

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA**



A espectrometria de massas e as bio-moléculas:

**Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações
íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos
biomarcadores em clínica médica por imageamento
químico-seletivo de tecidos**

PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR^{*}

**Tese apresentada ao programa de pós-
graduação em Química como parte dos
requisitos à obtenção do Título de Doutor, na
área de Concentração Química Orgânica.**

Orientador : Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

***Bolsista CNPQ**

**Campinas – SP
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Ab31e	Abdelnur, Patrícia Verardi. A espectrometria de massas e as bio-moléculas: relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos marcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos / Patrícia Verardi Abdelnur. — Campinas, SP: [s.n], 2010. Orientador: Marcos Nogueira Eberlin. Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Espectrometria de massas. 2. Reações íon/molécula. 3. Peptídeos. 4. Proteínas. I. Eberlin, Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Mass spectrometry and bio-molecules: structure-reactivity relation of peptides by ion/molecule reactions and ion mobility and search for new biomarkers in clinical medicine for chemo-selective imaging of tissues

Palavras-chaves em inglês: Mass spectrometry, Ion/molecule reactions, Peptides, Protein

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Marcos Nogueira Eberlin (orientador), Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre (DBM-UNESP), Prof. Dr. Rodinei Augusti (DQ-UFG), Dra. Regina Sparrapan (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino (FCM-UNICAMP)

Data de defesa: 02/06/2010

***AOS MEUS PAIS POR TODO AMOR, CARINHO, APOIO, INCENTIVO E PELA
TOTAL CONTRIBUIÇÃO À MINHA FORMAÇÃO PESSOAL E PROFISSIONAL.
A MINHAS QUERIDAS IRMÃS QUE SEMPRE ESTIVERAM AO MEU LADO.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin, por todos os ensinamentos transmitidos, pela orientação, confiança, amizade e excelente convivência;

Ao Prof. Dr. Richard M. Caprioli pela disponibilidade de seu laboratório e orientação na realização do trabalho desenvolvido no exterior;

À Dra. Michelle L. Reyzer pela forte contribuição e ensinamentos transmitidos nos experimentos realizados nos EUA, pela ótima convivência e amizade;

À Lívia S. Eberlin por toda contribuição nos experimentos e trabalhos desenvolvidos e pela amizade;

A todos os colegas do Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, especialmente aos amigos Beth, Dena, Fram, Mário, Sérgio, Regina, Rodrigo;

A todos os colegas do *Mass Spectrometry Research Center*, especialmente aos amigos Eduardo, Gwendoline, Jamie, Kristina, Lisa, Maureen, Peggi e Rita, pelo suporte profissional e pessoal em toda minha estadia nos EUA.

Aos meus pais, Elisa e Reinaldo, que estiveram sempre do meu lado, pela educação, carinho, apoio e luta para que meus objetivos fossem alcançados;

A minhas irmãs, Priscila e Elisinha, por estar sempre presente em minha vida;

A toda minha Família que sempre esteve unida e torcendo por mim em todos os momentos;

Ao Gustavo por me apoiar e me incentivar sempre em todas as decisões tomadas para a concretização dos meus sonhos e objetivos;

À CNPq pela concessão da bolsa no Brasil e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche, realizado nos Estados Unidos;

À Deus por estar ao lado, sempre me protegendo e guiando;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome Patrícia Verardi Abdelnur
Nome em citações ABDELNUR, P. V.
Sexo feminino
Filiação Reinaldo Abdelnur e Elisa Aparecida Verardi Abdelnur
Nascimento 03/08/1983 - Angatuba/SP - Brasil
Carteira de Identidade 38606695 ssp - SP - 28/09/1995
CPF 30682311839
Endereço residencial R. Dr. Cesar Bierrembach, 229, Apto. 501
13025-015
Campinas, SP – Brasil
Telefone: +55-19-35795768
Celular: +55-19-81012775
Endereço profissional Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química
Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas
Barão Geraldo - Campinas
13084-862, SP - Brasil
Telefone: +55-19-35213049
Endereço eletrônico e-mail para contato : abdelnur@iqm.unicamp.br
e-mail alternativo : patyvab@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

2006 – 2010 Doutorado em Química.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
Título: A espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos.
Orientador: Marcos Nogueira Eberlin
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2009 Doutorado sanduiche em Química.
Vanderbilt University, Vanderbilt University Medical Center, Biochemistry Department
Título: Busca de biomarcadores de câncer a partir da análise direta de tecidos por *MALDI MS Imaging*
Orientador : Richard M. Caprioli
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2006 Mestrado em Química.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
Título: Estudo Fitoquímico de Citrus: resistência a *Xylella fastidiosa* e interação com *Oncometopia facialis*, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2001 - 2004 Graduação em Química - Bacharelado
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2005 Graduação em Química - Licenciatura
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação complementar

- 2009** Curso em "Biostatistics for MALDI-Imaging and profiling", realizado pela Bruker Daltonics na Vanderbilt University, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA.
- 2008** Treinamento em DESI-MS e DESI-Imaging-MS (LTQ Thermo), realizado no Aston Laboratory (Prof. R. Graham Cooks), na Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- 2008** Curso em "Synapt HDMS Small Molecule Application", realizado na Waters Corporation, Beverly, USA.
- 2007** Curso em "LTQ-Ultra FTMS Training", realizado na Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha.
- 2005** Curso Teórico-Prático "MALDI-TOF", realizado no Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Prêmios e títulos

- 2008** Painele premiado 17º Congresso Brasileiro de Apicultura e 3º de Meliponicultura, Sociedade Brasileira de Apicultura e de Meliponicultura.
- 2006** Painele premiado 29ª Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Química, Sociedade Brasileira de Química.

Artigos completos publicados em periódicos

1. SAWAYA, A. C. H. F., ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, M. N.; CUNHA, I. B. S., KUMAZAWA, S.; AHN, M. R., BANG, K. S., NAGARAJA, N., BANKOVA, V. S., AFROUZAN, H. *Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Propolis*. Talanta, 81, 100-108, 2010.
2. FARACO, R. F. P., OLIVEIRA, G. C. B., ROCHA, A. P. C., ALVES, R. J., ALVES, R. B., ABDELNUR, P. V., EBERLIN, M. N., PRADO, M. A. F. *Tri-n-butyltin hydride-mediated radical reactions of ortho- and meta-iodobenzamides to synthesize benzomacrolactams. Surprising formation of biphenyl compounds from meta-regioisomers*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20, 1504-1514, 2009.
3. EBERLIN, L. S., ABDELNUR, P. V., PASSERO, A., de SA, G. F., DARODA, R. J., de SOUZA, V., EBERLIN, M. N. *Analysis of biodiesel and biodiesel-petrodiesel blends by high performance thin layer chromatography combined with easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*. Analyst (London), v.134, p.1652 - 1657, 2009.
4. ABDELNUR, P. V., EBERLIN, L. S., de SA, G. F., de SOUZA, V., EBERLIN, M. N. *Single-Shot Biodiesel Analysis: Nearly Instantaneous Typification and Quality Control Solely by Ambient Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry (Washington), v.80, p.7882 - 7886, 2008.
5. SAWAYA, A. C. H. F., CALADO, J. C. P., SANTOS, L. C., MARCUCCI, M. C., AKATSU, I. P., SOARES, A. E. E., ABDELNUR, P. V., CUNHA, I. B. S., EBERLIN, M. N. *Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees*. Journal of ApiProduct & ApiMedical Science, v.1, p.37 - 42, 2009.
6. SARAIVA, S. A., ABDELNUR, P. V., CATHARINO, R. R., NUNES, G., EBERLIN, M. N. *Fabric softeners: nearly instantaneous characterization and quality control of cationic surfactants by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v.23, p.357 - 362, 2009.
7. RIBEIRO, A. B., ABDELNUR, P. V., GARCIA, C. F., BELINI, A., SEVERINO, V. G. P., da SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., de CARVALHO, S. A., de SOUZA, A. A., MACHADO, M. A. *Chemical Characterization of Citrus sinensis Grafted on C. limonia and the Effect of Some Isolated Compounds on the Growth of Xylella fastidiosa*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.7815 - 7822, 2008.
8. BENASSI, M., ABDELNUR, P. V., EBERLIN, M. N., OKAZAKI, T., LAALI, K. K. *Intrinsic gas-phase acidity and electrophilicity of model heterocations and carbocations relative to pyridine: Adduct formation versus α - or β -(proton transfer) elimination*. Applied Catalysis. A, General, v.336, p.116 - 127, 2008.
9. LALLI, P. M., CORILO, Y. E., ABDELNUR, P. V., EBERLIN, M. N., LAALI, K. K. *Intrinsic acidity and electrophilicity of gaseous propargyl/allenyl Carbocations*. Organic and Biomolecular Chemistry, 2010, in press.
10. GONÇALVES, R. S.; ABDELNUR, P. V.; SANTOS, V. G.; SIMAS, R. C.; EBERLIN, M. N.; MAGALHÃES, A.; GONZÁLEZ, E. R. P. *Synthesis of Potentially Bioactive PABA-Related N-(aminoalkyl)lactamic Aminoacids and Esters via Selective S_NAr Reaction*. Amino Acids, 2010, in press.

RESUMO

“A espectrometria de massas e as bio-moléculas: Relação estrutura/reactividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons e busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento químico-seletivo de tecidos”

O objetivo principal deste projeto de doutorado foi o de estudar novas aplicações da espectrometria de massas (MS) para bio-moléculas com o emprego de novas técnicas e abordagens recentes. Um dos objetivos foi estudar reações específicas a pressão ambiente para os aminoácidos (AA's), visando uma identificação seletiva e mais rápida de um AA em uma sequência peptídica. Estudou-se também as formas tridimensionais dos peptídeos e de seus íons fragmentos formados (a, b e y), utilizando ferramentas modernas de MS, como a IMMS e reações íon/molécula, uma vez que a estrutura tridimensional exata destes íons ainda não é totalmente elucidada. Uma técnica recente em espectrometria de massas, o imageamento químico por MALDI-MS, foi também empregado na busca de biomarcadores proteicos para câncer. Esta técnica apresenta perspectivas de aplicações em diversas áreas de grande importância como na área médica, uma vez que fornece uma imagem dos constituintes químicos de tecidos. Esta imagem pode detectar um câncer a partir de dados químicos e não apenas pela morfologia das células como é feito atualmente. Neste trabalho, analisou-se amostras de tecidos pancreáticos normais, tumorais e com pancreatite, e algumas proteínas foram identificadas e apresentaram-se potencial como biomarcadores para este tipo de câncer.

ABSTRACT

“Mass spectrometry and bio-molecules: Structure-reactivity relation of peptides by ion / molecule reactions and ion mobility and search for new biomarkers in clinical medicine for chemo-selective imaging of tissues”

The aim of this doctoral project was to study new applications of mass spectrometry (MS) to bio-molecules by using new techniques and recent approaches. One objective was to study specific amino acids (AA's) reactions at room pressure, with the goal of obtaining a more rapid and selective identification of an AA in a peptide sequence. Three-dimensional forms of the peptides and their fragment ions formed (a, b and y), were also studied using modern tools of MS, as ion-mobility mass spectrometry (IMMS) and ion / molecule reactions. This study was important because the exact three-dimensional structure of these ions is not yet fully elucidated. A recent technique in mass spectrometry, the chemical imaging by MALDI-MS, was also employed in the search for protein biomarkers for cancer. This technique presents prospects for applications in several areas of great importance as in the medical field since it provides a picture of the chemical constituents of tissues. In this image, cancer can be detected cancer based on the chemical data and not only on the morphology of cells as is normally done today. In this study, we analyzed samples of normal pancreatic tissue, tumor and pancreatitis, and some proteins have been identified and presented themselves as potential biomarkers for this cancer.

ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ARM	<i>Acoustic Robotic Microspotter</i> – Microespotador robótico acústico
AUC	<i>Area under curve</i> – Área sob a curva
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina de Soro Bovino
CID	<i>Colission-Induced Dissociation</i> - Dissociação induzida por colisão
ESI	<i>Electrospray ionization</i> – Ionização por eletrospray
FA	<i>Formic acid</i> (ácido fórmico)
FT-ICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i> – Ressonância ciclotrônica do íon por transformada de Fourier
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida de alta eficiência
IMS	<i>Imaging Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas com imageamento
IMMS	<i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas com mobilidade iônica
H&E	<i>Hematoxylin & Eosin</i> – Hematoxilina e Eosina
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas de alta resolução
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> – Cromatografia líquida – Espectrometria de massas
LTQ	<i>Linear Trap Quadrupole</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser dissociation ionization</i> – Ionização por dissociação a laser assistida por matrix
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometria de massas
m/z	Razão Massa sobre Carga
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise de Componentes Principais
SA	<i>Sinapinic acid</i> – ácido sinapínico

SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i> – Análises significativas de microordem
t	Tempo
T	Temperatura
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> - Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time of flight</i> – Tempo de voo
T-PER	<i>Tissue Protein Extraction Reagent</i> – Reagente para a extração de proteína em tecido

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Sumário das reações dos diferentes peptídeos com ACN.....	80
TABELA 3.2. Íon fragmento selecionado e a intensidade do íon produto de reação com ACN.....	83
TABELA 4.1. Preparação de padrões diluídos de Albumina (BSA).....	107
TABELA 4.2. Disposição das soluções na microplaca.....	108
TABELA 4.3. Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de epitélio com tumor x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.....	116
TABELA 4.4. Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de epitélio normal x tumor, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.....	119
TABELA 4.5. Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de stroma com tumor x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.....	120
TABELA 4.6. Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma normal x tumor, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.....	122
TABELA 4.7. Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de estroma com tumor x pancreatite após análises por ProTS Data e ClinProTools.....	123
TABELA 4.8. Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma tumor x pancreatite, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.....	125
TABELA 4.9. Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de estroma com pancreatite x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.....	126
TABELA 4.10. Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma normal x pancreatite, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.....	128
TABELA 4.11. Resumo das análises realizadas e o número de íons significativos encontrados por cada programa.....	129
TABELA 4.12. Íons detectados como significativos nas análises de ProTS Data e ClinProTools.....	129

TABELA 4.13. Anotações da sequência da proteína DEF1_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.....	138
TABELA 4.14. Anotações da sequência da proteína DEF3_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.....	139
TABELA 4.15. Anotações da sequência da proteína PAHO_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.....	144
TABELA 4.16. Proteínas identificadas e suas respectivas seqüências, o <i>m/z</i> experimental, e o modo de identificação utilizado.....	147
TABELA 4.17. Valores de absorbância obtidos pelo método colorimétrico para as soluções padrões e amostras TH com concentrações desconhecidas.....	148
TABELA 4.18. Valores de absorbância e os desvios das medidas para as soluções padrões.....	149
TABELA 4.19. Valores de absorbância e concentrações ajustadas para os extratos proteicos.....	150
TABELA 4.20. Posição da amostra coletada pelo HPLC (coluna vermelha), o respectivo tempo de coleta (coluna branca) e a posição referente à aplicação na placa de MALDI (coluna azul) para as amostras a) TH_S01 e b) PH_S01.....	154
TABELA 4.21 Íons detectados como significativos nas análises de ProTS Data e ClinProTools, e íons presentes em frações após a análise por MALDI	156
TABELA 4.22. Íons de interesse selecionados após a detecção por MALDI-TOF, e respectivas as posições na microplaca de 96 poços e na placa de MALDI.....	157
TABELA 4.23. Posição de cada amostra aplicada no gel 1 e 2.....	158

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Fonte de ionização de EASI.....	9
FIGURA 1.2. Mecanismo de reação por FD-ESI.....	10
FIGURA 1.3. Fonte de ionização APTD-ESSI.....	10
FIGURA 1.4. a) Sistema robotizado <i>Nanomate</i> da <i>Advion</i> ®, com imagens do b) placa, c) ponteira e d) bocal.....	11
FIGURA 1.5. Estrutura dos íons a, b, c, d, x, y, z, v e w, que podem ser provenientes da fragmentação de peptídeos em geral.....	12
FIGURA 1.6. Estrutura dos íons b nas formas a) oxazolona cíclica terminal e b) macrocíclica.....	13
FIGURA 1.7. Cella <i>Triwave</i> do <i>Synapt HDMS</i>	14
FIGURA 1.8. Fluxograma dos experimentos de perfil proteico direcionado pela histologia e imagem.....	18
FIGURA 1.9. Fluxograma geral de um experimento de <i>MALDI Imaging</i> em tecido.....	19
FIGURA 1.10. Diferentes métodos utilizados na aplicação de matriz em um tecido....	22
FIGURA 1.11. Sistemas utilizados na aplicação de matriz em tecidos. a) Manual, b) <i>Portrait</i> , c) <i>Shimadzu ChIP</i> , d) <i>ImagePrep</i> , e) <i>Spraycoating</i> e f) Sublimação.....	23
FIGURA 1.12. Fluxograma de um experimento de identificação protéica <i>in situ</i> no tecido.....	24
FIGURA 1.13. Exemplos de experimentos de <i>MALDI Imaging MS</i> . a) Análise tridimensional de um tumor e b) Análise do corpo inteiro de rato.....	25
FIGURA 3.1. Esquema fonte de ionização de EASI.....	34
FIGURA 3.2. a) Vista superior da fonte de FD-ESI, b) Diagrama esquemático de FD- ESI-MS com um extrator de exaustão local instalado no topo da fonte.....	34
FIGURA 3.3. Reação de conversão do íon pirílio ao piridínio, utilizando a lisina como amina.....	40
FIGURA 3.4. Espectro de ESI(+)-MS/MS da lisina protonada <i>m/z</i> 147.....	41
FIGURA 3.5. Esquema de fragmentação da lisina protonada proposto a partir dos íons gerados no espectro de ESI(+)-MS/MS.....	42

FIGURA 3.6. Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e lisina em solução MeOH:H ₂ O (1:1).....	43
FIGURA 3.7. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto <i>m/z</i> 473.....	44
FIGURA 3.8. Esquema da formação do íon <i>m/z</i> 473.....	45
FIGURA 3.9. Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e lisina em solução MeOH.....	46
FIGURA 3.10. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto <i>m/z</i> 437.....	46
FIGURA 3.11: Proposta de mecanismo de fragmentação do íon <i>m/z</i> 437.....	47
FIGURA 3.12. Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e metilamina.....	48
FIGURA 3.13. Espectro de ESI(+)-MS da reação por FD-ESI de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e butilamina.....	49
FIGURA 3.14. Espectro de ESI(+)-MS da reação de FD-ESI de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e lisina.....	50
FIGURA 3.15. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto <i>m/z</i> 437.....	50
FIGURA 3.16. Espectro de ESI(+)-MS da reação de FD-ESI do agente de fluorização e arginina.....	51
FIGURA 3.17. Proposta para o produto da reação de fluorização da arginina.....	51
FIGURA 3.18. Espectros de ESI(+)-MS da reação de anidrido acético e a) Lisina e b) Glutamina.....	53
FIGURA 3.19. Formação do intermediário da reação de lisina e anidrido acético.....	53
FIGURA 3.20. Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon produto <i>m/z</i> 249.....	53
FIGURA 3.21. Proposta de fragmentação do íon produto <i>m/z</i> 249.....	54
FIGURA 3.22. Espectro de ESI(+)-MS da reação de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e a) lisina e b) glutamina utilizando a fonte EASI.....	55
FIGURA 3.23. Espectros de ESI(+)-MS dos AA's serina e triptofano utilizando a fonte EASI.....	56
FIGURA 3.24. Espectro de massas (ESI(+)-MS) do peptídeo nativo.....	57
FIGURA 3.25. Espectro de massas (ESI(+)-MS) do peptídeo nativo após a reação com a) propilvinileter, b) 2-metil-1,3-dioxolano e c) isopreno.....	57

FIGURA 3.26. Estrutura da Angiotensina II e os possíveis íons fragmentos.....	59
FIGURA 3.27. Espectro de massas (ESI(+)-MS) da Angiotensina II.....	59
FIGURA 3.28. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Angiotensina II com ACN no Q2.....	60
FIGURA 3.29. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Angiotensina II com ACN no Q2.....	61
FIGURA 3.30. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Angiotensina II com ACN no Q2.....	62
FIGURA 3.31. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $b_{(2-4)} - NH_3$ da Angiotensina II com ACN no Q2.....	63
FIGURA 3.32. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon y_2 com acetona.....	64
FIGURA 3.33. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido da reação do íon b_2 com acetona.....	65
FIGURA 3.34. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon $b_2 - NH_3$ com acetona.....	65
FIGURA 3.35. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon a_3 com acetona.....	65
FIGURA 3.36. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a interação do íon b_2 e b_4 com 2-metil,1,3-dioxolano no Q2.....	66
FIGURA 3.37. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a interação dos íons y_2 e y_5 com 2-metil-1,3-dioxolano, respectivamente.....	67
FIGURA 3.38. Espectro de massas ESI(+)-MS obtido da reação do íon a_3 com 2-metil-1,3-dioxolano.....	67
FIGURA 3.39. Espectro de massas ESI(+)-MS do íon b_2 da Angiotensina II após a reação com: a) acetonitrila, b) acetona e c) 2-metil, 1,3-dioxolano.....	68
FIGURA 3.40. Espectro de massas (ESI(+)-MS) da a) Bradiquinina e b) Encefalina...	69
FIGURA 3.41. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Bradiquinina com ACN no Q2.....	70
FIGURA 3.42. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a - NH_3 da Bradiquinina com ACN no Q2.....	70

FIGURA 3.43. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Bradiquinina com ACN no Q2.....	71
FIGURA 3.44. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b - NH ₃ da Bradiquinina com ACN no Q2.....	71
FIGURA 3.45. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Bradiquinina com ACN no Q2.....	72
FIGURA 3.46. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y - NH ₃ da Bradiquinina com ACN no Q2.....	72
FIGURA 3.47. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Enkefalina com ACN no Q2.....	73
FIGURA 3.48. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Enkefalina com ACN no Q2.....	74
FIGURA 3.49. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Enkefalina com ACN no Q2.....	74
FIGURA 3.50. Espectro de massas ESI(+)-MS da Substância P.....	75
FIGURA 3.51. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b – NH ₃ da Substância P com ACN no Q2.....	75
FIGURA 3.52. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y – H ₂ O da Substância P com ACN no Q2.....	76
FIGURA 3.53. Espectro de massas ESI(+)-MS da Colecistoquinina.....	76
FIGURA 3.54. Espectros de ESI(+)-MS após o contato do íon a ₃ – H ₂ O da Colecistoquinina com ACN no Q2.....	77
FIGURA 3.55. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Colecistoquinina com ACN no Q2.....	77
FIGURA 3.56. Espectros de ESI(+)-MS após o contato do íon y ₃ da Colecistoquinina com ACN no Q2.....	77
FIGURA 3.57. Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y - H ₂ O da Colecistoquinina com ACN no Q2.....	78
FIGURA 3.58. Espectro de Massas a) ESI(+)-MS e b) ESI(+)-MS/MS da Neurotensina.....	79

FIGURA 3.59. Corrente dos íons totais (TIC) da Encefalina, Bradiquinina e Angiotensina II, respectivamente, correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms).....	86
FIGURA 3.60. Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Angiotensina II....	87
FIGURA 3.61. Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Bradiquinina.....	87
FIGURA 3.62. Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de exposição na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Encefalina.....	88
FIGURA 3.63. Corrente dos íons totais (TIC) do íon fragmento a ₅ da Encefalina.....	89
FIGURA 3.64. Sistema interno do equipamento <i>Synapt HDMS</i> , com a presença da cela de <i>Tri Wave</i>	89
FIGURA 3.65. Espectro de Massas ESI(+)-MS/MS do íon presente no pico com tempo de retenção a) 4,35 e b) 2,37 ms, respectivamente.....	89
FIGURA 3.66. Estrutura a) linear e b) enovelada simulada para o mesmo íon a partir do programa Gaussian.....	92
FIGURA 4.1. Placas de MALDI com seções de tecidos de vários pacientes.....	97
FIGURA 4.2. a) Secção do tecido no criostáto e deposição na placa de MALDI; b) Lavagem da placa de MALDI com etanol.....	98
FIGURA 4.3. a) Esquema do sistema utilizado para eletroforese em gel 1D e b) Foto do sistema real sem a tampa com os cabos condutores da tensão.....	111
FIGURA 4.4. As amostras 1001T, 1067T, 1043T, 1053T com a matriz depositada em cada posição marcada pelo patologista.....	114
FIGURA 4.5. Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de epitélio normal x tumor. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.....	117
FIGURA 4.6. a) Análise de componentes principais (PCA) de epitélio normal x tumor, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon <i>m/z</i> 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon <i>m/z</i> 6.243.....	118

FIGURA 4.7. Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma normal x tumor. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.....	121
FIGURA 4.8. a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma normal x tumor, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 6.243.....	122
FIGURA 4.9. Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma tumor x pancreatite. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.....	124
Figura 4.10: a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma tumor x pancreatite, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 5.067, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 5.067.....	125
FIGURA 4.11. Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma normal x pancreatite. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.....	127
FIGURA 4.12. a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma normal x pancreatite, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 6.243.....	128
FIGURA 4.13. Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas das amostras: 1001-T (esquerda), 1067-T (centro), 1149-T (direita).....	131
FIGURA 4.14. Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas da amostra 1001-T.....	132
FIGURA 4.15 Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas das amostras: 1053-T (esquerda), 1043-T (direita).....	133
FIGURA 4.16. MALDI IMS dos tecidos 1043-T (esquerda) e 1053-T (direita); imagem química dos íons: a) m/z 3.369 e b) m/z 6.243.....	134
FIGURA 4.17. Seqüência da proteína Hemoglobina a) subunidade α e b) subunidade β e as respectivas seqüências dos peptídeos destacadas em amarelo....	137

FIGURA 4.18. Seqüência da proteína DEF1_HUMAN e as seqüências dos peptídeos a) defensina neutrofílica 1 e b) defensina neutrofílica 2, destacadas em amarelo.....	138
FIGURA 4.19. Seqüência da proteína DEF1_HUMAN e as seqüências dos peptídeos a) defensina neutrofílica 1 e b) defensina neutrofílica 2, destacadas em amarelo.....	139
FIGURA 4.20. Espectro de Massas MALDI(+)-TOF após seleção do íon m/z 3.481...	140
FIGURA 4.21. Espectro de Massas MALDI(+)-TOF/TOF do íon m/z 3.481.....	141
FIGURA 4.22. Seqüência da proteína GLUC_HUMAN e seqüência do peptídeo (glucagon) destacado em amarelo.....	141
FIGURA 4.23. Espectro de Massas MALDI(+)-TOF da amostra 1043-T.....	142
FIGURA 4.24. Espectro de Massas MALDI(+)-TOF/TOF do íon m/z 2.235.....	142
FIGURA 4.25. Seqüência da proteína PAHO_HUMAN e seqüência do peptídeo (icosapeptídeo pancreático) destacado em amarelo.....	143
FIGURA 4.26. Imagens referentes aos íons com a) m/z 2.235 e b) m/z 4.182.....	143
FIGURA 4.27. Seqüência da proteína PAHO_HUMAN e seqüência do peptídeo (hormônio pancreático) destacado em amarelo.....	144
FIGURA 4.28. Estrutura da Insulina Humana.....	145
FIGURA 4.29. Espectro de massas MALDI-TOF/TOF da a) insulina humana padrão e b) da insulina presente na amostra analisada.....	146
FIGURA 4.30. Cromatogramas das amostras a) TH_S01, b) TH_S02 e c) TH_S03 utilizando os comprimentos de onda 214nm e 280 nm no detector de UV.....	152
FIGURA 4.31. Cromatogramas das amostras a) PH_S01, b) PH_S02 e c) PH_S03 utilizando os comprimentos de onda 214nm e 280 nm no detector de UV.....	153
FIGURA 4.32. Posições na placa de MALDI que foram analisadas e que geraram (verde) ou não (laranja) espectros de massas com sinais, nos experimentos com as amostras a) TH_S01 e b) PH_S01.....	155
FIGURA 4.33. a) Gel 1 e b) Gel 2 após eletroforese em gel 1D.....	160

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1 Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Bradiquinina com ACN.....	81
GRÁFICO 3.2 Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Angiotensina II com ACN.....	81
GRÁFICO 3.3 Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Encefalina com ACN.....	81
GRÁFICO 3.4 Gráfico da intensidade versus m/z dos íons a, b e y após a reação dos peptídeos a) Bradiquinina, b) Angiotensina II e c) Encefalina com ACN.....	82
GRÁFICO 3.5 Gráfico “ <i>DriftScope</i> ”: drift time x m/z dos íons detectados para II a) Encefalina, b) Bradiquinina e c) Angiotensina II.....	86
GRÁFICO 3.6 Correlação a) linear e b) exponencial de <i>drift time</i> versus m/z dos íons a da Angiotensina II.....	90
GRÁFICO 3.7 Correlação a) linear e b) exponencial de <i>drift time</i> versus m/z dos íons a da Angiotensina II extrapolando para valores altos de m/z	91
GRÁFICO 3.8 Correlação linear e exponencial de <i>drift time</i> versus m/z dos íons a da Angiotensina II para os dados a) experimental e b) simulado.....	91
GRÁFICO 3.9 Mobilidades teóricas para estrutura linear (verde) e enovelada (vermelho) e <i>drift time</i> experimental (azul) obtido para os a) íons a, b) íons b e c) íons y da Angiotensina II.....	92
GRÁFICO 4.1. Gráficos SAM (<i>statistical analysis of microarrays</i>) plotado para análise epitélio tumor x normal após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.....	115
GRÁFICO 4.2. Gráficos SAM (<i>statistical analysis of microarrays</i>) plotado para análise estroma tumor x normal após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.....	119
GRÁFICO 4.3. Gráficos SAM (<i>statistical analysis of microarrays</i>) plotado para análise estroma tumor x pancreatite após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.....	123

GRÁFICO 4.4. Gráficos SAM (<i>statistical analysis of microarrays</i>) plotado para análise estroma normal x pancreatite após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.....	126
GRÁFICO 4.5. Absorbância x concentração das soluções padrões analisadas.....	151

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1. Esquema geral de um procedimento experimental de análise de perfil proteico direcionada pela histologia.....	100
ESQUEMA 4.2. Experimento de MALDI <i>imaging</i> , utilizando Portrait para aplicação da matriz.....	101
ESQUEMA 4.3. Experimento de MALDI <i>imaging</i> de alta resolução, utilizando <i>SprayCoating</i> para aplicação da matriz.....	102
ESQUEMA 4.4. Procedimento experimental geral realizado para a busca de biomarcadores de câncer utilizando os métodos de perfil proteico direcionado pela histologia e MALDI <i>imaging</i>	103
ESQUEMA 4.5. Fluxograma dos métodos de separação e purificação (gel, LC-MS/MS) normalmente utilizados na identificação proteica.....	105
ESQUEMA 4.6. Esquema resumido da análise do íon <i>m/z</i> 3.484 nas amostras 1053-T e 1043-T.....	135

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. IMPORTÂNCIA DOS PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS.....	3
1.2. SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS E SUAS PERSPECTIVAS DE APLICAÇÕES.....	4
1.3. MÉTODOS DE SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS.....	5
1.4. PRINCÍPIOS E INSTRUMENTAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA ANÁLISE DE BIO-MOLÉCULAS.....	7
1.5. ESTRUTURA/REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS POR REAÇÕES ÍON/MOLÉCULA E MOBILIDADE DE ÍONS.....	12
1.6. BUSCA DE NOVOS BIOMARCADORES EM CLÍNICA MÉDICA POR IMAGEAMENTO QUÍMIO-SELETIVO DE TECIDOS.....	15
2. OBJETIVOS.....	27
3. CAPÍTULO 1: Relação estrutura/reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons.....	31
3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.1.1. <i>Materiais e Métodos</i>	33
3.1.1.1. <i>Aquisição de materiais</i>	33
3.1.1.2. <i>Métodos Instrumentais</i>	33
3.1.2. <i>Experimentos de reações de AA's em solução</i>	36
3.1.3. <i>Experimentos de reações de AA's a pressão atmosférica</i>	36
3.1.4. <i>Experimentos de reações dos íons fragmentos de peptídeos a,b e y</i>	37
3.1.5. <i>Experimentos de mobilidade iônica dos íons fragmentos de peptídeos a,b e y</i>	39
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.2.1. <i>Reações de AA's em solução</i>	39
3.2.2. <i>Reações de AA's a pressão atmosférica</i>	49
3.2.3. <i>Reações dos íons fragmentos de peptídeos a,b e y</i>	56
3.2.4. <i>Experimentos de mobilidade dos íons fragmentos de peptídeos a, b e y utilizando o equipamento Synapt HDMS</i>	85

4. CAPÍTULO 2: BUSCA DE NOVOS BIOMARCADORES EM CLÍNICA MÉDICA POR IMAGEAMENTO QUÍMIO-SELETIVO DE TECIDOS.....	93
4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	95
4.1.1. <i>Materiais e Métodos.....</i>	95
4.1.1.1. <i>Aquisição de materiais.....</i>	95
4.1.1.2. <i>Métodos Instrumentais.....</i>	95
4.1.2. <i>Experimentos de imageamento químio-seletivo de tecido por MALDI-TOF.....</i>	96
4.1.3. <i>Experimentos de identificação protéica.....</i>	103
4.1.3.1. <i>Experimentos de MS/MS e HRMS diretamente no tecido intacto.....</i>	103
4.1.3.2. <i>Experimentos tradicionais após homogeneização do tecido.....</i>	104
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	113
4.2.1. <i>Busca de Biomarcadores de câncer.....</i>	113
4.2.2. <i>Método de perfil protéico direcionado pela histologia.....</i>	114
4.2.3. <i>Análise estatística do conjunto de dados.....</i>	115
4.2.4. <i>MALDI IMS.....</i>	130
4.2.5. <i>Identificação das proteínas de interesse.....</i>	136
5. CONCLUSÃO.....	163
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância de Peptídeos e Proteínas:

A importância de peptídeos na fisiologia e patofisiologia tem aumentado fortemente nos últimos anos. Com o progresso mundial da plataforma genômica, a base de entendimento em dados de expressão utilizados para a análise de proteínas e peptídeos tem aumentado drasticamente. Em paralelo, a procura médica por biomarcadores é cada vez mais evidente. Os peptídeos podem atuar como biomarcadores de diversas doenças, como câncer e mal de Alzheimer¹, e detectados em concentrações mínimas por espectrometria de massas (MS)². Os peptídeos são importantes em diversas áreas, como em aplicações biomédicas e farmacêuticas e em construção de novas vacinas recombinantes³ e de drogas peptídicas. Na área alimentícia, os peptídeos são altamente empregados como agentes emulsificantes e conservantes⁴ e são considerados como uma alternativa ecologicamente correta, pois são biodegradáveis⁵. Os peptídeos possuem, ainda, aplicação em biotecnologia, na formação de plantas transgênicas; na medicina veterinária; em materiais ortopédicos⁶; enfim, nos mais diversos setores. Os peptídeos e as proteínas também apresentam papel importante no controle de diversas doenças infecciosas, sendo, portanto agentes terapêuticos importantes⁷.

Outra classe de bio-molécula de grande importância é a das proteínas, moléculas fundamentais para a vida. Uma área atual de grande interesse mundial é a proteômica, a qual está relacionada com a determinação em grande escala do gene que a expressa e da função celular da proteína. A proteômica usa uma coleção de várias técnicas, e entre elas encontramos imagens celulares por microscopia eletrônica e experimentos com chip e *array*, e experimentos genéticos de leitura⁸.

Outra abordagem importante em proteômica é a análise *de novo* de proteínas e populações proteicas isoladas de células e tecidos. Tais estudos normalmente representam grandes desafios devido ao elevado grau de complexidade de proteomas celulares e a baixa abundância de muitas das proteínas envolvidas, o que requer técnicas analíticas altamente sensíveis. A Espectrometria de massas tem cada vez mais se tornado a técnica de escolha para a análise de amostras complexas de

proteínas. A proteômica utilizando a MS se torna viável pela disponibilidade de base de dados de sequências de genes (genoma) e avanços técnicos e conceituais em muitas áreas, como a descoberta e desenvolvimento de métodos de ionização de proteínas, reconhecidos com o prêmio Nobel de 2002 em química. A Proteômica baseada em MS tem se estabelecido como uma tecnologia indispensável para interpretar as informações codificadas em genomas. Até o momento, análises proteicas (sequência primária, modificações pós-traducional (PTMs) ou interações proteína-proteína) por MS tem tido mais sucesso quando aplicadas a pequenos conjuntos de proteínas isoladas em contextos funcionais específicos. A análise sistemática de um número muito maior de proteínas expressadas em uma célula, um objetivo explícito da proteômica, está agora também avançando rapidamente, principalmente devido ao desenvolvimento de novas abordagens experimentais⁸.

Embora tenha tido enorme sucesso, a proteômica-MS ainda enfrenta significantes desafios técnicos. Cada avanço que permite um novo tipo de medida ou melhora a qualidade dos dados por tipos tradicionais de medidas expande a gama de aplicações potenciais de proteômica-MS para biologia molecular e celular.

1.2. Seqüenciamento de peptídeos e suas perspectivas de aplicações:

Atualmente, uma área que está sendo muito explorada e aperfeiçoada, é o seqüenciamento de peptídeos. As principais razões são devido aos peptídeos possuírem funções de grande interesse e aplicabilidades importantes nos tempos atuais; e pelo fato da análise seqüencial de aminoácidos (AA's) e peptídeos ser freqüentemente a etapa inicial na caracterização de novas proteínas, as quais também possuem aplicações atraentes para as indústrias e para o meio acadêmico.

A tecnologia do seqüenciamento de peptídeos pode rapidamente gerar listas de proteínas identificadas a partir de algumas fontes virtuais de materiais protéicos. Assim como a quantificação relativa entre populações protéicas é também freqüentemente realizável. Além disto, os experimentos em proteômica recentes tem sido de larga escala e automatizados. Seguindo esta tendência uma das aplicações mais

compensáveis é a caracterização de proteínas com estruturas complexas. Há também, um aumento de foco nestas “máquinas moleculares”, e a MS é muito valiosa como a primeira etapa para identificação da estrutura destes complexos e, possivelmente, seu estado de modificação. Tem-se realizado a identificação em larga escala de complexos multiproteicos imunoprecipitados para a derivatização da interação-proteína para a caracterização de organelas. Pesquisas intensas são necessárias no presente em proteômica, pois estratégias semelhantes são capazes de detectar e identificar biomarcadores de doenças. Experimentos de MS que comparam níveis de expressões proteicas são muito mais trabalhosos que experimentos *microarray*, mas são atrativos porque as proteínas são os agentes ativos da célula, onde a população de RNAm é freqüentemente um pobre indicador de níveis proteicos. A tecnologia no seqüenciamento de peptídeos está rapidamente se aperfeiçoando. É provável que logo se torne possível quantificar muitas das proteínas em uma linha celular ou tecidos usando espectrometria de massas de alta resolução, especialmente, pois a abertura das técnicas proteômicas baseadas em MS (que é, os limites de detecção e dinâmica) estão sendo aceleradas a novos limites por hardware engenhosos e softwares desenvolvidos. Sistemas biológicos aumentaram a confiança na combinação dos dados de RNAm, proteoma e genética. A proteômica utilizando a MS além de contribuir com dados confiáveis em relação à estrutura química da molécula poderá contribuir com a habilidade de analisar as proteínas em seus níveis endogênicos e em seus estados nativos⁹.

1.3. Métodos de Seqüenciamento de peptídeos:

Estratégias de seqüenciamento universal empregam reagentes químicos para remover um aminoácido (AA) a partir de grupos amino terminal seguido pelo isolamento e análise de derivados de AA's¹⁰. Muitas técnicas, no entanto, são limitadas¹¹. Limitações na eficiência química do processo previnem a determinação da seqüência completa de uma proteína a partir de quantidades mínimas de amostra¹⁰,

por exemplo, a técnica utilizando sódio dodecil sulfato – poliacrilamida gel eletroforese tem uma precisão de apenas 5% em relação a massa do analito¹¹.

Há dez anos atrás, para sequenciar uma proteína quantidades consideráveis precisavam ser purificadas e uma técnica conhecida como degradação de Edman era utilizada. No entanto, este método falha completamente se a proteína for acetilada em seu grupo amino terminal ou se este for bloqueado, pois esta reação requer grupos aminos terminais livres. Durante a década de 90, a Espectrometria de Massas, substituiu a degradação de Edman, isso porque a técnica de MS é muito mais sensível e pode fragmentar peptídeos em segundos ao invés de horas ou dias. Além disto, a MS não requer proteínas e peptídeos purificados e não tem problema na identificação de proteínas modificadas ou bloqueadas⁹. A partir das inovações como Espectrometria de Massas com ionização eletrospray (ESI), os íons são submetidos a uma célula de colisão onde ocorre a dissociação por colisão indutiva (CID), e sob estas condições, os fragmentos peptídicos criam características “precursoras” de seqüências de AA's específicos¹⁰. Com o desenvolvimento das fontes de MALDI e ESI em MS, obteve-se a determinação de massa molecular de proteínas com alta precisão, em níveis de subpicomols e análises de seqüências de peptídeos em pequenas quantidades¹¹. Espectrômetros de massas podem medir a massa de proteínas intactas, no entanto, realiza-se o seqüenciamento de peptídeos ao invés de proteínas, uma vez que a sensibilidade do espectrômetro de massas para proteínas é bem menor que para peptídeos⁹.

Um método recente de seqüenciamento relatado incorpora a modificação química de Edman e a detecção por MALDI-TOF, mas muitas técnicas de MS fazem uso de MS/MS. Variações neste tipo de procedimento têm sido implementadas no setor magnético e instrumentos com transformada de Fourier e ressonância ciclôtrônica de íons, mas vale ressaltar que o mais amplo e versátil instrumento disponível em uso é o espectrômetro de massas triplo quadrupolo¹¹. As vantagens das técnicas de MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação a misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a MS tem sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia central para o campo de proteômica. Como as facilidades da MS em proteínas tem se proliferado,

muitos biólogos agora podem submeter uma amostra e receber uma lista de proteínas que foram identificadas por MS⁹.

1.4. Princípios e Instrumentação de Espectrometria de Massas na análise de bio-moléculas:

Medidas por MS são efetuadas a partir de analitos ionizados e ejetados para dentro de um espectrômetro de massas. Por definição, um espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de massas que mede a razão massa-carga (m/z) de um analito ionizado, e um detector que registra o número de íons em cada valor de m/z .

Ionização por eletrospray (ESI) e Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) são as duas técnicas mais comumente utilizadas para ionizar as proteínas ou peptídeos para análise por espectrometria de massas. A técnica ESI consiste em transferir analitos ionizados da solução para a fase gasosa sendo, portanto facilmente acoplada a técnicas de separação líquida (por exemplo, separação cromatográfica líquida e eletroforética). A técnica de MALDI dessorve e ioniza as amostras a partir de pulsos de laser com o auxílio de uma matriz cristalina e seca. MALDI-MS é normalmente utilizado para analisar misturas relativamente simples de peptídeos enquanto que ESI-MS (LC-MS) são sistemas preferíveis na análise de amostras complexas.

O analisador de massas é fundamental em proteômica-MS, e seus parâmetros chave são a alta sensibilidade, resolução, precisão e exatidão na medida de massa e a capacidade para gerar fragmentos peptídicos (espectros de MS/MS). Existem quatro tipos básicos de analisadores de massas atualmente utilizados em pesquisas proteômicas: os ion-trap, TOF (*time-of-flight*), quadrupolo e analisadores de ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier (FT-MS). Estes espectrômetros diferem em *design* e desempenho. Estes analisadores podem ser utilizados isoladamente ou em sistemas híbridos em sequência para explorar as vantagens individuais⁸.

- EASI (*Easy Ambient Sonic Spray Ionization*):

A espectrometria de massas vem sendo explorada cada vez mais, devido a sua ampla utilização e aplicações em diversas áreas. Diversas fontes de ionização foram desenvolvidas e continuam sendo desenvolvidas no mundo inteiro por diversos grupos. Prof. Graham Cooks, em 2004, desenvolveu uma técnica de ionização a pressão atmosférica, denominada DESI¹² (*Desorption ElectroSpray Ionization*), a qual não necessita de preparo prévio da amostra. A amostra é colocada entre o spray oriundo da fonte de *eletrospray* e a entrada do espectrômetro de massas. Esta técnica teve repercussão mundial e vários outros laboratórios passaram a utilizar o DESI, devido a sua facilidade e praticidade nas análises.

Porém esta técnica necessita de alta voltagem, uma vez que o spray de íons é gerado igualmente na fonte de *eletrospray*. O grupo de pesquisadores do laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas¹³ desenvolveu, então, em 2006 uma nova técnica de ionização, na qual o *spray* de íons é gerado, a partir do cisalhamento de gotas provenientes de um *sonic spray*. Esta característica torna a técnica muito atrativa, pois, além da vantagem de ter uma análise a pressão ambiente, sem preparo prévio da amostra e extremamente rápida, não utiliza voltagem e nem temperatura na fonte. Esta técnica foi denominada inicialmente por DESSI¹³ (*Desorption Electro SonicSpray Ionization*) e em 2008 foi renomeada por EASI (*Easy Ambient SonicSpray Ionization*)¹⁴ (Figura 1.1).

Desde seu desenvolvimento, o EASI vem sendo amplamente utilizado no Laboratório ThoMSon, como, por exemplo, na análise de fármacos, biocombustíveis, óleos vegetais, amaciantes, entre outros. Além da análise direta de amostras, o acoplamento de EASI com outros sistemas também está sendo realizado, como a adaptação com MIMS (*Membran Introduction Mass Spectrometry*)^{14a}, TLC (*Thin Layer Chromatography*)^{14b} e HPTLC (*High Performace Thin Layer Chromatography*)^{14c}. Reações químicas também estão sendo realizadas via EASI.

