *Mini-PROTEAN® System* representado na figura:

Após a electroforese a detecção de proteínas nos géis é realizada pelos diferentes métodos de coloração. As figuras seguintes correspondem a alguns géis obtidos, que permitem comparar as linhas celulares sob diferentes condições.



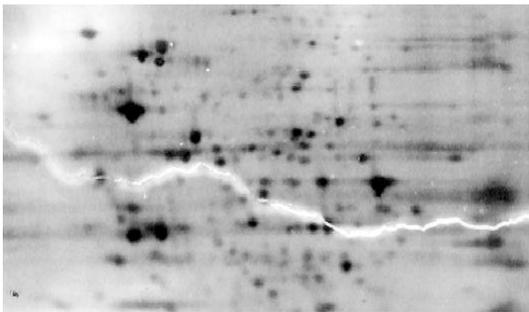
**Figura 25.** Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de normóxia. Corado com prata.



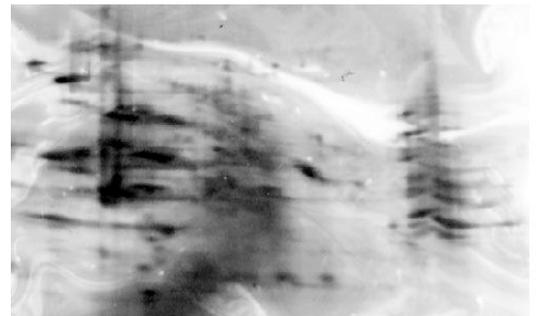
**Figura 26.** Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia 2h. Corado com prata.



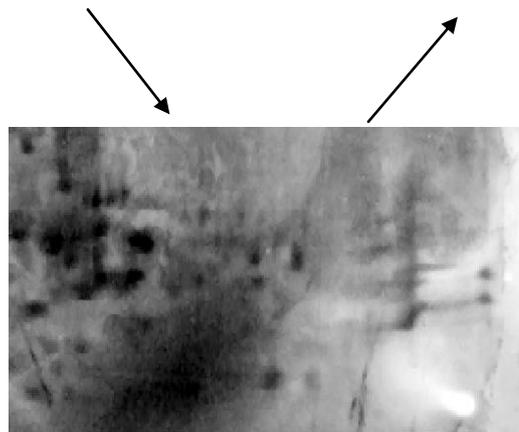
**Figura 24.** Gel 2D da linha celular LS1034 em condições de hipóxia 48h. Corado com prata.



**Figura 28.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de normóxia. Coloração com prata.



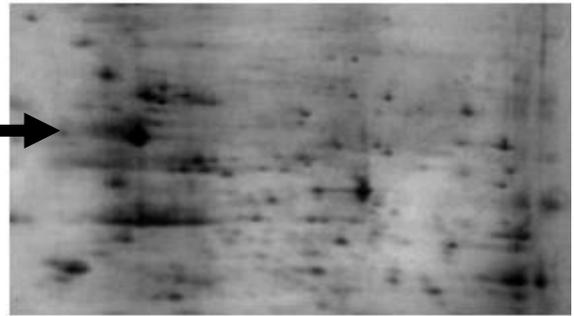
**Figura 27.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de hipóxia 48h. Coloração com prata.



**Figura 29.** Gel 2D da linha celular C2BBe1 em condições de hipóxia 2h. Coloração com prata.



**Figura 30.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de normóxia. Corado com prata.



**Figura 31.** Gel 2D da linha celular WiDr em condições de hipóxia 2h. Corado com prata.

Os resultados obtidos nos géis 2D, permitem analisar as diferenças de expressão protéica entre as três linhas celulares (WiDr, LS1034 e C2BBE1) em condição de hipóxia e normóxia. Como se pode observar pelas figuras 24, 25 e 26, na linha celular LS1034 proveniente do ceco há um acréscimo de *spots* proteicos desde a condição normal de oxigénio até a mais acentuada exposição a ambiente de hipóxia (48h). Analisando singularmente cada *spot* também é possível afirmar que a sua expressão tem tendência a aumentar principalmente na faixa de pH entre os 4-7. Quanto as linhas celulares provenientes do cólon (C2BBE1 e WiDr) verifica-se um decréscimo de *spots* de proteínas da condição normal de oxigénio para hipóxia também na faixa de pH de 4-7 como se pode observar nas figuras 27, 28 e 29 para C2BBE1 e nas figuras 30 e 31 para WiDr.

Era interessante ter feito uma análise mais detalhada dos géis, quer em termos de quantificação de *spots* similares nas diferentes condições como também apontar alguns *spots* em que a expressão seja diferencial entre as condições.