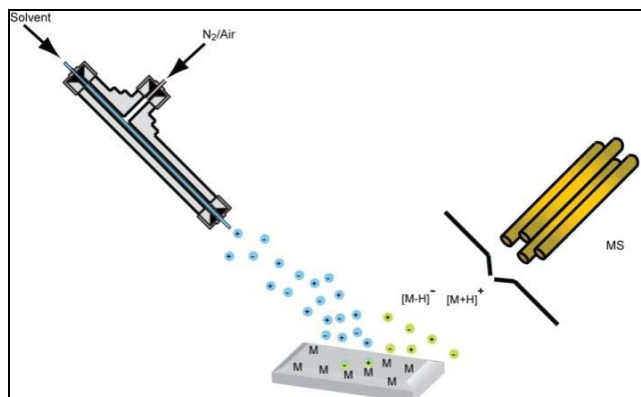


Figura 1.1: Fonte de ionização de ESI.

- FD-ESI (*Fused-Dropled Electrospray Ionization*):

Espectrometria de massas por FD-ESI é utilizada como um método simples para obter diretamente espectro de massas de alta qualidade de amostras biológicas devido a diminuição da solubilidade de componentes indesejáveis. FD-ESI é um método de duas etapas de ionização por eletrospray e tem sido aplicado com grande sucesso para moléculas biológicas ionizáveis (assim como proteínas e peptídeos) dissolvidas em água pura. Os processos de ionização na fonte de FD-ESI são diferentes de uma convencional de ESI, onde o eletrospray é gerado diretamente de uma amostra em solução. Para FD-ESI a amostra em solução aquosa é primeiramente dispersa em uma fina mistura de gotas por um nebulizador ultrassônico. O aerosol neutro resultante é então fundido com gotas carregadas geradas a partir do eletrospray normal (Figura 1.2). Os íons, os quais são gerados na reação, são detectados por um analisador de massas^{15,16}. Em FD-ESI, a polaridade do solvente orgânico para eletrospray parece ser um fator mais significativo na determinação da eficiência de ionização do analito do que da amostra em solução. Então, a qualidade do espectro de FD-ESI pode ser ajustada variando-se a composição do solvente do eletrospray, tornando-se uma técnica poderosa na remoção facilitada de interferentes de compostos orgânicos.

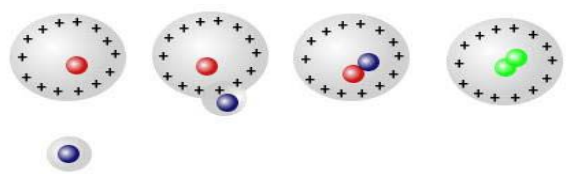


Figura 1.2: Mecanismo de reação por FD-ESI.

- APTD-ESSI (*Atmospheric Pressure Thermal Dissociation- Electrosonic Spray Ionization*):

Cooks *et al.*¹⁸ desenvolveram a técnica APTD-ESSI; e o esquema desta fonte de ionização está ilustrado na figura 1.3.

Dissociação térmica a temperatura ambiente (APTD) representa um método para a fragmentação de íons de proteínas e peptídeos, o qual ocorre fora do espectrômetro de massas. Íons de peptídeos gerados por ionização com *spray* eletrossônico (ESSI) ou outro método de ionização atravessam um tubo de metal aquecido, onde eles fragmentam. Uma fragmentação extensiva é normalmente obtida com este método, o que o torna atrativo para elucidação da seqüência primária de peptídeos e proteínas. O mais importante é que os fragmentos neutros chegando do APTD podem ser caracterizados *on-line* pela ionização da descarga corona, promovendo uma informação estrutural complementar que não é facilmente acessível via métodos de dissociação conduzidos no vácuo.

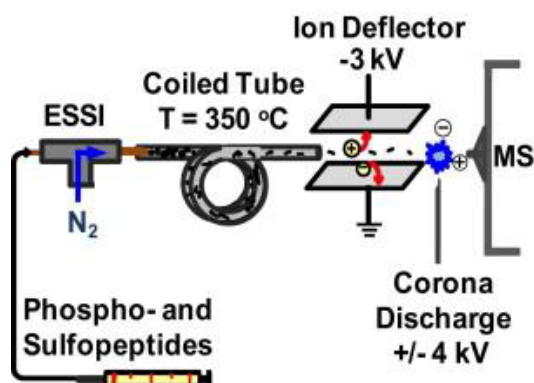


Figura 1.3: Fonte de ionização APTD-ESSI.

- Sistema automatizado com fonte de ionização *nanoESI* - Nanomate:

A empresa *Advion* lançou no mercado há alguns meses um sistema de *nanoESI* robotizado capaz de analisar até 400 amostras em seqüência, chamado *Nanomate* (Figura 1.4 a). As amostras são colocadas em placas descartáveis (Figura 1.4 b), os quais podem conter de 96 ou 384 pocinhos; a partir daí, uma ponteira (Figura 1.4 c) também descartável aspira um volume pré-determinado da amostra e coloca em contato com o bocal (Figura 1.4 d). Uma voltagem é então aplicada ao *nozzle* e o *nanospray* é formado. O fluxo da amostra, a voltagem aplicada, a pressão de gás são ajustados, e com 5 μL de amostra é possível obter um *spray* constante de 25 min. Esta técnica possui várias vantagens, dentre elas pode-se citar a pequena quantidade de amostra necessária para análise, o que também propicia menor sujeira dentro do espectrômetro de massas; outra vantagem relevante é que o sistema utiliza vários itens descartáveis, inclusive o *nanochip*, evitando-se assim, contaminação cruzada de amostras, proporcionando resultados muito confiáveis; além disto, o *spray* gerado é estável e o sistema possui boa reprodutibilidade.

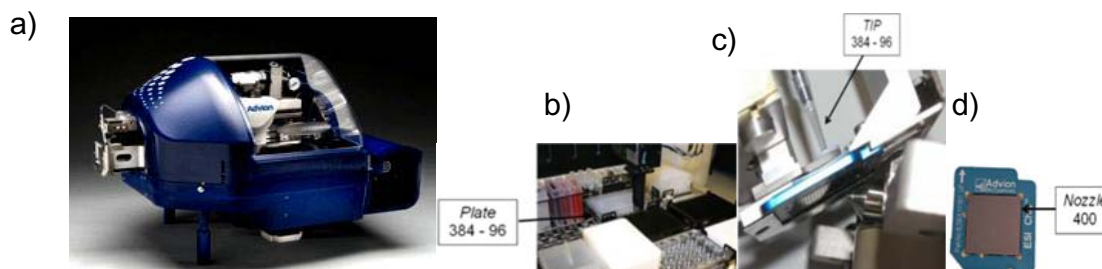


Figura 1.4: a) Sistema robotizado *Nanomate* da *Advion*®, com imagens do b) placa, c) ponteira e d) bocal.

1.5. Estrutura/Reatividade de peptídeos por reações íon/molécula e mobilidade de íons:

- Estrutura/Reatividade dos íons fragmentos de peptídeos:

A identificação e o seqüenciamento de proteínas são normalmente realizados utilizando a espectrometria de massas MS/MS e pela análise de tipos específicos de fragmentos obtidos a partir dos peptídeos protonados. A identificação sequencial total ou parcial pode ser alcançada por este método⁸.

Os peptídeos quando ionizados e analisados por um espectrômetro de massas geram, além do íon molecular, íons provenientes de fragmentações internas das suas moléculas (Figura 1.5)¹⁹, os quais são: íons N-terminal e C-terminal: a, b, c, x, y, z, v e w entre outras perdas, como amônia e água¹⁹.

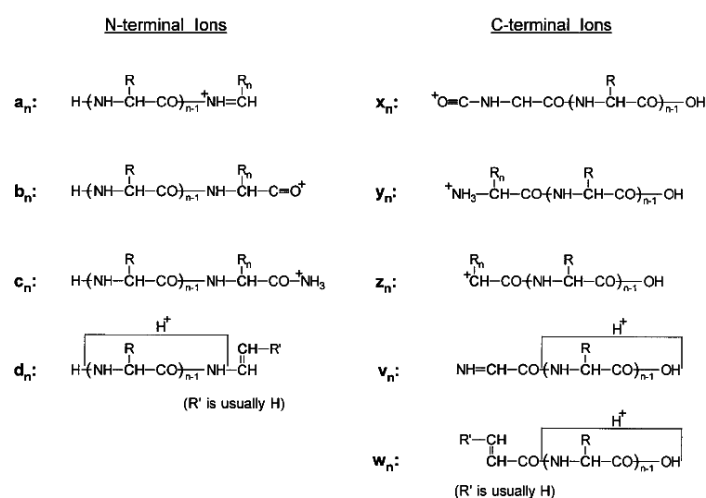


Figura 1.5: Estrutura dos íons a, b, c, d, x, y, z, v e w, que podem ser provenientes da fragmentação de peptídeos em geral.

Os íons fragmentos de peptídeos mais comuns são os íons a, b e y, mas a forma tridimensional exata e a reatividade destes íons fragmentos gasosos estão ainda sob investigação. Existem diferentes propostas em relação à estrutura dos íons b, tais como íon acílio e íons cíclicos tipo oxazolona. Yalcin *et al*²⁰. realizou experimentos

utilizando a técnica FAB (*Fast-Atom Bombardment*) para formar íons e concluiu que íons b consistem em uma cadeia peptídica linear, com uma estrutura oxazolona cíclica terminal; e após a perda de CO, o anel oxazolônico abre e são formados os íons a. Além disso, há evidências que íons b possuem estruturas macrocíclicas intermediárias^{21,22} (Figura 1.6); uma estrutura macrocíclica para um específico íon b-5 foi proposta como resultado de estudos computacionais, comparação dos gráficos *breakdown*²³ e espectrometria de massas de mobilidade iônica (IMMS)²⁴.

Recentemente, Garcia e col.²⁵ realizaram experimentos utilizando marcação de isótopo estável com IMMS, os quais confirmaram a hipótese anterior da forma macrocíclica para íons fragmentos peptídicos, principalmente para íons b maiores. Por outro lado, alguns estudos têm investigado as estruturas dos íons a, e os resultados não são claros, sugerindo uma mistura de estruturas lineares e cíclicas para estes íons²⁴.

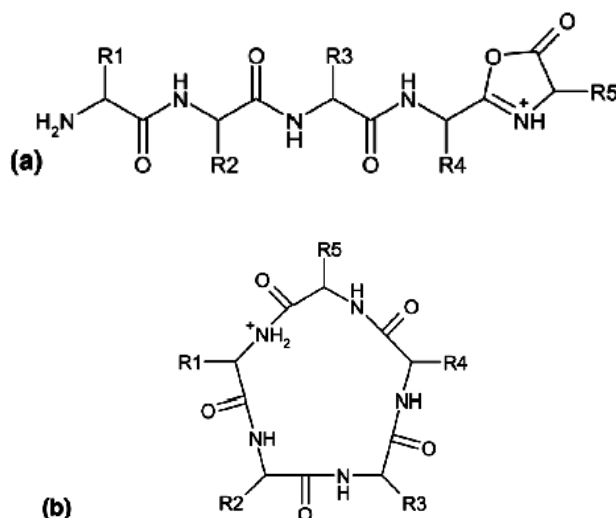


Figura 1.6: Estrutura dos íons b nas formas a) oxazolona cíclica terminal e b) macrocíclica.

Como descrito acima, as estruturas químicas de íons fragmentos peptídicos são distintas, mas a estrutura de íons b mais aceita é a de um íon acílio na cadeia terminal. Íons acílio são bem conhecidos e há estudos relatando sua estrutura mais estável e

também seu caráter reacional. Estudos anteriores foram realizados produzindo íons acílio em solução²⁶, e este estudo foi ampliado posteriormente para a fase gasosa²⁶. Uma vantagem da reação em fase gasosa é a capacidade de estudar a reatividade intrínseca das moléculas e íons sem a interferência do solvente ou de contra íons da solução. Estudo em fase gasosa²⁶ propôs que íons acílio são estáveis sob vácuo e reagem da forma semelhante a compostos carbonílicos. Estudos²⁶ também confirmam que estes íons tendem a ter o mesmo comportamento tanto em fase gasosa quanto em solução, reagindo muito bem com compostos nitrílicos. Íons acílio em fase gasosa reagem rapidamente com aril nitrilas para formar íons 1,3,5-oxadiazinium pela ciclização via adição dupla²⁶. Além disso, a adição de uma nitrila ao íon acílio forma um aduto. Íons b devem ter o mesmo comportamento tanto para estrutura de íon acílio ou cíclico em sua cadeia terminal. No entanto, a reação não deve ocorrer para os íons y.

- Estrutura/Mobilidade dos íons fragmentos de peptídeos:

Outra abordagem foi estudar a forma da estrutura dos íons fragmentos peptídicos usando IMMS, a qual é uma técnica recentemente desenvolvida capaz de separar íons de acordo com suas mobilidades²⁷. Resumidamente, os íons são submetidos a uma atmosfera de gás neutro sob a influência de um campo elétrico e são separados de acordo com o tempo que levam para atravessar o *T-wave* (Figura 1.7). O tempo de *drift* depende de muitos fatores como a massa, estado de carga e interação de seção de choque com o gás.

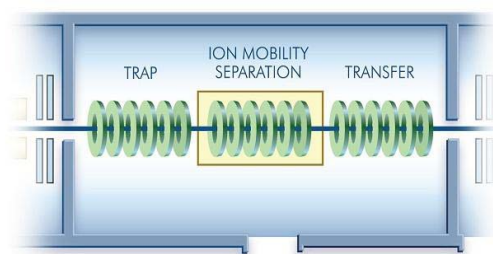


Figura 1.7: Cella *Triwave* do Synapt HDMS.

A IMMS pode separar seletivamente íons isômeros ou isóbaros (de mesma m/z)²⁷, e, portanto poderia distinguir entre cadeias terminais lineares ou cíclicas nas estruturas de íons b.

O acoplamento da separação por mobilidade iônica com espectrometria de massas tem se tornado um método poderoso para a análise de misturas complexas e para determinação de estrutura molecular. A IMMS tem sido considerada também uma técnica complementar para métodos mais utilizados como cristalografia de raio-X e ressonância magnética nuclear (NMR) para análises estruturais de três dimensões para proteínas. Há evidências que a estrutura da proteína em fase gasosa pode refletir, sob condições controladas, a estrutura nativa em solução. Vários estudos²⁸ tem mostrado uma boa correlação entre medidas de média rotacional da seção de choque obtidas a partir de raio-X e NMR com medidas obtidas por experimentos com mobilidade iônica.

1.6. Busca de novos biomarcadores em clínica médica por imageamento quimio-seletivo de tecidos

- Biomarcadores proteicos para câncer:

Biomarcador é um indicador que mede um estado biológico específico, indicando a presença ou o estágio da doença. Os biomarcadores podem ser utilizados clinicamente para diagnóstico ou monitoramento de atividade de doenças, para guiar padrões moleculares terapêuticos ou avaliar resposta terapêutica³².

As proteínas são provavelmente as moléculas mais afetadas quando as doenças são diagnosticadas, além de refletirem a fisiologia celular³³, e há uma grande expectativa na descoberta de muitos biomarcadores proteicos. A busca de biomarcadores proteicos é de grande interesse e vem sendo cada vez mais explorada, podendo atuar na detecção inicial e em possíveis tratamentos de diversas doenças, como “mal de *Alzheimer*”^{34,35}, síndrome de *Down*³⁶, diabetes³⁷, miopia³⁸, doenças cardiovasculares³⁹⁻⁴¹ e diferentes tipos de câncer, como câncer de próstata⁴²⁻⁴⁵,

pâncreas⁴⁶⁻⁴⁸, pulmão^{49,50}, ovário⁵¹⁻⁵⁵, mama⁵⁶⁻⁵⁸ e carcinoma hepatocelular⁵⁹⁻⁶¹, entre outras⁶²⁻⁷⁰.

Uma das áreas mais estudadas atualmente é a descoberta de biomarcadores proteicos visando à obtenção de um *screening* capaz de detectar cada tipo de câncer no estágio inicial, uma vez que diagnósticos de centenas de tipos de câncer permitirão uma escolha mais efetiva da terapia a ser efetuada e uma melhor triagem clínica.

Um biomarcador de câncer é uma substância encontrada em uma quantidade alterada no corpo, indicando que um certo tipo de câncer está presente. Idealmente, este biomarcador deve estar presente no sangue ou em outros fluidos biológicos que possam ser acessados de uma maneira não invasiva. Infelizmente, a descoberta de biomarcadores proteicos em soros associados a tumor nas décadas passadas não foi efetiva para diagnosticar o câncer primário. Uma razão para a baixa sensibilidade e especificidade de um biomarcador é a presença destes marcadores no soro de indivíduos sem câncer ou com a doença não maligna.

Atualmente há alguns testes clínicos sanguíneos baseados em biomarcadores proteicos, como CA 19-9 (*cancer antigen*) para câncer pancreático e coloretal, CA15-3 para câncer de mama, CA125 para câncer de ovário⁷¹, PSA (*prostate specific antigen*) para câncer de próstata e CEA (*carcinoembryonic antigen*) para câncer ginecológico³³. A maioria dos testes falha na detecção do câncer em estágio inicial, e na especificidade, sendo um problema também na detecção de doenças em estágio avançado. A heterogeneidade genética no meio das populações é problemática, pois um biomarcador pode indicar a doença em um grupo, mas pode ser estatisticamente insignificante em outro.

As análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento de perfil dos mesmos dentro de grupos de amostras diferentes, por exemplo, em indivíduos doentes e saudáveis. O resultado final de um experimento é uma lista de peptídeos/proteínas que são regulados com aumento ou decréscimo entre os dois grupos. A determinação da variação na concentração relativa e absoluta é fundamental para a descoberta de biomarcadores válidos.

- Obtenção de novos biomarcadores proteicos:

O esforço de descobertas de biomarcadores atualmente está em dois caminhos: acadêmico e industrial. Porém, apesar do grande investimento na área, a velocidade de introdução de novas proteínas analitos aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) é muito pequena. Desde 1998, apenas 1 nova é inserida no mercado por ano^{32,71}. As razões deste fenômeno são: o caminho longo e difícil a partir da descoberta ao teste clínico e a falta de coerência e de processos compreensivos para o desenvolvimento de biomarcadores. Há seis componentes de processos essenciais para obter um novo biomarcador proteico: descoberta, qualificação, verificação, otimização, validação clínica e comercialização³².

Métodos de obtenção de perfil proteico direcionado pela histologia (*Histology-directed Protein Profiling*) e MALDI IMS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry*) são duas técnicas relativamente novas (Figura 1.8)⁷² e que tem sido utilizada na descoberta de biomarcadores proteicos. A técnica de MALDI IMS está despertando muito interesse na área por apresentar algumas vantagens: pouca ou quase nenhuma preparação de amostra; a amostra não precisa ser homogeneizada para análise; e o resultado é a análise espacial dos constituintes químicos presentes no tecido.

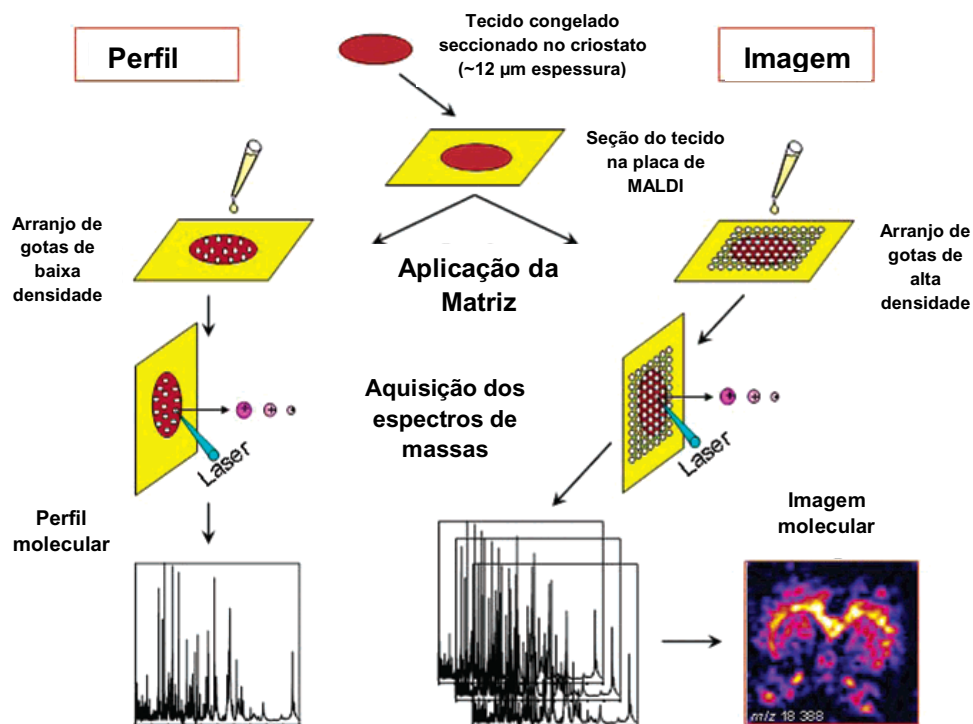


Figura 1.8: Fluxograma dos experimentos de perfil proteico direcionado pela histologia e imagem.

- Perfil protéico direcionado pela histologia:

Métodos de perfil protéico direcionado pela histologia (*histology-directed protein profiling methods*) têm sido amplamente utilizados quando se visa determinar populações celulares específicas, como estroma e epitélio, mantendo alta qualidade espectral para cada classe. Este trabalho necessita do envolvimento de um patologista, o qual seleciona populações celulares de interesse a ser revestida seletivamente com a matriz. A matriz é depositada sobre a região marcada via um sistema de ejeção acústica de gotículas automatizado altamente preciso. Portanto, perfis proteicos podem ser obtidos a partir de áreas discretas em um tecido (~200 µm em diâmetro) o qual efetivamente representa um único tipo de célula.

Esses métodos são utilizados antes da obtenção de uma imagem do tecido total, uma vez que são mais pontuais e, portanto, necessitam de um tempo menor de

análise. É muito utilizado, por exemplo, como etapa precursora na busca de biomarcadores em tecidos cancerígenos⁷².

- MALDI IMS (*Imaging Mass Spectrometry*):

Ao longo da última década⁷³⁻⁷⁴, proteômica tornou-se um complemento indispensável à análise genética na investigação de quase todos os aspectos das ciências da vida. Estes incluem a elucidação de processos celulares na saúde e doença e a descoberta e avaliação de compostos farmacêuticos. A espectrometria de massas (MS) tornou-se uma ferramenta analítica essencial para a investigação destes processos moleculares. Novos avanços em MS oferecem agora a oportunidade para estudos na investigação de interações moleculares no tecido intacto. Ao contrário dos estudos realizados com o tecido intacto por décadas, estudos realizados hoje podem aproveitar a especificidade molecular oferecida pela MS. Em particular, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Imaging Mass Spectrometry (IMS)* permite a análise espacial da distribuição de proteínas diretamente em amostras de tecido (Figura 1.9).

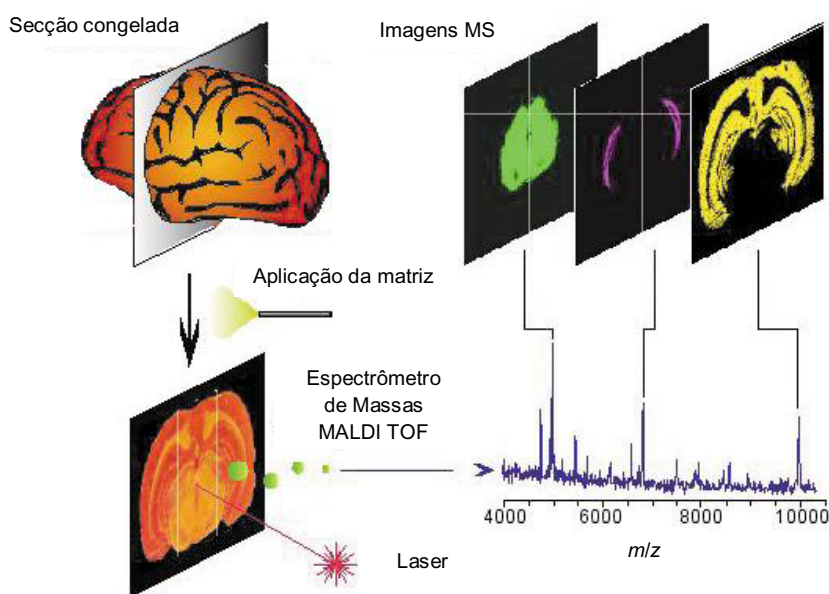


Figura 1.9: Fluxograma geral de um experimento de *MALDI Imaging* em tecido.

A IMS pode ser usada para localizar moléculas específicas, como drogas, lipídios, peptídeos e proteínas diretamente a partir de seções de tecido fresco congelado com imagem de resolução lateral de 30 a 50 μm . A IMS tem resultado novas oportunidades em uma ampla variedade de aplicações, incluindo a determinação espacial da expressão de proteínas diferenciais em tecidos doentes contra saudáveis, caracterização de tecidos com tumores e não tumores adjacentes, e o mapeamento da localização de drogas e distribuição metabólica em tecidos vivos ou no contexto do corpo todo de animais.

Um dos aspectos mais atraentes da IMS é a capacidade de simultaneamente visualizar o arranjo espacial de centenas de analitos diretamente do tecido, sem qualquer conhecimento prévio ou a necessidade de reagentes específicos tais como anticorpos. IMS permite a visualização de modificações pós-traducionais e processamento proteolítico e ao mesmo tempo retém a localização espacial. Outras técnicas de MS, tais como *Secondary Ionization Mass Spectrometry* (SIMS), têm também sido utilizadas para uma variedade de aplicações em imagens. Uma das principais vantagens do SIMS é a capacidade de imagens de alta resolução (50–100 nm) para as substâncias químicas e pequenas moléculas ($m/z < 1000$ Da). No entanto, até agora não mostrou ser eficaz para a análise de proteínas e peptídeos maiores.

- Aspectos práticos de um experimento de MALDI IMS:

Análises diretas de tecidos com MALDI MS permitem detectar compostos endógenos e exógenos presentes em tecidos com especificidade molecular enquanto mantém suas orientações espaciais. Esta combinação única, acoplando excelente sensibilidade e tempo de análise rápida, apresenta vantagens para uma ampla variedade de aplicações nos diversos campos biológicos. A preparação de amostra e fluxograma de trabalho é relativamente simples e não necessita de homogeneização ou etapas de extração/reconstituição. Basicamente, uma amostra congelada é seccionada, colocada na placa de MALDI, revestida com matriz, e analisada por MALDI MS. Resumidamente, MALDI é uma técnica de ionização que envolve irradiação da

amostra com um *laser*, tipicamente UV (N_2 a 337 nm ou $Nd:Y_3Al_5O_{12}$ a 355 nm), para formar íon analitos em fase gasosa. Uma matriz é necessária para absorver a energia do *laser*, auxiliando na desorção de moléculas intactas de analitos, e na sua ionização (freqüentemente via reações de transferência de prótons). Além disso, a aplicação de matriz em tecidos também serve para extrair analitos (proteínas) fora do tecido. A matriz é um composto orgânico pequeno, o qual é preparado em solução e aplicado na superfície do tecido, normalmente utiliza-se o ácido sinapínico (SA) para análises de proteínas e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) para análises de peptídeos. No entanto, há vários outros compostos que são utilizados como matrizes; a escolha de uma matriz ideal para a classe de interesse a ser analisada é crucial para aumentar a sensibilidade e seletividade da análise.

A análise proteica é normalmente efetuada com tecidos preparado pelo uso do ácido sinapínico (SA) como a matriz em 50 a 60 % de acetonitrila. Este protocolo resulta em uma melhor extração proteica, sensibilidade e resolução para espécies com alta massa molecular (> 5.000 Da). Para análise de peptídeos em tecido^{75, 76}, CHCA ou ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) em 50 % de acetonitrila é preferível. Essas matrizes tendem a ter menos interferentes químicos no intervalo de peso molecular menor e maior sensibilidade. Para análise de lipídeos, DHB e 2, 6-dihidroxiacetofenona (DHA) em 60 – 70 % de etanol são comumente utilizados⁷⁷. Outros compostos de baixa massa molecular podem exigir otimização por meio de testes de várias diferentes matrizes e combinações de solventes porque as especificidades químicas de pequenas moléculas, como drogas e metabolitos, podem variar amplamente.

Há diferentes métodos de aplicação de matriz (Figura 1.10), e alguns são inclusive comercializados. O método empregado está diretamente relacionado com o experimento a ser realizado e no caso de experimentos de imageamento químico, com a qualidade da imagem adquirida. Os experimentos de perfil proteico necessitam a aplicação da matriz pontual, na região delimitada pelo patologista, portanto, pode-se utilizar os métodos de gotas (nL ou μ L). As imagens de baixa resolução podem ser adquiridas utilizando-se sistema de aplicação por gotas menores (μ L). Já os experimentos de imagem com alta resolução necessitam um sistema de aplicação de matriz capaz de aplicá-la por todo o tecido, com o mínimo de espaço entre a matriz

possível, ou seja, uma camada uniforme de matriz.

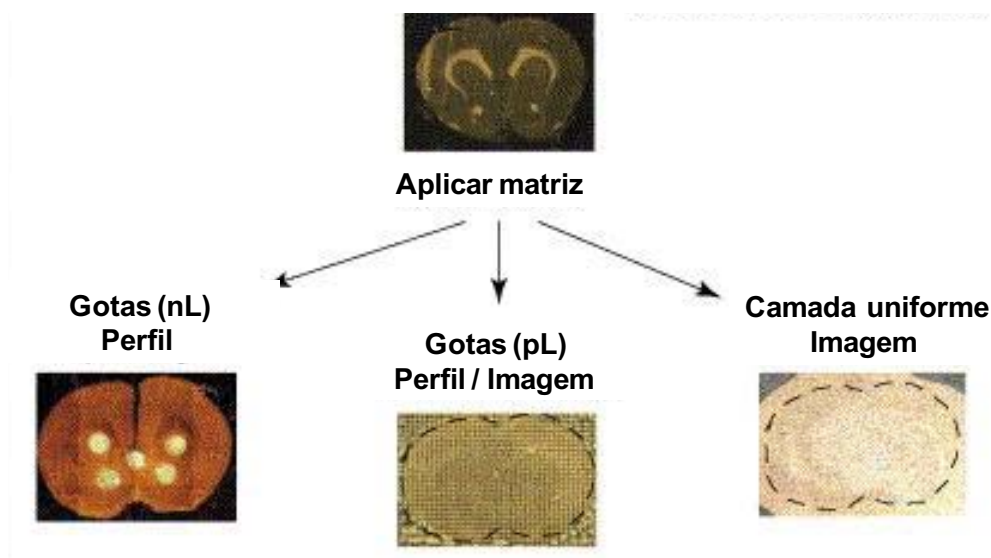


Figura 1.10: Diferentes métodos utilizados na aplicação de matriz em um tecido.

O método mais simples para deposição de matriz é a utilização de uma pipeta manual, esta é alternativa mais barata, porém possui baixa reprodutibilidade e resolução, pois as gotas da matriz ficam muito grandes (Figura 1.11 a). Para análise de perfil proteico direcionado pela histologia, normalmente não é necessário um equipamento para deposição de matriz com alta resolução, uma vez que o patologista marca regiões de 200 μm . Há pelo menos dois sistemas comerciais, o Portrait (da *Labcyte*®) (Figura 1.11 b) e o Shimadzu ChIP (da *Shimadzu*®) (Figura 1.11 c). As imagens de alta resolução, no entanto, necessitam de aplicadores de matriz que forneçam a maior cobertura de matriz e mais homogênea possível. Um dos sistemas utilizados para este caso lança um *spray* fino da solução da matriz sobre toda a superfície do tecido. Há um sistema comercial, o ImagePrep (da *Bruker*®) (Figura 1.11 d), e um sistema com o mesmo princípio, mas que pode ser montado no próprio laboratório pelos cientistas, o *Spraycoating* (Figura 1.11 e). Este é um sistema de borrifamento de solvente igual aos utilizados em revelação de placas de TLC (*Thin Layer Chromatography*).

Por último, existe também um sistema de aplicação de matriz para análises de

imagens de alta resolução baseados no princípio de sublimação (Figura 1.11 f). É um experimento que pode ser facilmente montado no próprio laboratório, sendo robusto e simples, e é mais utilizado na análise de lipídeos (Mass Spectrometry Research Center - Nashville, TN).

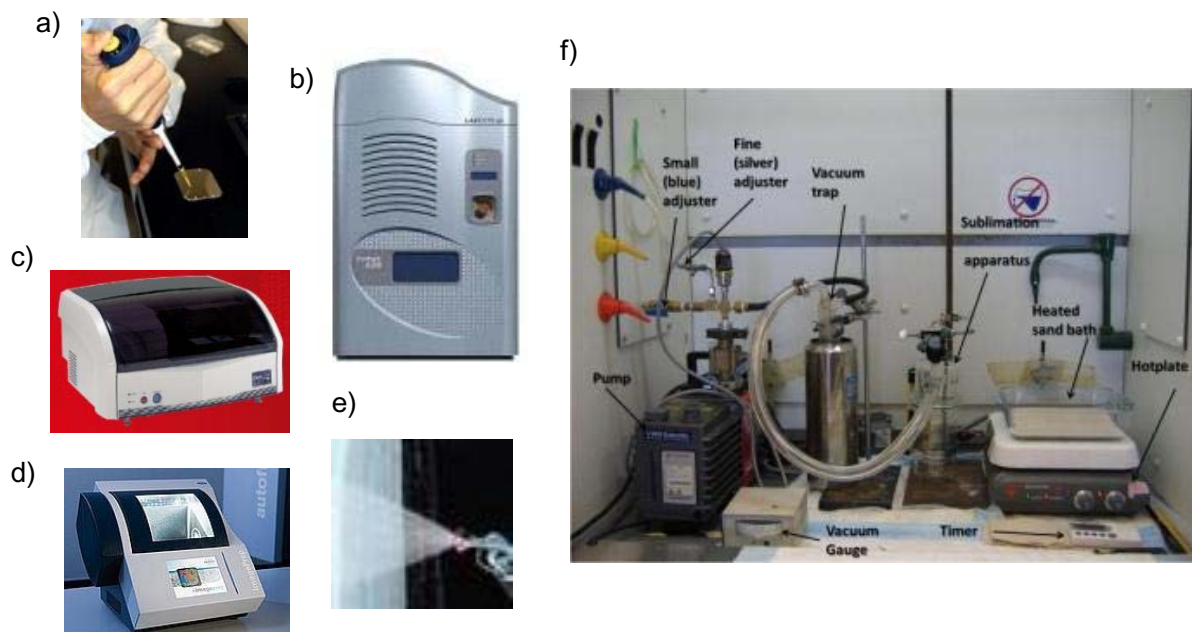


Figura 1.11: Sistemas utilizados na aplicação de matriz em tecidos. a) Manual, b) *Portrait*, c) *Shimadzu CHIP*, d) *ImagePrep*, e) *Spraycoating* e f) Sublimação.

- Aplicações recentes em MALDI IMS:

MALDI IMS tem evoluído exponencialmente e novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas e aplicadas a fim de aprimorar cada vez mais a técnica. Como exemplo pode-se citar o acoplamento de MALDI IMS e analisadores de massas de ultra alta resolução, como orbitrap e FTICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*)⁷⁸; este último pode gerar espectros de massas com resolução de aproximadamente 1.000.000. Outro avanço foi à utilização de MALDI IMS com *ion mobility MS (Imaging IMMS)*⁷⁹. *Imaging IMMS* foi apresentada com grande sucesso em um modo totalmente

automatizado para a separação estrutural e por m/z de analitos diretamente do tecido de cérebro de rato⁷⁹.

Alguns novos métodos químicos têm sido desenvolvidos para facilitar problemas freqüentemente encontrados em análises, como por exemplo, um método de seqüenciamento *in situ* em tecido⁸⁰ foi desenvolvido para facilitar a identificação de proteínas diretas no tecido sem a degradação do mesmo, e sem a alteração da posição da proteína na amostra. Após a adição da enzima no tecido, obtêm-se uma imagem e os peptídeos de cada proteína são identificados e conseqüentemente se tem o seqüenciamento da proteína. Este é um método eficaz e mais simples que os convencionais (Figura 1.12).

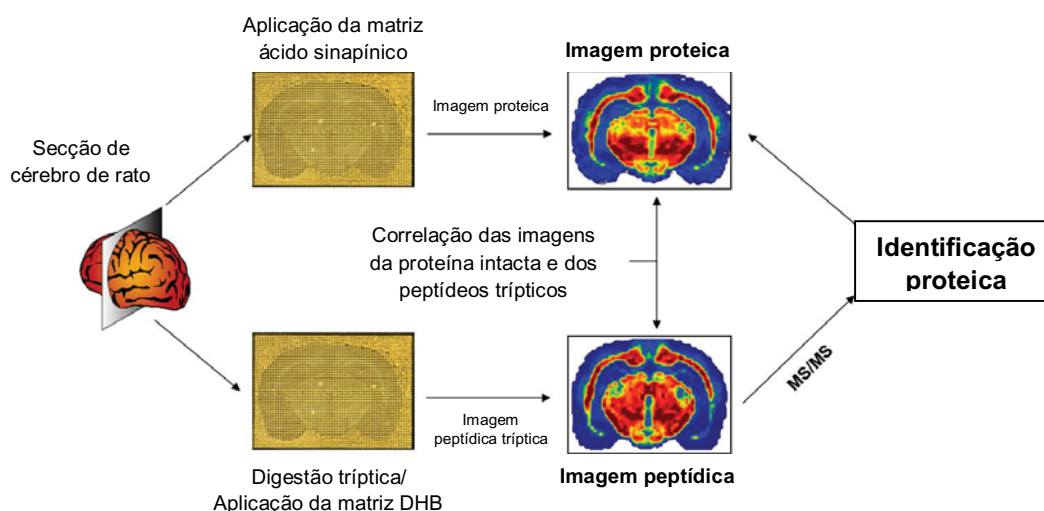


Figura 1.12: Fluxograma de um experimento de identificação proteica *in situ* no tecido.

Até o momento as técnicas de MALDI IMS foram descritas utilizando-se tecidos frescos. Porém, trabalhos recentes mostram a possibilidade de realizar IMS em tecidos fixados com formalina embebidos em parafina (*FFPE - Formalin fixed paraffin embedded*)^{81,82}. Uma vez que não há mais a necessidade dos tecidos serem frescos para ser realizada a imagem, eles podem ter vários anos de armazenamento, com isso,

por exemplo, é possível analisar amostras de pacientes que tiveram câncer e depois de vários anos relacionar com o quadro clínico dos mesmos.

MALDI IMS é uma tecnologia efetiva para as análises qualitativas e quantitativas de tecidos normais e doentes e para avaliar as alterações em sistemas biológicos⁸³. Além disso, as mais novas aplicações relacionadas nesta área são a geração de imagens tridimensionais de proteínas do cérebro^{84,85} (Figura 1.13 a), reconstruções de todo o corpo⁸³ (Figura 1.13 b) e a medição de alterações proteicas em tecidos específicos após a administração sistêmica de drogas⁷². IMS é uma técnica que apesar de ser nova, está se desenvolvendo rapidamente e vem apresentando vários avanços tecnológicos, fornecendo cada vez mais ferramentas úteis e importantes para o entendimento de sistemas biológicos⁸⁶.

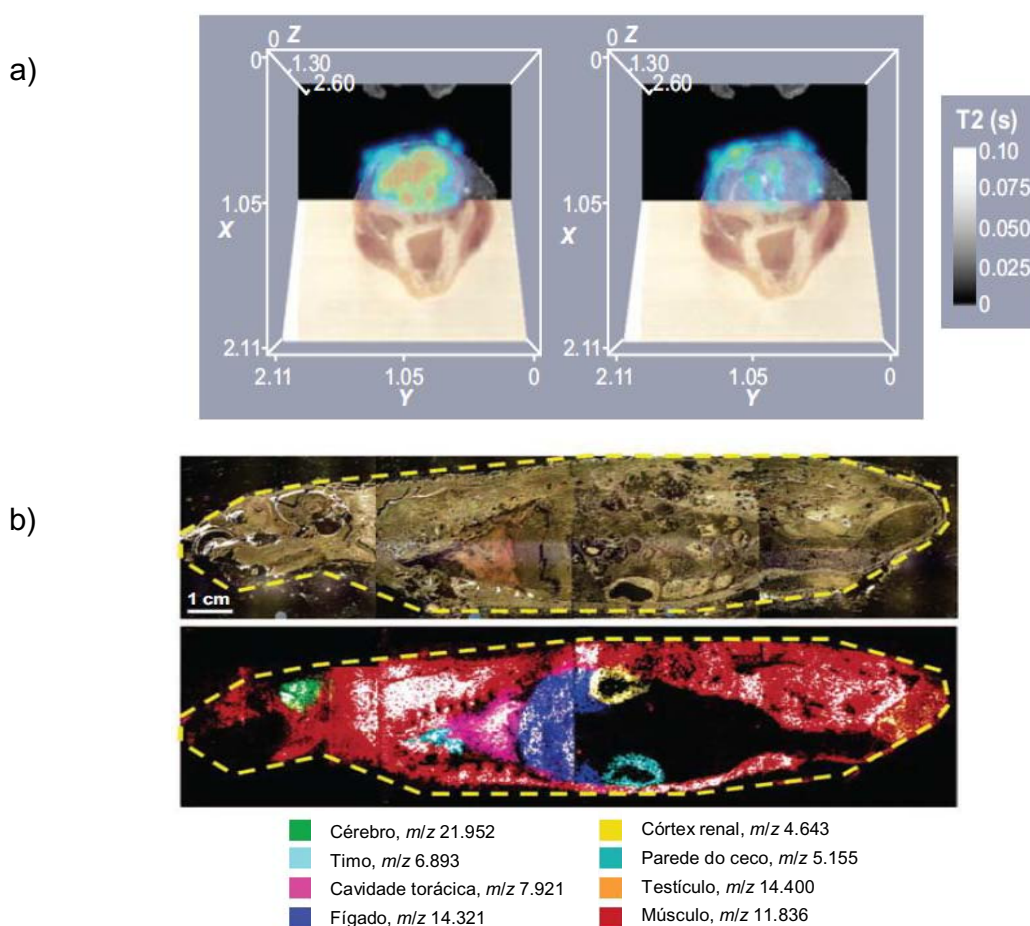


Figura 1.13: Exemplos de experimentos de MALDI *Imaging* MS. a) Análise tridimensional de um tumor e b) Análise do corpo inteiro de rato.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal do projeto de doutorado é estudar novas aplicações da MS para bio-moléculas com novas técnicas e recentes aborgadens. Para alcançar tal objetivo foram estabelecidos objetivos específicos:

- a) Estudo de reações químicas a pressão atmosférica de AA's com diferentes reagentes, visando obter reações específicas, e com isso caracterizar os AA's de uma maneira direta e simples em uma sequência peptídica, por exemplo.
- b) Estudo das formas tridimensionais dos íons fragmentos peptídicos mais comuns (íons a, b e y), através de ferramentas modernas de MS, como a IMMS e reações íon/molécula, uma vez que não se sabe ainda qual seria a estrutura tridimensional exata destes íons.
- c) Aplicação de uma técnica recente em espectrometria de massas, o imageamento químico por MALDI-MS, na busca de biomarcadores protéicos. Utilizando-se o câncer pancreático como exemplo, investigou-se tecido pancreático normal, com tumor e com pancreatite. O intuito é distinguir quimicamente estes tecidos, e classificá-los como sadio ou doente a partir dos seus constituintes químicos, complementando os dados de morfologia dos tecidos, método utilizado hoje por patologistas.

3. CAPÍTULO 1:

RELAÇÃO ESTRUTURA/REATIVIDADE DE PEPTÍDEOS POR REAÇÕES ÍON/MOLÉCULA E MOBILIDADE DE ÍONS

3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

3.1.1. Materiais e Métodos:

3.1.1.1. Aquisição do material:

Os aminoácidos (AA's) testados (Lisina, Glutamina e Arginina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os peptídeos Angiotensina II (DRVYIHPF), Bradiquinina (RPPGFSPFR), *[D-Ala2, D-Leu5]*-Encefalina (YaGFL), Substância P (RPKPQQFFGLM-NH₂), Colecistoquinina (YMGWMDF-NH₂), Neurotensina (RRPYIL) foram adquiridos da AnaSpec. Metanol grau analítico *HPLC* e ácido fórmico foram obtidos da Merck SA (Rio de Janeiro, Brasil).

3.1.1.2. Métodos instrumentais:

Os experimentos foram realizados utilizando-se diferentes espectrômetros de massas. Portanto, diversas fontes de ionização e analisadores de massas foram utilizados, os quais estão descritos abaixo.

- Fonte de Ionização EASI:

Foram realizadas algumas reações de AA's à pressão atmosférica utilizando-se o espectrômetro de massas Q-Trap (*Applied Biosystems*, EUA) e Quadrupolo (LCMS-2010EV –*Shimadzu Corp.*, Japão), e com uma fonte de ionização de EASI (*Easy Ambient SonicSpray Ionization*, Figura 3.1).

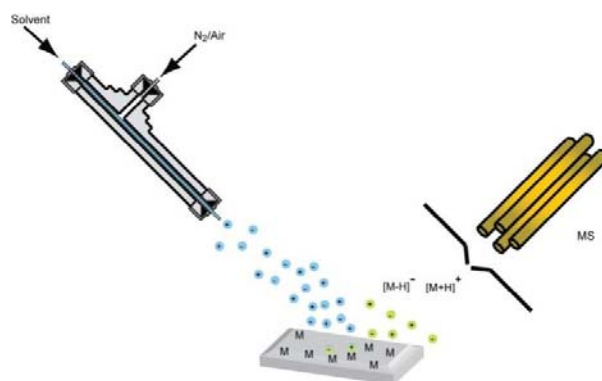


Figura 3.1: Esquema fonte de ionização ESI.