## ***IV. Discussão***



O nível de oxigénio nos tumores constitui um parâmetro essencial na avaliação da distribuição da  $pO_2$  assim como da sua concentração intratumoral que depende essencialmente do fornecimento de oxigénio aos tecidos e da taxa de respiração das células que o constituem. O crescimento dos tumores sólidos, pode levar à formação de regiões de hipóxia, sendo detectados níveis considerados clinicamente relevantes de hipóxia, em cerca de 50-60% nos tumores sólidos dos doentes (Chan et al., 2007).

A hipóxia tumoral resulta de uma inadequada taxa de fornecimento e consumo de oxigénio pelas células tumorais, que por sua vez, é influenciado pela vascularização, densidade da microvascularização dos vasos funcionais, fluxo sanguíneo, saturação de oxigénio no sangue e principalmente pela  $pO_2$  que se regista no tumor, o que pode comprometer as normais funções biológicas. O facto de estar directamente associado à progressão maligna, propagação e resistência à terapia, torna a hipóxia um factor preponderante e motivo de discussão na fisiologia e tratamento tumoral (Hockel & Vaupel, 2001).

Para que os tumores tenham as condições ideais para crescer e proliferarem é necessário uma vascularização funcional adequada. A vascularização para além de criar um ambiente favorável ao crescimento do tumor com o transporte de oxigénio e nutrientes, também serve como via de saída das células tumorais, permitindo a sua disseminação à distância, ou seja, a metastização. As áreas de hipóxia resultam então de um rápido crescimento da massa tumoral, com conseqüente criação de regiões intratumorais mal vascularizadas, aumentando a heterogeneidade, a agressividade e a probabilidade de falha das terapêuticas. Tumores sólidos com regiões de hipóxia são

normalmente associados a um prognóstico fraco (Kinuya et al., 2003; Kunz & Ibrahim, 2003)

A porção de células em hipóxia, em muitos tumores de tipos e estadios semelhantes, pode constituir o factor que mais significativamente varia. Sendo assim, é de extrema importância a abordagem a técnicas capazes de estudar e analisar a hipóxia tumoral para traçar estratégias de tratamento mais adequadas (Zhang, Melo, Rauth, & Ballinger, 2001).

Actualmente, existem vários métodos que de forma directa ou indirecta são capazes de quantificar as regiões de hipóxia. Contudo, algumas destas metodologias apresentam um elevado grau de invasibilidade tornando-as inadequadas ao tratamento clínico. O eléctrodo de oxigénio é um bom exemplo destas técnicas. É considerado uma técnica de referência, apesar da morbilidade associada à sua utilização (Hung et al., 2002).

Com o conhecimento de que as alterações genómicas e proteómicas constituem uma importante resposta adaptativa das células tumorais a ambientes pobres em O<sub>2</sub>, a proteómica constitui um método de diagnóstico precoce e pré-tratamento que permite detectar modificações pós-transcricionais e/ou a expressão diferencial de proteínas e posterior identificação empregando a espectrometria de massa (Vaupel & Harrison, 2004a). Outra importante aplicação da proteómica é a identificação de biomarcadores e previsão da resposta farmacológica de um doente mediante a análise das variações da expressão protéica e as consequentes diferentes propriedades funcionais (Cockman et al., 2009; Han et al., 2006). A possibilidade de existir um método capaz de identificar tão precocemente as variações da expressão protéica em ambientes de hipóxia e dessa forma compreender a resposta celular

associada a esse ambiente, torna aliciante o desenvolvimento de uma metodologia deste tipo.

Para compreender melhor os mecanismos adaptativos associados a este microambiente tumoral, começou-se por preparar amostras de três linhas celulares diferentes, WiDr, C2BBe1 e LS1034, todas de carcinoma colo-rectal. Para a realização de um estudo experimental deste género, é necessário a obtenção de uma amostra com uma considerável grau de pureza e concentração de proteína. Para tal, vários tampões e metodologias foram testados e otimizados até chegar ao que consensualmente reunia os melhores resultados. O tampão RIPA foi o primeiro a ser testado, contudo, tal como os resultados na tabela 6 demonstram, a concentração de proteína ficou aquém do valor pretendido. A fraca progressão dos valores de tensão na focagem isoeléctrica e os géis 2D com muito poucos ou nenhuns *spots* confirmam que o tampão RIPA não é a solução mais adequada para uma técnica deste tipo. Assim sendo, foram testados os tampões MIX e GUY. Para além da solução tampão propriamente dita não foram feitas alterações ao procedimento de extracção. Os resultados com o tampão GUY não forneceram melhorias significativas aos resultados obtidos e embora as quantificações de proteína realizadas com base no tampão MIX demonstrem ser ligeiramente melhores, a focagem isoeléctrica e os géis 2D continuaram a revelar muito poucos *spots*. A última abordagem foi a extracção com TCA (ácido tricloroacético) e acetona. Apesar de ser um método que consome muito mais tempo e difícil de por em prática, na tabela 7 pode-se constatar a eficiência desta nova solução e metodologia. As concentrações de proteína solúvel foram muito superiores às dos extractos preparados com os outros tampões, em alguns casos quase

10x superior. Assim, o recurso ao TCA e acetona tornou-se o método de extração por excelência.

É de maior importância obter uma amostra de elevada concentração em proteína, de modo a que um pequeno volume seja utilizado para perfazer os 75µg de proteína que serão diluídos em tampão de rehidratação e carregados nas *strips* (Berg, J. M. et al., 2011). A progressão da tensão na focagem isoelétrica está dependente da natureza do tampão e na concentração de sais. Os sais podem interferir na focagem isoelétrica, pelo que deve ser reduzida ao máximo a sua concentração na amostra. A explicação reside no facto de que estes sais produzem um aumento da resistência que pode dificultar a progressão da tensão eléctrica e originar artefactos e deslocações horizontais nos géis devido à deficiente focagem das proteínas (Lee & Chang, 2009). Posto isto e considerando que todo o material utilizado está devidamente limpo, os sais apenas surgem do volume de amostra aplicado. Logo, também aqui quanto menor o volume necessário de amostra para os 75 µg de proteína, menor a probabilidade de transportar sais. Está documentado que a precipitação com TCA e lavagem com acetona é o mais popular método de preparação de amostra para a análise do proteoma (Bhima et al., 2011; H. Li et al., 2012). O mecanismo de acção do TCA não está completamente compreendido mas vários estudos comprovam que este será mesmo o melhor método de extração de proteína conhecido (Cilia et al., 2009).

Na determinação da eficiência dos métodos de extração de proteína, a primeira avaliação é realizada através da quantificação de proteína. Para que estas técnicas sejam úteis e rentáveis, é necessário um método que seja capaz de quantificar a concentração de proteína numa amostra. O método do BCA com o *kit* da *Pierce* foi o utilizado nos extratos preparados com RIPA, GUY e MIX. No método de TCA e acetona,

depois de algumas tentativas, verificou-se que não era possível quantificar com exactidão a proteína na nossa amostra. Isto deverá ocorrer porque o *pellet* obtido é solubilizado em tampão de rehidratação que contém ureia e tiourea em concentrações que se tornam incompatíveis com o método do BCA. Assim, passou a utilizar-se o *2D-Quant kit da GE Healthcare*, que apesar de ser um método que consome mais tempo e de execução mais complicada se mostrou exacto e reprodutível.

Após optimização de todo o processo de extracção e quantificação de proteína, prosseguiu-se com as amostras devidamente preparadas para a etapa de focagem isoeléctrica. Este processo inicia-se pela rehidratação das *strips*. Foi necessário seleccionar um tampão de rehidratação capaz de solubilizar devidamente as proteínas, particularmente tendo em conta a anterior precipitação das mesmas em TCA e acetona. A primeira solução tampão utilizada, descrita na tabela 3, revelou insucesso na focagem isoeléctrica como se pode verificar nas figuras 9 e 10. Um bom tampão de rehidratação deve ser capaz de eliminar a estrutura tridimensional das proteínas e solubilizá-las (Sickmann et al., 2002). Para tal, necessita de uma concentração adequada de ureia e tiourea. A tiourea na presença de grandes concentrações de ureia, tal como esta, adquire uma eficiente acção caotrópica, aumentando assim a solubilidade das proteínas (Bennion & Daggett, 2003). Neste sentido, foi aumentada a concentração de ambos os compostos para os valores indicados na tabela 4, constituindo o tampão de rehidratação II. O tampão de rehidratação é ainda constituído por outros compostos como o CHAPS. Este componente é um detergente não iónico, que usado juntamente com agentes redutores como é o caso do DTT (ditiotreitól), que também entra na composição deste tampão, contribuem fortemente

para a solubilização de um maior número de proteínas. O DTT, tal como supracitado, é um agente redutor capaz de desfazer as pontes dissulfito, dando assim um importante contributo na eliminação da estrutura tridimensional das proteínas (Rand & Grant, 2006). A amostra só se encontra devidamente preparada para iniciar a rehidratação, depois da adição do *IPG buffer* e do *Destreak*. O primeiro tem como função facilitar a migração das proteínas, aumentar a sua solubilização e eliminar o excesso de corante do fundo do gel. O *Destreak* melhora a reprodutibilidade e qualidade dos géis 2D, evitando estrias, elimina *spots* provenientes da oxidação de proteínas e estabiliza-as durante toda a corrida. Após o contacto das amostras com a solução de rehidratação é peremptório colocar as amostras num agitador rotativo durante 30 minutos, para que a amostra fique bem homogenizada (Pennington et al., 2004).