- Fonte de Ionização FD-ESI:

As reações por FD-ESI foram realizadas utilizando-se o equipamento Q-TOF com algumas adaptações oriundas da necessidade experimental. Removeu-se o vidro de proteção da fonte de ESI e adicionou-se um sistema de vácuo para remover o reagente em excesso proveniente do nebulizador. O nebulizador foi colocado em um ângulo ideal (45°) com as gotas oriundas do ESI para uma reação mais eficiente (Figura 3.2).

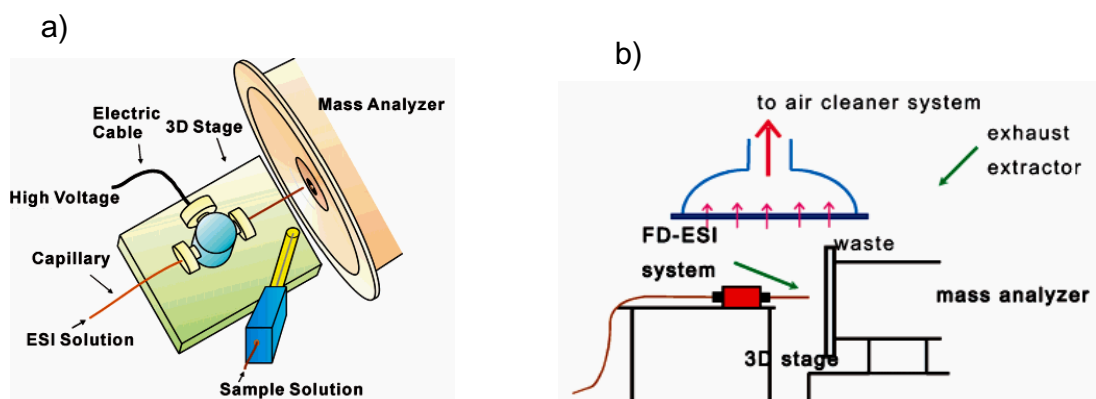


Figura 3.2: a) Vista superior da fonte de FD-ESI, b) Diagrama esquemático de FD-ESI-MS com um extrator de exaustão local instalado no topo da fonte.

- Fonte de ionização nanoESI:

Os experimentos iniciais com peptídeo nativo foram realizados com uma fonte *Nanospray (NanoESI)* acoplada ao Q-TOF, isso porque a quantidade de peptídeo disponível era muito pequena minimizando desta forma as perdas de amostra se comparada com a fonte normal de *eletrospray*.

- Fonte de ionização APTD-ESSI:

Os sistemas de ESSI e APTD foram construídos em nosso próprio laboratório. Para a ionização por ESSI, utilizou um sistema de teflon contendo nanotubos, nanocapilar e entrada para gás; e para APTD utilizou-se um tubo de aço inox envolto por uma manta de aquecimento.

- Fonte de ionização nanoESI - Nanomate:

Os experimentos de infusão direta dos peptídeos no Q-TOF foram realizados utilizando um *nanoESI* como fonte de ionização. Para tal, o sistema de *nanoESI* robotizado *TriVersa NanoMate* (da *Advion BioSciences*) foi utilizado.

- Espectrômetro de Massas Q-Trap:

Os experimentos de reações de AA's em solução foram realizados no equipamento Q-Trap (da *Applied Biosystems*) com uma fonte de ESI convencional. As condições experimentais utilizadas foram otimizadas para cada experimento.

- Espectrômetro de Massas Q-TOF:

Os experimentos de reações íon molécula por fusões de gotas e os experimentos de reações na célula de colisão, Q2, foram realizados em um espectrômetro de massas Q-TOF (da *Micromass*).

- Espectrômetro de Massas Synapt HDMS:

Os experimentos de separação dos íons por mobilidade iônica foram realizados em um *Waters Synapt HDMS* (da *Waters Corp., Manchester, UK*). Os parâmetros operacionais foram otimizados para cada experimento.

3.1.2. Experimentos de reações de AA's em solução:

Os experimentos de reações de AA's em solução foram realizados utilizando uma fonte de eletrospray, no modo positivo (ESI(+)-MS) acoplada a um espectrômetro de massas Q-Trap. As condições experimentais utilizadas foram: fluxo do solvente de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, tensão na fonte: 4000 V, temperatura: 100 $^{\circ}\text{C}$, pressão do gás 1 e 2 na fonte: 16 e 10 bar, respectivamente, pressão do *curtain gas* de 30 bar, potencial de *decluster* de 20 V e potencial de entrada de 6 V. Espectros de massas foram adquiridos na faixa de m/z 100 a 700. Experimentos de MS/MS foram realizados otimizando-se as condições de energia do gás (N_2) para cada caso.

3.1.3. Experimentos de reações de AA's a pressão atmosférica:

- Experimentos realizados utilizando fonte de ionização EASI e espectrômetro de massas Q-Trap e Quadrupolo:

Os experimentos de AA's a pressão atmosférica foram realizados inicialmente utilizando-se uma fonte de EASI acoplada a um espectrômetro de massa Q-Trap e

Quadrupolo. Os parâmetros experimentais foram: fluxo do solvente (reagente testado) de 20 $\mu\text{L}/\text{min.}$, pressão do gás de nebulização (N_2) de 30 bar, pressão do *curtain gas* de 10 bar, potencial de *decluster* de 100 V, distância de 2 mm entre superfície com o AA e a entrada do equipamento, e um ângulo de 30°. Uma gota do AA (cerca de 5 μL) foi aplicado em uma superfície de vidro e evaporada a temperatura ambiente. Espectros de massas foram adquiridos operando o q2 com um íon trap linear no modo positivo na faixa de m/z 50 a 1000.

- Experimentos realizados utilizando fonte de ionização FD-ESI e espectrômetro de massas Q-TOF:

Os experimentos de AA's a pressão atmosférica foram posteriormente realizados utilizando-se uma fonte de FD-ESI acoplada a um espectrômetro de massa Q-TOF. As condições utilizadas nos experimentos de ESI(+)-MS foram: fluxo da seringa: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, temperaturas de dessorção e nebulização: 100°C, fluxo do gás do nebulizador: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, ângulo entre fluxo do ESI e nebulizador: 60 °C. Os demais parâmetros, cone, capilar e extrator, foram otimizados para cada reação. As energias de colisão utilizadas nos experimentos de ESI(+)-MS/MS foram distintas para cada íon.

3.1.4. Experimentos de reações dos íons fragmentos de peptídeos a, b e y:

- Experimentos realizados utilizando fonte de ionização nanoESI e espectrômetro de massas Q-TOF:

Para tais experimentos, utilizou-se uma solução de 0,1 % ácido fórmico em acetonitrila: água (1:1). A concentração final da solução peptídica analisada foi 1 ppm.

Foi realizado inicialmente um ESI(+)-MS *full scan* utilizando uma fonte comercial de *nanoeletrospray* no modo positivo (*nanoESI(+)-MS*) de um peptídeo nativo extraído de cobra. As tensões aplicadas na fonte foram: 4,0 kV no capilar, 35 V no cone e 4 V

no extrator. O fluxo da seringa foi de 1 µl/min. Após a aquisição do peptídeo, foram realizadas algumas reações, utilizando os seguintes reagentes: propilvinileter, 2-metil-1,3-dioxolano e isopreno. Para tais reações, os reagentes foram inseridos na entrada do gás de colisão (Ar).

- Experimentos realizados utilizando fonte de ionização APTD-EESI e espectrômetro de massas Q-TOF:

Os peptídeos analisados foram diluídos em uma solução de 0,5 % ácido fórmico em metanol: água (1:1). A concentração da solução peptídica analisada foi 50 ppm. Foi realizado inicialmente um *full scan* utilizando uma fonte de APTD-DESI, construída no próprio laboratório, no modo positivo (ESI(+)-MS) do peptídeo comercial Angiotensina II. As tensões aplicadas na fonte foram: 3,5 kV no nanocapilar, 35 V no cone e 4 V no extrator. O fluxo da seringa foi de 1 µl/min. A temperatura aplicada no tubo externo foi de 100 °C. Após a aquisição do espectro de *full scan* do peptídeo, *nanoESI(+)-MS*, os íons detectados foram identificados e selecionados para fazer a reação com os reagentes: acetonitrila, acetona e 2-metil-1,3-dioxolano. Para tais reações, o íon de interesse foi selecionado no primeiro quadrupolo e reagido na cela de colisão, a qual estava saturada com o reagente escolhido.

- Experimentos realizados utilizando fonte de ionização nanoESI e espectrômetro de massas Q-TOF:

Os peptídeos analisados foram diluídos em uma solução de 0,5 % ácido fórmico em metanol: água (1:1). A concentração da solução peptídica analisada foi 50 ppm. Foi realizado inicialmente um *full scan* utilizando uma fonte normal de *eletrospray* no modo positivo (ESI(+)-MS). Foram utilizados 6 peptídeos: Angiotensina II (DRVYIHPF), Bradiquinina (RPPGFSPFR), [D-Ala2, D-Leu5]-Encefalina (YaGFL), Substância P (RPKPQQFFGLM-NH₂), Colecistoquinina (YMGWMDF-NH₂), Neurotensina (RRPYIL). As tensões aplicadas na fonte de ESI foram: 3,5 kV no capilar, 190 V no cone e 4 V no

extrator. O fluxo da seringa foi de 10 µl/min. Quando utilizou a fonte de ionização *nanoESI*, a partir do sistema *Nanomate*, a voltagem aplicada no capilar foi 1,35 kV e a pressão do gás foi de 0,3 psi, as voltagens no cone e extrator foram 190 V e 4 V, respectivamente e o fluxo da seringa foi de 200 nL/min.

Após a aquisição do espectro de *full scan* de cada peptídeo, os íons detectados foram identificados e selecionou-se alguns dos íons para fazer a reação com acetonitrila. Para tais reações, o íon de interesse foi selecionado no primeiro quadrupolo e reagido na cela de colisão, a qual estava saturada com o reagente escolhido.

3.1.5. Experimentos de mobilidade iônica dos íons fragmentos de peptídeos a, b e y:

Este experimento foi realizado para os peptídeos: Angiotensina II, Bradiquinina e [D-Ala2, D-Leu5]-Encefalina. Todas as amostras foram dissolvidas para uma concentração de 5 µg/mL utilizando uma solução metanol:água (1:1) 0,1 % ácido fórmico. Um espectrômetro de massas Synapt HDMS foi utilizado para analisar as formas e conformações dos peptídeos utilizando um fluxo de 10 µL/min para *ESI(+)-MS* com as seguintes condições: capilar 4.0 kV, pressão do gás 0.3 psi, cone 50 V, extrator 4 V. O gás para *IMS* foi o nitrogênio a um fluxo de 24 mL/min, a velocidade e a altura da onda foram operadas a 300 m/s e 8 V, respectivamente. O controle do instrumento e a análise dos dados dos experimentos usando QTOF e Synapt HDMS foram realizadas utilizando MassLynx V3.5 e V4.1 software (Waters Corp., Manchester, UK), respectivamente.

3.2. Resultados e Discussão

3.2.1. Reações de AA's em solução:

- Reações de AA's em solução utilizando um Q-Trap:

A primeira reação testada foi proveniente do íon pirílio obtido do sal de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio com o AA L-lisina (Figura 3.3), uma vez que esta é uma reação clássica de conversão de íon pirílio ao piridínio a partir de uma amina^{19,20}. Um fator interessante é que esta reação ocorre em diferentes velocidades dependendo do tipo da amina reagente. Aminas primárias reagem mais facilmente, e, portanto mais rapidamente, do que aminas secundárias, as quais reagem mais velozmente do que aminas terciárias. Isto pode ser empregado diretamente na diferenciação dos isômeros, lisina e glicina, uma vez que o último contém um grupo amida terminal, e conseqüentemente irá reagir mais lentamente do que a amina primária da lisina. Esta diferenciação é de extrema importância, pois atualmente não há um método direto e eficaz para tal; o que se é empregado é a diferenciação por diferenças de massas a partir de espectros de MS/MS, ou por distinção da massa por alta resolução, no entanto, é necessário um equipamento de alto custo para obter tais ferramentas.

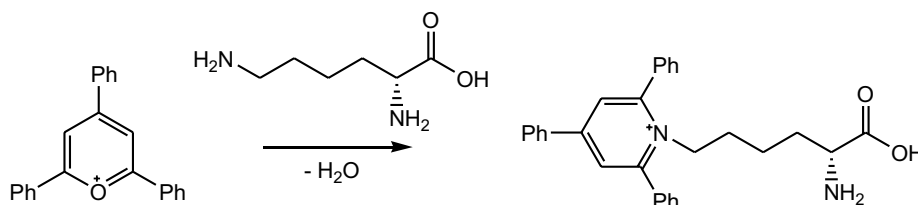


Figura 3.3: Reação de conversão do íon pirílio ao piridínio, utilizando a lisina como amina.

Inicialmente, realizou-se a reação em solução para verificar se esta era reprodutível e se os produtos eram condizentes com a literatura, já que os artigos que descrevem a reação são antigos e o meio de identificação dos produtos e dos intermediários são apenas via Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A literatura cita que há uma série de fatores que influenciam na reação, os quais estão citados a seguir, então foi necessário a otimização dos mesmos.

A velocidade de reação varia conforme a amina empregada: *n*BuNH₂: 1,0, RCH₂NH₂: 1,3 - 0,7, RR'CHNH₂: 0,01 - 0,002, anilina e *m*-nitroanilina: 0,02 - 0,007.

Na etapa final da reação há um fechamento do anel, o qual é facilitado por uma catálise ácida, sendo o AcOH o mais efetivo ($\text{AcOH} > \text{PhCO}_2\text{H} > \text{HCO}_2\text{H} > \text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H} > \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$). A ordem de velocidade de reação utilizando-se os diferentes solventes dimetilformamida, acetonitrila, diclorometano é 1:20:270, respectivamente, porém em espectrometria de massas não se pode utilizar diclorometano como solvente, por isso foi necessário testar outros solventes compatíveis com a técnica, como H_2O , MeOH, ACN e a mistura destes.

Primeiramente, utilizou-se como solvente uma solução de MeOH: H_2O (1:1). Injetou-se uma solução contendo íon pirílio e outra de lisina, separadamente, e obteve-se os respectivos espectros de ESI(+)-MS e ESI(-)-MS, para verificar quais eram os fragmentos de cada íon reagente. O íon pirílio por ser aromático é muito difícil de fragmentar, portanto, mesmo utilizando uma energia de colisão muito alta ele não se fragmenta. Abaixo está apresentado o espectro de ESI(+)-MS/MS da lisina (Figura 3.4) e o mecanismo de fragmentação proposto (Figura 3.5).

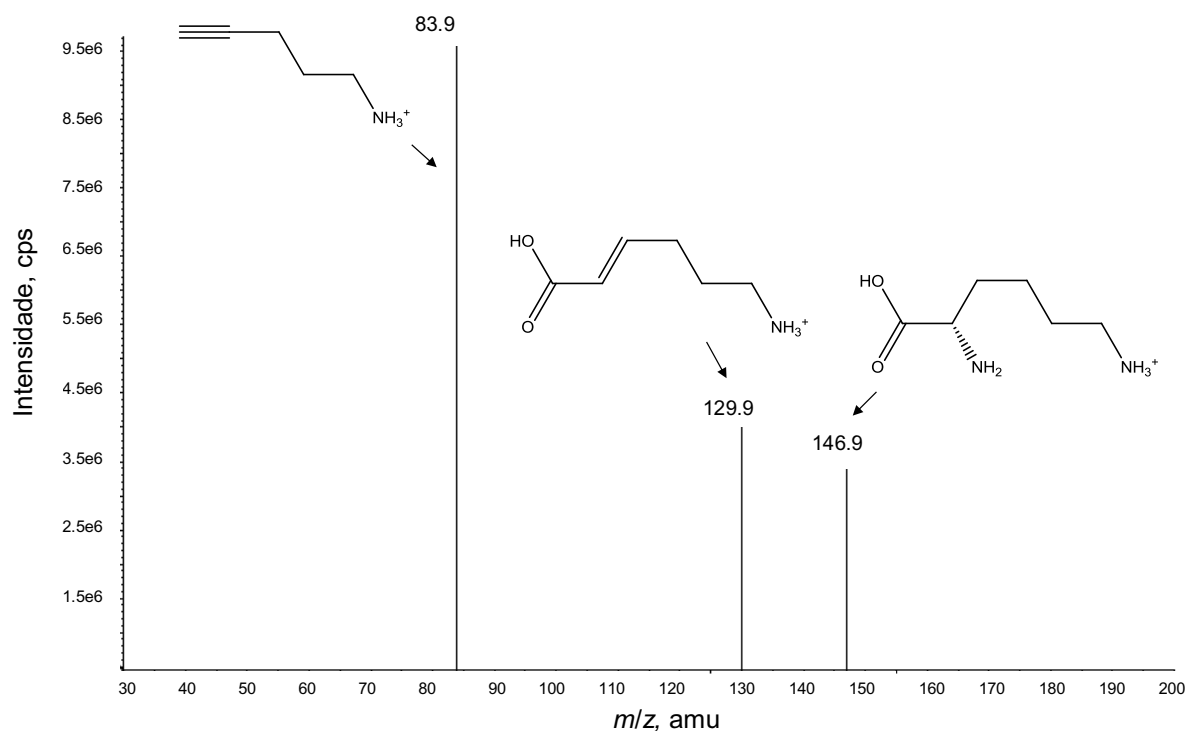


Figura 3.4: Espectro de ESI(+)-MS/MS da lisina protonada m/z 147.

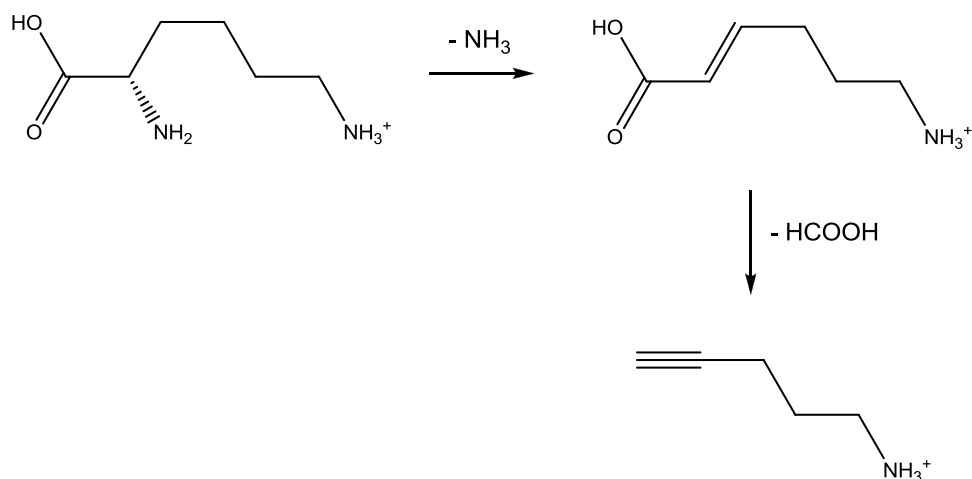


Figura 3.5: Esquema de fragmentação da lisina protonada proposto a partir dos íons gerados no espectro de ESI(+)-MS/MS.

Em seguida, realizou-se a reação utilizando AcOH como catalisador na etapa final, porém detectou-se os produtos com m/z 327 e 473 e não o produto esperado com m/z 437 (Figura 3.6). Obteve-se o espectro de ESI(+)-MS/MS (Figura 3.7) do íon com m/z 473, para verificar a estrutura da molécula, e os fragmentos resultantes foram m/z 327 e 147 os quais correspondem ao íon pirílio com a adição de uma molécula de H_2O e a uma molécula de lisina protonada, respectivamente. O íon com m/z 130 é um fragmento da molécula de lisina conforme mostrado anteriormente.

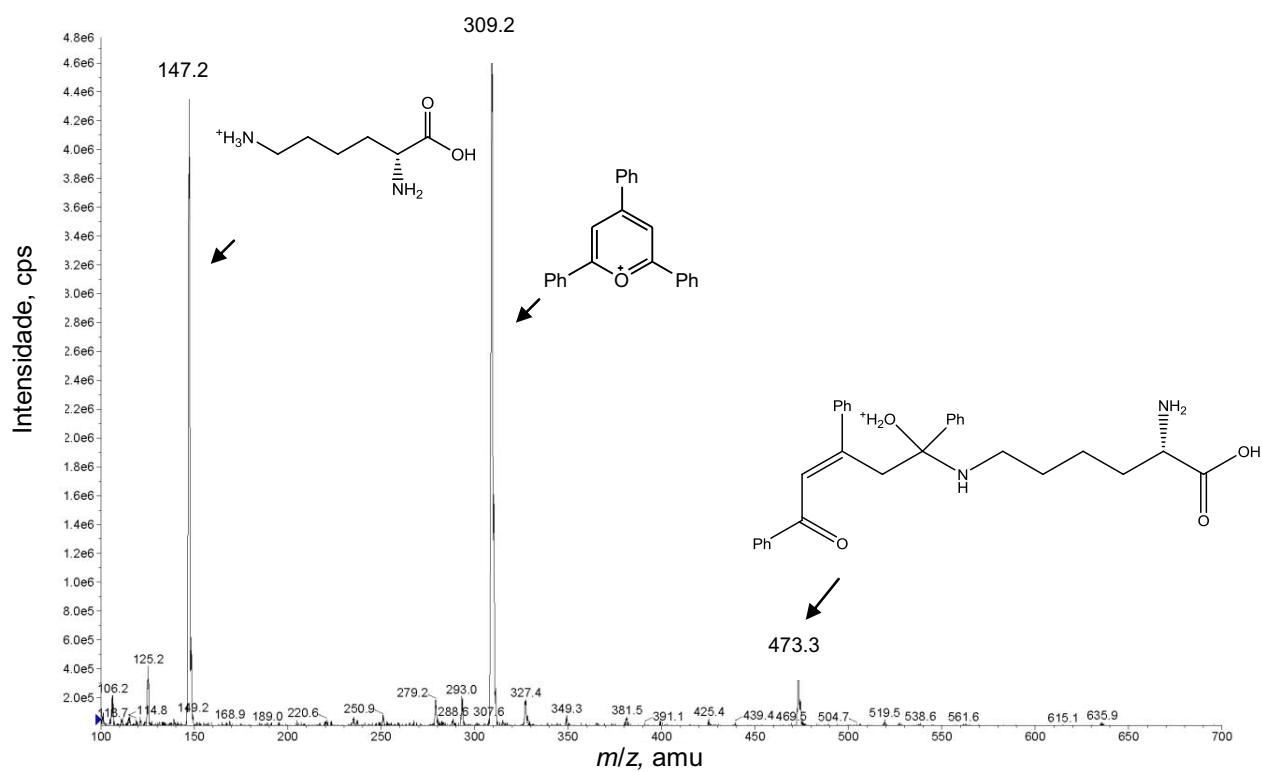


Figura 3.6: Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e lisina em solução MeOH:H₂O (1:1)

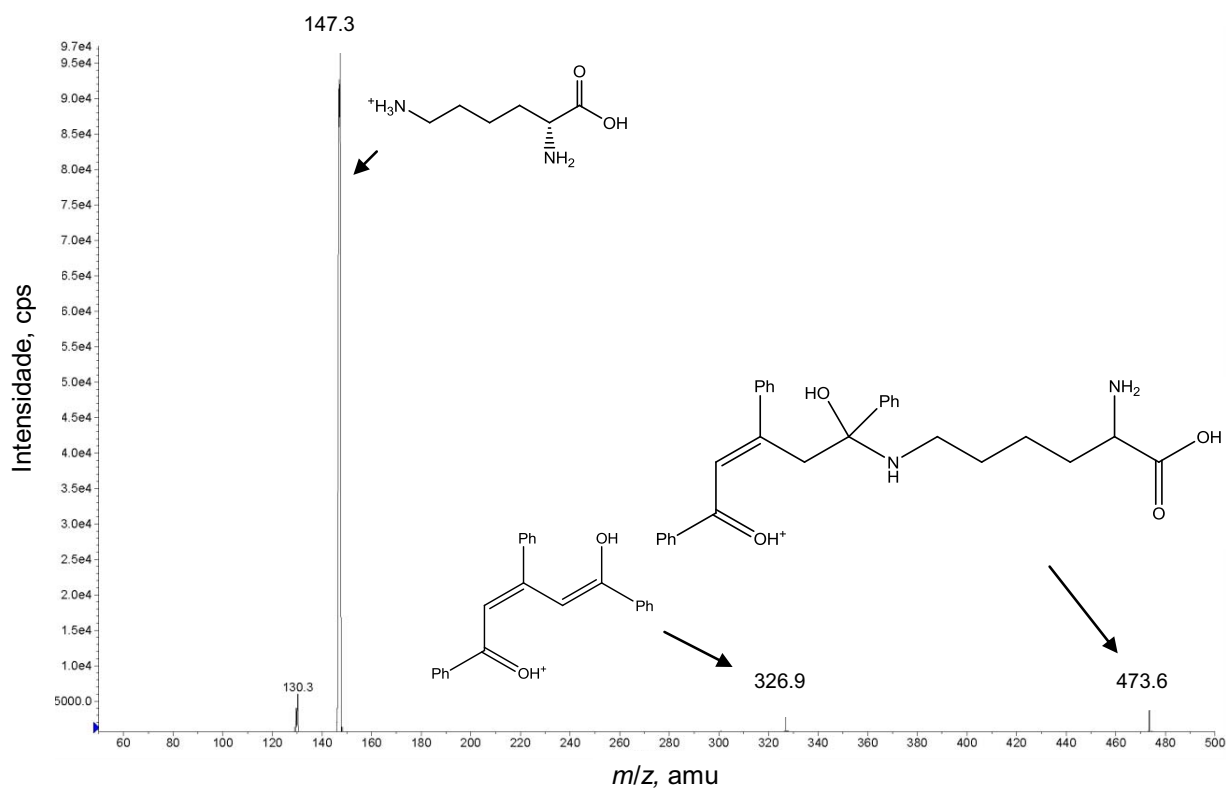


Figura 3.7: Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto m/z 473.

Como havia H_2O no meio reacional, esta adicionou-se rapidamente ao íon pirílio e posteriormente ocorreu a adição de lisina (Figura 3.8)²¹. Devido a essa facilidade de adição de água no íon reagente, a lisina não se adicionou diretamente ao íon pirílio e, portanto, não se formou o produto esperado.

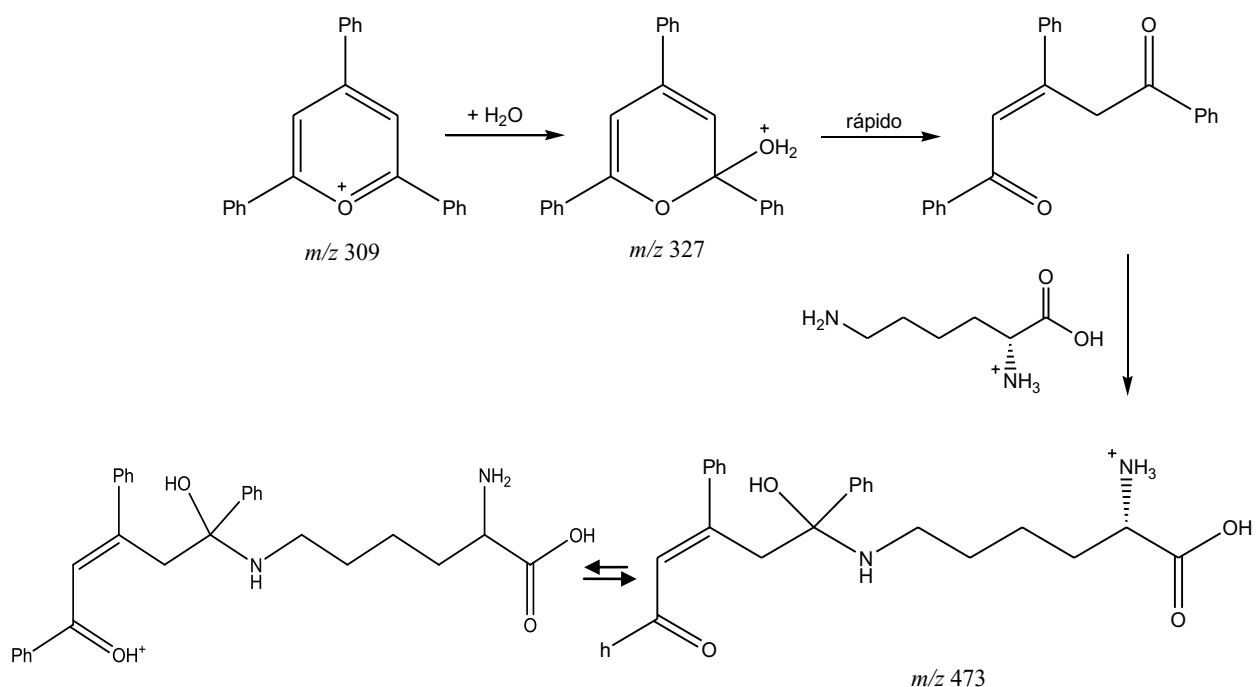


Figura 3.8: Esquema da formação do íon m/z 473.

Realizou-se novamente a reação, porém utilizando-se 100% MeOH, ou seja, removeu-se a H_2O para que não ocorresse reação de competição conforme descrito acima. Assim, conforme esperado, a reação de conversão ocorreu e o produto detectado foi o íon piridínio com m/z 437 (Figura 3.9). E o experimento de MS/MS foi realizado para a comprovação do produto formado (Figura 3.10). Uma proposta de fragmentação foi atribuída aos íons formados após a colisão do íon precursor com o gás de colisão Ar (Figura 3.11).

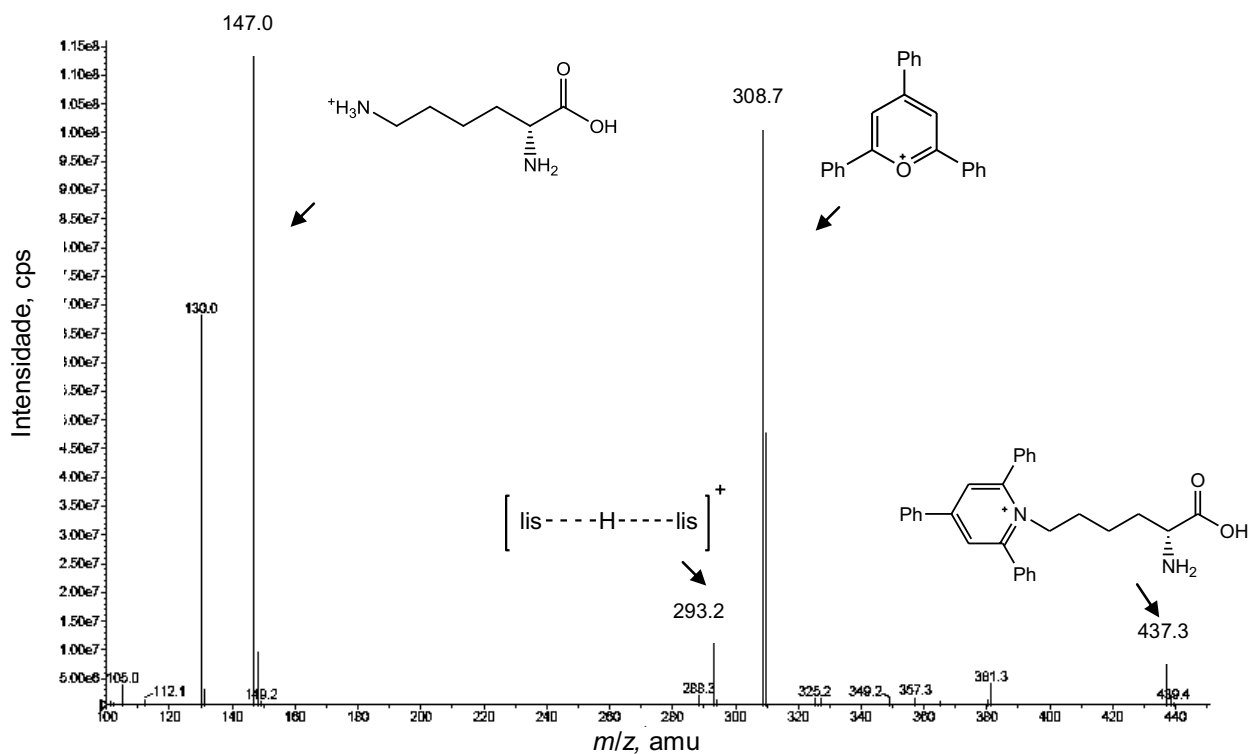


Figura 3.9: Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e lisina em solução MeOH.

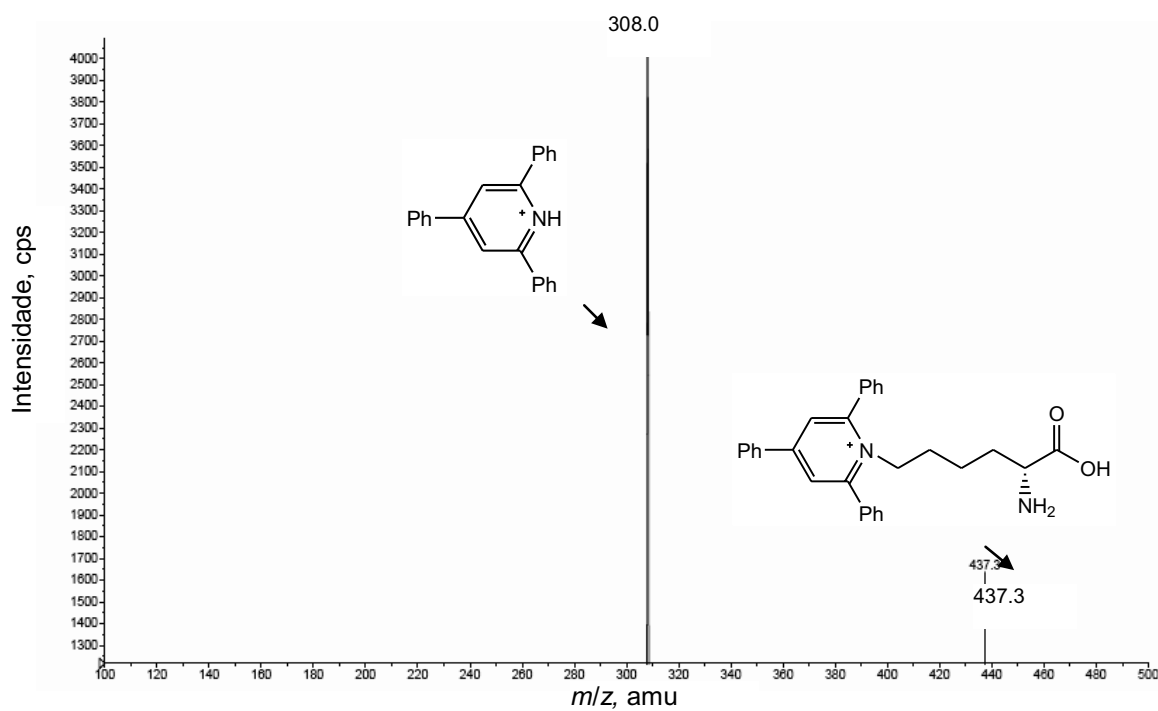


Figura 3.10: Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto m/z 437.

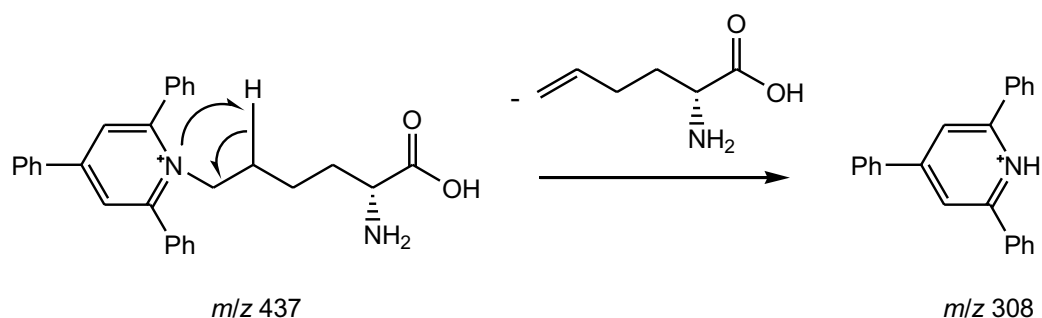


Figura 3.11: Proposta de mecanismo de fragmentação do íon $m/z\ 437$.

Apesar das alterações feitas nas condições experimentais, as quais estão citadas a seguir, não se conseguiu otimizar mais o sinal de $m/z\ 437$.

1. Alteração dos solventes, testou-se ACN (a lisina não dissolveu), ACN:MeOH.
2. Aquecimento da reação a 100°C.
3. Análise em diferentes tempos (com e sem aquecimento): 0, 10, 30, 60, 120, 150, 240, 270 s.
4. Alterou-se a quantidade de AcOH utilizado como catalisador: 2, 5, 10 μL .

Realizou-se um experimento com o íon pirílio e uma amina primária (Figura 3.12), a metilamina, para verificar se havia diferença na intensidade do produto formado, ou seja, observar se esta reage preferencialmente, uma vez que a lisina, mesmo sendo uma amina primária, possui uma cadeia lateral maior.

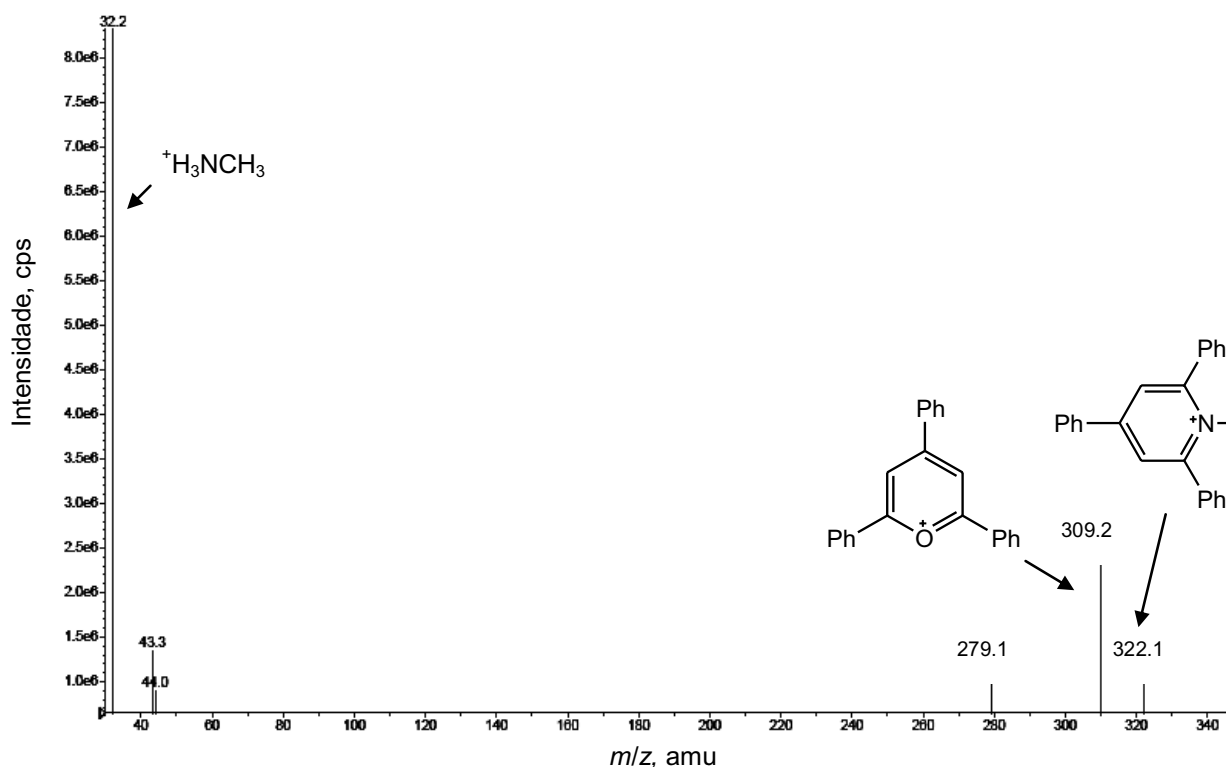


Figura 3.12: Espectro de ESI(+)-MS da reação do íon pirílio e metilamina.

Tentou-se otimizar ainda mais as condições para a obtenção de um sinal mais intenso com uma velocidade de reação mais rápida, porém não houve mudanças significativas nas intensidades dos sinais, ou seja, esta reação reage lentamente, como descrito na literatura (demorando aproximadamente 2 dias para reagir nas condições ideais).

Nos experimentos realizados, o resultado para 0 hora e 4h 30 min. (tempo máximo de reação) foram similares, porém os sinais dos produtos não apresentaram intensidades muito altas. Um tempo maior não foi testado, pois não seria viável, uma vez que se quer determinar reações rápidas para um diagnóstico prático e dinâmico.

O experimento seguinte seria fazer a reação do íon pirílio com glicina, para verificar a possibilidade de diferenciação destes isômeros, porém desenvolvemos em nosso laboratório uma técnica mais rápida e com pouquíssimo preparo prévio de amostra: reações por FD-ESI. Começou-se a estudar diversas reações a partir deste

método, uma vez que é muito mais prático e se empregará muito melhor nas análises futuras.

3.2.2. Reações de AA's a Pressão Atmosférica:

- Reações de AA's por FD-ESI utilizando um equipamento Q-TOF:

Algumas reações realizadas utilizando FD-ESI-MS estão ilustradas nos espectros a seguir. Os produtos destas reações foram analisados estruturalmente por experimentos FD-ESI-MS/MS.

Reações de conversão do íon pirílio ao piridínio:

A primeira reação realizada por FD-ESI foi a conversão do íon pirílio ao piridínio, uma vez que já se havia testado este tipo de reação em solução anteriormente²². Assim, um resultado comparativo entre reações em solução e em gota seria possível. Preparou-se uma solução metanólica de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio, a qual foi adicionada no eletrospray. O nebulizador continha uma solução metanólica de butilamina. A partir da fusão das gotas oriundas do ESI e do nebulizador detectou-se o produto esperado da reação (Figura 3.13). Neste experimento inicial utilizou-se como reagente a butilamina, pois é uma amina primária mais simples; o próximo passo foi fazer a reação com um aminoácido que continha uma amina terminal, no caso, a lisina.

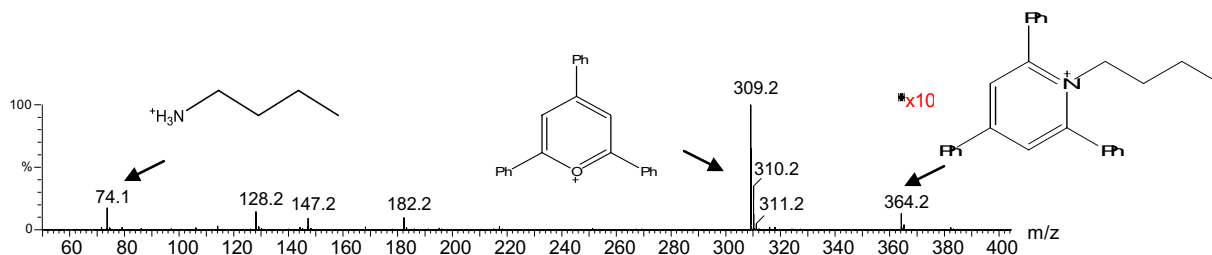


Figura 3.13: Espectro de ESI(+)-MS da reação por FD-ESI de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e butilamina.

Nesta reação, utilizou-se novamente uma solução metanólica do sal pirílio no ESI e uma solução metanólica de lisina no nebulizador. O produto de reação, o íon de m/z 437, foi detectado (Figura 3.14) e realizou-se o experimento de MS/MS para comprovar a estrutura (Figura 3.15). Utilizou-se uma energia de colisão muito alta, então todo o íon produto foi fragmentado e, com isso, detectou-se apenas o íon fragmento m/z 308, o qual corresponde ao íon piridínio com a perda da cadeia lateral. O espectro de MS/MS foi similar ao realizado em solução (descrito anteriormente).

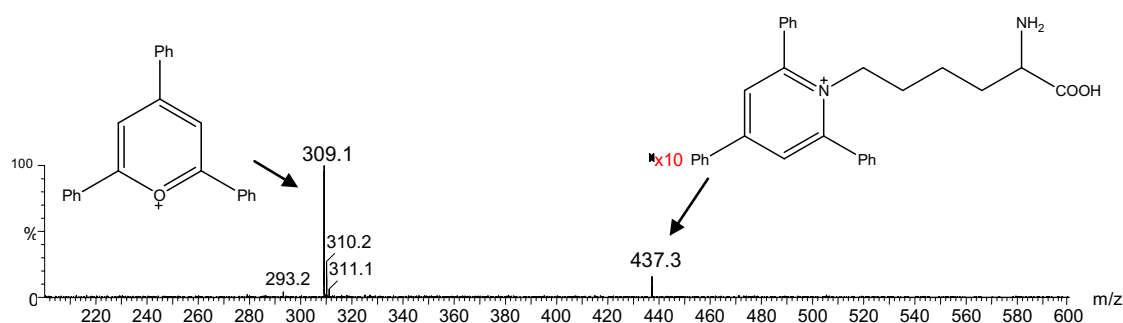


Figura 3.14: Espectro de ESI(+)-MS da reação de FD-ESI de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e lisina.