Na continuação do processo, as amostras são colocadas na célula de focagem em contacto com as *strips* e dá-se início a rehidratação previamente programada para 12 horas. Terminado esse tempo, inicia-se a focagem isoeléctrica. As proteínas começam então a migrar consoante o seu *pI*. A carga total de qualquer proteína em particular é igual a soma das suas cargas positivas e negativas. Estas são determinadas pelas cadeias laterais básicas e acídicas dos seus aminoácidos constituintes. Se o número de grupos acídicos exceder o número de grupos básicos, a proteína é classificada como ácida. A situação inversa também se verifica. Durante a migração pela *strip* de gradiente de pH imobilizado, as proteínas captam ou perdem protões. Enquanto isto, a sua carga total aproxima-se de zero e a mobilidade também começa a diminuir até atingir o seu *pI* e parar por completo (Angstadt et al., 2002). O programa de focagem isoeléctrica correcto também foi definido por método de tentativa erro, até encontrar uma tensão final adequada à migração e separação das proteínas nas *strips*

com gradiente de pH immobilizado de 3-10. Este programa é definido em três passos principais: o primeiro com uma tensão baixa para remover alguns sais, juntamente com os *Weaks* dos eléctrodos; o segundo consiste num progressivo aumento para uma tensão elevada para mobilizar os iões, polipeptídeos e proteínas e um último passo com tensão elevada para completar a focagem isoeléctrica (Angstadt et al., 2002). A evolução da tensão eléctrica sempre constituiu um dado muito importante e uma referência para a evolução do estudo e optimização deste longo e complexo processo, desde a preparação da amostra, até aos géis 2D. Comparando os gráficos da figura 13 e relacionando-os com os géis 2D das figuras 14, 15 e 16, constata-se que existe uma relação entre ambos. Nas amostras em que a tensão média atingida não ultrapassou os 1500V verificaram-se poucos *spots*, enquanto que nas amostras em que a tensão ultrapassou este valor, os *spots* estão presentes e são bem definidos. Para além destas seria possível fazer mais correlações entre os valores de baixa tensão com os géis 2D, contudo apenas recentemente com a aquisição do novo aparelho de focagem **PROTEAN® i12™ IEF System** da Bio-Rad por parte da Unidade de Biofísica - Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem (IBILI), Faculdade de Medicina se tornou possível a obtenção destes gráficos. Até então, todas as focagens foram realizadas numa célula desprovida da aplicação para a obtenção dos gráficos tensão/tempo do *Centro for Neuroscience and Cell Biology (CNC)*, que gentilmente nos cedeu o aparelho. Com o protocolo já optimizado, apenas há este registo com valores de tensão inferiores a 1500V no novo aparelho mas as tensões baixas que originaram géis mal resolvidos, ou seja, com poucos *spots*, foi algo que muitas vezes se observou.

A tensão total aplicada nas amostras atingiu sempre os valores pretendidos, uma vez que a focagem está programada para que o passo 3 (s3) termine apenas

quando todas as amostras alcançarem 15000V. Contudo, observando a correlação das tensões com os géis 2D, verifica-se que não é suficiente para que a separação ocorra devidamente. É necessário uma tensão média considerável para que as proteínas migrem adequadamente. A concentração de sais está directamente ligada aos valores de tensão e por agora é a explicação mais aceite para este fenómeno (Wu et al., 2010).

Em relação a detecção de proteínas propriamente dita, ou seja, a coloração dos géis, foram testados três métodos. O primeiro, o azul de coomassie, foi testado com duas soluções diferentes. Contudo, ambos os protocolos revelaram-se inadequados para este tipo de coloração e a prata permitiu visualizar com mais pormenor os *spots*. Enquanto o coomassie apresenta uma sensibilidade de 25ng de proteína/*spot*, a da coloração com prata é inferior a 1 ng. Apesar da coloração com prata ser muito mais sensível, revelar com maior contraste e consumir muito menos tempo, é um método mais agressivo para a composição das proteínas. Para recorrer a este tipo de coloração, é necessário desenvolver um protocolo adequado para que seja compatível com a espectrometria de massa (Wait et al., 2000). Os protocolos comuns, oxidam as cadeias laterais dos aminoácidos e introduzem o glutaraldeído que interfere com a determinação da sequenciação. Através da bibliografia passamos a usar apenas o tiosulfato de sódio como sensibilizador, tornando este método eficaz e inofensivo para a estrutura física e química das proteínas (Shevchenko, Wilm, Vorm, & Mann, 1996). Outro método de coloração testado, foi o *Sypro Ruby*, um método de fluorescência também muito sensível, cerca de 1 ng por *spot*/proteína, mas de elevado custo e com a particularidade de que não é possível realizar o *spot picking* à vista desarmada (Lazarev, Robinson, & Patton, 2000). Dada a impossibilidade de utilizar um *spot cutter* que para além de emitir fluorescência, selecciona as proteínas que revelam

diferenças de expressão e faz o seu *picking* automático, continuou-se a recorrer à coloração com prata.

Os resultados obtidos nos géis 2D, revelam um comportamento adaptativo diferente das linhas celulares WiDr e C2BBe1 em relação as LS1034. Como se observa pelas figuras 25, 26 e 27 as LS1034 apresentam um acréscimo de *spots* proteicos desde a condição normal de oxigénio até a hipóxia (48h) na faixa de pH entre os 4-7. De modo a estudar com maior precisão e resolução o perfil proteico desta linha celular seria interessante realizar a focagem isoeléctrica e a electroforese 2D com recurso a *strips* com gradiente de pH mais curto e de maior comprimento, adaptado a faixa de pH onde se regista a maior afluência de proteínas. Quanto a linha celular C2BBe1, observa-se precisamente o contrário das LS1034. Nas figuras 28, 29 e 30 regista-se uma maior quantidade de *spots* para condições normais de oxigénio, verificando-se uma subexpressão dos mesmos consoante a exposição a hipóxia agrava. A faixa de pH onde se encontra a maior afluência de proteínas também seria de 4-7, portanto um estudo semelhante ao que foi referido anteriormente para as LS1034 seria igualmente interessante. Por fim, as WiDr por observação das figuras 31 e 32, apresentam um comportamento semelhantes ao das C2BBe1, verificando-se uma diminuição do número de *spots* da condição de normóxia para hipóxia e em geral uma diminuição de expressão individual de cada proteína. Adaptar a focagem isoeléctrica e a electroforese 2D a um gradiente de pH mais apropriado, começar de 4-7 como já foi referido para as outras linhas celulares seria igualmente interessante.

O perfil proteico destas linhas celulares, pode estar directamente ligado a sua origem. É importante lembrar que as linhas celulares WiDr e C2BBe1 provém do cólon e as LS1034 do ceco, todas de doentes diagnosticados com carcinoma colo-

rectal. Seria interessante no futuro estudar a expressão das proteínas que se diferenciam no estado de normóxia para hipóxia, assim como as diferenças de comportamento entre as linhas celulares do mesmo tipo de cancro.

***V. Conclusão e  
Perspectivas  
Futuras***



A electroforese bidimensional (2D) é a principal técnica utilizada na proteómica para separar as proteínas e prepará-las para posterior identificação por espectrometria de massa. O trabalho desenvolvido focou-se na optimização de um processo de separação de proteínas reprodutível para análise do proteoma de adenocarcinoma colo-rectal. O objectivo proposto foi cumprido e foi possível concluir a cerca de vários aspectos.

Com este trabalho foi possível concluir que para concretizar uma separação adequada é essencial uma eficiente extracção de proteínas, com concentração e pureza suficientes. Verificou-se, tal como descrito na literatura que o método de extracção com TCA 20% e lavagem com acetona é o método mais eficaz e que surte melhores resultados. A solubilização do *pellet* obtido em tampão de rehidratação com as concentrações de ureia e tiourea adequadas é de igual importância para uma eliminação de interferentes e para que as proteínas sejam capazes de migrar até a faixa de pH correspondente ao seu pI, durante a focagem isoeléctrica (primeira dimensão – separação pelas cargas).

Ainda na electrofocagem é também importante realçar, que as proteínas necessitam de uma tensão total e média suficientemente elevadas para migrarem adequadamente e obter spots bem resolvidos.

Após a electroforese 2D (segunda dimensão – separação pela massa) é essencial um método de coloração, sensível e compatível com a espectrometria de massa. A coloração com prata demonstrou ser o método mais concordante com estas duas características com a ressalva de que nem todos os protocolos respeitam a compatibilidade com o espectrómetro.

Por fim, pelos resultados preliminares obtidos nos géis 2D, podemos afirmar que a hipóxia regula a expressão de proteínas e de modo diferente entre as linhas celulares do mesmo tipo de tumor, neste caso do carcinoma colo-rectal.

Desta forma e tendo em conta o objectivo inicial do trabalho será de extrema relevância, a continuidade deste longo, complexo e optimizado processo de separação de proteínas e prosseguir com a identificação de cada um dos *spots* de interesse por MALDI-TOF/TOF e com recurso a base de dados *Mascot*.