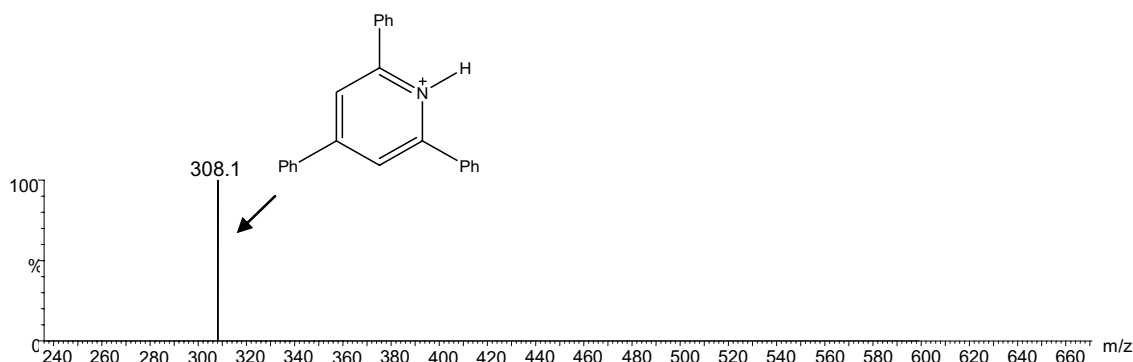


Figura 3.15: Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon produto m/z 437.

Pode-se observar que ambas as reações ocorreram com um rendimento um pouco menor do que quando realizadas em solução, porém o produto foi exatamente o mesmo. Estas reações têm a grande vantagem de não ser necessário a mistura prévia

dos reagentes em uma solução e de não ter a influência do contra-íon. Com isso, as reações são mais dinâmicas e, portanto mais práticas de serem realizadas do que em solução. Estes experimentos de FD-ESI apresentam resultados iniciais, uma vez que ainda precisa-se otimizar alguns fatores, como a fonte, a velocidade do fluxo de gás do nebulizador, o ângulo ideal entre o gás do nebulizador e o fluxo do ESI.

Reações de fluorização:

Utilizou-se o reagente N-chloromethyl-N'-fluorotriethylenediammonium-bis-(tetrafluoroborate) para a reação de fluorização, o qual é um forte agente de fluorização. O AA arginina foi utilizado, uma vez que é o único que possui ligação dupla C=N na cadeia lateral, ou seja, esta será uma reação específica para esse AA. O espectro de ESI(+)-MS apresentou a arginina protonada (m/z 175) e o produto da reação com flúor adicionado na dupla ligação (m/z 195) (Figura 3.16), cuja proposta está ilustrada a seguir (Figura 3.17).

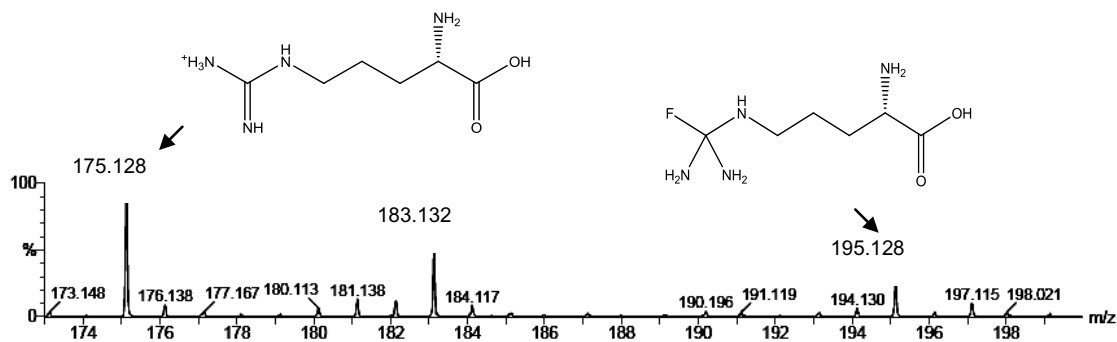


Figura 3.16: Espectro de ESI(+)-MS da reação de FD-ESI do agente de fluorização e arginina.

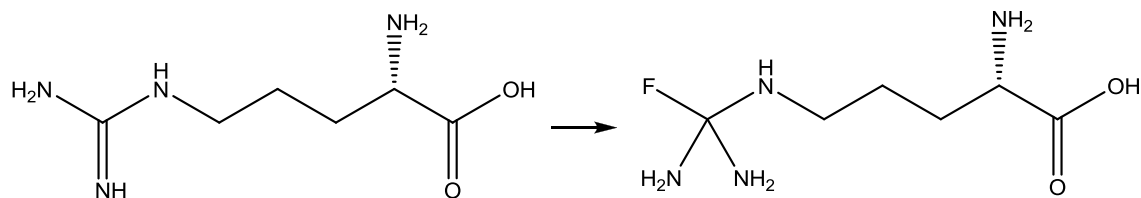


Figura 3.17: Proposta para o produto da reação de fluorização da arginina.

Reações de acetilação:

Reações de acetilação são reações clássicas para a proteção de grupos aminas. Então, realizou-se a reação de anidrido acético com o AA lisina, o qual contém uma amina na cadeia lateral. Posteriormente, foi feito o mesmo experimento, porém utilizando o AA glutamina, pois este não contém uma amina terminal e sim uma amida, a qual é menos reativa porque o par de elétrons está conjugando com a carbonila, não sendo um nucleófilo tão eficaz quanto a amina.

Foi adicionada ao ESI uma solução metanólica de lisina, e anidrido acético diluído em acetonitrila no nebulizador. Logo após, sob as mesmas condições, adicionou-se uma solução metanólica de glutamina no lugar da lisina. Porém os íons detectados em ambos experimentos foram referentes apenas aos AA's protonados e aos "clusters" de solventes, não foi detectado nenhum produto de reação.

Então se alterou o solvente utilizado para diluir o anidrido acético para MeOH. Realizou-se as reações com lisina e glutamina, respectivamente (Figura 3.18 a e b) e o ácido. Alguns íons referentes a "clusters" de solventes foram detectados; o íon majoritário foi o de m/z 227, correspondente a duas moléculas de anidrido acético coordenadas com sódio, este íon havia sido detectado nos experimentos anteriores. O produto esperado para a reação não foi detectado (m/z 189), porém o produto da adição do AA ao anidrido acético foi detectado (íon de m/z 249), ou seja, o intermediário da reação (Figura 3.19). Foram realizados experimentos de MS/MS para comprovar as estruturas propostas (Figura 3.20 e 3.21). Os dois AA's reagiram da mesma maneira, os espectros foram muito parecidos e o mecanismo para a reação da lisina está ilustrado na Figura 3.21.

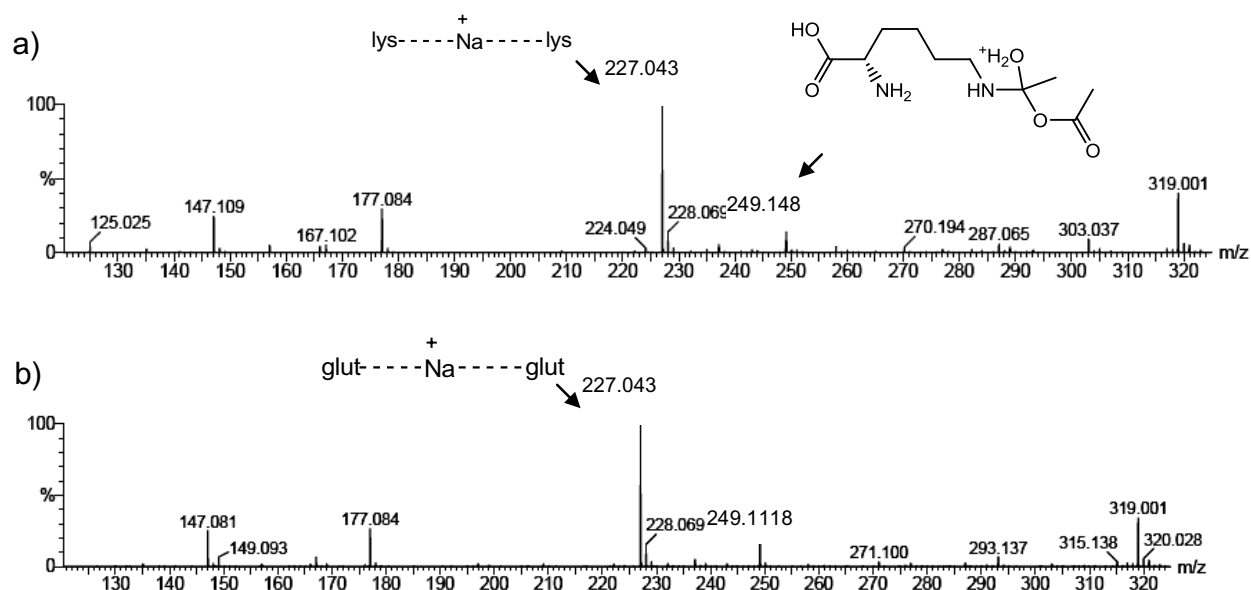


Figura 3.18: Espectros de ESI(+)-MS da reação de anidrido acético e a) Lisina e b) Glutamina.

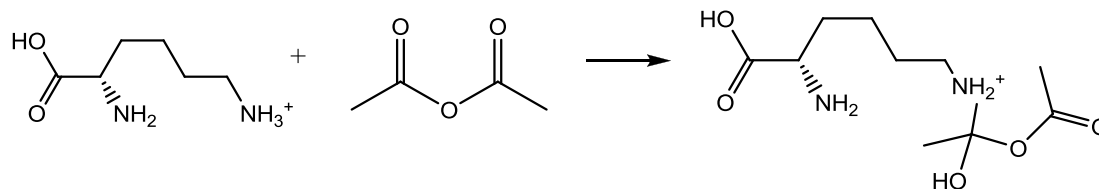


Figura 3.19: Formação do intermediário da reação de lisina e anidrido acético.

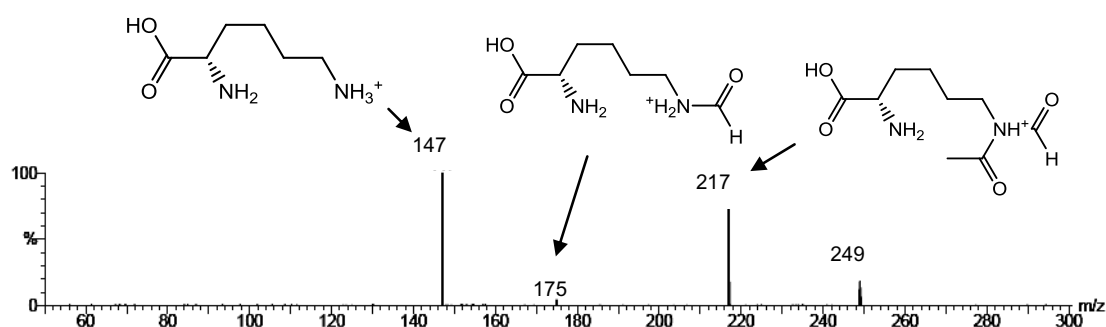


Figura 3.20: Espectros de ESI(+)-MS/MS do íon produto de m/z 249.

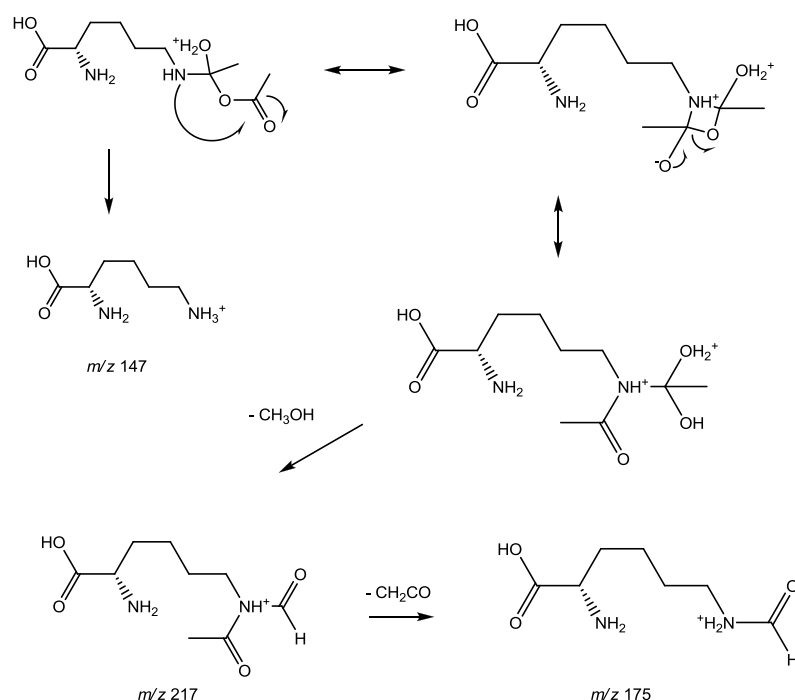


Figura 3.21: Proposta de fragmentação do íon produto de m/z 249.

Esta reação foi feita, posteriormente, em modo negativo, para que o meio reacional fosse básico e com isso não houvesse a captura do próton, gerando o produto final com a adição de COCH_3 nos AA's. No entanto, não se obteve sucesso nesta reação, uma vez que os produtos formados não eram os esperados e não se atribuiu nenhuma possível estrutura a eles.

Utilizou-se outro anidrido, o anidrido succínico, nos dois modos de ionização, positivo e negativo, mas os resultados não foram satisfatórios. Realizou-se também reações do AA arginina, no ESI em modo positivo e negativo, e benzil, no nebulizador, porém os produtos formados não foram os esperados.

- Reações de AA's por EASI:

As reações do íon pirílio com os AA's foram então realizadas utilizando a fonte de ionização EASI, a qual é uma fonte a temperatura ambiente e que não necessita de voltagem e de temperatura para promover a ionização de íons. Os primeiros AA

testados foram lisina e glutamina, uma vez que são isômeros, possuindo a mesma massa, porém com fórmulas moleculares distintas. A lisina reagiu e formou o produto citado anteriormente de m/z 437 (Figura 3.22 a), a partir da conversão do íon pirílio em piridínio por uma amina. No entanto, quando se utilizou o AA glutamina, o produto da reação não foi detectado (Figura 3.22 b), ou seja, não ocorreu a reação. Isso se deve ao fato da glutamina possuir uma amida na cadeia lateral e não uma amina, como no caso da lisina, portanto, a amida não reage com o pirílio convertendo-o em piridínio.

A mesma reação foi realizada para todos os AA's. Além da lisina, apenas o AA serina também reagiu, porém ocorreu apenas uma reação de adição, não havendo a liberação de água para a formação do íon piridínio; e os demais AA's não reagiram. Alguns exemplos estão ilustrados na figura 3.23.

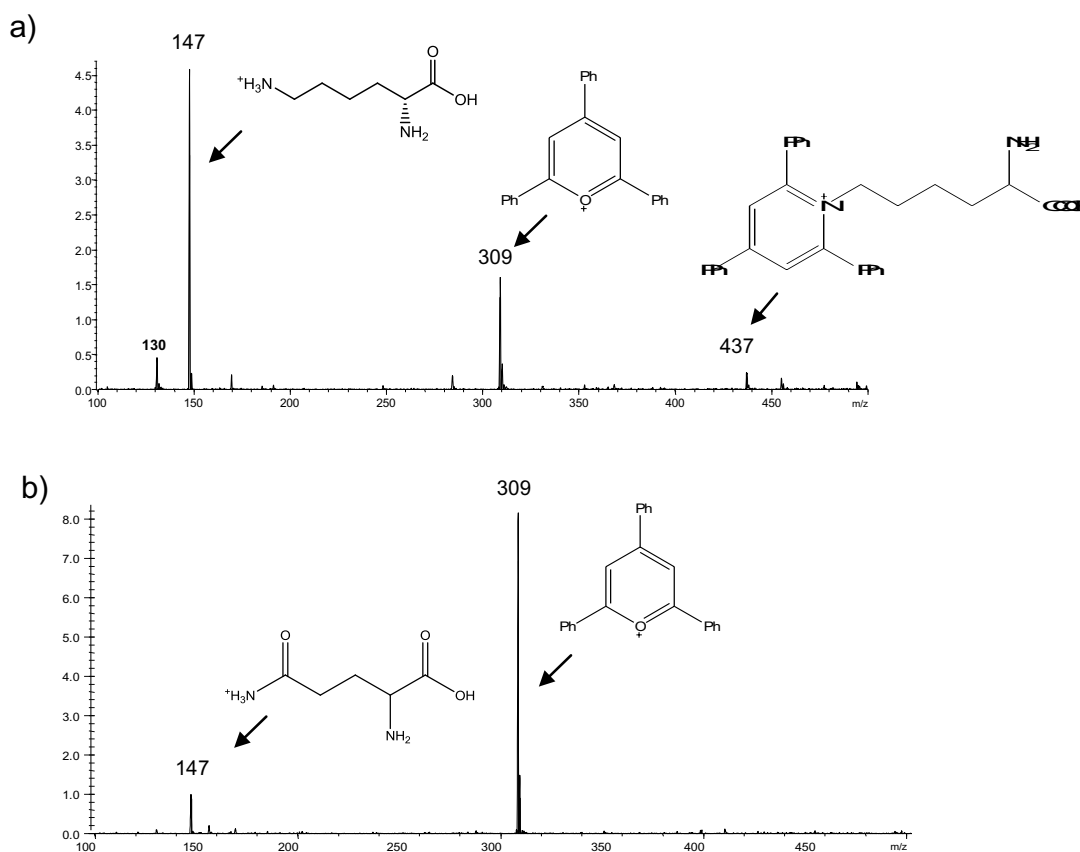


Figura 3.22: Espectro de ESI(+)-MS da reação de tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirílio e a) lisina e b) glutamina utilizando a fonte EASI.

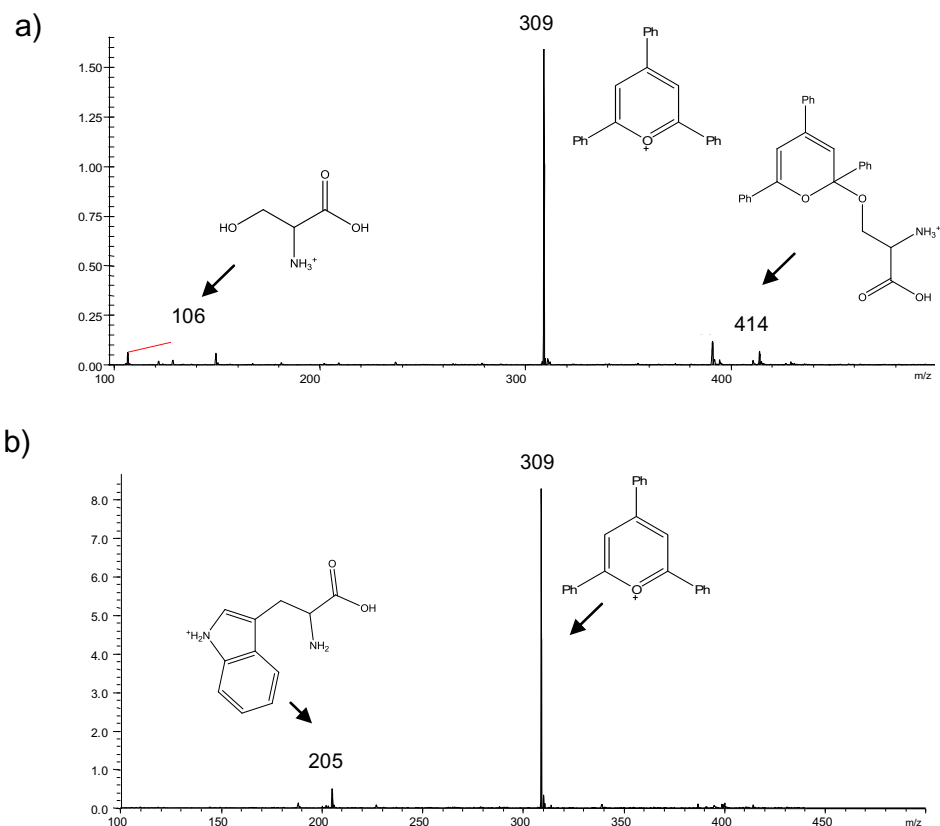


Figura 3.23: Espectros de ESI(+)-MS dos AA's a) serina e b) triptofano utilizando a fonte EASI.

3.2.3. Reações dos íons fragmentos a, b e y de peptídeos:

- Reações dos íons a, b e y de um peptídeo nativo:

O primeiro experimento realizado com peptídeos foi utilizando peptídeo nativo, presente em veneno de cobra. O espectro *full scan* ESI(+)-MS obtido do peptídeo está representado na Figura 3.24.

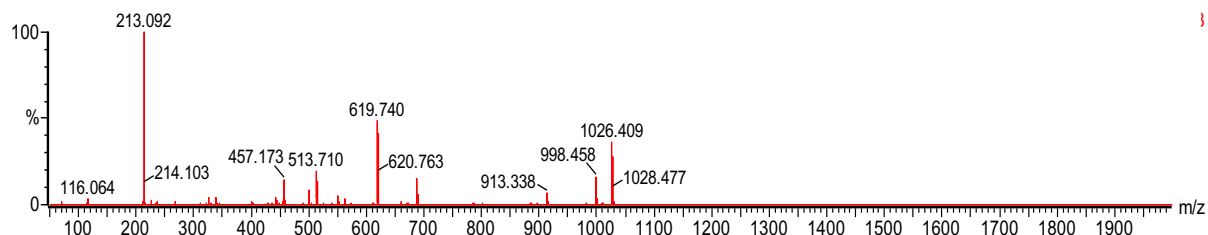


Figura 3.24: Espectro de ESI(+)-MS do peptídeo nativo.

Após a aquisição do espectro de massas *full scan*, adicionou-se o reagente na cela de colisão para verificar se havia a reação de algum íon, independente de sua natureza. Os reagentes foram colocados na cela de colisão, separadamente, na seguinte seqüência: propilvinileter, 2-metil-1,3-dioxolano e isopreno, e os espectros obtidos estão indicados na Figura 3.25.

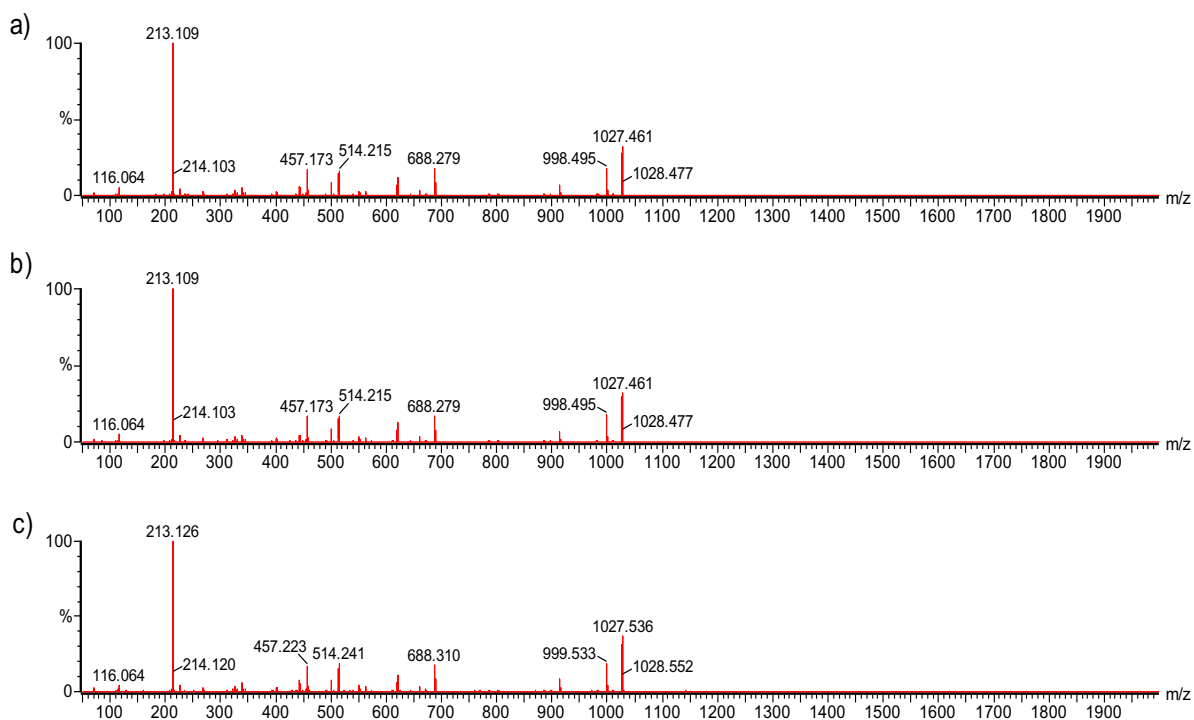


Figura 3.25: Espectro de ESI(+)-MS do peptídeo nativo após a reação com a) propilvinileter, b) 2-metil-1,3-dioxolano e c) isopreno.

Observando-se cuidadosamente os espectros do peptídeo nativo, com os espectros referentes aos peptídeos após o contato com propilvinileter, 2-metil-1,3-dioxolano e isopreno, não notou nenhuma modificação nos íons, ou seja, não houve reação de nenhum íon, independente da sua estrutura. Como não houve nenhuma reação, os experimentos seguintes foram realizados com peptídeos adquiridos comercialmente, pois não haveria problema com quantidade de amostra, além do mais, já se sabe a seqüência de AA's destes peptídeos comerciais o que facilita a determinação dos íons presentes no espectro de *full scan* e determinar os íons que provavelmente irão reagir. Estes primeiros experimentos mencionados acima foram realizados com fonte comercial de *nanoeletrospray*, pois a quantidade de amostra era muito pequena.

- Reação dos íons a, b e y de peptídeos comerciais:

Formação dos íons a, b e y após ionização por APTD-EESI:

Nestes novos experimentos, utilizou-se uma fonte de ionização descrita recentemente na literatura¹⁸, o APTD-EESI, a qual também utiliza *nanoeletrospray*. Esta técnica é mais sensível que as técnicas a pressão ambiente para análise por peptídeos, pois os íons fragmentos formados ficam mais intensos depois de aquecidos no tubo externo. Inicialmente, com o intuito de reproduzir esta nova técnica, e verificar a real utilidade desta para nossos experimentos, utilizou-se a Angiotensina II.

Quando se realizou o experimento de ESSI, sem o tubo de aquecimento, o sinal foi detectado normalmente, e quando o tubo foi colocado entre a fonte de ESSI e o espectrômetro de massas, o sinal diminuiu de intensidade. Ou seja, realizou-se alguns experimentos utilizando APTD-EESI, porém esta técnica apresentou baixa sensibilidade. Isto deve ter ocorrido, pois existe este tubo de aquecimento entre o capilar e a entrada do espectrômetro de massas, o sinal dos íons detectados acaba sendo pouco intenso, pois há perda dos mesmos devido ao longo caminho percorrido a pressão ambiente.

Reações dos íons a, b e y dentro da cela de colisão q2 do equipamento Q-TOF:

Outra fonte de ionização *nanospray* foi testada para tentar obter uma melhor sensibilidade. Para tal, um sistema robotizado *Nanomate* da *Advion*® foi testado com as soluções de peptídeos comerciais. Este sistema possui algumas vantagens, dentre elas pode-se citar a pequena quantidade de amostra necessária para análise. Outra vantagem relevante é que o sistema utiliza vários itens descartáveis, como pipetas, placas e inclusive o *nanochip*, resultando em uma diminuição de contaminação cruzada de amostras; além disto, o *spray* gerado é estável e o sistema possui boa reprodutibilidade.

O peptídeo inicial utilizado foi Angiotensina II (Figura 3.26) e o reagente inicial foi a acetonitrila, a qual é uma molécula menor que as outras empregadas sem sucesso com o peptídeo nativo. Aumentou-se a energia do cone para gerar os íons fragmentos de interesse. Os íons com *m/z* referentes aos fragmentos a, b e y do peptídeo foram identificados (Figura 3.27).

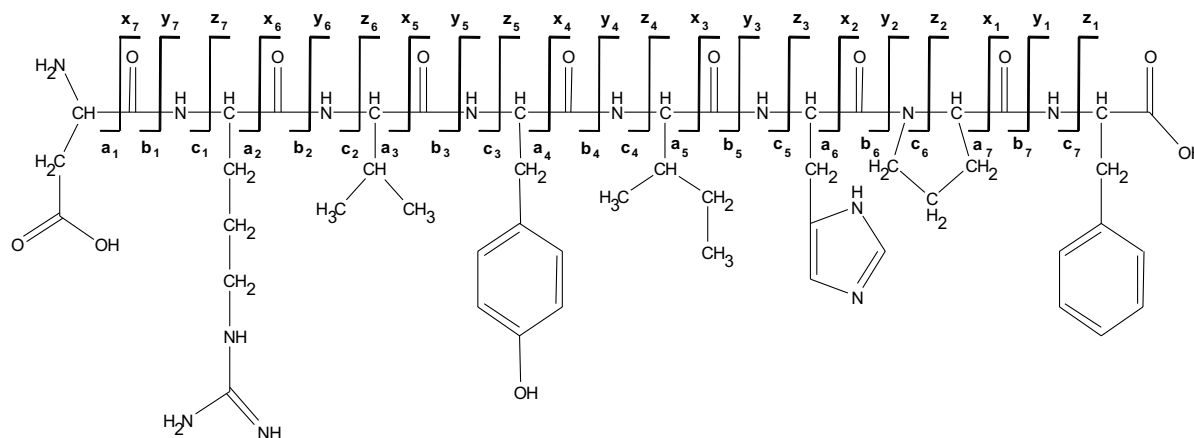


Figure 3.26: Estrutura da Angiotensina II e os possíveis íons fragmentos.

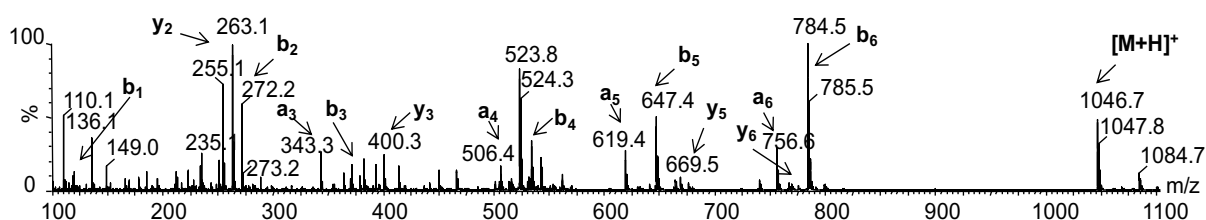


Figure 3.27: Espectro de ESI(+)-MS da Angiotensina II.

Cada íon fragmento a, b e y foi selecionado no Q1 do equipamento QTOF e direcionado ao Q2, o qual continha o reagente escolhido, a fim de realizar a reação. Os espectros de ESI(+)-MS de todos os íons a, b e y selecionados após o contato com acetonitrila em Q2 estão ilustrados na Figura 3.28 – 3.30.

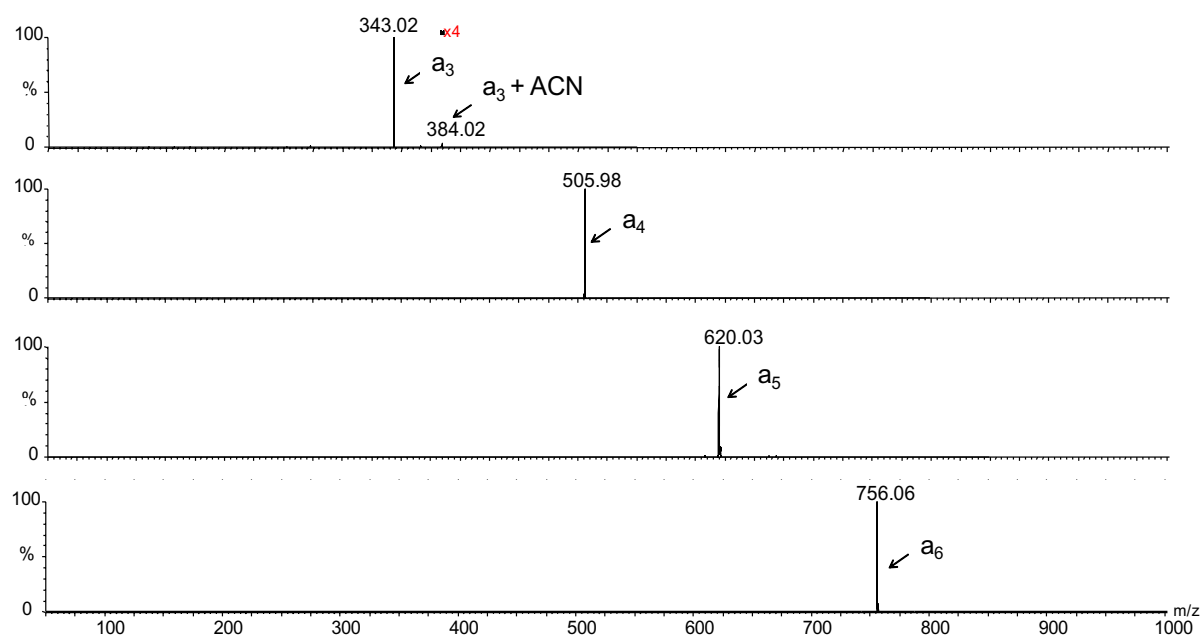


Figure 3.28: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Angiotensina II com ACN no Q2.

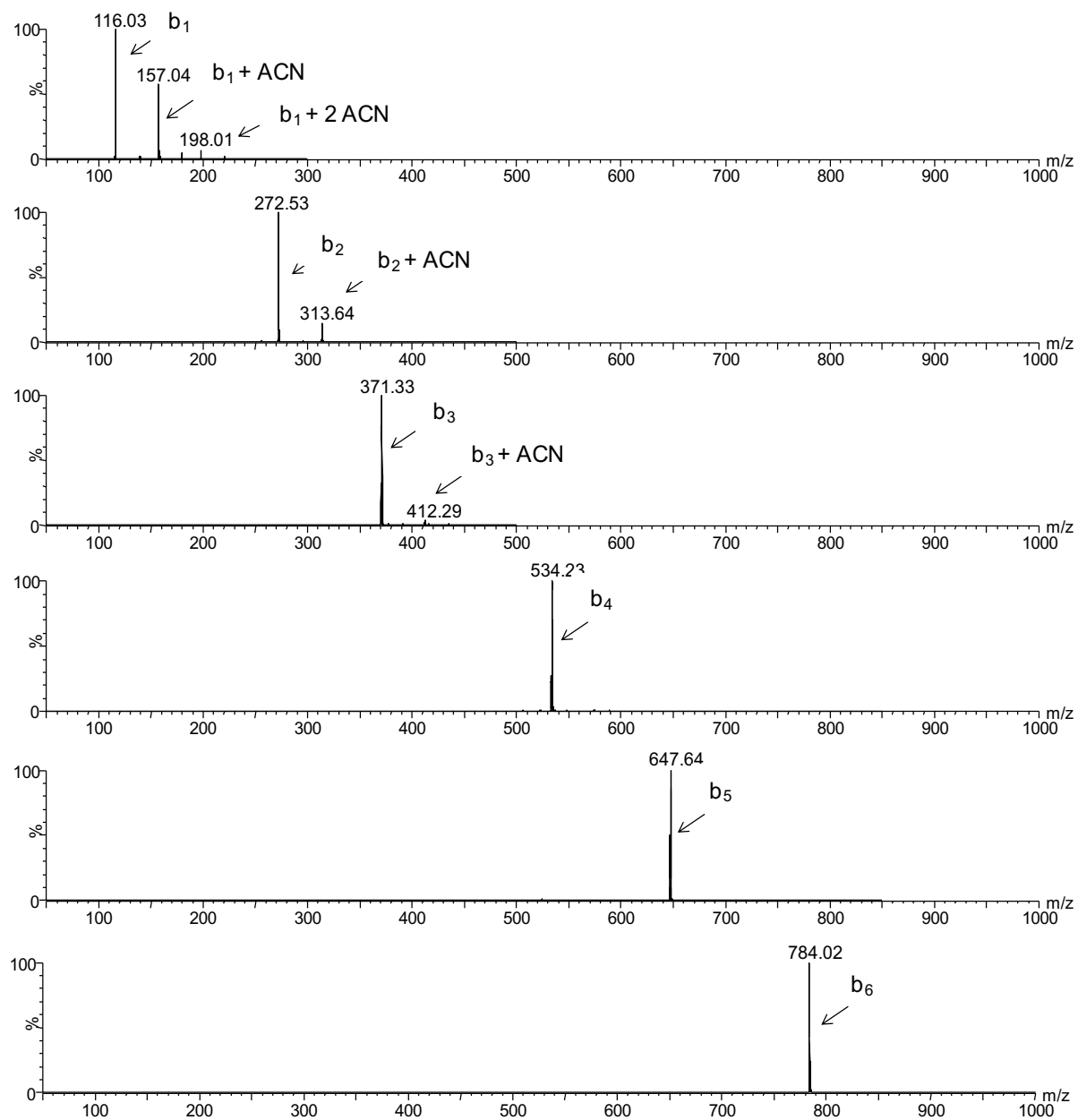


Figure 3.29: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Angiotensina II com ACN no Q2.

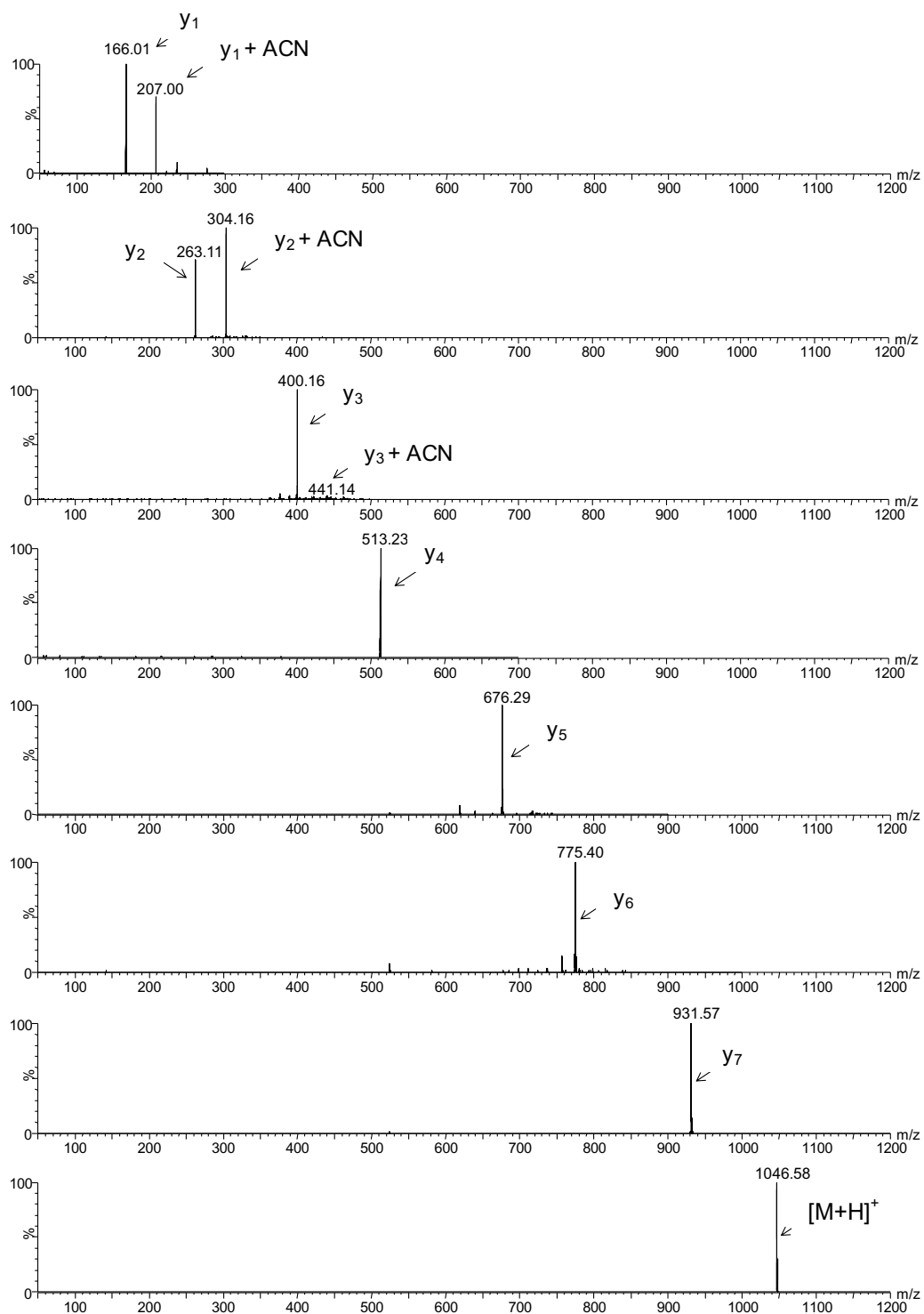


Figure 3.30: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Angiotensina II com ACN no Q2.

Os peptídeos não fragmentam da mesma forma na fonte e não geram sempre todos os possíveis íons teoricamente esperados, como por exemplo, a_1 a a_8 , y_1 a y_8 e b_1 a b_8 . Outro fator a ser considerado é que além da formação dos íons a , b e y , na fonte, outros íons similares a estes também são formados, os quais podem ser provenientes de uma perda de moléculas de H_2O e NH_3 , e estes são indicados como $y - H_2O$, $b - H_2O$, $a - H_2O$, $y - NH_3$, $b - NH_3$, $a - NH_3$.

Em todos os experimentos, realizou-se a reação com o maior número possível de íons a , b e y , intactos e com perdas de moléculas.

Além dos íons a , b e y , íons b com uma perda de uma molécula de amônio foram observados no espectro da Angiotensina II, os quais também foram submetidos à reação com ACN (Figura 3.31).

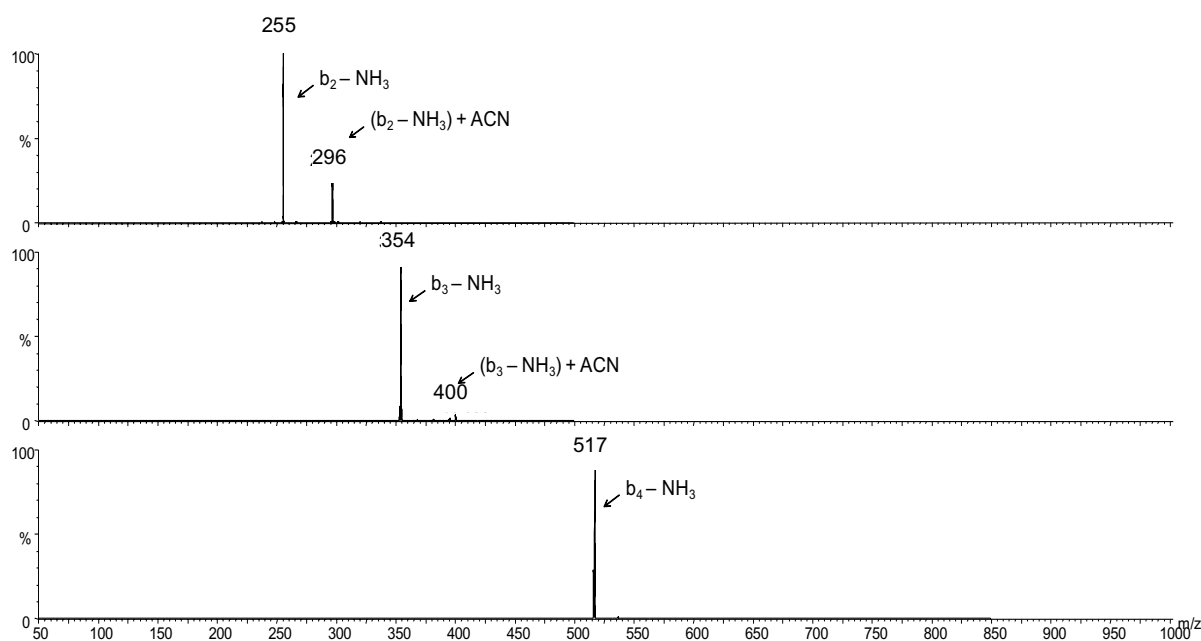


Figure 3.31: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $b_{(2-4)}-NH_3$ da Angiotensina II com ACN no Q2.

Os resultados mostraram que a reação com acetonitrila não é seletiva para nenhum grupo de íons, b , y e a , uma vez que os produtos eram provenientes de uma reação de adição de uma, ou duas moléculas em sua estrutura. Portanto, trocou-se o

reagente para acetona. Os reagentes empregados tinham que ser facilmente volatilizados e com pressão de vapor baixa, pois as reações foram realizadas na cela de colisão de Ar, e após os experimentos colocava-se novamente o Ar para experimentos tradicionais de MS/MS. Além do mais, todo o cuidado era tomado para não contaminar entre um reagente e outro.

Selecionou-se um íon de cada fragmentação da Angiotensina II: a, b, b - NH₃ e y, os quais já haviam sido reagidos anteriormente com acetonitrila, exceto o b - NH₃, a fim de verificar se ocorrem às mesmas e/ou diferentes reações e se estas são específicas para cada íon.

O espectro da reação do íon y₂ com acetona (Figura 3.32) apresentou a formação de dois íons e após análise, verificou-se que o íon *m/z* 304 é referente a adição de acetonitrila, a qual provavelmente não saiu totalmente da cela e da linha, pois os experimentos foram realizados em seqüência, e o íon *m/z* 321 é referente a adição de acetona. Ou seja, a reação foi a mesma observada quando utilizou-se acetonitrila como reagente.