## **VI. *Bibliografia***



- Angstadt, C., Coomes, M. W., Cory, J. G., Crabb, D. W., Devlin, T. M., Glitz, D. G., Glew, R. H., et al. (2002). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. (T. M. Devlin, Ed.) *Management* (fifth., p. 1169). New York: Wiley-liss.
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry : A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, 2012. doi:10.1155/2012/282574
- Basson, M. D., Modlin, I. M., & Madrit, J. A. (1992). Human Enterocyte ( C2BBe1 ) Migration Is Modulated In Vitro by Extracellular Matrix Composition and Epidermal Growth Factor, 90(July), 15-23.
- Bennion, B. J., & Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Production, 2003*(Track II).
- Bhima, B., Devi, T. A., Reddy, M. S., Reddy, Y. R., & Rao, L. V. (2011). Optimized Protein Extraction from Yeast ( *Saccharomyces cerevisiae* ) for 2-D Gel Electrophoresis. *Electrophoresis, 8*, 77-84.
- Blaum, K. (2006). High-accuracy mass spectrometry with stored ions. *Physics Reports, 425*, 1-78. doi:10.1016/j.physrep.2005.10.011
- Cairns, R., Papandreou, I., Denko, N., Microenvironment, T., Cairns, R., Papandreou, I., & Denko, N. (2006). Overcoming Physiologic Barriers to Cancer Treatment by Molecularly Targeting the Tumor Microenvironment Overcoming Physiologic Barriers to Cancer Treatment by Molecularly Targeting the. *Molecular Cancer Research, 61-70*. doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0002
- Carolina, N. (2008). Development and Characterization of an Ionization Technique for Analysis of Biological Macromolecules : Liquid Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization, 80(17), 6773-6778.
- Casalta-lobes, J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Rio, J., Cristina, A., Oliveiros, B., Sarmento-ribeiro, A. B., et al. (2011). Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines : The Role of Nuclear Medicine. *Online, 2011*(August), 408-417. doi:10.4236/jct.2011.23056
- Chan, N., Milosevic, M., & Bristow, R. G. (2007). Tumor hypoxia , DNA repair and prostate cancer progression : new targets and new therapies. *DNA Repair, 3*, 329-341.
- Chen, Y., Cairns, R., Papandreou, I., Koong, A., & Denko, N. C. (2009). Oxygen Consumption Can Regulate the Growth of Tumors , a New Perspective on the Warburg Effect. *Cancer, 4*(9). doi:10.1371/journal.pone.0007033
- Cilia, M., Fish, T., Yang, X., Mclaughlin, M., Thannhauser, T. W., & Gray, S. (2009). ARTICLE A Comparison of Protein Extraction Methods Suitable for Gel-Based Proteomic. *Proteins, 201-215*.

- Cockman, M. E., Webb, J. D., Kramer, H. B., Kessler, B. M., & Ratcliffe, P. J. (2009). Proteomics-based Identification of Novel Factor Inhibiting Hypoxia-inducible Factor ( FIH ) Substrates Indicates Widespread Asparaginyl Hydroxylation of Ankyrin Repeat Domain-containing Proteins \* □. *Molecular & Cellular Proteomics*, 535-546. doi:10.1074/mcp.M800340-MCP200
- Crank, J. A. (2009). Ionic liquids : MALDI-MS matrices and gas chromatography stationary phases.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I.-kyung, Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells.
- El-aneid, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry , Review of the Basics : Electrospray , MALDI , and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy*, (May 2012), 210-230.
- Fonseca, G. N. (n.d.). The role of HER2 / neu , BCL2 , p53 genes and proliferating cell nuclear protein as molecular prognostic parameters in localized prostate carcinoma.
- Gardner, P. R. (2005). Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin , hemoglobin , myoglobin and their associated reductases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(2), 247-266. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.10.003
- Goda, N., Ryan, H. E., Khadivi, B., Rickert, R. C., Johnson, R. S., Goda, N., Ryan, H. E., et al. (2003). Hypoxia-Inducible Factor 1  $\alpha$  Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia Hypoxia-Inducible Factor 1 □ Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. *Society*, 23(1). doi:10.1128/MCB.23.1.359
- Gogichaeva, N. V., Williams, T., & Alterman, M. A. (2007). MALDI TOF / TOF Tandem Mass Spectrometry as a New Tool for Amino Acid Analysis. *Society*. doi:10.1016/j.jasms.2006.09.013
- Han, Y.-hui, Xia, L., Song, L.-ping, Zheng, Y., Chen, W.-li, & Zhang, L. (2006). Comparative proteomic analysis of hypoxia-treated and untreated human leukemic U937 cells. *Proteomics*, 3262-3274. doi:10.1002/pmic.200500754
- Hockel, & Vaupel. (2001). Tumor Hypoxia : Definitions and Current Clinical , AND IN. *Cancer*, 93(4).
- Hung, G.-uei, Weng, Y.-chyang, Lin, W.-yu, Wang, S.-jen, Hsia, C.-chung, Wey, S.-pyng, Wang, H.-ell, et al. (n.d.). Preliminary Study of 99m Tc-HL91 on a Tumor Mouse Model. *Annals of Nuclear Medicine*.
- Hyseni, A., & Groep, P. V. D. (2011). Subcellular FIH-1 expression patterns in invasive breast cancer in relation to HIF-1 $\alpha$  expression. *Cell*, 565-570. doi:10.1007/s13402-011-0053-5
- Jaskolla, T. W., Lehmann, W.-dieter, & Karas, M. (2008). 4-Chloro- □ -cyanocinnamic acid is an advanced , rationally designed MALDI matrix. *PNAS*.
- Jiang, T.-fu, Gu, Y.-long, Liang, B., Li, J.-bai, Shi, Y.-ping, & Ou, Q.-yu. (2003). Dynamically coating the capillary with 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids for separation

- of basic proteins by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 479, 249-254. doi:10.1016/S0003-2670(02)01537-4
- Jones, S., & Thornton, J. M. (1996). Review Principles of protein-protein interactions, 93(January), 13-20.
- Jungblut, P., & Thiede, B. (1997). PROTEIN IDENTIFICATION FROM 2-DE GELS BY MALDI MASS SPECTROMETRY. *Heart*, (April), 145-162.
- Kinumi, T., Saisu, T., Takayama, M., & Niwa, H. (2000). Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 422(September 1999), 417-422.
- Kinuya, S., Li, X.-feng, Yokoyama, K., Mori, H., Shiba, K., & Watanabe, N. (2003). Reduction of 99m Tc-sestamibi and 99m Tc-tetrofosmin uptake in MRP-expressing breast cancer cells under hypoxic conditions is independent of MRP function. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 30(11), 1-3. doi:10.1007/s00259-003-1268-0
- Kunz, M., & Ibrahim, S. M. (2003). Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer*, 13, 1-13.
- Laurent-puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J.-baptiste, Lecomte, T., Rougier, P., et al. (2009). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Analysis of PTEN , BRAF , and EGFR Status in Determining Benefit From Cetuximab Therapy in Wild-Type KRAS Metastatic Colon Cancer. *Society*, 27(35). doi:10.1200/JCO.2008.21.6796
- Lay, J. O. (2002). MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY OF BACTERIA, (October 2001). doi:10.1002/mas.10003
- Lazarev, A., Robinson, M., & Patton, W. F. (2000). A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling Proteomics and 2-DE. *System*, 3673-3683.
- Lee, D.-yen, & Chang, G.-dong. (2009). Electrolytic Reduction : Modification of Proteins Occurring in Isoelectric Focusing Electrophoresis High Salts. *Spring*, 81(10), 3957-3964.
- Li, H., Wang, J., Wang, J., Geng, G., Ju, H., & Creamer, R. (2012). Protein extraction methods for the two-dimensional gel electrophoresis analysis of the slow growing fungus *Undifilum oxytropis*. *Journal of Microbiology*, 6(4), 757-763. doi:10.5897/AJMR11.901
- Lie, A., Cayre, A., Corre, D. L., Buc, E., Ychou, M., Bouche, O., Landi, B., et al. (2008). JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 26(3). doi:10.1200/JCO.2007.12.5906
- Lord, M. (2003). Gel Electrophoresis of Proteins. *Cell*.
- Mcdermott, D. F., & George, D. J. (2010). Bevacizumab as a treatment option in advanced renal cell carcinoma : An analysis and interpretation of clinical trial data. *Cancer Treatment Reviews*, 36(3), 216-223. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.ctrv.2009.12.003