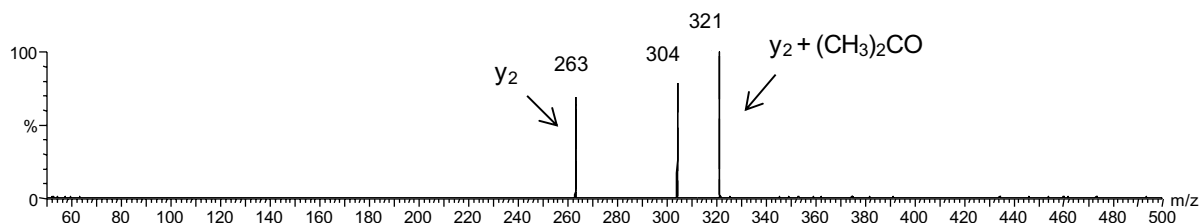


Figura 3.32: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon y₂ com acetona.

O espectro da reação do íon b₂ com acetona apresentou a formação de dois íons, igualmente ao caso do íon y₂, e após análise, verificou-se que ambos (íon *m/z* 313 e íon *m/z* 330) são referentes a produtos de reação de adição do íon b₂ com acetonitrila e acetona, respectivamente (Figura 3.33). Ou seja, as mesmas reações observadas para o íon y₂; portanto, estas não são capazes de distingui-los.

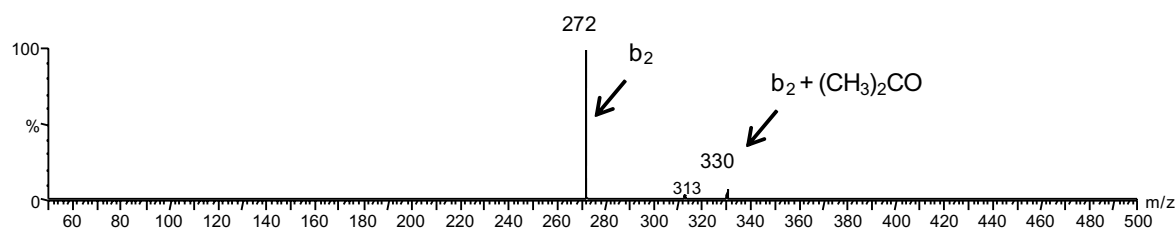


Figura 3.33: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido da reação do íon b_2 com acetona.

Quando reagiu o íon selecionado $b_2 - \text{NH}_3$ (m/z 255), observou-se apenas um produto de reação, o íon m/z 313, o qual é proveniente da reação de adição de uma molécula de acetona (Figura 3.34).

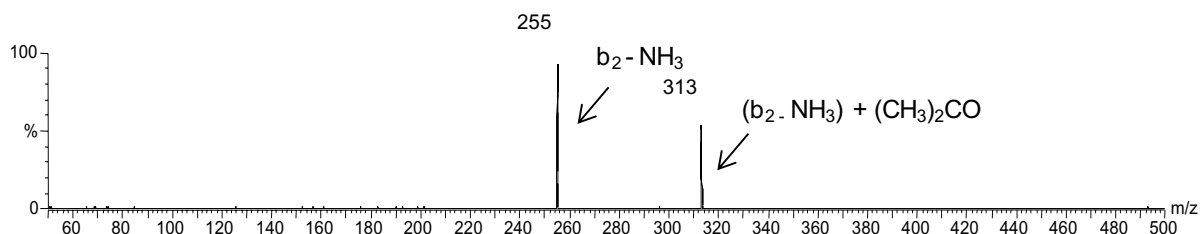


Figura 3.34: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon $b_2\text{-NH}_3$ com acetona.

A mesma reação observada (adição de uma molécula de acetona ou acetonitrila) foi detectada para o íon a_3 (Figura 3.35). Ou seja, a acetona também não é um reagente seletivo para os íons estudados e reage igualmente à acetonitrila.

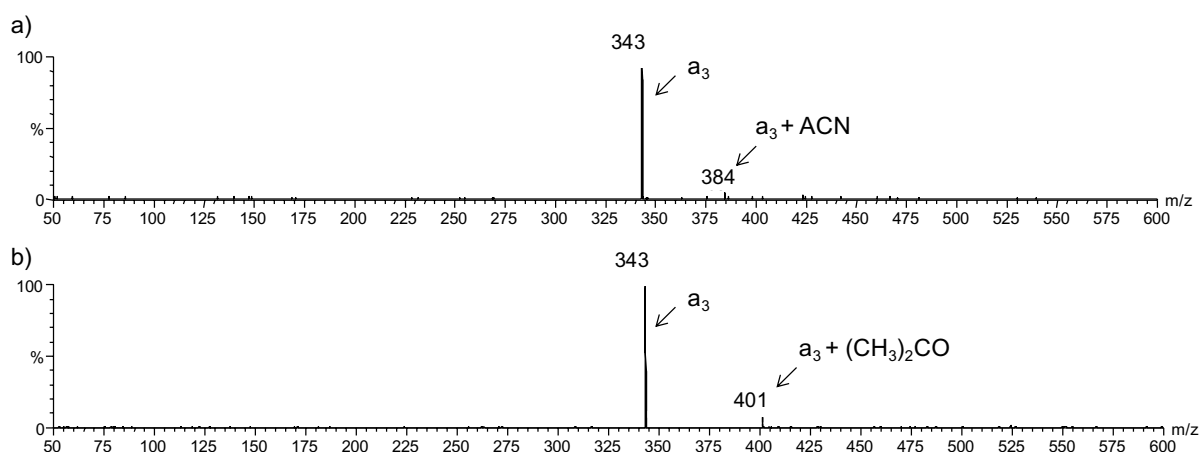


Figura 3.35: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a reação do íon a_3 com acetona.

Como os reagentes utilizados possuem estruturas químicas relativamente similares e reagiram do mesmo modo, então, escolheu-se um reagente com estrutura mais distinta e capaz de reagir com o íon acílio dos íons b, este reagente foi o 2-metil-1,3-dioxolano, reação de Eberlin⁸⁷.

Foram testados alguns íons a, b e y para verificar se alguma destas conformações reagia diferentemente. Primeiramente, selecionou-se os íons b, b₂ a b₆, pois esperava-se que estes reagissem, porém nenhum produto com intensidade significativa não foi observado. Os espectros de massas (ESI(+)-MS) dos íons b₂ e b₄ após a interação com o 2-metil,1,3-dioxolano no Q2 estão representados na figura 3.36.

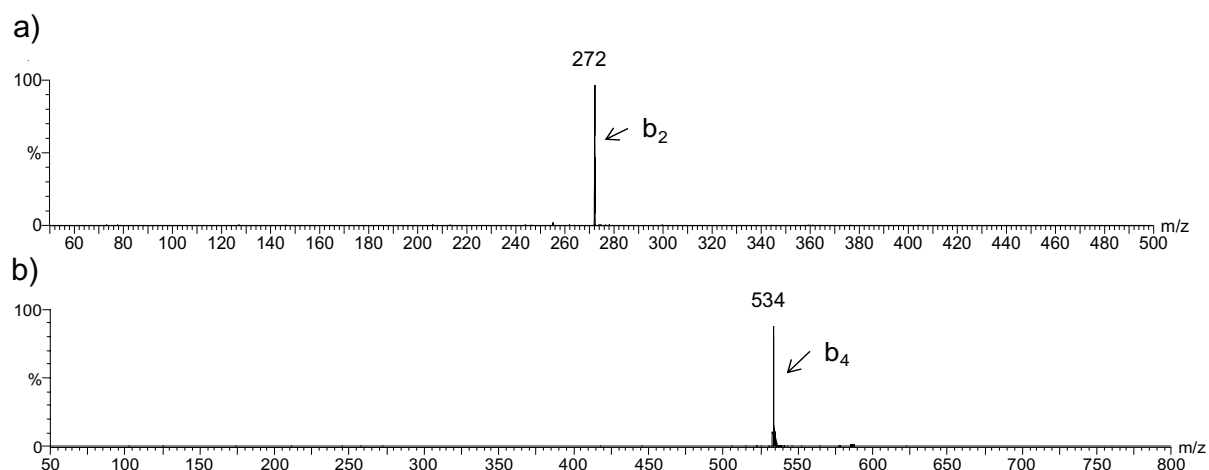


Figura 3.36: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a interação do íon b₂ e b₄ com 2-metil,1,3-dioxolano no Q2.

Para os íons y, realizou-se os experimentos de reação para os íons y₂ e y₅. Ambos os íons não formaram produtos de reação esperados (Figura 3.37).

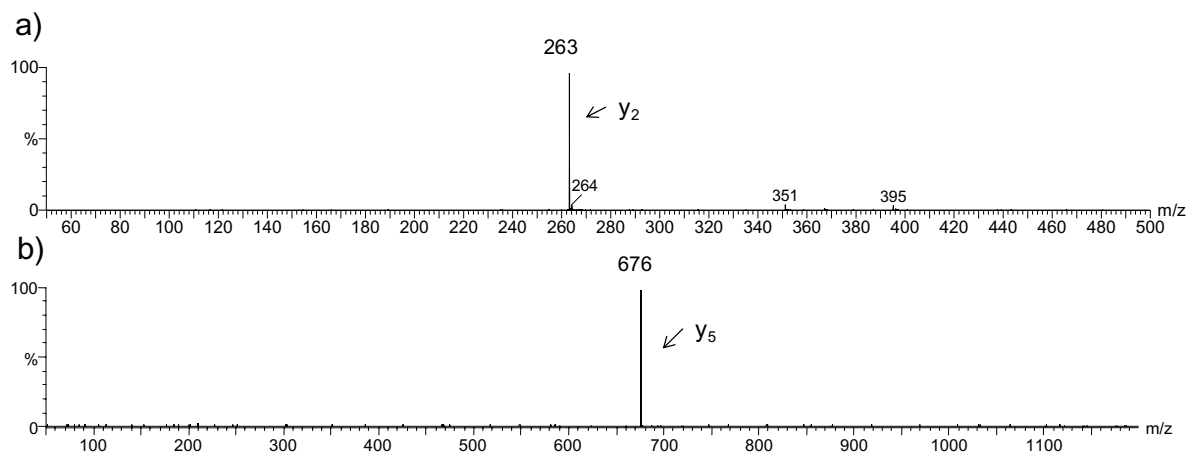


Figura 3.37: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido após a interação dos íons y_2 e y_5 com 2-metil-1,3-dioxolano, respectivamente.

Realizou-se a reação do íon a_3 , porém não se detectou a presença de nenhum produto de reação (Figura 3.38).

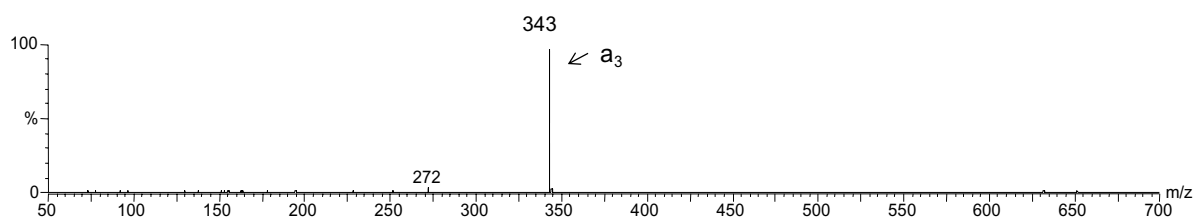


Figura 3.38: Espectro de massas ESI(+)-MS obtido da reação do íon a_3 com 2-metil-1,3-dioxolano.

Os íons analisados seguiram a mesma tendência reacional, e um resumo da probabilidade de reações considerando os reagentes testados está ilustrado na figura abaixo para o íon b_2 da Angiotensina II. Houve a adição de uma molécula de acetonitrila e acetona quando se utilizou estes reagentes, porém não houve reação utilizando-se 2-metil,1,3-dioxolano (Figura 3.39).

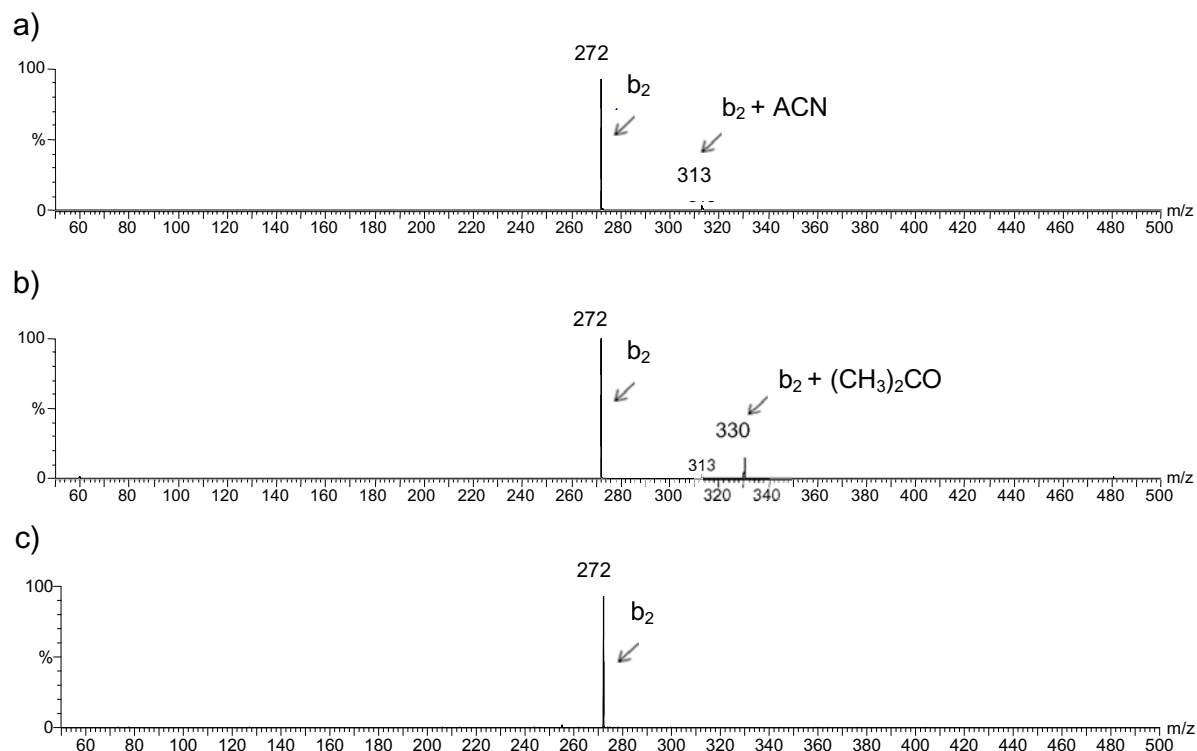


Figura 3.39: Espectro de massas ESI(+)-MS do íon b_2 da Angiotensina II após a reação com: a) acetonitrila, b) acetona e c) 2-metil, 1,3-dioxolano.

A partir destes experimentos realizados com Angiotensina II com os três diferentes reagentes, não se conseguiu detectar nenhuma reação específica para cada conformação analisada, y, b e a. Porém observou-se que as reações de formação de adutos apenas ocorreram para íons menores (menor seqüência de resíduos de AA's) e que este caráter reacional caiu drasticamente, e muitas vezes nem ocorreu reação, para íons maiores, ou seja, o tamanho do íon deve influenciar muito na sua estrutura terciária e, por isso, na sua reatividade. Uma hipótese seria que íons maiores teriam seu sítio reativo menos acessível devido sua forma enovelada.

Com isso, os experimentos seguintes foram realizados reagindo outros peptídeos com a acetonitrila, para verificar se tal observação era realmente válida.

Os peptídeos comerciais utilizados nesta etapa foram: Bradiquinina, [D-Ala², D-Leu⁵]-Encefalina, Substância P, Colecistoquinina, Neurotensina. O espectro de massas de cada peptídeo foi adquirido inicialmente, para verificar quais íons eram formados na

fonte. Os dois peptídeos que apresentaram um maior número de íons fragmentos a, b e y, além da Angiotensina testada anteriormente, foram a Bradiquinina e a Encefalina (Figura 3.40).

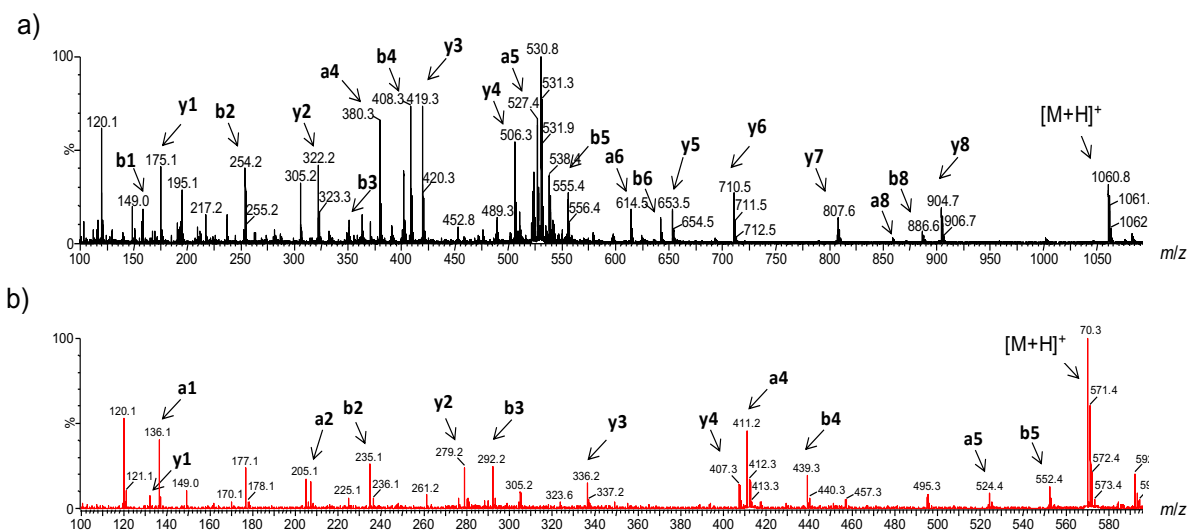


Figure 3.40: Espectro de massas (ESI(+)-MS) da a) Bradiquinina e b) Encefalina.

Os íons a, a - NH₃, b, b - NH₃, y, y - NH₃ provenientes da bradiquinina foram reagidos com ACN e os espectros de massas ESI(+)-MS resultantes estão ilustrados a seguir (Figura 3.41 - 3.46).

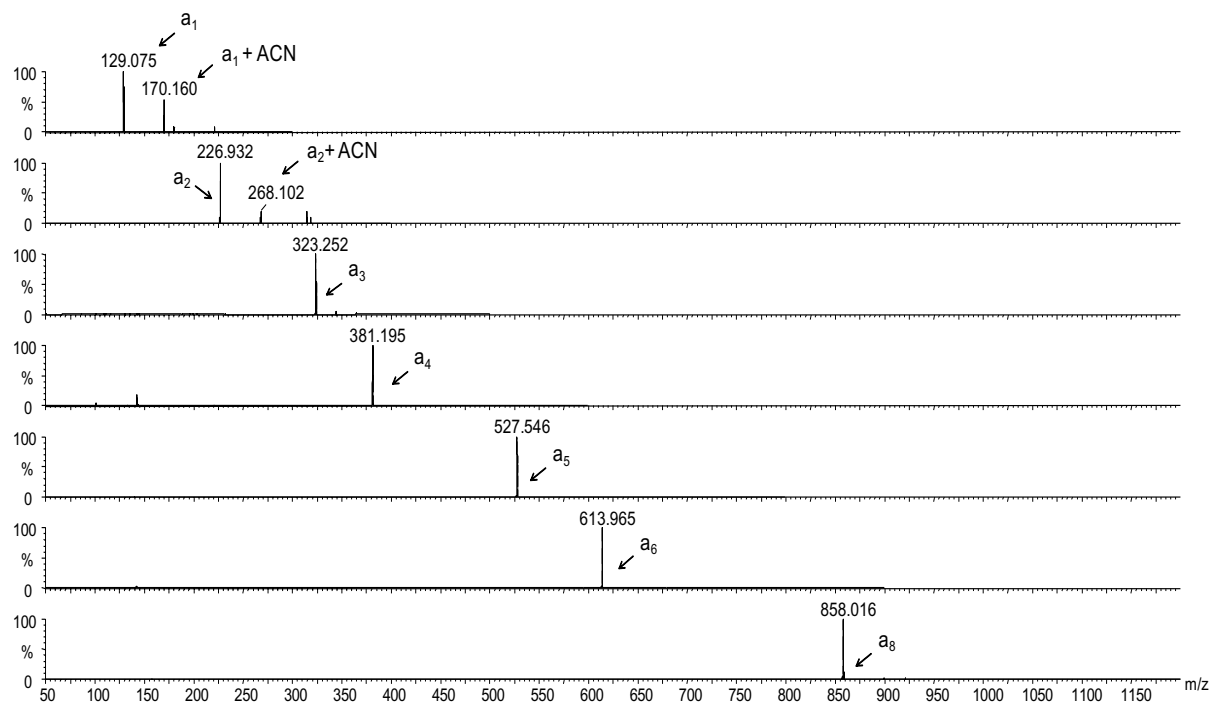


Figure 3.41: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Bradiquinina com ACN no Q2.

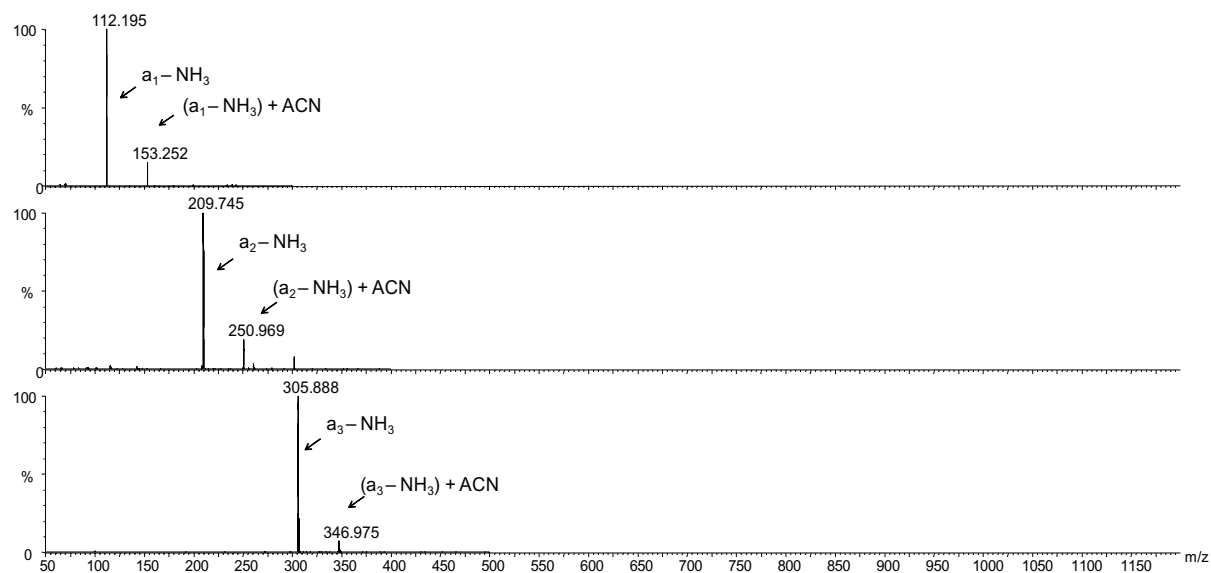


Figure 3.42: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a - NH_3 da Bradiquinina com ACN no Q2.

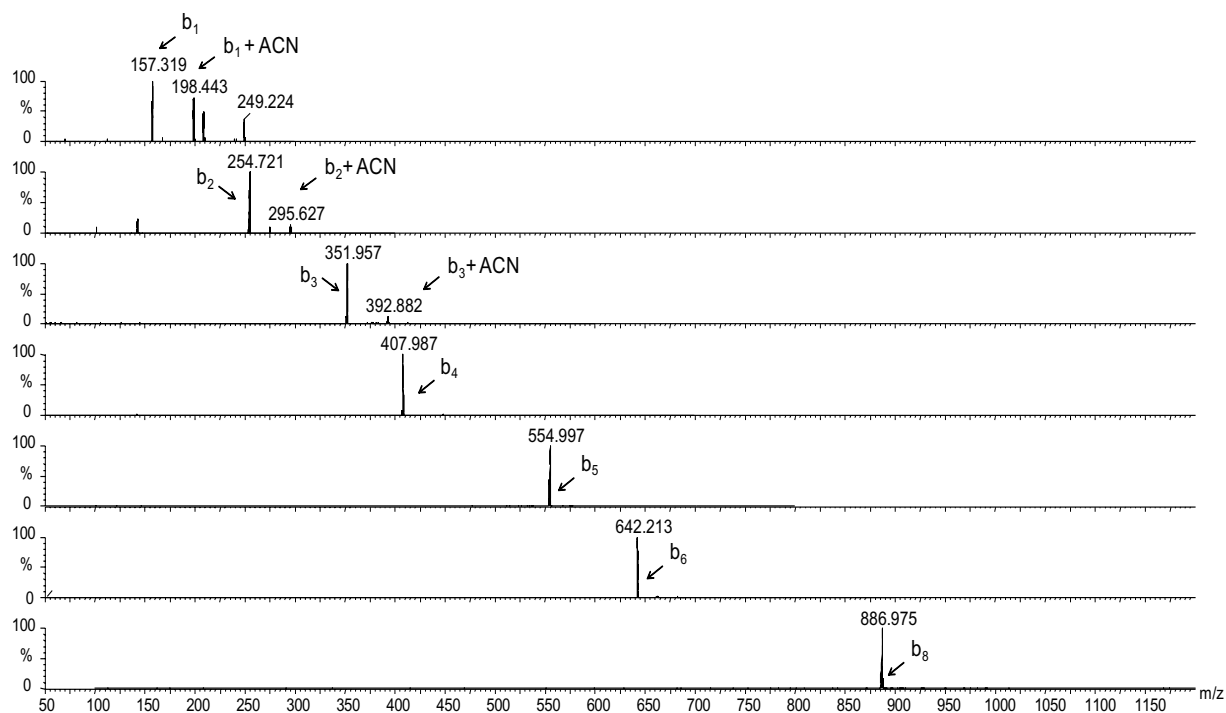


Figure 3.43: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Bradyquinina com ACN no Q2.

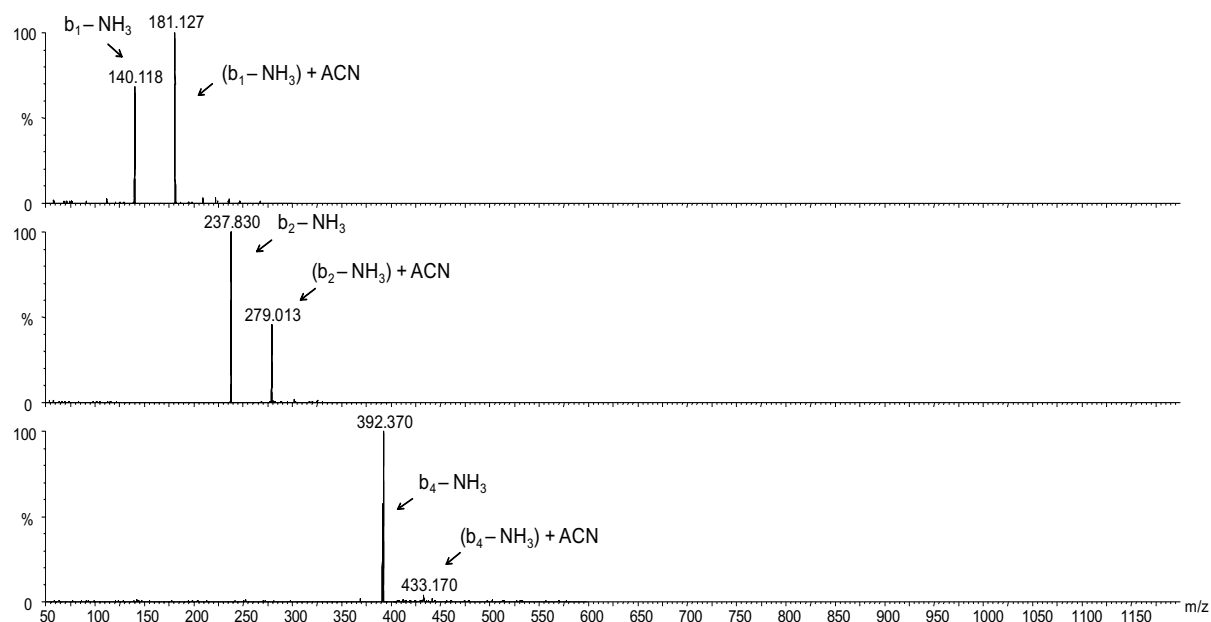


Figure 3.44: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b - NH₃ da Bradyquinina com ACN no Q2.

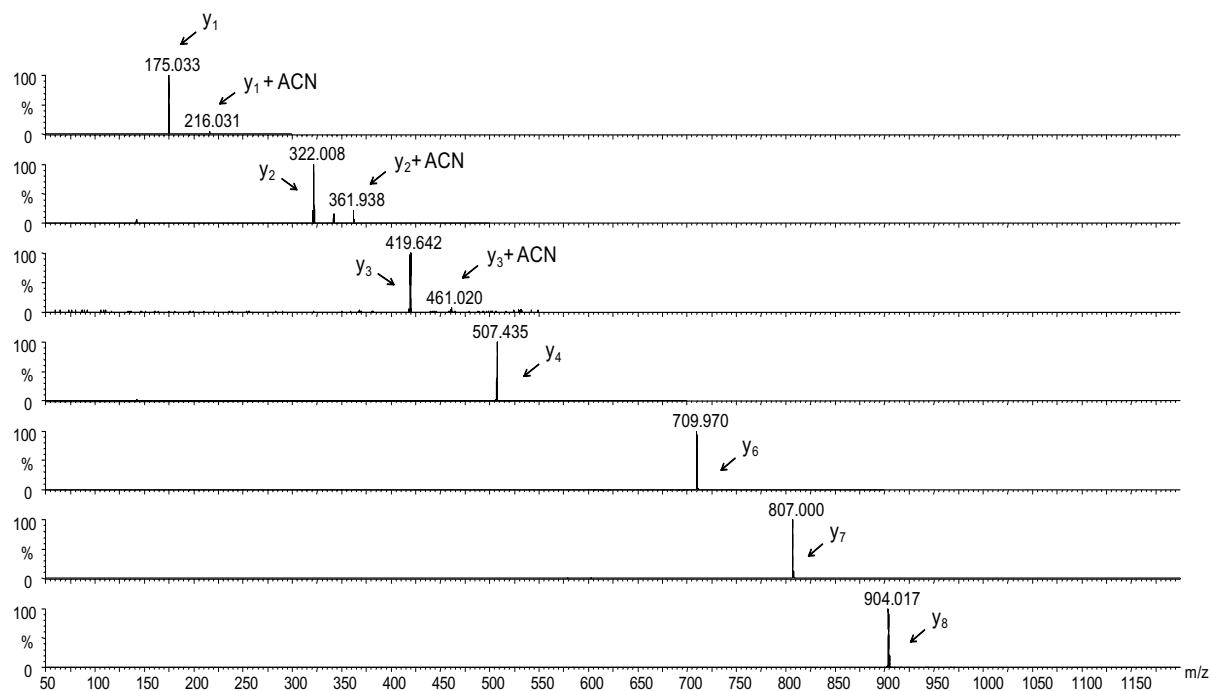


Figure 3.45: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Bradiquinina com ACN no Q2.

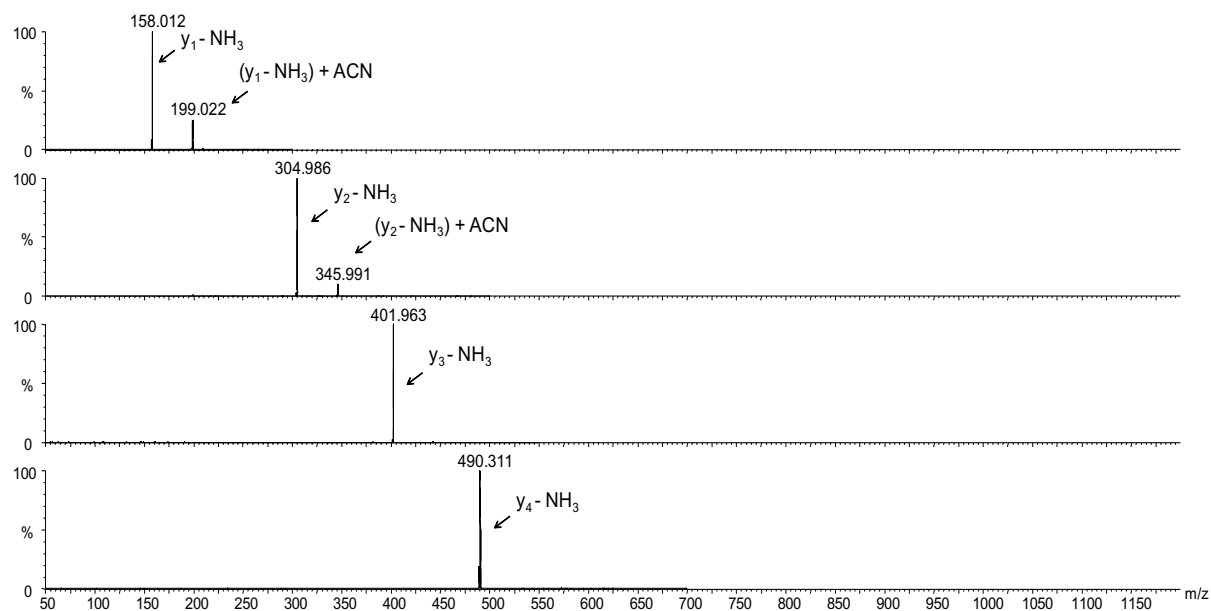


Figure 3.46: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $y - \text{NH}_3$ da Bradiquinina com ACN no Q2.

O peptídeo Encefalina foi o menor peptídeo estudado, com apenas 5 AA's, no entanto, toda a seqüência de íons $a_{(1-4)}$, $b_{(1-4)}$ e $y_{(1-4)}$ foi observada após a ionização na fonte. Com isso, o estudo reacional completo deste peptídeo foi realizado. Os espectros de massas obtidos após as reações dos íons a, b e y estão representados a seguir (Figura 3.47 - 3.49, respectivamente).

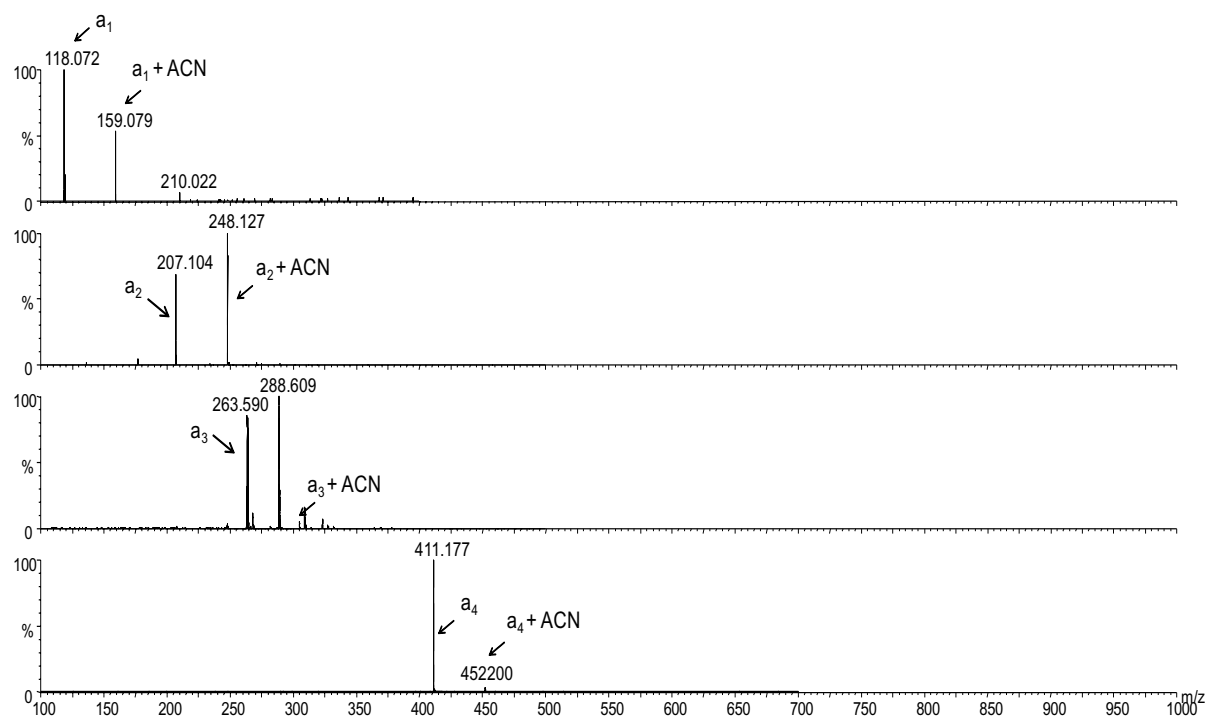


Figure 3.47: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons a da Encefalina com ACN no Q2.

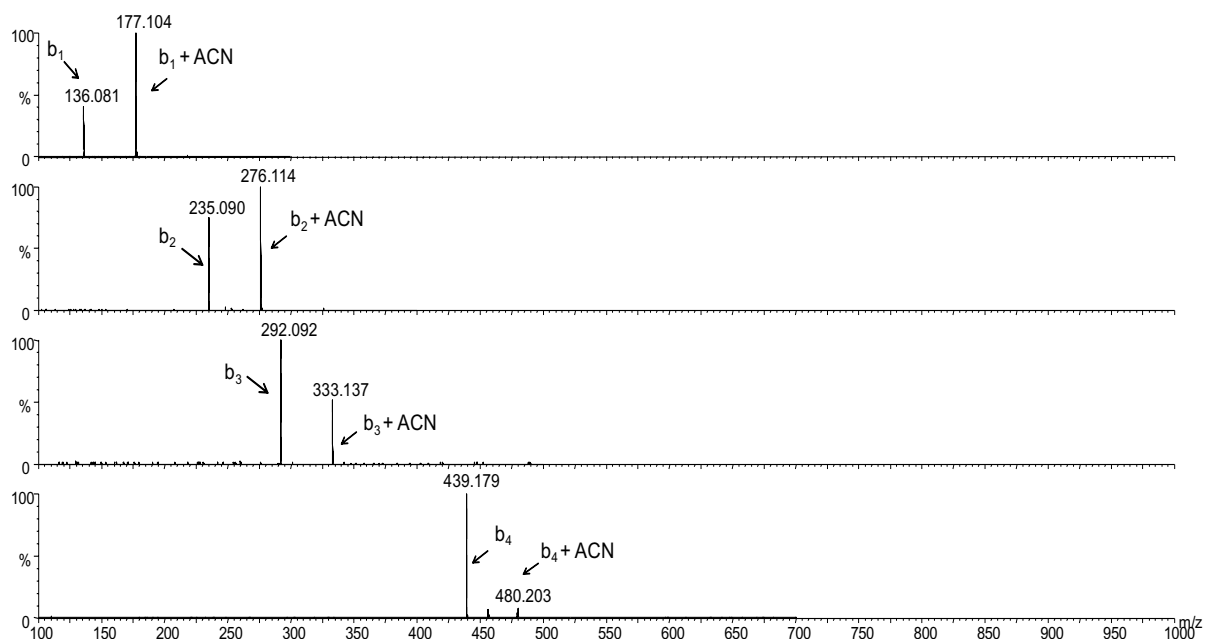


Figure 3.48: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Encefalina com ACN no Q2.

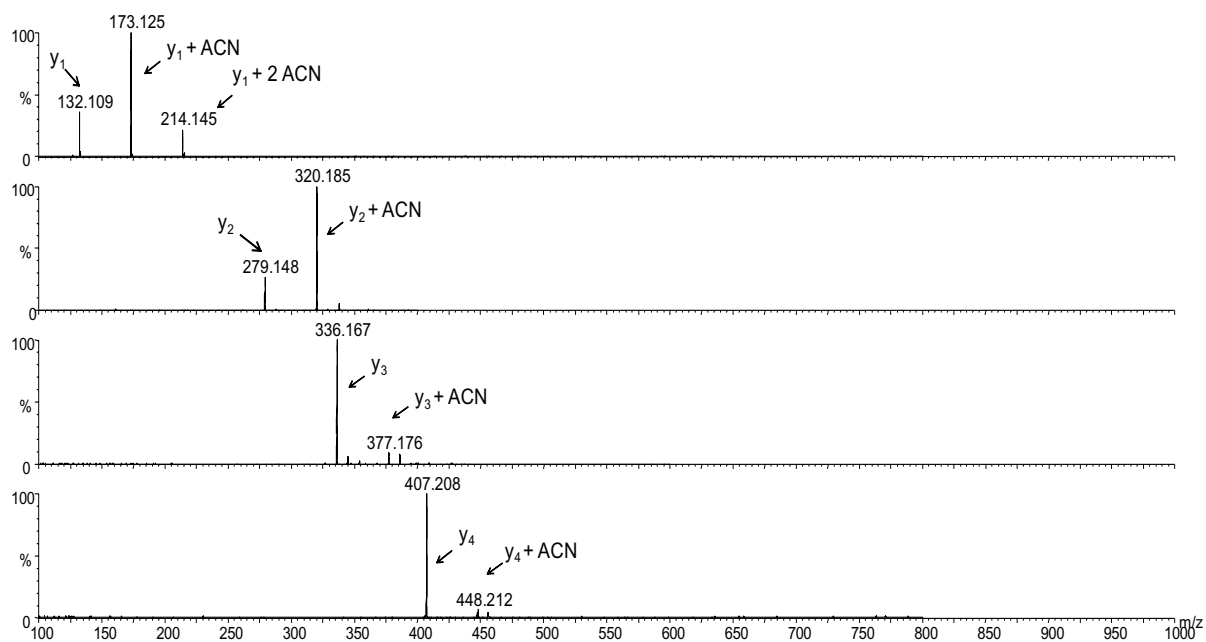


Figure 3.49: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons y da Encefalina com ACN no Q2.

Os íons que foram submetidos à reação foram todos os observados nos espectros de *full scan* adquiridos, cuja intensidade foi suficiente para seleção no quadrupolo. No caso do peptídeo Substância P, a partir do espectro de massas ESI(+)-MS obtido (Figura 3.50) foi possível apenas selecionar os íons $b_{(5-6)}-NH_3$ (Figura 3.51) e $y_{(1-10)}-H_2O$ (Figura 3.52).

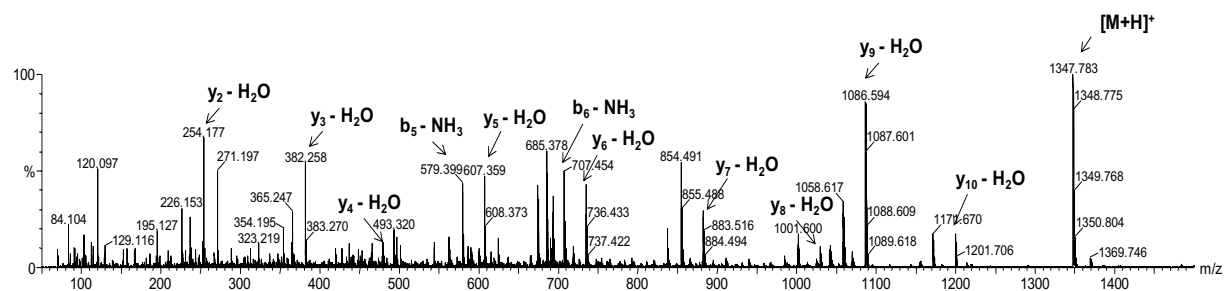


Figura 3.50: Espectro de massas ESI(+)-MS da Substância P.

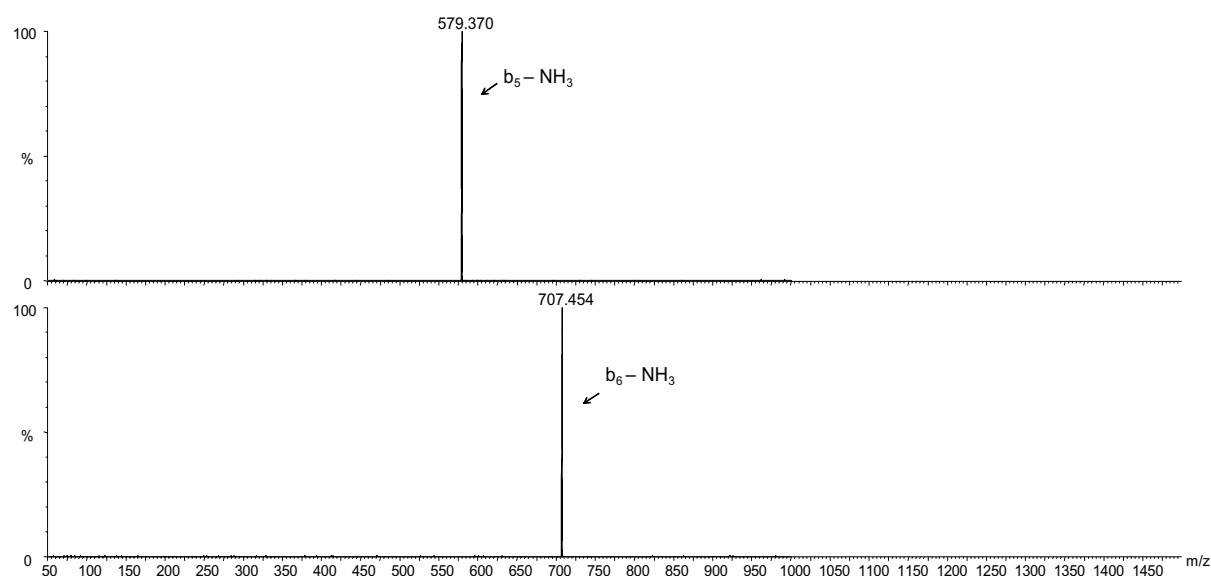


Figure 3.51: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $b - NH_3$ da Substância P com ACN no Q2.