- Mildvan, A. S. (1997). Mechanisms of Signaling and Related Enzymes. *North*, 416(June), 401-416.
- Moraes, M. C. B., Lucio, C., Fundamental, D. D. Q., Química, I. D., Paulo, U. D. S., Prof, A., & Prestes, L. (2003). ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR "ELECTROSPRAY" APLICADA AO ESTUDO DE ESPÉCIES INORGÂNICAS E ORGANOMETÁLICAS Maria Carolina B. Moraes. *Energia Nuclear*, 26(4), 556-563.
- Pellegrino, M. A., Milstien, J., Needy, C., Browne, W., & Petricciani, J. (1979). Cell-Identification Studies Carcinoembryonic antigen (CEA) production. *October*, 15(6).
- Pennington, K., Mcgregor, E., Beasley, C. L., Overall, I., Cotter, D., & Dunn, M. J. (2004). Technical Brief Optimization of the first dimension for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics*, 27-30. doi:10.1002/pmic.200300624
- Peterson, M. D., & Mooseker, M. S. (1992). Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2 BBe clones of the human intestinal cell line, C2BBE1. *Journal of Cell Science*, 600, 581-600.
- Rand, J. D., & Grant, C. M. (2006). The Thioredoxin System Protects Ribosomes against Stress-induced Aggregation. *Molecular Biology of the Cell*, 17(January), 387-401. doi:10.1091/mbc.E05
- Schiller, J., Su, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Leßig, J., Mu, M., Petkovic, M., et al. (2004). Progress in Lipid Research Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, 43, 449-488. doi:10.1016/j.plipres.2004.08.001
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1, O<sub>2</sub>, and the 3 PHDs: How Animal Cells Signal Hypoxia to the Nucleus. *October*, 107, 1-3.
- Shetty, D., Jeong, J.-min, & Shim, H. (2012). Stroma Targeting Nuclear Imaging and Radiopharmaceuticals, 2012. doi:10.1155/2012/817682
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Society*, 68(5), 850-858.
- Sickmann, A., Dormeyer, W., Wortelkamp, S., Woitalla, D., Kuhn, W., & Meyer, H. E. (2002). Towards a high resolution separation of human cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B*, 771, 167-196.
- Slebos, R. J. C., Brock, J. W. C., Winters, N. F., Stuart, S. R., Martinez, M. A., Li, M., Chambers, M. C., et al. (2008). Evaluation of Strong Cation Exchange versus Isoelectric Focusing of Peptides for Multidimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry research articles. *Journal of Proteome Research*, 5286-5294.
- Stewart, G. D., Ross, J. A., McLaren, D. B., Parker, C. C., Habib, F. K., & Riddick, A. C. P. (2009). microenvironment in prostate cancer. *BJU International*, 8-13. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08921.x

- Suardet, L., Gaide, A.-c, Calmã, J.-m, Sordat, B., Givel, J.-c, Eliason, J. F., & Odartchenko, N. (1992). Responsiveness of Three Newly Established Human Colorectal Cancer Cell Lines to Transforming Growth Factors  $\beta$  and  $\gamma$ . *Growth Factors*, 1-7.
- Suzuki, H., Igarashi, S., Nojima, M., Maruyama, R., Yamamoto, E., Kai, M., Akashi, H., et al. (2010). IGFBP7 is a p53-responsive gene specifically silenced in colorectal cancer with CpG island methylator phenotype. *Access*, 31(3), 342-349. doi:10.1093/carcin/bgp179
- Vaupel, P., & Harrison, L. (2004a). Oncologist. *New York*, 9(suppl 5), 4-9.
- Vaupel, P., & Harrison, L. (2004b). Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. *New York*, 9(suppl 5), 4-9.
- Wait, R., Harry, R. A., Westbrook, J. A., Wheeler, C. H., & Dunn, M. J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption / ionization and electrospray ionization- mass spectrometry Proteomics and 2-DE. *Heart And Lung*, 1.
- Williams, J. D., & Burinsky, D. J. (2001). Mass spectrometric analysis of complex mixtures then and now: the impact of linking liquid chromatography and mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 212, 111-133.
- Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S., & Sickmann, A. (2007). Silver- and Coomassie-staining protocols: Detection limits and compatibility with ESI. *Digestion*, 2095-2099. doi:10.1002/elps.200600670
- Wu, H.-chung, Chen, T.-ning, Kao, S.-hsuan, Shui, H.-ai, Chen, W.-jung, Lin, H.-jia, & Chen, H.-min. (2010). Isoelectric Focusing Management: An Investigation for Salt Interference and an Algorithm for Optimization research articles. *Journal of Proteome Research*, 5542-5556.
- Yang, S. Y., Sales, K. M., Fuller, B., Seifalian, A. M., & Winslet, M. C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends in Molecular Medicine*, (April), 225-233. doi:10.1016/j.molmed.2009.03.003
- Yates, J. R. (2001). Mass Spectrometry in Biology. *Journal of Mass Spectrometry*, 1-5.
- Yergey, A. L., Coorsen, J. R., Backlund, P. S., Blank, P. S., Humphrey, G. A., Zimmerberg, J., Campbell, J. M., et al. (2002). De Novo Sequencing of Peptides. *Methods*, 0305(02).
- Zhang, X., Melo, T., Rauth, A. M., & Ballinger, J. R. (2001). Cellular accumulation and retention of the technetium-99m-labelled hypoxia markers BRU59 – 21 and butylene amine oxime. *Nuclear Medicine and Biology*, 28, 949-957.