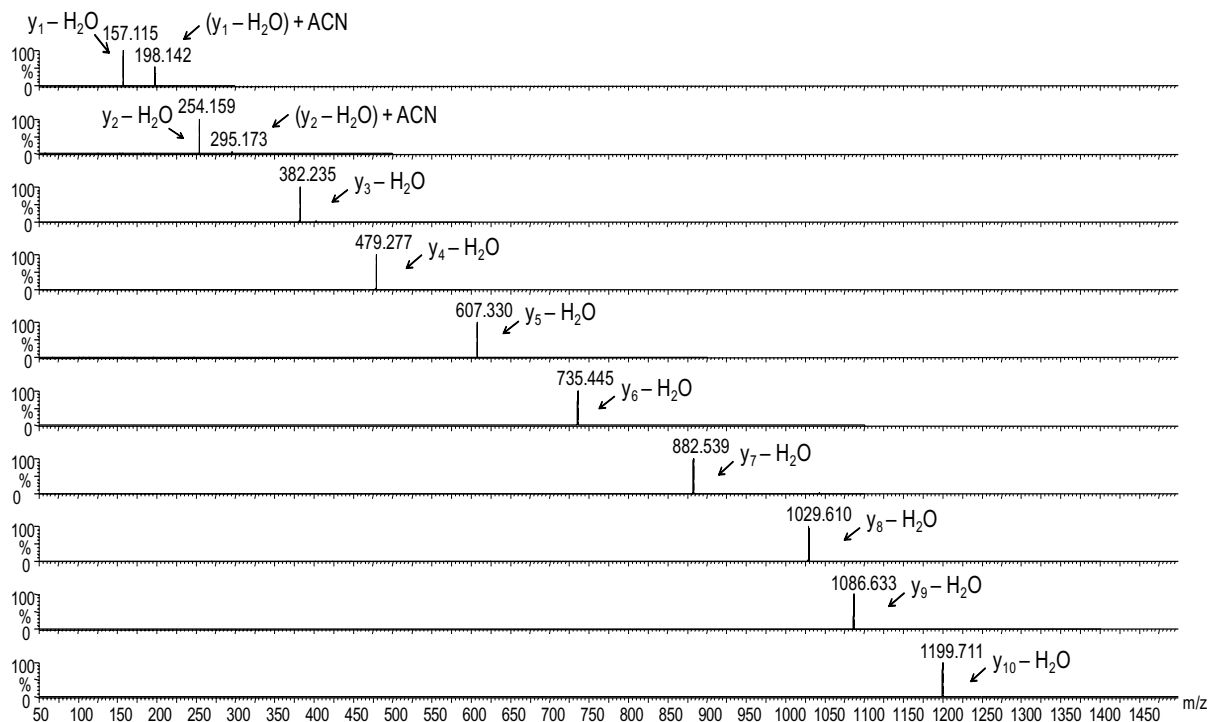


Figure 3.52: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $y - H_2O$ da Substância P com ACN no Q2.

Nos experimentos com a Colecistoquinina, o espectro de massas ESI(+)-MS apesar de ter vários íons, não apresentavam m/z correspondente aos íons a, b e y; portanto, apenas poucos íons foram atribuídos (Figura 3.53). Os íons selecionados e submetidos à reação em Q2 foram: $a_3 - H_2O$, b_2 e b_3 , y_3 , $y_{(4-6)} - H_2O$ (Figura 3.54 - 3.57, respectivamente). Com isso, nenhum estudo detalhado para este peptídeo pode ser realizado.

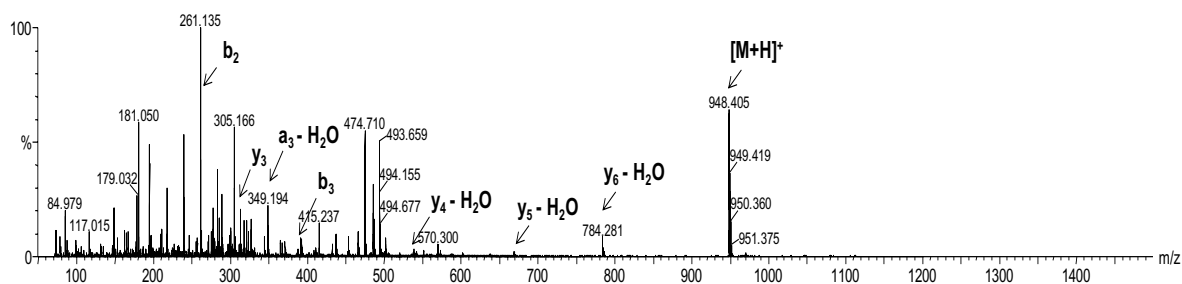


Figura 3.53: Espectro de massas ESI(+)-MS da Colecistoquinina.

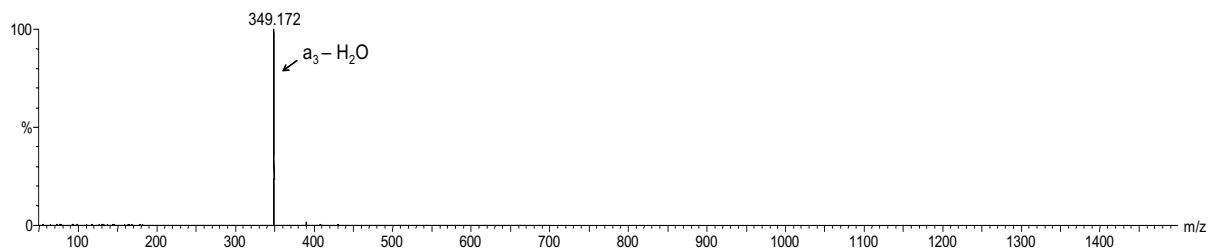


Figure 3.54: Espectros de ESI(+)-MS após o contato do íon $a_3 - H_2O$ da Colecistoquinina com ACN no Q2.

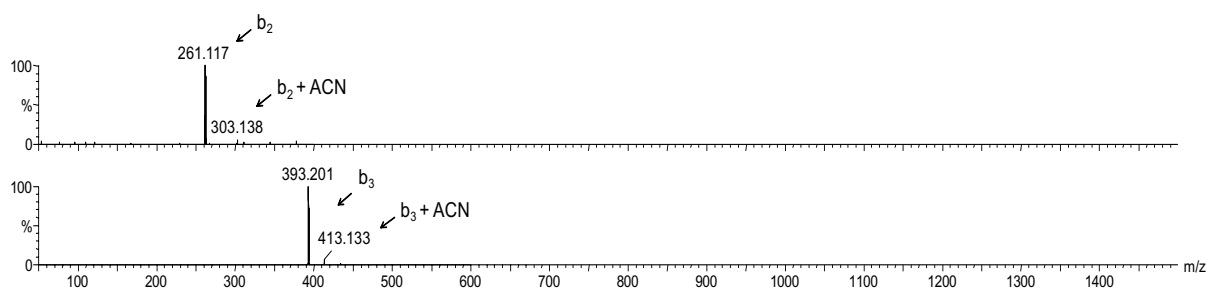


Figure 3.55: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons b da Colecistoquinina com ACN no Q2.

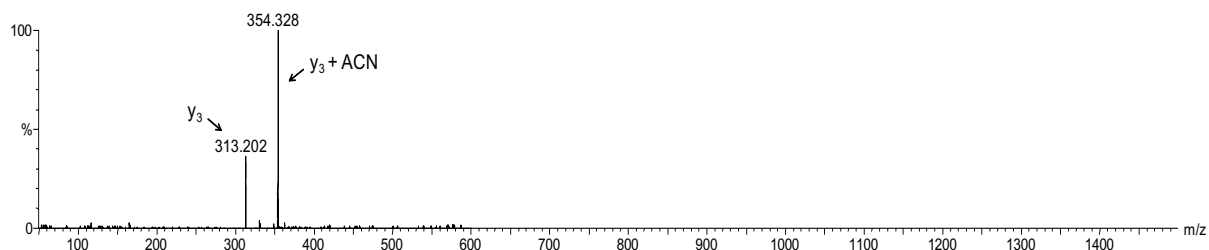


Figure 3.56: Espectros de ESI(+)-MS após o contato do íon y_3 da Colecistoquinina com ACN no Q2.

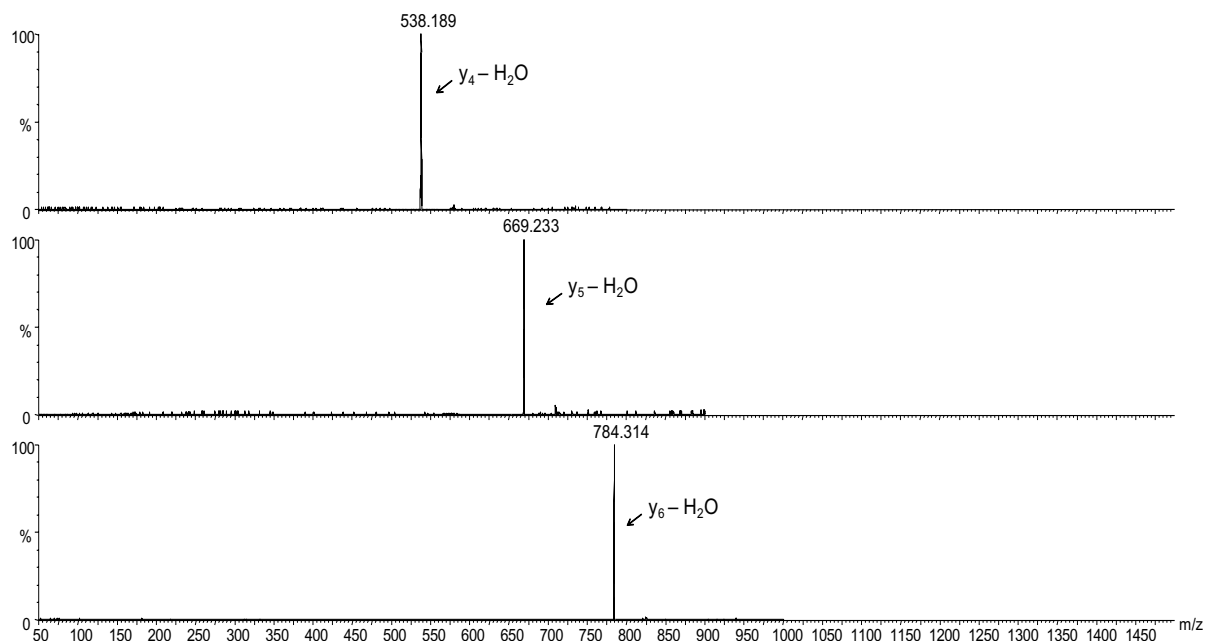


Figure 3.57: Espectros de ESI(+)-MS após o contato dos íons $y - H_2O$ da Colecistoquinina com ACN no Q2.

O espectro de massas *full scan* de ESI(+)-MS para o peptídeo Neurotensina (Figura 3.58 a) apresentou majoritariamente os íons referentes ao peptídeo monoprotonado $[M+H]^+$ de m/z 817 e diprotonado $[M+2H]^{2+}$ de m/z 409. Os íons referentes à molécula fragmentada, como os íons a, b e y, estavam com uma intensidade muito pequena, mesmo utilizando um cone extremamente alto e alta energia no nanocapilar, portanto, não foi possível isolar estes íons e reagi-los.

O experimento de ESI(+)-MS/MS foi realizado para o íon molecular da Neurotensina (Figura 3.58 b) para investigar a estabilidade do íon, e verificar se o íon também não fragmentava mesmo após a colisão com o gás Ar. O espectro resultante apresentou poucos íons fragmentos com intensidade baixa.

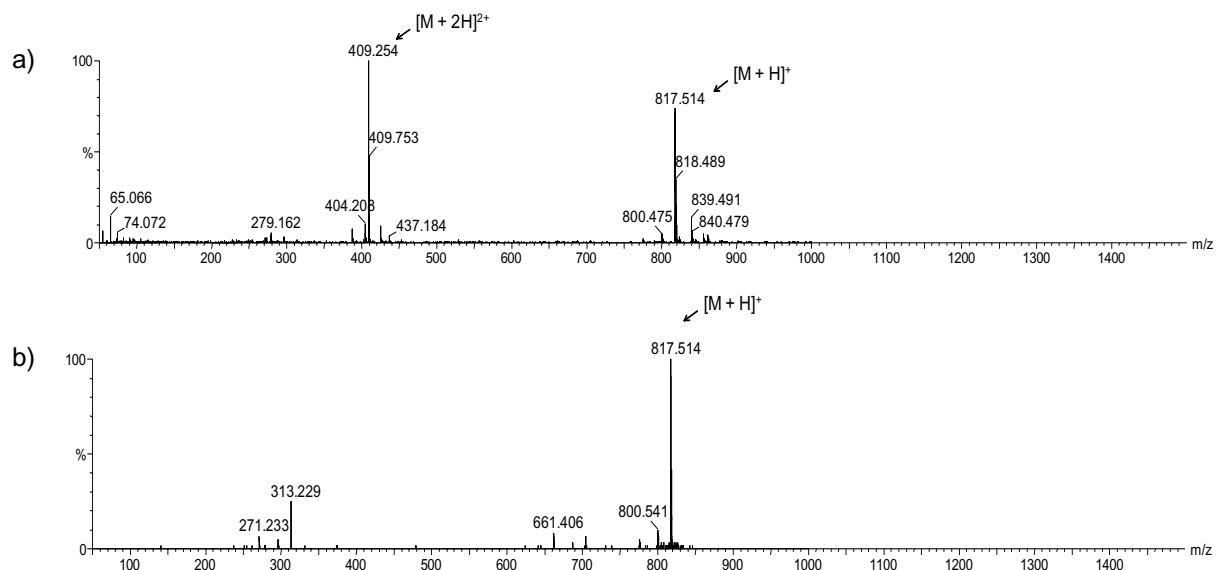


Figura 3.58: Espectro de Massas a) ESI(+)-MS e b) ESI(+)-MS/MS da Neurotensina.

Abaixo segue uma tabela com os peptídeos estudados, os íons que reagiram ou não quando em contato com acetonitrila (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Sumário das reações dos diferentes peptídeos com ACN.

Peptídeo	Íon que Reagiu com 2 moléculas de ACN	Íon que reagiu com 1 molécula de ACN	Íon que não reagiu
Angiotensina II (DRVYIHPF)	b_1	$b_2\text{-NH}_3$, b_2 , b_3^* , $b_3\text{-NH}_3^*$ y_1 , y_2 , y_3^*	$[M+2H]^{2+}$ y_4 , y_5 , y_6 , y_7 , y_8 , b_4 , $b_4\text{-NH}_3$, b_5 , b_6
[D-Ala2, D-Leu5]-Encefalina (YaGFL)	y_1	b_1 , b_2 , b_3 , b_4^* y_2 , y_3 , y_4^* a_1 , a_2 , a_3 , a_4^*	$[M+H]^+$
Substância P (RPKPQQFFGLM-NH ₂)	-	$y_1\text{-H}_2\text{O}$, $y_2\text{-H}_2\text{O}$, $y_3\text{-H}_2\text{O}^*$	$y_4\text{-H}_2\text{O}$, $y_5\text{-H}_2\text{O}$, $y_6\text{-H}_2\text{O}$, $y_7\text{-H}_2\text{O}$, $y_8\text{-H}_2\text{O}$, $y_9\text{-H}_2\text{O}$, $y_{10}\text{-H}_2\text{O}$ $b_5\text{-NH}_3$, $b_6\text{-NH}_3$
Neurotensina (RRPYIL)	-	-	-
Bradiquinina (RPPGFSPFR)	-	a_1 , $a_1\text{-NH}_3$, a_2 , $a_2\text{-NH}_3$, a_3^* , $a_3\text{-NH}_3^*$ b_1 , $b_1\text{-NH}_3$, b_2 , $b_2\text{-NH}_3$, b_3 , b_4^* , $b_4\text{-NH}_3^*$ y_1 , $y_1\text{-NH}_3$, y_2 , $y_2\text{-NH}_3$, y_3^* , $y_3\text{-NH}_3^*$	$[M+2H]^{2+}$ a_4 , a_5 , a_6 , a_8 b_5 , b_6 , b_8 y_4 , $y_4\text{-NH}_3$, y_6 , y_7 , y_8
Colecistoquinina (YMGWMDNF-NH ₂)	-	b_2 , b_3 y_3 , $a_3\text{-H}_2\text{O}$	$y_4\text{-H}_2\text{O}$, $y_5\text{-H}_2\text{O}$, $y_6\text{-H}_2\text{O}$

*produto de reação pouco intenso.

Um gráfico relacionando intensidade do íon do produto esperado após a reação versus o valor de m/z do íon foi plotado para os peptídeos Bradiquinina, Angiotensina II e Encefalina (Gráfico 3.1 - 3.3), uma vez que estes peptídeos foram os que apresentaram um maior número de íons a, b e y nos espectros de massas de *full scan*.

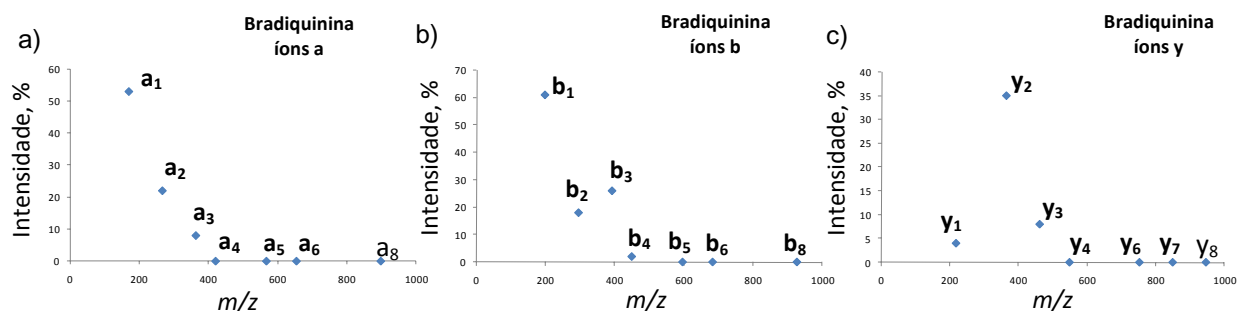


Gráfico 3.1: Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Bradiquinina com ACN.

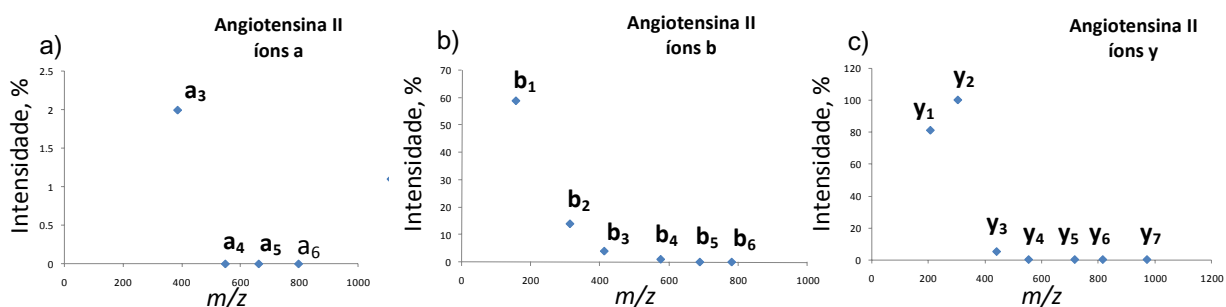


Gráfico 3.2: Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Angiotensina II com ACN.

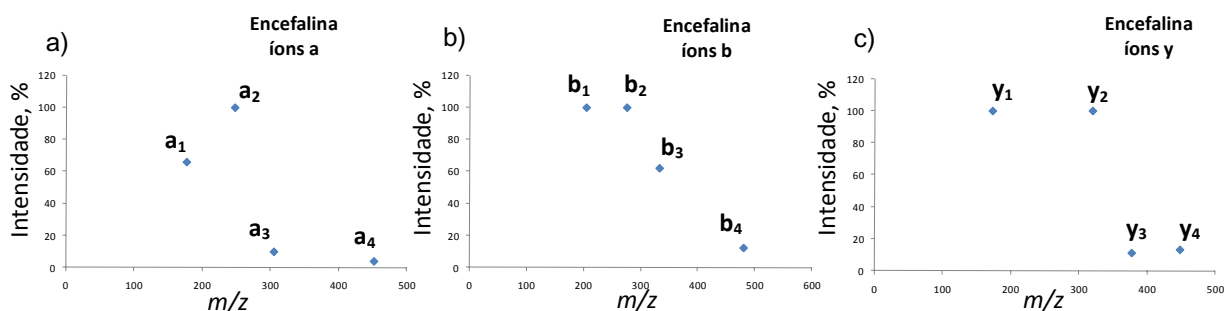


Gráfico 3.3: Gráfico da intensidade versus m/z dos a) íons a, b) íons b e c) íons y após a reação da Encefalina com ACN.

Os gráficos abaixo (Gráfico 3.4) referem-se à intensidade dos íons (a, b e y) versus o m/z dos produtos formados após a reação dos íons a, b e y para cada peptídeo (Bradiquinina, Angiotensina II e Encefalina) e ACN. No caso da Angiotensina II, apenas os íons b e y foram selecionados para reação, pois este foi o primeiro peptídeo testado e a idéia inicial era estudar apenas os íons b e y. No entanto, após os experimentos iniciais, decidiu-se ampliar a classe dos íons estudada para íons a, b e y.

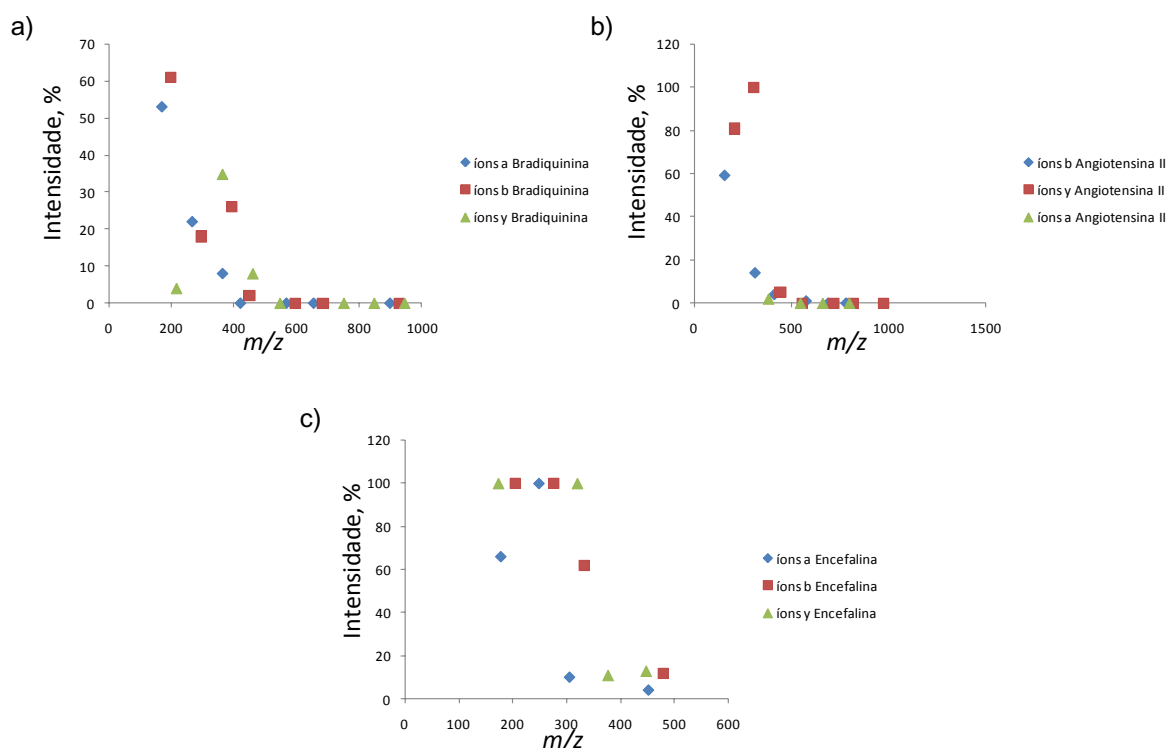


Gráfico 3.4: Gráfico da intensidade versus m/z dos íons a, b e y após a reação dos peptídeos a) Bradiquinina, b) Angiotensina II e c) Encefalina com ACN.

Como resultado, todos os peptídeos testados apresentaram o mesmo caráter reacional relatado anteriormente para a Angiotensina II, o que corroborou com a hipótese anterior, em que os íons menores reagem devido à carga reacional estar mais exposta enquanto que os íons maiores devem possuir estruturas enoveladas, por resultar em uma maior estabilidade, protegendo, portanto, a carga e dificultando a

reação. A tabela 3.2 mostra os íons selecionados de cada peptídeo e o respectivo m/z , e a intensidade do produto formado (íon + ACN) e o respectivo m/z .

Tabela 3.2: Íon fragmento selecionado e a intensidade do íon produto de reação com ACN.

Peptídeos	Íon fragmento selecionado	m/z	m/z (íon + ACN)	Intensidade (%)
Colecistokinina (YMGWMDF-NH ₂)	a ₃ -H ₂ O	349	390	3
	b ₂	263	303	5
	b ₃	393	434	5
	y ₃	313	354	100
	y ₄ -H ₂ O	538	579	3
	y ₅ -H ₂ O	669	710	0
	y ₆ -H ₂ O	784	825	0
Substância P (RPKPQQFFGLM-NH ₂)	b ₅ -NH ₃	579	620	0
	b ₆ -NH ₃	707	748	0
	y ₁ -H ₂ O	157	198	55
	y ₂ -H ₂ O	254	295	10
	y ₃ -H ₂ O	382	423	0
	y ₄ -H ₂ O	479	520	0
	y ₅ -H ₂ O	607	648	0
	y ₆ -H ₂ O	735	776	0
	y ₇ -H ₂ O	882	923	0
	y ₈ -H ₂ O	1029	1070	0
	y ₉ -H ₂ O	1086	1127	0
	y ₁₀ -H ₂ O	1199	1240	0
Encefalina (YaGFL)	a ₁	136	177	66
	a ₂	207	248	100
	a ₃	264	305	10
	a ₄	411	452	4
	b ₁	164	205	100
	b ₂	235	276	100
	b ₃	292	333	62
	b ₄	439	480	12
	y ₁	132	173	100
	y ₂	279	320	100
	y ₃	336	377	11
	y ₄	407	448	13

Continuação Tabela 3.2: Íon fragmento selecionado e a intensidade do íon produto de reação.

Bradiquinina (RPPGFSPFR)	a ₁	129	170	53
	a ₂	226	267	22
	a ₃	323	364	8
	a ₄	380	421	0
	a ₅	527	568	0
	a ₆	614	655	0
	a ₈	858	899	0
	b ₁	157	198	61
	b ₂	254	295	18
	b ₃	351	392	26
	b ₄	408	449	2
	b ₅	555	596	0
	b ₆	642	683	0
	b ₈	886	927	0
	y ₁	175	216	4
	y ₂	322	363	35
	y ₃	419	460	8
	y ₄	506	547	0
	y ₆	710	751	0
	y ₇	807	848	0
	y ₈	904	945	0
Angiotensina II (DRVYIHPF)	a ₃	343	384	2
	a ₄	506	547	0
	a ₅	620	661	0
	a ₆	756	797	0
	b ₁	116	157	59
	b ₂	272	313	14
	b ₃	371	412	4
	b ₄	534	575	1
	b ₅	647	688	0
	b ₆	739	780	0
	y ₁	166	207	81
	y ₂	263	304	100
	y ₃	400	441	5
	y ₄	513	554	0
	y ₅	676	717	0
	y ₆	775	816	0
	y ₇	931	972	0

3.2.4. Experimentos de mobilidade dos íons fragmentos a, b e y de peptídeos utilizando o equipamento Synapt HDMS:

Inicialmente, realizou-se o experimento de infusão direta do peptídeo Angiotensina II no espectrômetro de massas *Synapt* e obteve-se o respectivo espectro de ESI(+)-MS com alta resolução, uma vez que o detector utilizado foi TOF. Este experimento foi realizado para outros dois peptídeos Bradiquinina e Encefalina, uma vez que experimentos anteriores mostraram que estes peptídeos fragmentam e geram quase todos os íons a, b e y, sendo, portanto, padrões ideais para o estudo. Portanto, estes três peptídeos padrões foram utilizados nos experimentos de mobilidade dos íons fragmentos.

O espectrômetro de massas *Synapt* é capaz de separar íons com diferentes formas e o *software* gera um gráfico, denominado *DriftScope*, o qual correlaciona o tempo que o íon demorou para atravessar a cela de mobilidade (*drift time*) e a razão massa/carga do íon (Gráfico 3.5). Pode-se observar que quanto maior o íon (m/z) maior o tempo que o mesmo leva para atravessar a cela, ou seja, maior o *drift time*. Outra informação obtida pelos gráficos abaixo é que temos em todos os casos dois diferentes grupos de íons, os quais correspondem aos íons duplamente carregados, linha de tendência a esquerda, e mono carregados, localizados a direita do gráfico. Com este experimento podemos então selecionar os íons de interesse, como os íons monocarregados, por exemplo, e ter um espectro mais simplificado e mais seletivo. Esta é uma grande vantagem da técnica, na qual é possível obter espectros com maior informação estrutural e com menos interferentes.

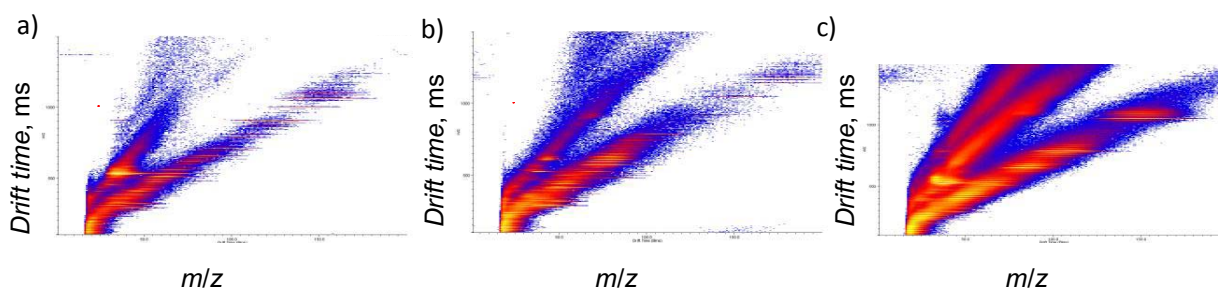


Gráfico 3.5: Gráfico “*DriftScope*”: drift time x m/z dos íons detectados para Il a) Encefalina, b) Bradiquinina e c) Angiotensina II.

É possível também detectar a corrente de íons totais (TIC) de todos os íons detectados (Figura 3.59) e de cada íon individualmente e conseqüentemente determinar o tempo que cada íon levou para atravessar a cela *tri-wave*.

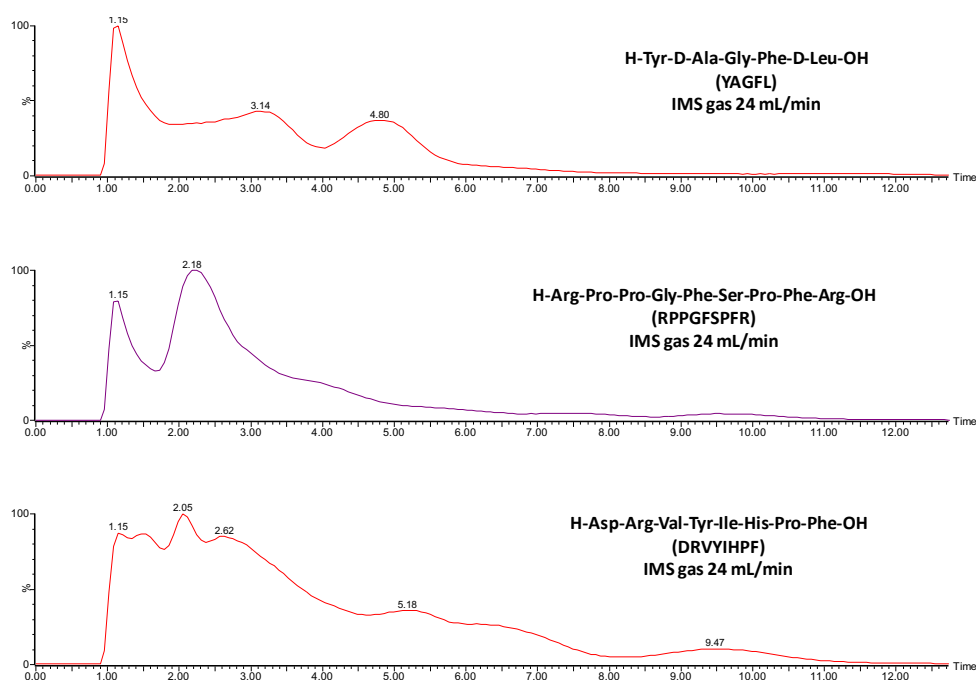


Figura 3.59: Corrente dos íons totais (TIC) da Encefalina, Bradiquinina e Angiotensina II, respectivamente, correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms).

O TIC foi obtido para cada íon separadamente e foram sobrepostos. A Figura 3.60 mostra o TIC de cada íon b, y e a, respectivamente, obtido para Angiotensina II.

Este mesmo procedimento foi realizado para os demais peptídeos, Bradiquinina e Encefalina (Figura 3.61 e 3.62, respectivamente).

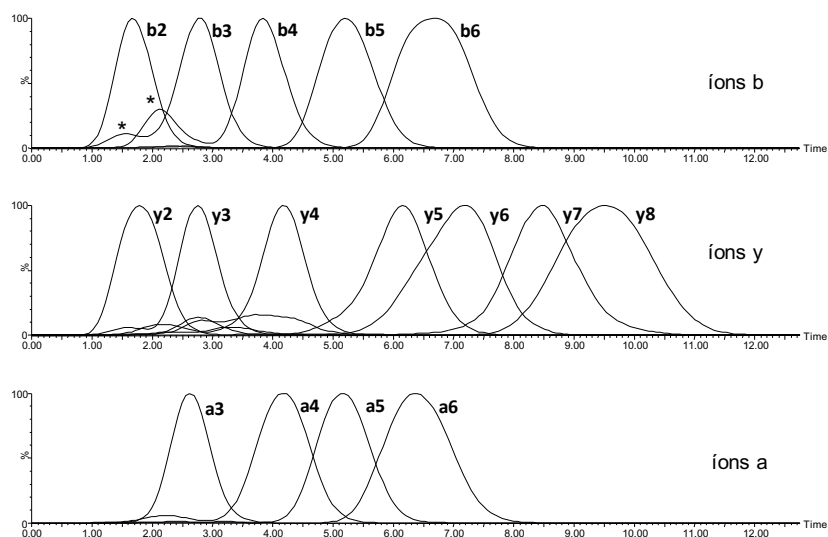


Figura 3.60: Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Angiotensina II.

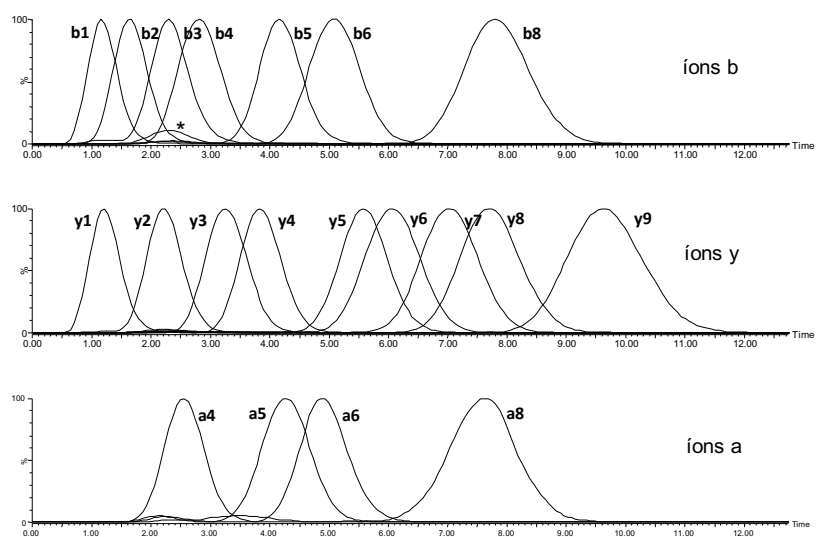


Figura 3.61: Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de residência na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Bradiquinina.

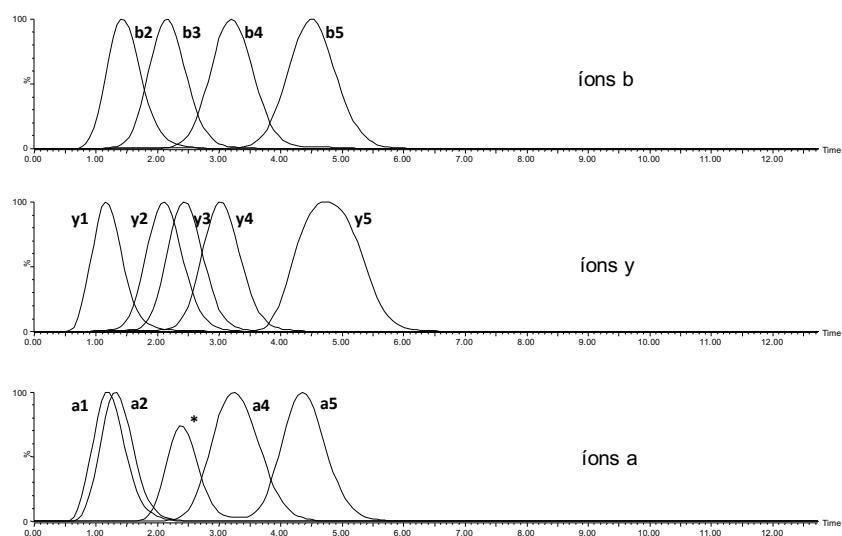


Figura 3.62: Corrente dos íons totais (TIC), correlacionando intensidade (%) e tempo de exposição na cela (ms), dos íons fragmentos b, y e a da Encefalina.

Alguns íons dos diferentes peptídeos, como, por exemplo, o a_5 da Encefalina, apresentou dois picos (Figura 3.63). Como este equipamento tem a particularidade de separar isômeros estruturais na cela de *drift time*, devido a diferentes interações dos mesmos com o gás presente dentro da cela e do campo elétrico formado por placas do *tri wave*, no primeiro momento, sugeriu-se que o íon (a_5) possuía um isômero e por isso dois picos haviam sido detectados. Então para comprovar tal hipótese, selecionou-se no primeiro quadrupolo o m/z referente ao íon, e aumentou-se a pressão do gás no *transfer* para fragmentar o íon selecionado (o sistema interno do equipamento está ilustrado na Figura 3.64), e com isso ter experimento de MS/MS de cada pico separadamente (Figura 3.65). Como resultado, dois picos foram identificados, porém não se tratavam da mesma molécula, uma vez que apresentaram fragmentos distintos, sendo o pico detectado em 2,37 ms referente a uma molécula duplamente carregada enquanto que o pico em 4,35 refere-se a uma molécula monocarregada.

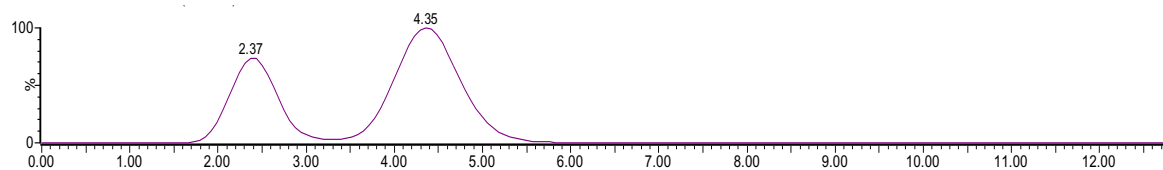


Figura 3.63: Corrente dos íons totais (TIC) do íon fragmento a_5 da Encefalina.

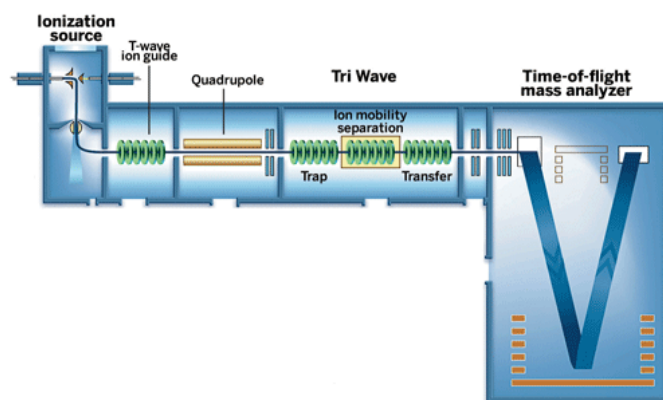
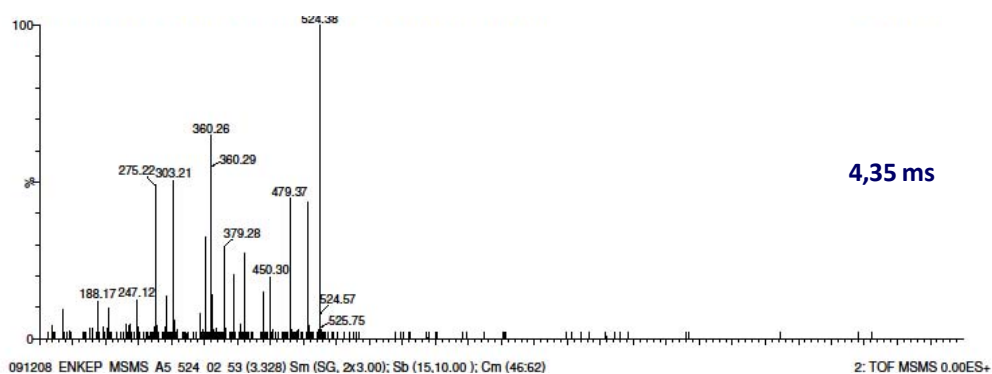


Figura 3.64: Sistema interno do equipamento *Synapt HDMS*, com a presença da cela de *Tri Wave*.

a)



b)

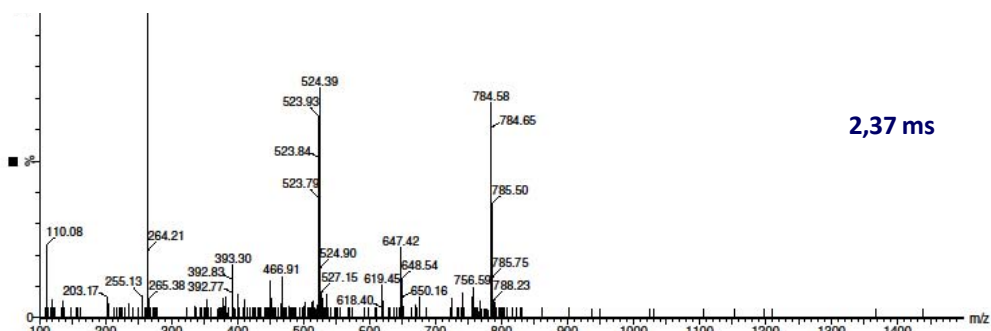


Figura 3.65: Espectro de Massas ESI(+)-MS/MS do íon presente no pico com tempo de retenção a) 4,35 e b) 2,37 ms, respectivamente.

Concluiu-se também a partir do padrão de fragmentação que um pico era correspondente a molécula esperada e o outro pico, com menor *drift time*, correspondia a uma molécula duplamente carregada.

Gráficos correlacionando o *drift time* e a razão massa carga do íon foram plotados para todos os íons do peptídeo Angiotensina II. O resultado observado foi o mesmo em todos os casos, e o gráfico 3.6 está ilustrando o resultado apresentado para o íon a da Angiotensina II. Inicialmente, determinou-se o R^2 para uma tendência linear entre o *drift time* e o m/z , e em seguida determinou-se para uma tendência logarítmica para os dados. Se a correlação for linear, indicará que os íons são lineares, pois não houve alteração com o tempo que os íons demoram a atravessar a cela com o seu tamanho. No entanto, se a correlação for logarítmica é um indício que os íons começam a se enovelar conforme aumentam de tamanho, e por isso demoram menos tempo para atravessar a cela de colisão, uma vez que tem menos interação com o gás.

Ambos os valores foram próximos a 1,00, não podendo concluir, portanto, se o *drift time* está relacionado linear ou logaritmicamente com o m/z do íon.

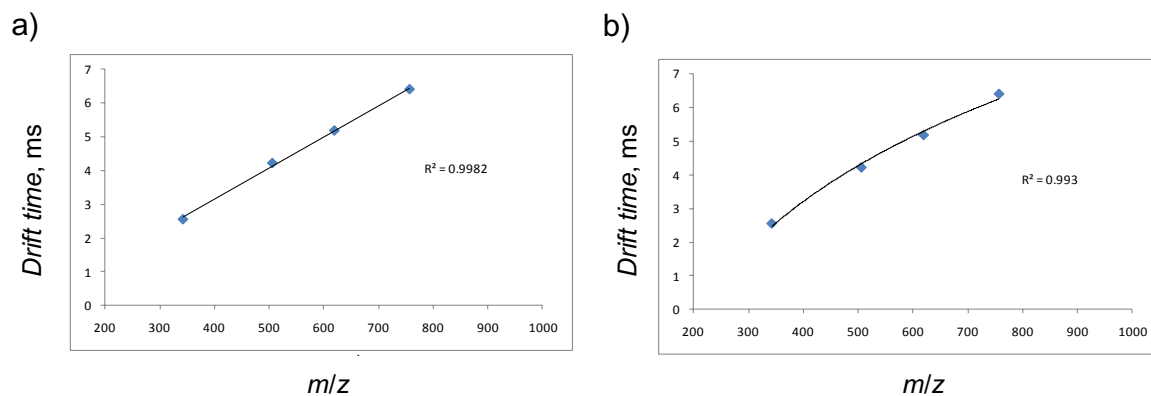


Gráfico 3.6. Correlação a) linear e b) exponencial de *drift time* versus m/z dos íons a da Angiotensina II.

O gráfico 3.7 representa uma simulação realizada, levando em consideração um peptídeo maior, então seria possível verificar a tendência dos íons analisados.

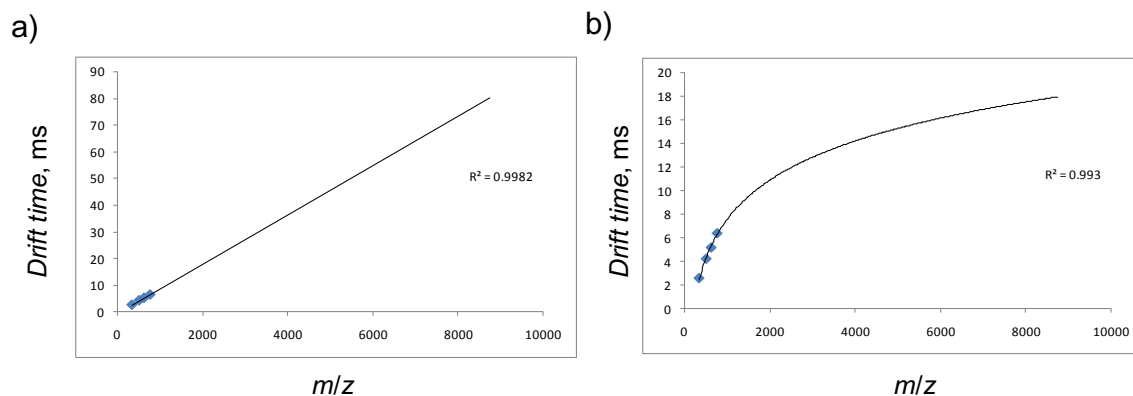


Gráfico 3.7. Correlação a) linear e b) exponencial de *drift time* versus *m/z* dos íons a da Angiotensina II extrapolando para valores altos de *m/z*.

Por fim, um gráfico relacionado às duas retas de tendências, linear e logarítmica, com os dados obtidos (Gráfico 3.8) e com os dados simulados representa claramente que se os peptídeos analisados tivesse uma sequência de AA's maior e apresentasse maiores íons a, b e y, poderia-se obter maiores informações sobre as estruturas destes íons a partir de experimentos de mobilidade iônica.

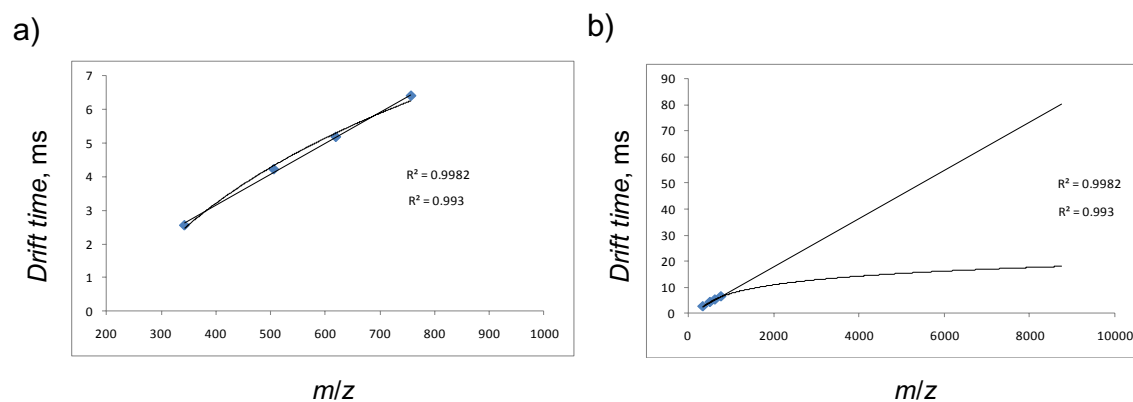


Gráfico 3.8. Correlação linear e exponencial de *drift time* versus *m/z* dos íons a da Angiotensina II para os dados a) experimental e b) simulado.

Outro experimento foi então calcular o valor teórico das possíveis formas estruturais, tanto a forma linear quanto a enovelada, de cada íon (Figura 3.66). Primeiramente, otimizou-se cada estrutura utilizando o programa *Gaussian*¹⁷ com a base *PM3*. A partir das estruturas otimizadas, calculou-se o valor das seções de

choque de cada íon com as duas conformações utilizando o programa *MobCal*^{18,19}, desenvolvido pelo grupo do prof. Dr. Jarrold na “*Indiana University*”.

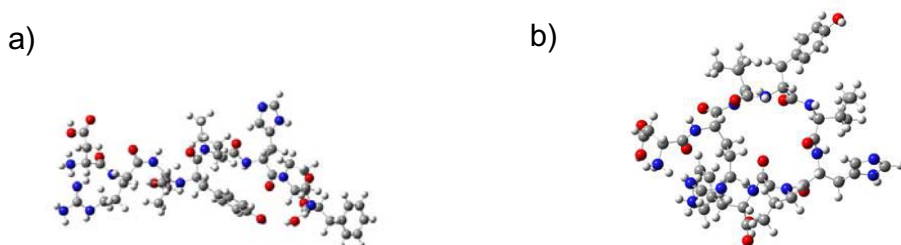


Figura 3.66: Estrutura a) linear e b) enovelada simulada para o mesmo íon a partir do programa Gaussian.

Os valores teóricos encontrados para os íons na forma enovelada e linear foram muito próximos e não apresentaram uma correlação direta com os dados experimentais (Gráfico 3.9), portanto, não foram conclusivos. Conforme discutido anteriormente, talvez tal resposta fosse obtida na análise de íons provenientes de peptídeos maiores.

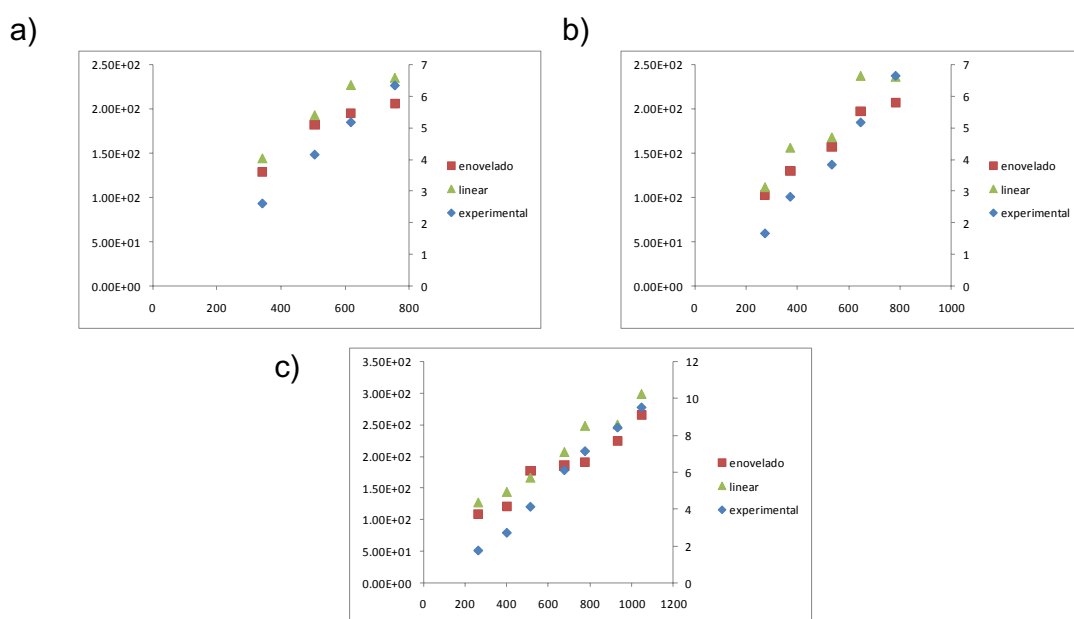


Gráfico 3.9. Mobilidades teóricas para estrutura linear (verde) e enovelada (vermelho) e *drift time* experimental (azul) obtido para os a) íons a, b) íons b e c) íons y da Angiotensina II.

4. CAPÍTULO 2:

BUSCA DE NOVOS BIOMARCADORES EM CLÍNICA MÉDICA POR IMAGEAMENTO QUÍMIO-SELETIVO DE TECIDOS

4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

4.1.1. Materiais e Métodos:

4.1.1.1. Aquisição do material:

Amostras de tecidos pancreáticos (normais, tumores e com pancreatite) removidas de pacientes foram fornecidas pelo Dr. Nipun Merchant, do Departamento Cirúrgico Oncológico (*Surgical Oncology Department*), na *Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA*. Água, acetonitrila, etanol e metanol grau analítico *HPLC* foram obtidos da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Hampton, NH, USA). Ácido sinapínico e ácido trifluoroacético foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). O meio de congelamento de tecido foi obtido do Triangle Biomedical Sciences, Inc. (Durham, NC, USA). Outros reagentes utilizados estão mencionados a seguir na parte experimental específica.

4.1.1.2. Métodos Instrumentais:

- Equipamentos utilizados na aplicação de matriz:

Para a realização de experimentos de MALDI-MS, primeiramente, uma matriz é aplicada na superfície a ser analisada, neste caso, o tecido humano. Para os experimentos de perfil proteico, utilizou-se um equipamento de aplicação de matriz, com alta precisão, desenvolvido e fabricado pelo próprio grupo do prof. Richard M. Caprioli e, portanto, não é disponível comercialmente.

No entanto, para experimentos de imagem, os equipamentos utilizados foram: *Portrait 630 acoustic reagent multispotter* (Labcyte Inc., Sunnyvale, CA) e um sistema não comercial de *spraycoating*, que basicamente consiste em um borrifador de solução.

- Espectrômetro de Massas, UV e HPLC:

Os experimentos MALDI-MS e MALDI-MS/MS, na busca de biomarcadores proteicos por perfil químico e imagem, foram realizados utilizando-se MALDI-TOF (*Bruker Autoflex II Linear; Bruker Daltonik, Bremen, Germany*), e MALDI-TOF/TOF (*Bruker UltrafleXtreme; Bruker Daltonik, Bremen, Germany*), respectivamente.

Para os experimentos de identificação proteica, o tecido foi homogeneizado e a concentração de proteínas presentes na solução foi determinada a partir do espectrofotômetro *Plate Reader SpectraMax M2e*. A solução foi diluída para uma concentração ideal para injeção na coluna de HPLC e separada em frações, a partir de um sistema de HPLC (*Waters 2690 Alliance*). Algumas frações foram analisadas por MALDI-TOF para verificar se apresentavam os íons de interesse. Algumas frações foram selecionadas e submetidas a experimentos clássicos de gel 1D. Então realizou-se uma digestão triptica, utilizando tripsina, e logo após, a solução peptídica formada foi analisada por LC-MS/MS.

As análises por LC-MS/MS dos peptídeos resultantes da digestão enzimática foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com íon-trap com um sistema de descoberta de PTM (modificações pós traducionais) da Bruker Daltonics Inc., o HCT ultra, equipado com um auto injetor de amostras FAMOS™ modelo 920 (LC Packings-A DIONEX Company; Sunnyvale, CA) e uma bomba de HPLC binária Hewlett-Packard Série 1100 (Agilent Technologies, Inc.; Santa Clara CA).

4.1.2. Experimentos de imageamento químico-seletivo de tecido por MALDI-TOF:

- Preparação do tecido:

As amostras de tecidos pancreáticos removidas de pacientes foram congeladas a -80°C. Os tecidos foram cortados em seções de 12 µm de espessura em um criostato

a -20°C (*Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL*), e as seções foram transferidas em placas de MALDI de aço inoxidável revestidas de ouro (Figura 4.1).

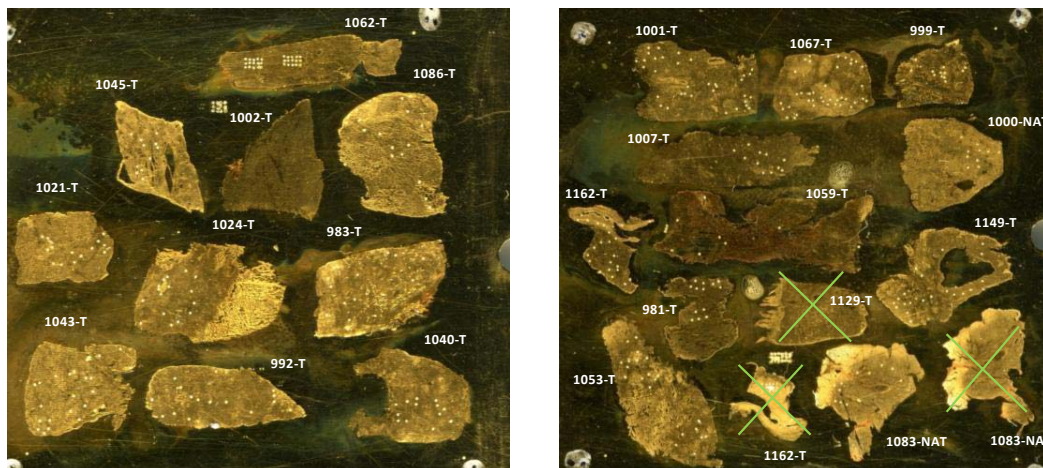


Figura 4.1: Placas de MALDI com seções de tecidos de vários pacientes.

As placas de MALDI foram colocadas em um dessecador a vácuo por 30 minutos para permitir que o tecido secasse e equilibrasse com a temperatura ambiente. A fixação do tecido e a remoção de sais e outros contaminantes foi realizada a partir de uma série de etapas de lavagem com etanol/água, as quais consistem na submersão das seções de tecidos em soluções de etanol (70/90/95%) por 30 s. As seções de tecidos foram então secadas e armazenadas em um dessecador à vácuo até a aplicação da matriz, que foi ácido sinapínico (SA) preparado em 50:50 acetonitrila:0.1% ácido trifluoroacético em água. Este procedimento de preparação de amostra remove espécies interferentes, como sais e fosfolipídeos, que podem promover a formação de adutos, supressão iônica e uma cristalização ineficaz da matriz.

A figura 4.2 ilustra o procedimento desde o seccionamento do tecido, deposição na placa de MALDI e lavagem da mesma para remoção de interferentes.

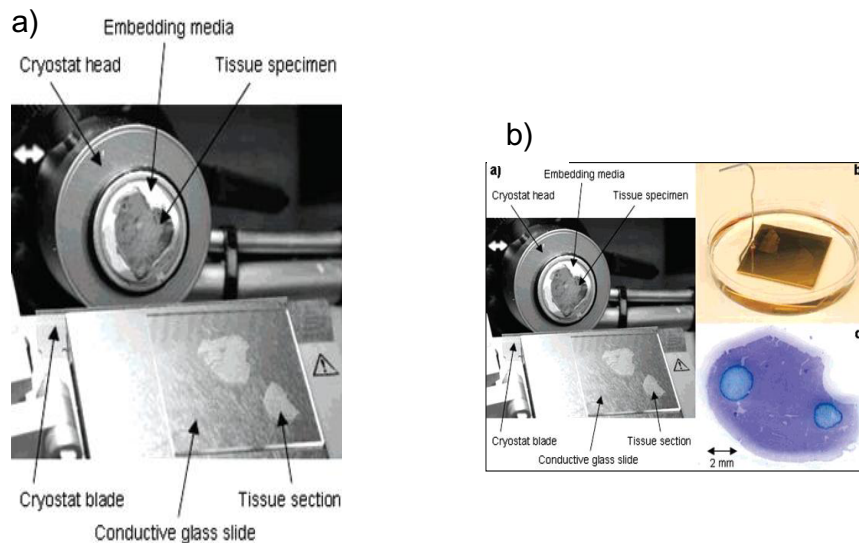


Figura 4.2: a) Secção do tecido no criostato e deposição na placa de MALDI; b) Lavagem da placa de MALDI com etanol.

- Perfil proteico direcionado pela histologia e análises por MALDI-TOF:

Para análise de perfil proteico, a matriz foi aplicada precisamente nas áreas distintas das secções do tecido via um analisador robótico de ejeção de gotículas automatizado (*LabCyte, Inc, Sunnyvale, CA*).

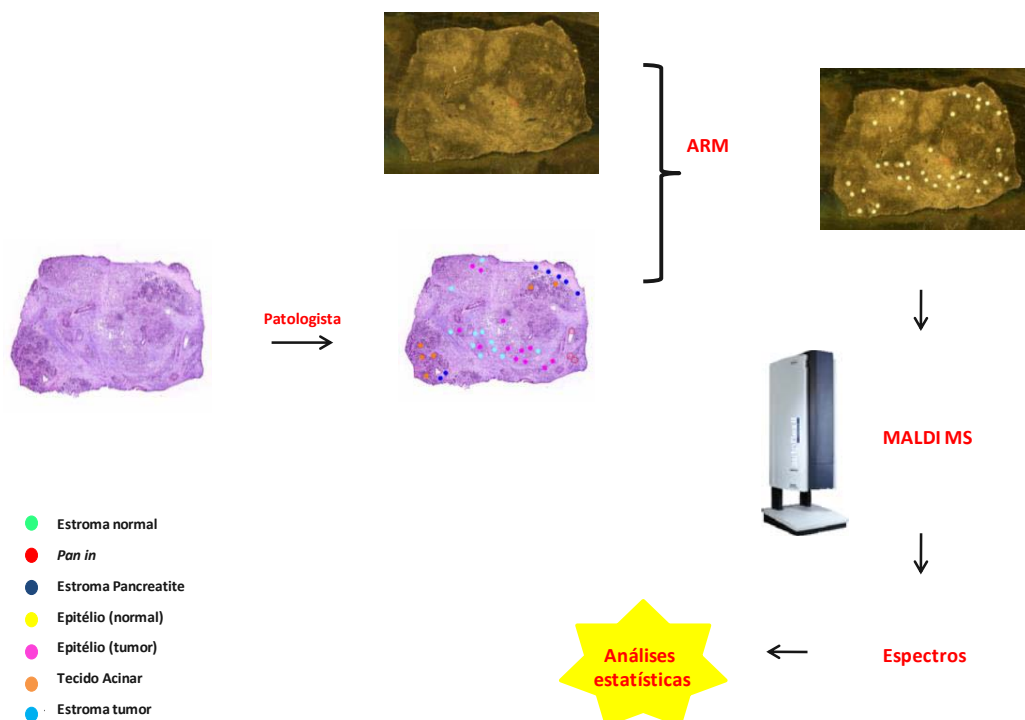
Duas secções em série foram obtidas a partir de cada secção de tecido, uma para análise por MALDI, e uma para análise histológica. Um patologista (*Dr, Bill Chopp, da Vanderbilt University*) examinou as figuras eletrônicas de secções (*H&E staining*) e identificou as áreas dentro do tecido para análises por MALDI. O patologista marcou as seguintes regiões: estroma normal, estroma tumoral, estroma pancreatite, epitélio normal, epitélio tumoral, ascinar e *pan in*. As figuras eletrônicas foram marcadas com círculos (200 um diâmetro) sobre as áreas altamente enriquecidas em células de interesse (tipicamente > 80%). As figuras marcadas de todas as secções do tecido foram importadas por um *software* de processamento de imagem e sobrepostas a uma figura eletrônica da placa inteira do MALDI. Cada figura H&E foi alinhada com sua correspondente secção de tecido do MALDI, e as coordenadas x,y foram obtidas para

cada círculo marcado. Estas coordenadas foram transferidas para o sistema de coordenada de um analisador robótico. Nanogotas da matriz foram, então, automaticamente aplicadas às coordenadas precisas x,y para cada círculo marcado, resultando em *spots* de matriz que são ~200 µm de diâmetro.

Espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro de massas MALDI-TOF (*Autoflex, Bruker Daltonics, Germany*), equipado com um *SmartBeam Nd:YAG laser* (355 nm). Espectros foram adquiridos em um modo positivo linear com tempo de atraso de 350 ns. Coordenadas para cada *spot* foram importadas para o espectrômetro de massas. Uma calibração externa linear foi realizada anteriormente à aquisição dos dados utilizando uma mistura proteica de Insulina ($[M + H]^+$ 5.734), citocromo C ($[M + H]^+$ 12.361), mioglobina ($[M + H]^+$ 16.952) e tripsinogena ($[M + H]^+$ 23,982).

Espectros foram obtidos a partir de cada *spot* (geralmente uma soma de 400 pulsos de *laser* em 50 pulso/passo) via uma corrida de aquisição automatizada, onde o *laser* passa através de cada *spot* para irradiar múltiplos cristais através da superfície. Picos individuais no espectro primeiramente representam espécies de proteínas endógenas que são extraídas pela combinação matriz/solvente e desorvidas e ionizadas pelo *laser*. Portanto, perfis proteômicos únicos foram adquiridos, o que representa um subconjunto de proteínas ativas presentes em diferentes regiões do tecido.

O esquema abaixo (Esquema 4.1) mostra as etapas relacionadas a um experimento de perfil proteico direcionado pela histologia.



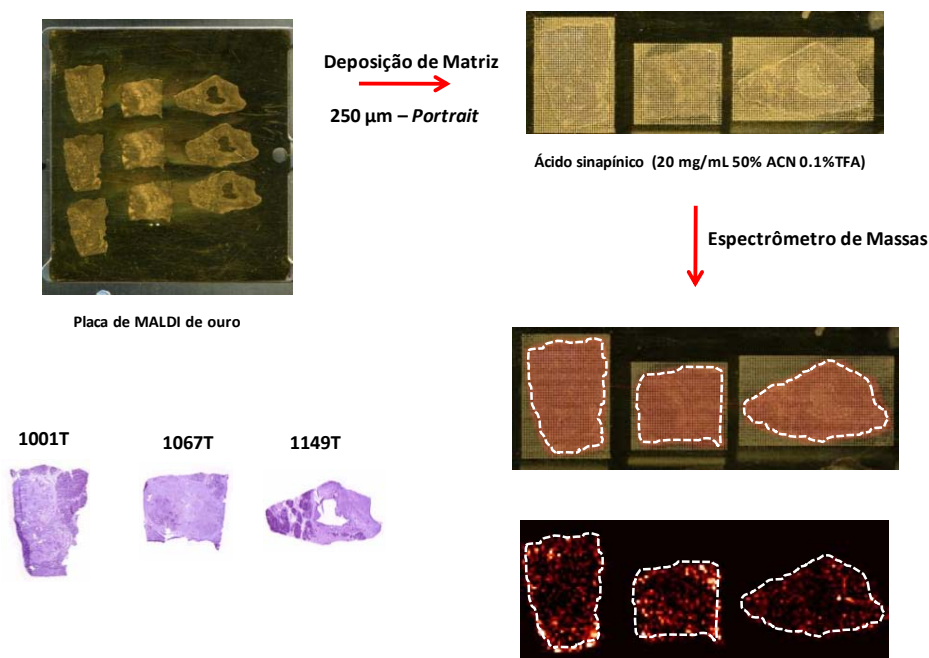
Esquema 4.1: Esquema geral de um procedimento experimental de análise de perfil proteico direcionada pela histologia.

- Pré-processamento de espectros:

Uma vez que todos os espectros foram adquiridos, eles foram manualmente inspecionados para garantir a alta qualidade do dado. *Outliers* (espectro não detectando um mínimo de exigência de relação sinal/ruído e/ou mínimo de número de picos) foram eliminados. Os espectros remanescentes foram processados (subtração da linha de base, ruído, normalização da corrente de íons totais, calibração de massa e alinhamento) utilizando dois pacotes diferentes de *softwares* estatísticos, sendo o primeiro o *ProTS Data* (*Biodesix, Steamboat Springs, CO*) e o outro o *ClinProTools* (*Bruker Daltonik, Bremen, Germany*). Ambas as análises utilizavam SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Todos os espectros correspondendo a um tipo de célula único para um paciente foram, então, somados para análise final. Espectros característicos (picos) foram divididos, os quais foram submetidos a vários algoritmos para descobrir classificadores com significado estatístico.

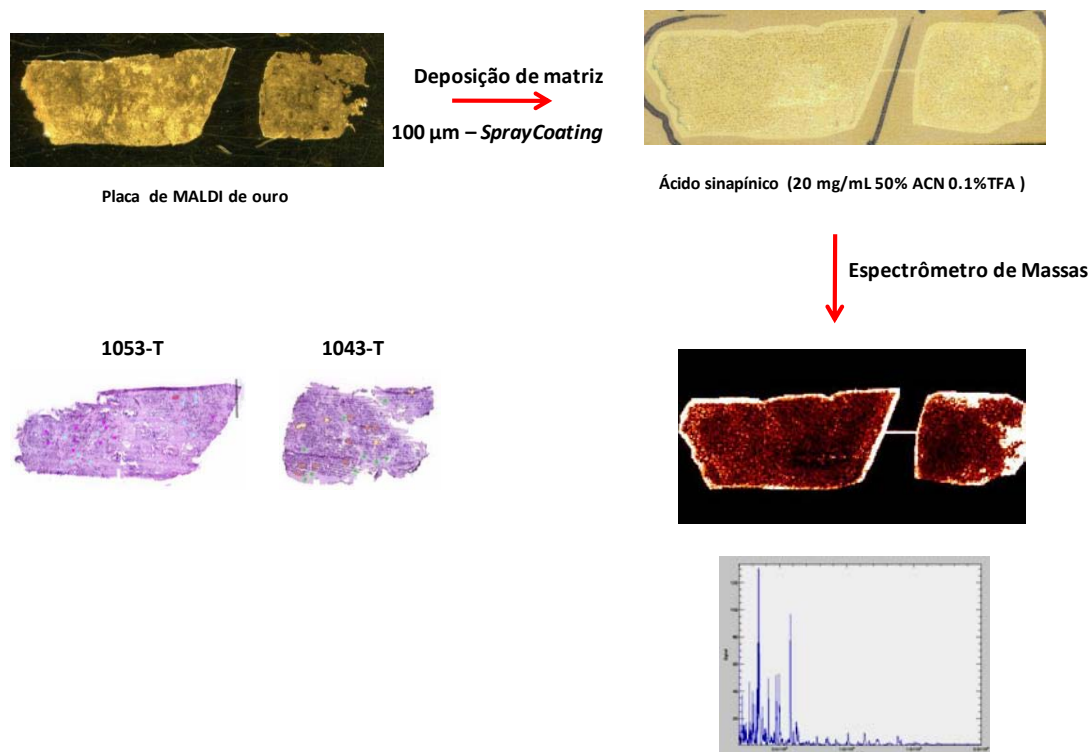
- MALDI IMS e análise por MALDI-TOF:

Para a aquisição de imagens do tecido completo foi realizado a deposição automatizada de matriz utilizando o equipamento *Portrait 630 acoustic reagent multispotter* (Labcyte Inc., Sunnyvale, CA) (Esquema 4.2). O método otimizado foi 40 passagens de 1 *spot* (170 pL) por vez de ácido sinapínico a 20 mg/mL em 50%ACN/0.1%TFA, aplicando a uma distância de 250 μm entre cada *spot*.



Esquema 4.2: Experimento de MALDI *imaging*, utilizando Portrait para aplicação da matriz.

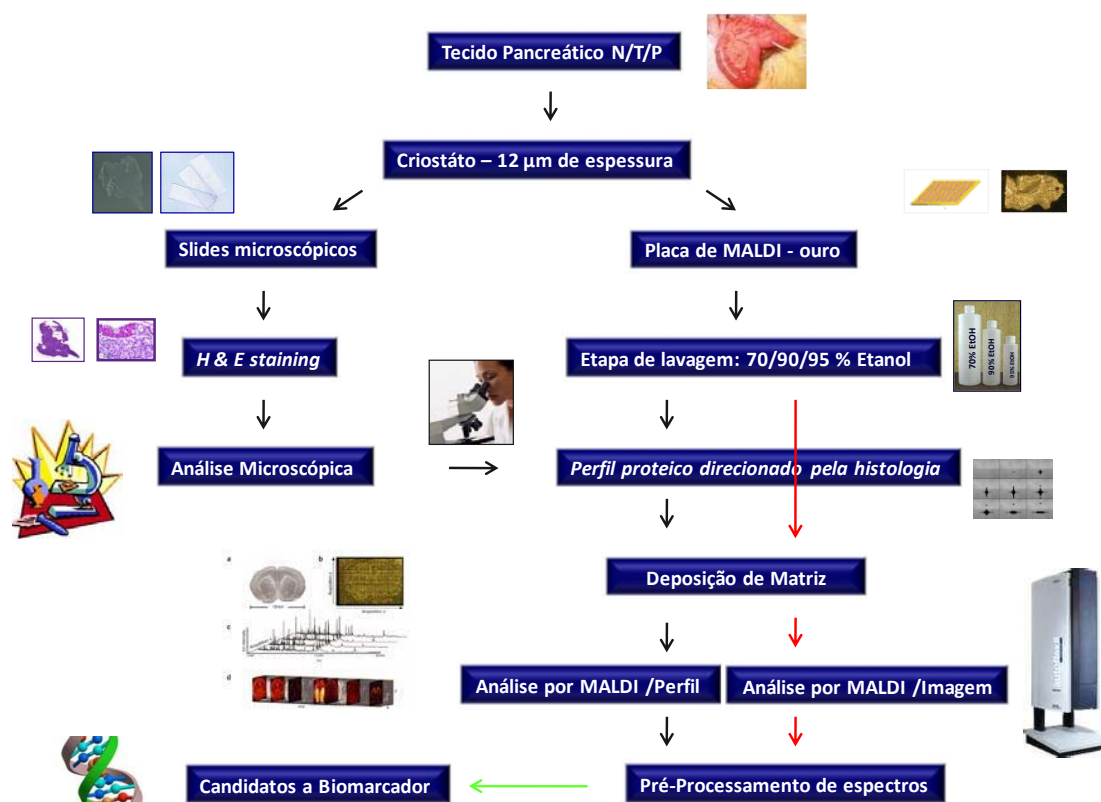
As imagens de alta-resolução lateral foram realizadas utilizando o sistema manual de “*spraycoating*” para a aplicação da matriz (Esquema 4.3), que foi a mesma supracitada na concentração e solvente. Para cada placa de MALDI foram aplicados 10 mL de matriz.



Esquema 4.3: Experimento de MALDI *imaging* de alta resolução, utilizando *SprayCoating* para aplicação da matriz.

As análises foram realizadas no modo linear, modo positivo com +20 kV de aceleração potencial no TOF (*Bruker Autoflex II Linear; Bruker Daltonik, Bremen, Germany*), o qual é equipado com um *laser* capaz de operar a uma taxa de repetição de 200 Hz. Os parâmetros de extração dos íons foram otimizados para a intensidade do sinal e para a resolução em 12 kDa. A mesma calibração externa utilizada nos experimentos anteriores de perfil proteico foi utilizada neste experimento de imagem. Conjuntos de dados de espectros de massas foram adquiridos por toda a seção utilizando o *software FlexImaging (Bruker Daltonik, Bremen, Germany)* na faixa de massas de m/z 2.000 to 40.000, com uma resolução de 250 μm e 100 *laser shots* por espectro. Depois da aquisição dos dados, imagens moleculares foram reconstruídas utilizando os *softwares FlexImaging e BioMap*. Os dados foram normalizados utilizando parâmetros de exclusão de espectros ruídos normalmente usados no *software FlexImaging*.

Abaixo está ilustrado um esquema geral (Esquema 4.4) utilizado desde a obtenção do tecido pancreático até o resultado final com possíveis biomarcadores, utilizando as metodologias de análise de perfil proteico direcionado pela histologia e MALDI *imaging*. A maior diferença é que esta ultima metodologia não utiliza um patologista para marcar as regiões a serem analisadas, portanto, esta parte diferencial, a qual ocorre nos experimentos de imagem, está indicada pela seta vermelha.



Esquema 4.4: Procedimento experimental geral realizado para a busca de biomarcadores de câncer utilizando os métodos de perfil proteico direcionado pela histologia e MALDI *imaging*.

4.1.3. Experimentos de identificação protéica:

4.1.3.1. Experimentos de MS/MS e HRMS diretamente no tecido intacto:

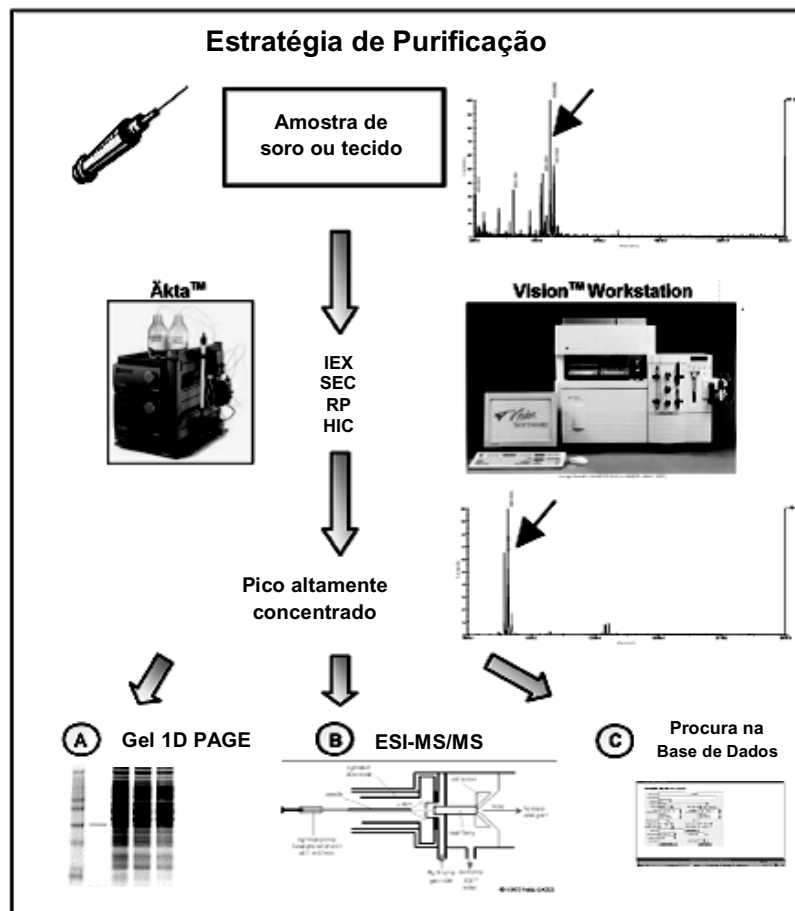
Para a etapa de identificação protéica foram realizados os experimentos de MS/MS e HRMS utilizando-se os instrumentos TOF/TOF e FT-ICR, respectivamente. As condições experimentais dos equipamentos foram otimizadas em cada caso.

O espectro obtido após a fragmentação a partir de colisões com os íons dentro do espectrômetro de massas foi exportado para a base de dados MASCOT e algumas proteínas eram então atribuídas.

Experimentos realizados comumente utilizando gel 1D e LC-MS para separação, purificação e análise de proteínas foram também realizados para identificar outras proteínas relatadas como interessantes pelos tratamentos estatísticos.

4.1.3.2. Experimentos tradicionais após homogenização do tecido:

Alguns íons não foram identificados pelas análises de MS/MS realizadas diretamente no tecido intacto, portanto, métodos tradicionais foram realizados para a obtenção de um maior número de proteínas identificadas. Um fluxograma resumido das etapas experimentais está ilustrado a seguir (Esquema 4.5). Inicialmente, a amostra foi seccionada e homogenizada; o extrato resultante foi fracionado por separação cromatográfica HPLC; e as frações similares foram reunidas para uma maior concentração da proteína; as quais foram então separadas via eletroforese em gel 1D; as bandas de interesse foram removidas do gel, digeridas com tripsina e injetada em um nanoLC-MS/MS; por fim, o conjunto de espectros gerados foi analisado por uma base de dados, o MASCOT, e proteínas e peptídeos foram identificados.



Esquema 4.5: Fluxograma dos métodos de separação e purificação (gel, LC-MS/MS) normalmente utilizados na identificação proteica.

- Preparação da amostra:

Para a identificação destas proteínas, o primeiro experimento realizado foi a homogenização do tecido para a extração de todas as proteínas presentes em tecidos congelados. Para esta etapa, foi utilizado o reagente T-PER® (*Tissue Protein Extraction Reagent*, da *PIERCE*) e um inibidor de protease, para evitar a degradação das proteínas, o comprimido *Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail*.

O ideal é utilizar um pedaço do tecido de ~250 mg, porém como é difícil conseguir amostras de pacientes com câncer e nós não poderíamos consumir toda a amostra para este experimentos, foram cortados 30 seções de 20 µm, resultando em

35 mg do tecido. Como a quantidade de amostra era pequena, utilizou-se amostras de dois pacientes distintos, 1086-T e 1149-T, coletando 15 seções de cada um.

Os tecidos foram retirados do freezer a - 80°C e foram seccionados utilizando o criostato. Os tecidos foram pesados e logo após foram mantidos em gelo para permanecer gelado e evitar possíveis degradações. Todo o material foi colocado em um tubo de vidro homogenizador e em seguida, adicionou-se 700 µL do reagente T-PER. Porém como nós queríamos testar a eficiência do comprimido de inibição da protease, então foram preparadas duas soluções de 350 µL do reagente, utilizando-se em uma delas apenas T-PER e na outra T-PER com o comprimido inibidor. A partir deste momento, duas soluções protéicas do tecido pancreático foram formadas, a TH (T-PER) e PH (T-PER com inibidor da protease) e o procedimento experimental utilizado foi o mesmo para ambas.

As amostras foram homogenizadas no tubo de vidro no gelo com o auxílio de um bastão de vidro até que pedaços dos tecidos não fossem mais observados. O líquido foi transferido para um tubo *falcon* de 15 mL e mantidos em gelo e as soluções foram sonicadas em gelo por 5 ciclos, utilizando-se o equipamento *Branson Sonifier 450*. Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos e as soluções foram transferidas para *ependorfs* de 1,5 mL, ou seja, obteve-se 2 *ependorfs* com as soluções, 1 com a TH e outro com a PH. Em seguida os *ependorfs* foram centrifugados a 14,000 x g por 10 min em um ambiente condicionado à -20°C. O supernadante de cada *ependorf* foi coletado cuidadosamente e colocados em tubos de PCR de 200 µL em gelo e se o mesmo não for uma solução limpa, contendo vestígios de tecidos, uma nova centrifugação deve ser realizada. Os supernadantes e o *pellet* foram mantidos no freezer - 80°C até a realização da próxima etapa.

- Determinação da quantidade proteica do extrato:

Um método colorimétrico para a quantificação total de proteínas (*Brafford Coomassie*) foi realizado para a determinação da quantidade proteica presente no extrato a ser analisado; e esta etapa é necessária antes das etapas de separação por HPLC ou eletroforese de gel para determinar o fator de diluição/concentração.

Para este experimento, utilizou-se o kit de ensaio proteico *Coomassie* (Brafford) da *Pierce*, o qual continha 950 mL do reagente de ensaio proteico *Coomassie* (Brafford) e 10 ampolas de 1 mL albumina padrão (2 mg/mL).

O primeiro passo foi preparar a solução de calibração, os padrões diluídos foram preparados a partir de diluições de uma ampola (solução estoque) utilizando como diluente a água mili-Q, seguindo concentrações de BSA de 2.000 a 0 µg/mL (tabela 4.1). Os padrões foram preparados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Cada solução foi agitada em um *vortex* logo após a preparação. As soluções foram armazenadas a -4°C após a utilização.

Tabela 4.1: Preparação de padrões diluídos de Albumina (BSA).

Dilution Scheme for Standard Test Tube and Microplate Protocols (Working Range = 100–1,500 µg/ml)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	0	300 µl of Stock	2,000 µg/ml
B	125 µl	375 µl of Stock	1,500 µg/ml
C	325 µl	325 µl of Stock	1,000 µg/ml
D	175 µl	175 µl of vial B dilution	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl of vial C dilution	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl of vial E dilution	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl of vial F dilution	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl of vial G dilution	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank

O reagente *Commassie* foi levemente misturado, invertendo o frasco vários vezes, e a quantidade de reagente necessário para o experimento (~20 mL) foi removida do frasco e equilibrada a temperatura ambiente antes do uso, uma vez que o reagente estava armazenado a -4°C.

Cada padrão, amostra e branco foi preparado em triplicata e as soluções obtidas no experimento anterior, TH e PH, foram denominadas como desconhecidas (Unk), para que se possa determinar as suas concentrações. Estas soluções foram analisadas na concentração inicial (CI-TH/PH) e foram também analisadas após as diluições 1:10-TH/PH, 1:100-TH/PH e 1:1000-TH/PH em água mili-Q. Também foi analisado o branco, que foi a solução T-PER utilizada na preparação da solução TH e PH, em sua

concentração inicial (CI) e nas diluições 1:10, 1:100 e 1:100, para verificar se o meio interferia nas medidas das soluções TH e PH. A disposição das soluções na microplaca analisada está ilustrada na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Disposição das soluções na microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0 ug/mL	25 ug/mL	125 ug/mL	250 ug/mL	500 ug/mL	750 ug/mL	1000 ug/mL	1500 ug/mL	2000 ug/mL	
B	0 ug/mL	25 ug/mL	125 ug/mL	250 ug/mL	500 ug/mL	750 ug/mL	1000 ug/mL	1500 ug/mL	2000 ug/mL	
C	0 ug/mL	25 ug/mL	125 ug/mL	250 ug/mL	500 ug/mL	750 ug/mL	1000 ug/mL	1500 ug/mL	2000 ug/mL	
D										
E	CI-TH/PH	1:10-TH/PH	1:100-TH/PH	1:1000-TH/PH			CI-Branco	1:10-Branco	1:100-Branco	1:1000-Branco
F	CI-TH/PH	1:10-TH/PH	1:100-TH/PH	1:1000-TH/PH			CI-Branco	1:10-Branco	1:100-Branco	1:1000-Branco
G	CI-TH/PH	1:10-TH/PH	1:100-TH/PH	1:1000-TH/PH			CI-Branco	1:10-Branco	1:100-Branco	1:1000-Branco
H										

5 µL de cada solução foi pipetado e adicionado no poço correspondente na microplaca, determinado na Tabela 4.2. Em seguida, 250 µL do reagente Commassie foram adicionados em cada poço. A placa foi então misturada e incubada por 10 min dentro do espectrofotômetro (*Plate Reader- Spectrophotometer, SpectraMax M2e*). O espectrofotômetro fez a leitura da placa e os valores foram gerados (vide tabela 4.17) e a concentração da solução foi ajustada para a concentração ideal para a inserção no HPLC (vide tabela 4.19).

- Fracionamento do extrato por HPLC:

As soluções TH e PH foram separadas individualmente utilizando um HPLC com sistema de detecção de UV. Inicialmente, preparou-se a fase móvel, a qual correspondeu à solução H₂O 0.1% TFA (Solvente linha B) e ACN 0.1% TFA (Solvente linha C). Cada solvente foi sonificado por 10 min após a mistura com o ácido. O *degasser* foi ativado em modo contínuo para evitar bolhas no sistema e uma coluna de fase reversa C8 (Grace Vydac®) foi utilizada para a separação. Um método foi otimizado contendo um fluxo gradiente e 110 min de corrida cromatográfica. Foram injetados 50 µL de uma solução padrão de citocromo C, insulina, ribonuclease A e BSA para verificar se as condições cromatográficas estavam boas.

Cada amostra foi diluída para a concentração de 1 mg/mL, utilizando-se 98:2 H₂O:ACN 0.1% TFA. Então, 200 µL da solução diluída (TH, PH) foram injetadas em triplicata (TH_S01, TH_S02, TH_S03; PH_S01, PH_S02, PH_S03). Um autocoletor foi utilizado, trocando a posição da placa de 96 poços a cada 1 min. Após a coleta dos 96 poços, o solvente restante proveniente do HPLC (14 min) foi descartado.

Cada placa contendo as frações de HPLC foi então inserida no *Speedvac* para a remoção do solvente. As condições utilizadas no *Speedvac* foram brandas, não foi utilizada temperatura, para evitar degradação. Depois de secas as amostras, a placa foi colocada no freezer - 80°C, até a próxima etapa.

Com as amostras separadas por HPLC, o próximo passo foi analisar cada poço da placa por MALDI(+)-TOF para verificar quais poços continham as proteínas de interesse. Para isso, a placa foi removida do freezer e colocada a temperatura ambiente, então 30 µL de uma solução de reconstituição (60:40 H₂O:ACN 0.1%TFA) foi adicionada em cada poço. Agitou-se levemente por 20 seg a placa coberta utilizando um vortex; após agitação, a placa foi colocada na bancada por 2 min, e o mesmo procedimento foi realizado mais duas vezes.

Em seguida, 1 µL de cada solução reconstituída foi aplicada a placa de MALDI e, logo após, antes mesmo da amostra secar, 1 µL da solução de matriz (20 mg/mL SA, 60:40 H₂O:ACN 0.1% TFA) foi aplicada em cima da solução. Este procedimento foi realizado para os 96 poços coletados do HPLC e uma posição da placa de MALDI foi

preenchida com o padrão de calibração e matriz. As condições experimentais utilizadas para o MALDI foram as mesmas descritas nos experimentos de perfil proteico. Após a determinação dos poços contendo as proteínas de interesse, e uma calibração interna foi realizada para a verificação de massas exatas. Para tal, 0,5 µL da solução contendo a proteína interesse, 0,5 µL da solução padrão e 1,0 µL da solução da matriz foram aplicadas na placa de MALDI.

- Experimentos de eletroforese em gel 1D:

Após cada fração do HPLC ter sido analisada pelo MALDI, algumas foram selecionadas (vide tabela 4.22) por apresentarem proteínas de interesse. Experimentos de separação por eletroforese em gel 1D foram realizados para a purificação destas proteínas, as quais foram detectadas em mistura após análise por MALDI.

As amostras secas foram reconstituídas em 7 µL de H₂O e foram adicionados 7 µL de solução de tampão (*Tricine SDS Sample Buffer (2X)*, da *Invitrogen*). Em seguida, foi adicionado 1,4 µL do reagente redutor (da *Invitrogen*). A solução foi aquecida a 85 °C por 2 minutos. A solução da corrida (*Tricine SDS Running Buffer (10X)*, da *Invitrogen*) foi preparada, misturando-se 100 mL de 10x Tricine SDS e 900 mL de H₂O.

O próximo passo foi inserir as amostras no gel (10-20% Tricine gel, 1.0 mm x 10 poços, da *Invitrogen*) e um padrão de escada de peso molecular, o *SeeBlue* (da *Invitrogen*). Inicialmente, removeu-se o pente do gel e lavou os poços com água deionizada e solução tampão. O sistema para a corrida do gel foi montado (Figura 4.3), e a câmara interna e externa foram preenchidas com a solução tampão. Então, 15 µL das amostras foram aplicadas em cada dois poços do gel, deixando um vazio entre as amostras para facilitar na hora da remoção das bandas, ou seja, cada gel continha 10 poços, porém foram apenas aplicadas 4 amostras e um padrão *SeeBlue* em cada gel. Como foram utilizados 2 géis, no total, 8 frações provenientes do HPLC foram separadas. Após aplicação das amostras, a tampa do sistema foi fechada e uma tensão 120V foi aplicada, começando o processo de eletroforese em gel.

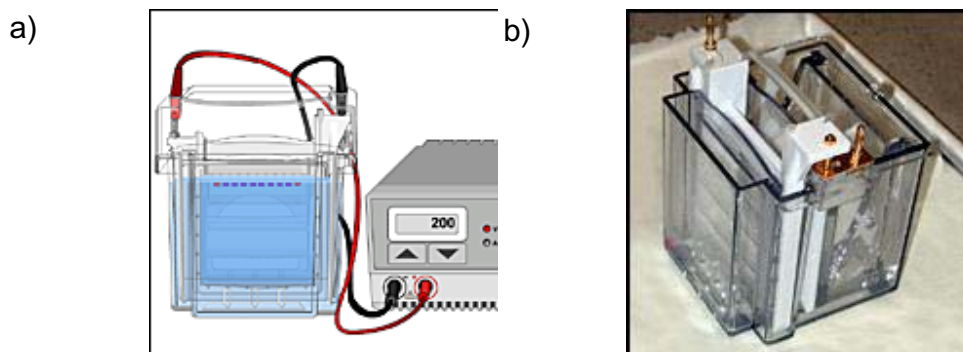


Figura 4.3: a) Esquema do sistema utilizado para eletroforese em gel 1D e b) Foto do sistema real sem a tampa com os cabos condutores da tensão.

Quando a mancha referente ao padrão *SeeBlue* se deslocou para a parte debaixo do gel, desligou-se o sistema, removendo-se os géis das câmaras e removendo-se o protetor do gel com o auxílio de uma espátula. Os procedimentos descritos a seguir foram realizados para ambos os géis (Gel 1 e Gel 2), individualmente. Colocou-se o gel em contato com a solução de fixação (40 mL de água deionizada, 50 mL de metanol e 10 mL de ácido acético) e agitou-se por 10 min a temperatura ambiente. Adicionou-se o gel na solução de coloração (*Colloidal blue stain kit* da *Invitrogen*), contendo 55 mL de água deionizada, 20 mL de metanol e 20 mL do *Stainer A* (da *Invitrogen*) e agitou-se por 10 min. Adicionou-se então 5 mL do *Stainer B* (da *Invitrogen*) e deixou a solução em um sistema de agitação por 16 horas (durante a noite). Após este período, foi removida a solução de coloração e adicionado 200 mL de água deionizada, a qual foi trocada a cada hora para agilizar o processo. O sistema continuou sob agitação neste processo de remoção do corante em excesso, o qual durou 3 horas. As bandas referentes a massas próximas as das proteínas de interesse foram recortadas do gel e digeridas com tripsina. Uma banda acima e abaixo da massa esperada também foi cortada a fim de evitar eventuais perdas na separação.

A digestão trípica em gel foi realizada utilizando-se as soluções de bicarbonato de amônio 100 mM, DTT (ditiolreitol) 100 mM e iodoacetamida 500 mM e 100 µg de tripsina (*Trypsin Gold* da *Promega*). Após a remoção da banda de interesse do gel, adicionou-se 100 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 15 minutos e então removeu esta solução. Em seguida, adicionou-se 150 µL de bicarbonato de amônio 100

mM e 10 µL de DTT 100 mM e incubou-se a 50 °C por 15 min. Então, adicionou-se 10 µL de iodoacetamina 500 mM e deixou no escuro por 15 min a temperatura ambiente. Removeu-se o líquido e substituiu-se com 100 µL de 50:50 ACN: bicarbonato de amônio (100 mM) e deixou a solução em repouso por 15 min. Novamente, substituiu-se o líquido por 100 µL de ACN por 10 min. Removeu-se o líquido e colocou-se no *speedvac* por 10 min.

Uma solução estoque de tripsina 0.1 mg/mL foi preparada a partir de 100 µg tripsina em 1000 µL ácido acético (50 mM). Esta solução estoque foi diluída 1:10 em 25 mM bicarbonato de amônio. Adicionou-se 10 µL desta solução final nas bandas de gel desidratadas e deixou-se durante a noite em uma estufa a 37 °C. O sobrenadante foi removido de cada tubo e transferido a um novo *eppendorf* de 0.5 mL. Os peptídeos foram extraídos do gel com 20 µL de 60% ACN, 0.1% ácido fórmico (FA) em água. Depois de 15 min, removeu-se o extrato e misturou-se ao sobrenadante removido anteriormente, repetindo-se uma segunda extração. O extrato foi adicionado no *eppendorf* contendo o extrato anterior e o sobrenadante, e evaporou-se a solução com um *speedvac*. Os peptídeos foram reconstituídos em 2% ACN, 0.1 % FA em água e analisados no LTQ (nanoLC-MS/MS).

- Experimentos de LC-MS/MS

Os peptídeos foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida (100 µm x 12 cm) empacotado com resina C18 (Monitor C18, 5 µm; Column Engineering, ON, Canada). A fase móvel A foi água com 0,1% ácido fórmico (v/v), e a fase móvel B foi acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (v/v). Devido as bombas de HPLC não serem designadas a operar em fluxos de nL/min, a bomba foi operada a fluxos maiores e um divisor de efluente foi inserido antes a válvula de injeção. Para manter um fluxo constante, utilizou-se uma rampa de fluxo de 0,5 – 0.63 mL/min (de 0 – 61 min). O fluxo foi retornado a 0,5 mL/min um minuto antes da próxima injeção. O fluxo da fase móvel na saída final da coluna capilar foi medida como sendo 250 nL/min em uma composição da fase móvel de 25% de B. Os peptídeos foram separados utilizando gradientes lineares e com a seguinte programação: 2% B por 10min, 2 a 27% B

durante 35 min, 27 a 50% B durante 15 min, 50 a 95% B durante 1 min e mantido por 4 min.

Os peptídeos eluentes da ponta do capilar foram introduzidos dentro da fonte de *nanoeletrospray* do HCT no modo positivo com uma voltagem capilar de transferência do íon de aproximadamente 2,4 kV. Nitrogênio foi utilizado com um gás de secagem a uma temperatura de 180 °C e um fluxo de 10 L/min. Espectros de MS/MS de peptídeos foram obtidos utilizando uma varredura de dados dependentes em que uma faixa do espectro de MS (375–1200 u) foi seguido por 5 espectros de MS/MS dos 5 íons mais intensos da varredura total. Os espectros de MS/MS foram registrados em duplicata para cada massa precursora.

Após a aquisição dos espectros de massas de todas as amostras analisadas (21 no total), os espectros foram analisados via MASCOT, na base de dados para *homo sapiens*, com tolerância peptídica igual a 1.2 e no MS/MS igual a 0.6, com as modificações possíveis de carbamidometil (C) e oxidação. Uma lista de prováveis proteínas e peptídeos identificados foi reportada para cada amostra.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Busca de biomarcadores de câncer:

Para o presente trabalho, métodos de perfil proteico direcionado pela histologia e espectrometria de massas por imageamento químico (IMS) foram utilizados para avaliar câncer pancreático. Um conjunto de amostras com tumor, normais (adjacentes ao tumor) e com pancreatite foram analisadas. Alguns íons específicos relacionados a proteínas foram detectados majoritariamente em tecido normal e outros em tecidos tumorais. Alguns íons que apresentaram diferenças significativas entre amostras com tumor e normal foram caracterizados e poderão ser avaliados para a utilização como biomarcador de câncer pancreático.

4.2.2. Método de perfil proteico direcionado pela histologia:

Analizou-se amostras de tecido pancreático de 86 diferentes pacientes. O patologista marcou células de estroma (64 pacientes) e epitélio (73 pacientes) no conjunto de amostras e no final obteve-se amostras estroma tumoral, estroma normal, estroma pancreatite, epitélio tumoral e epitélio normal (Figura 4.4). O espectro de massas de cada célula foi obtido e o conjunto total foi analisado estatisticamente por dois diferentes programas, a fim de obter-se um resultado mais seguro e confiável. Após o tratamento estatístico, os resultados foram apresentados através do gráfico *SAM* (*Significance Analysis of Microarrays*).

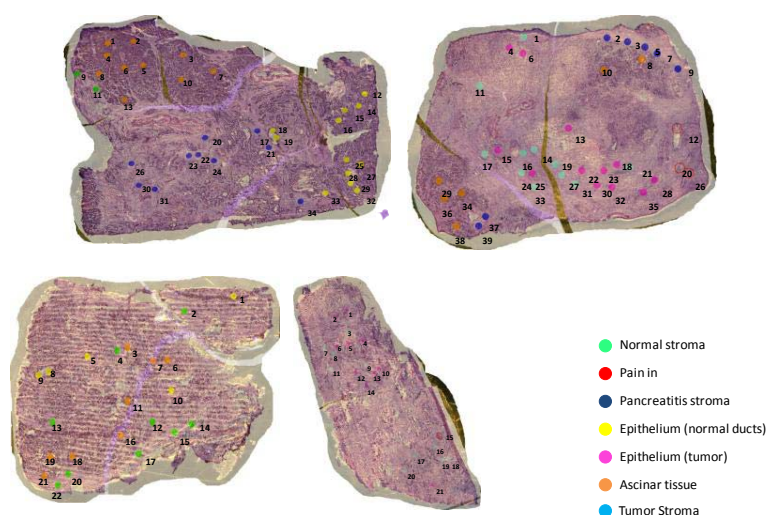


Figura 4.4: As amostras 1001T, 1067T, 1043T, 1053T com a matriz depositada em cada posição marcada pelo patologista.

4.2.3. Análise estatística do conjunto de dados:

O conjunto de dados para análise estatística foi dividido em epitélio (normal e tumor) e estroma (normal, tumor e pancreatite).

A análise utilizando *ProTS data* e *ClinProTools* para as amostras com epitélio normal (19 pacientes) x tumor (31 pacientes) apresentaram uma lista de 17 e 7 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em tumor e 8 e 10 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em tecido normal, respectivamente (Gráfico 4.1). Os *m/z* dos íons considerados significantes pelos tratamentos estatísticos estão listados na Tabela 4.3.

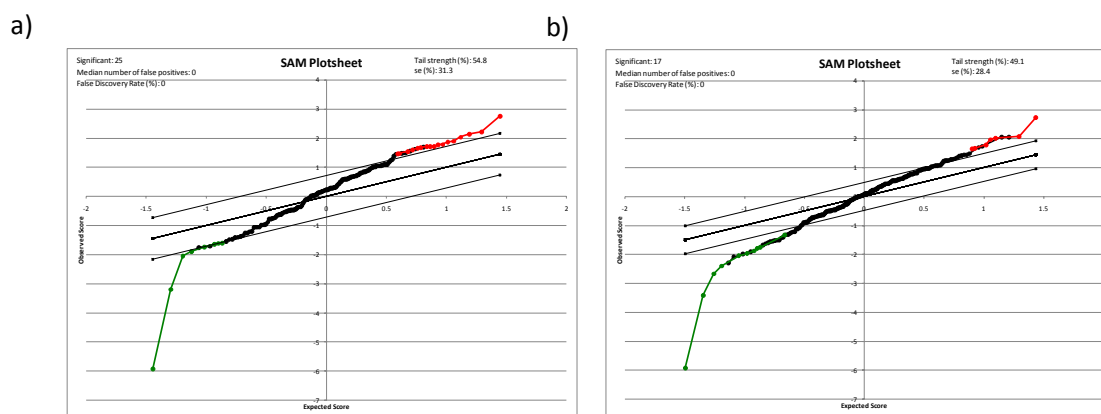


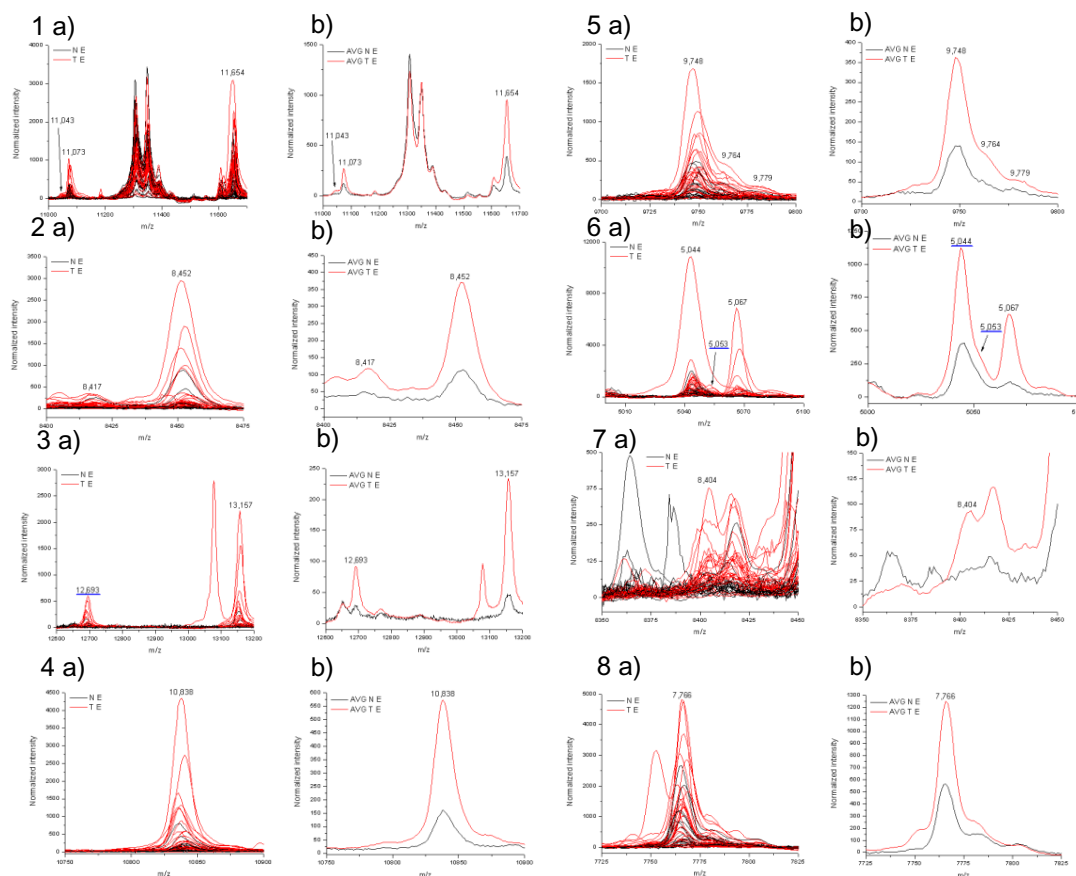
Gráfico 4.1: Gráficos SAM (*statistical analysis of microarrays*) plotado para análise epitélio tumor x normal após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.

Tabela 4.3: Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de epitélio com tumor x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.

Epitélio			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
11.654	6.243	11.653	6.242
11.043	6.448	10.838	14.836
8.417	15.27	8.453	12.547
8.452	4.181	13.156	12.504
12.693	16.801	5.066	16.077
11.073	6.224	9.748	16.037
13.157	6.013	5.044	15.127
10.838	5.808		4.182
9.748			15.869
9.779			4.199
9.764			
5.053			
5.067			
8.404			
5.044			
7.766			
9.910			

* Os valores em azul (11.653, 10.838, 8.453, 13.156, 5.066, 9.748, 5.044, 6.242 e 4.182) significam os íons que já haviam sido detectados pela análise por ProTS Data e foram detectados pela análise por ClinProTools também.

Todos os íons apresentados como significantes pelos tratamentos estatísticos foram inspecionados visualmente para verificar se estes eram realmente íons significantes, com diferença de intensidades considerável e com mesmo comportamento espectral para amostras de diferentes pacientes, e não apenas ruídos ou *outliers*. Para tal, as regiões referentes a cada íon foram ampliadas individualmente, e isso foi realizado para todos os espectros analisados e para a média dos espectros. Alguns íons selecionados estão representados na figura 4.5 para ilustração. Os espectros em vermelho são os espectros obtidos de pacientes com tumor e os espectros em preto referem a amostras analisadas de pacientes com pâncreas normal.



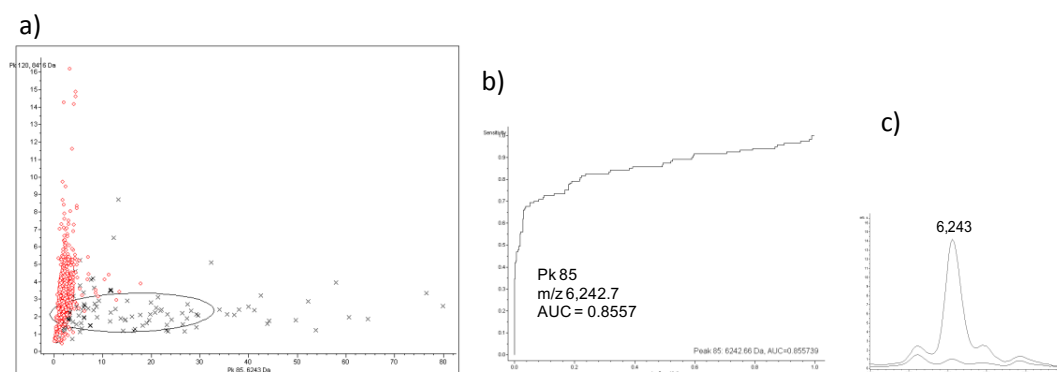
* espectros em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.5: Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de epitélio normal x tumor. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.

A maioria dos íons apresenta diferença significativa entre amostras normais e tumores (m/z 11.654, 8.452, 12.693, 13.157, 10.838, 9.748, 5.067 e 7.766 – Figura 4.5), porém há alguns casos em que a intensidade do íon em amostras normais e tumorais não é muito diferente (m/z 11.073, 8.147 e 11.043 – Figura 4.5); outros que nem são considerados um íon (m/z 5.053, 8.404, 9.764 e 9.779 – Figura 4.5); e há casos em que apenas um paciente apresentou o íon com intensidade muito grande e com isso na média dos espectros o íon ficou mais intenso e foi considerado como significativo, mas na verdade é apenas um *outlier* (m/z 5.044 – Figura 4.5). Portanto, a análise visual é necessária para um resultado mais exato e confiável, e esta foi feita

para todas as amostras analisadas: normal, tumor e pancreatite, epitélio e estroma. O mesmo resultado foi consistente para os demais casos.

Uma análise gerada pelo ClinProTools refere-se a análise de componentes principais (PCA), a qual mostrou uma distinção clara entre as duas classes analisadas, tumor e normal (Figura 4.6 a). O programa gera: a) uma tabela de dados relatando os íons que mais contribuíram para a separação das classes no PCA (Tabela 4.4); e b) um gráfico de sensibilidade x especificidade para cada íon relatado. Os íons mais significantes são os que apresentam uma área sobre a curva (AUC) do gráfico mais próximos a 1. Nesta análise, o íon com maior AUC foi o m/z 6.243, com valor igual a 0.8557, sendo, portanto, o mais importante na diferenciação das duas classes no PCA. Este íon foi analisado visualmente para confirmação dos dados obtidos estatisticamente e realmente apresentou maior intensidade em amostras normais do que em tumores, o que confirma os resultados descritos.



* dados em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.6: a) Análise de componentes principais (PCA) de epitélio normal x tumor, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 6.243.

A tabela fornecida pelo programa mostra a razão m/z dos íons e os valores obtidos para cada tratamento estatístico realizado, como por exemplo, PTTA, PWKW, StdDev1 e StdDev2.

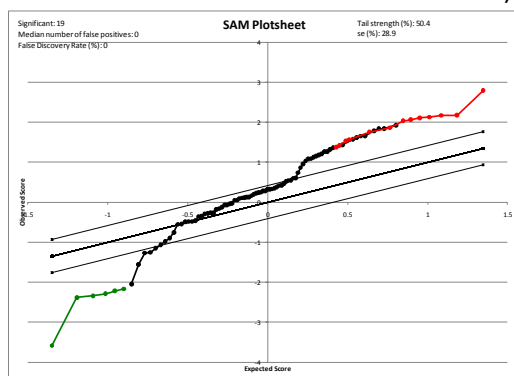
Tabela 4.4: Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de epitélio normal x tumor, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
85	6242.66	159.37	0.0105	< 0.000001	< 0.000001	186.72	27.35	137.79	14.34	73.79	52.42
1	2006.88	2.39	0.195	0.00551	< 0.000001	5.39	3	5.32	2.21	98.68	73.65
186	14836.34	48.61	0.0598	0.00713	< 0.000001	62.84	14.23	63.24	4.45	100.63	31.3
120	8415.61	14.98	0.0256	0.00729	0.00127	21.49	36.47	8.78	18.06	40.83	49.52
168	12547.92	15.89	0.041	0.00729	< 0.000001	28.6	12.71	18.98	5.13	66.34	40.34
2	2234.16	15.13	0.121	0.00729	< 0.000001	30.55	15.42	25.93	7.81	84.89	50.65
121	8453.23	31.62	0.136	0.00809	< 0.000001	24.72	56.34	25.99	74.76	105.14	132.7
157	11653.89	159.42	0.041	0.00838	0.000305	128.48	287.89	124.59	208.04	96.98	72.26

Foram realizados os mesmos tratamentos estatísticos para todas as outras análises, as quais estão apresentadas a seguir.

As amostras de estroma foram divididas em 3 análises: normal x tumor, tumor x pancreatite e normal x pancreatite. A análise utilizando *ProTS data* e *ClinProTools* para as amostras com estroma normal (20 pacientes) x tumor (32 pacientes) (Gráfico 4.2) apresentaram uma lista de 11 e 9 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em tumor e 6 e 8 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em tecido normal, respectivamente (Tabela 4.5).

a)



b)

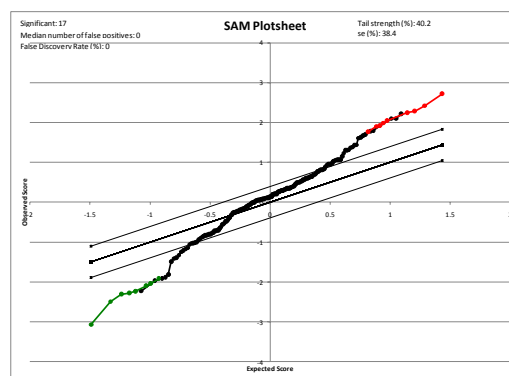
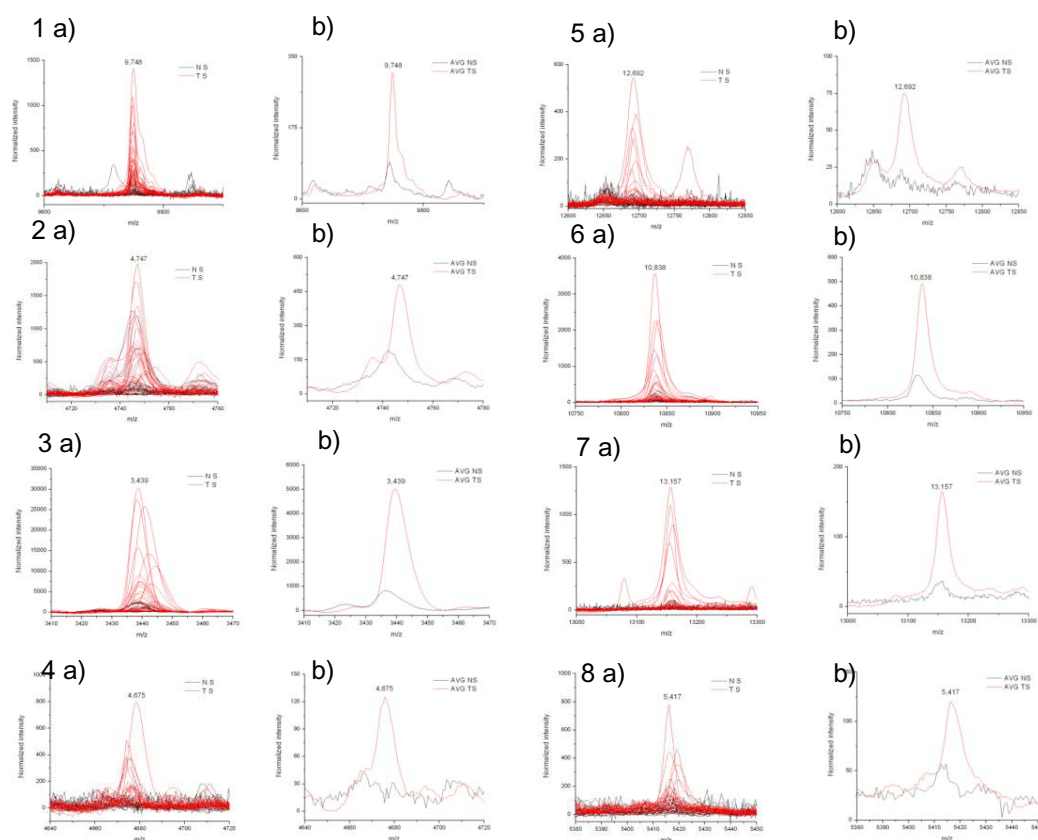


Gráfico 4.2: Gráficos SAM (*statistical analysis of microarrays*) plotado para análise estroma tumor x normal após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.

Tabela 4.5: Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de estroma com tumor x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.

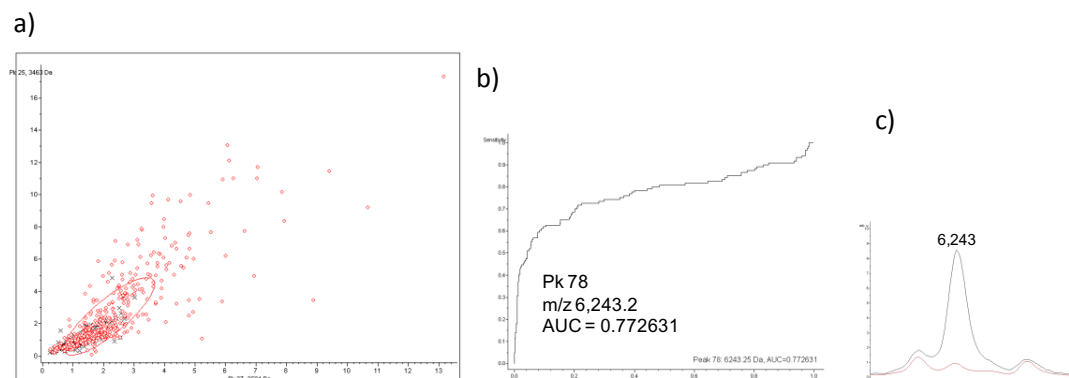
Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
9.748	6.243	9.749	6.243
4.747	16.082	3.439	16.079
3.439	7.565	10.838	7.566
4.675	15.129	3.462	15.129
12.692	15.868	13.157	15.871
10.838	7.935	3.483	7.937
13.157		3.368	14.837
5.417		3.407	8.041
3.368		3.394	
9.187			
3.482			

* Os valores em azul (9.749, 3.439, 10.838, 13.157, 3.483, 3.368, 6.243, 16.079, 7.566, 15.129, 15.871 e 7.937) significam os íons que já haviam sido detectados pela análise por ProTS Data e foram detectados pela análise por ClinProTools também.



* espectros em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.7: Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma normal x tumor. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.



* dados em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.8: a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma normal x tumor, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 6.243.

Tabela 4.6: Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma normal x tumor, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
27	3504.05	12.06	0.0051	0.0139	0.000494	16.12	28.17	5.43	12.89	33.67	45.74
20	3368.52	278.87	0.0423	0.126	< 0.000001	112.55	391.42	94.51	448.56	83.97	114.6
78	6243.25	99.44	0.0423	0.0139	< 0.000001	136.24	36.8	122.92	21.22	90.22	57.65
132	9749.42	40.91	0.0423	0.0139	< 0.000001	24.7	65.61	18.8	64.73	76.11	98.67
125	9187.39	7.63	0.0898	0.112	0.00029	14.7	22.33	6.41	13.35	43.62	59.79

A análise utilizando *ProTS data* e *ClinProTools* para as amostras com estroma tumor (29 pacientes) x pancreatite (23 pacientes) (Gráfico 4.3) apresentaram uma lista de 1 e 4 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em tumor e 5 e 2 íons referentes a proteínas com maior intensidade do íon em pancreatite, respectivamente (Tabela 4.7).

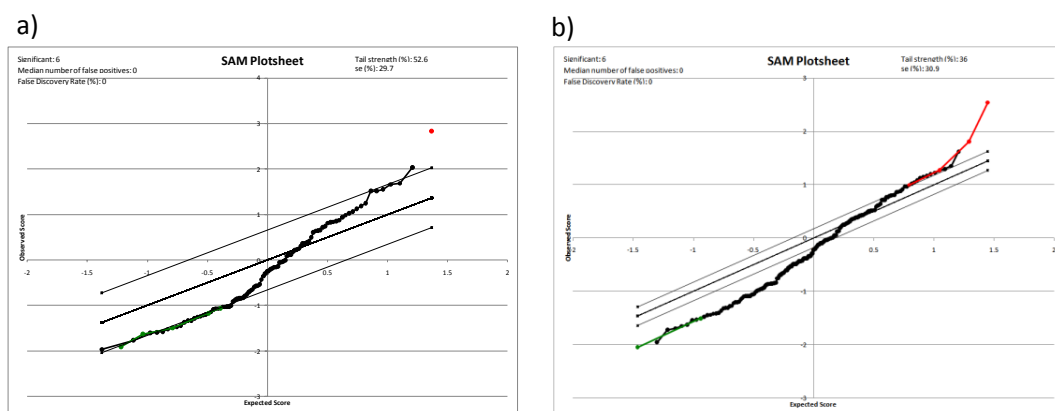
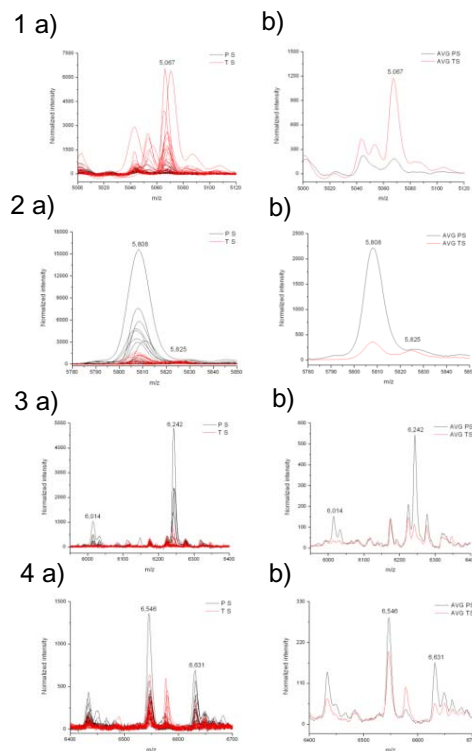


Gráfico 4.3: Gráficos SAM (*statistical analysis of microarrays*) plotado para análise estroma tumor x pancreatite após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.

Tabela 4.7: Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de estroma com tumor x pancreatite após análises por ProTS Data e ClinProTools.

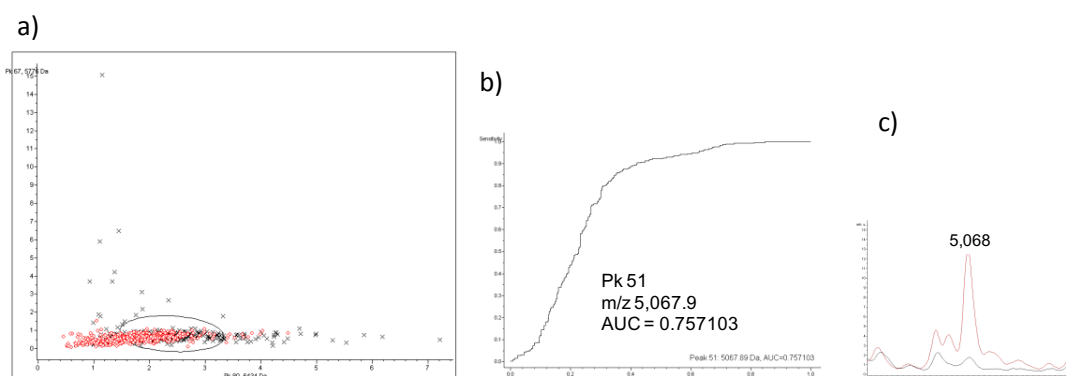
Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Pancreatite	Tumor	Pancreatite
5.067	5.808	5.067	5.808
	6.242	13.157	6.242
	6.014	10.838	
	5.825	3.434	
	6.631		

* Os valores em azul (5.067, 5.808 e 6.242) significam os íons que já haviam sido detectados pela análise por ProTS Data e foram detectados pela análise por ClinProTools também.



* espectros em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.9: Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma tumor x pancreatite. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.



* dados em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.10: a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma tumor x pancreatite, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 5.067, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 5.067.

Tabela 4.8: Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma tumor x pancreatite, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
80	6433.98	9.27	0.0486	0.0179	0.031	31.66	22.39	9.56	5.9	30.21	26.35
67	5776.48	2.59	0.162	0.0681	0.00122	10.16	7.57	3.23	1.89	31.78	24.93
66	5764.73	6.1	0.166	0.201	0.0404	28.07	21.97	7.58	5.64	27.01	25.66
51	5067.89	78.49	0.177	0.107	< 0.000001	39.61	118.1	18.79	132.34	47.44	112.05

A última análise foi comparando amostras com estroma normal (20 pacientes) x pancreatite (19 pacientes) (Gráfico 4.4), a qual apresentou uma lista de 4 e 3 íons referentes a proteínas em maior intensidade do íon em pancreatite e 6 e 6 íons referentes a proteínas em maior intensidade do íon em tecido normal, utilizando *ProTS data* e *ClinProTools*, respectivamente (Tabela 4.9).

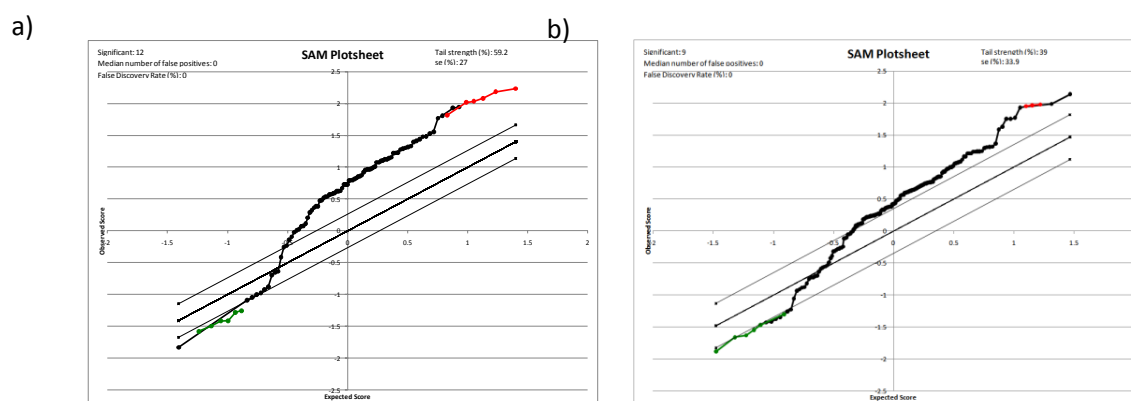
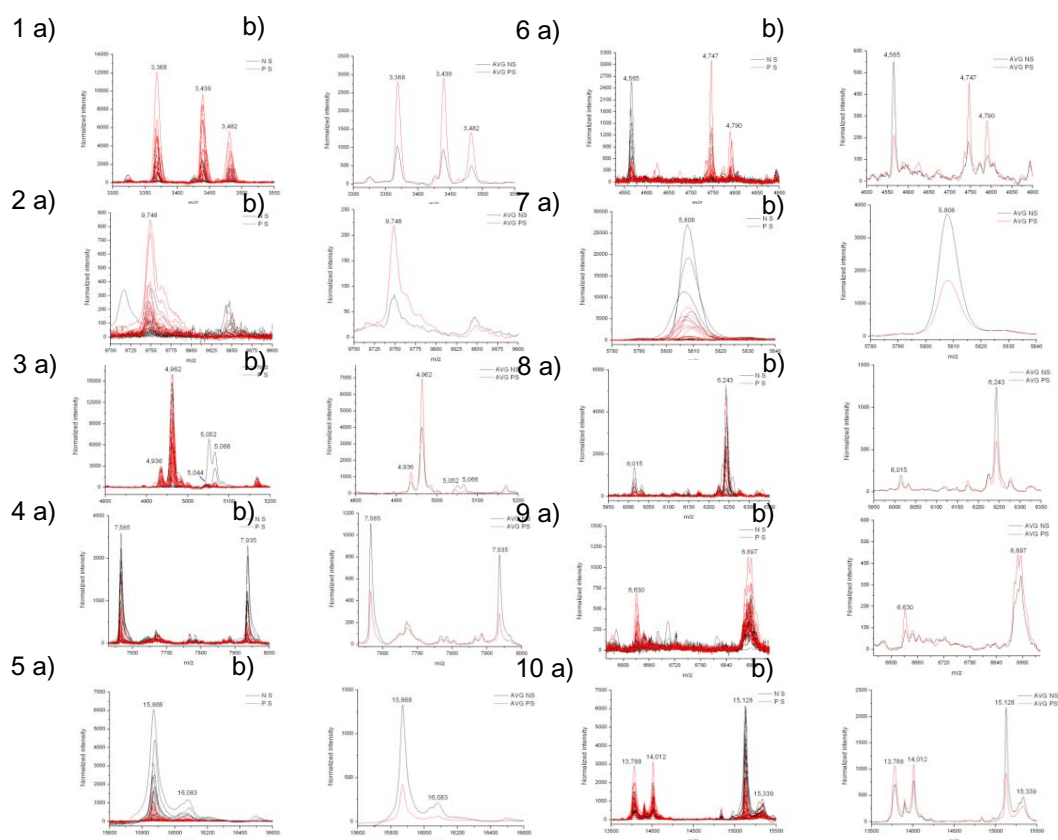


Gráfico 4.4: Gráficos SAM (*statistical analysis of microarrays*) plotado para análise estroma normal x pancreatite após os tratamento estatísticos a) ProTS Data e b) ClinProTools.

Tabela 4.9: Tabela dos íons apresentados com significativos na análise de estroma com pancreatite x normal após análises por ProTS Data e ClinProTools.

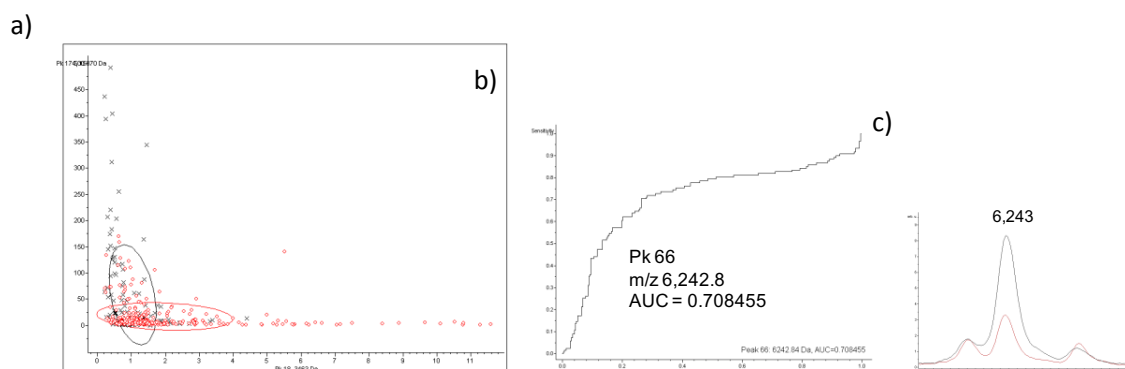
Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Pancreatite	Normal	Pancreatite	Normal
3.482	5.044	3.368	16.078
3.368	16.083	3.439	15.870
9.748	7.935	3.482	7.936
3.439	5.052		16.494
	7.565		7.566
	15.868		15.128

* Os valores em azul (3.368, 3.439, 3.482, 16.078, 15.870, 7.936 e 7.566) significam os íons que já haviam sido detectados pela análise por ProTS Data e foram detectados pela análise por ClinProTools também.



* espectros em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.11: Região ampliada dos espectros de massas de alguns íons selecionados na análise de estroma normal x pancreatite. A coluna da esquerda refere-se a todos os espectros obtidos de pacientes e a coluna da direita refere-se a um espectro da média dos espectros de amostras.



* dados em preto e em vermelho referem-se a amostras normais e tumores, respectivamente.

Figura 4.12: a) Análise de componentes principais (PCA) de estroma normal x pancreatite, b) Área sob a curva (AUC) do gráfico do íon m/z 6.243, c) Espectro de Massas da média dos pacientes ampliado na região do íon m/z 6.243.

Tabela 4.10: Tabela gerada pelo ClinProTools na análise de estroma normal x pancreatite, fornecendo os íons mais significativos e os valores encontrados utilizando diferentes métodos estatísticos.

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
66	6242.84	62.58	0.388	0.379	< 0.000001	140.73	78.15	124.97	93.38	88.8	119.48
159	13644.02	4.08	0.388	0.379	0.0601	13.62	17.7	6.83	6.71	50.18	37.92

A tabela abaixo (Tabela 4.11) resume o tipo de célula analisada, a quantidade de amostras (pacientes) de cada análise e o número de íons significativos detectado em cada programa estatístico utilizado.

Tabela 4.11: Resumo das análises realizadas e o número de íons significativos encontrados por cada programa.

Célula	Tecido (# pacientes)	ProTS Data	ClinProTools
Epitélio	Normal (19)	8	10
	Tumor (31)	17	7
Estroma	Normal (20)	6	8
	Tumor (32)	11	9
Estroma	Tumor (29)	1	4
	Pancreatite (23)	5	2
Estroma	Normal (20)	6	6
	Pancreatite (19)	4	3

O resultado das análises estatísticas reportando os íons mais significativos está ilustrado na tabela 4.12.

Tabela 4.12: Íons detectados como significativos nas análises de ProTS Data e ClinProTools.

Epitélio			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
11.654	6.243	11.653	6.242
11.044	6.448	10.838	14.836
8.417	15.27	8.453	12.547
8.453	4.181	13.156	12.504
12.692	16.801	5.066	16.077
11.074	6.224	9.748	16.037
13.157	6.013	5.044	15.127
10.838	5.808		4.182
9.748			15.869
9.779			4.199
9.764			
5.054			
5.067			
8.403			
5.045			
7.765			
9.91			

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Pancreatite	Tumor	Pancreatite
5.067	5.808	5.067	5.808
	6.242	13.157	6.242
	6.014	10.838	
	5.825	3.434	
	6.631		

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
9.748	6.243	9.749	6.243
4.747	16.082	3.439	16.079
3.439	7.565	10.838	7.566
4.675	15.129	3.462	15.129
12.692	15.868	13.157	15.871
10.838	7.935	3.483	7.937
13.157		3.368	14.837
5.417		3.407	8.041
3.368		3.394	
9.187			
3.482			

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Pancreatite	Normal	Pancreatite	Normal
3.482	5.044	3.368	16.078
3.368	16.083	3.439	15.870
9.748	7.935	3.482	7.936
3.439	5.052		16.494
	7.565		7.566
	15.868		15.128

* Íons em azul referem-se aos íons também encontrados na análise feita pelo ProTS Data, além da análise pelo Clin ProTools.

Os íons mais interessantes após a comparação dos resultados estatísticos e a inspeção visual na média dos espectros foram os íons: m/z 6.243 que apareceu

majoritariamente em tecidos normais e m/z 3.368, 3.439, 3.482 que apareceu majoritariamente em tecidos com tumor.

4.2.4. MALDI IMS:

Após a análise de perfil protéico direcionado pela histologia, realizou-se o imageamento químico de algumas amostras com tumor e normais, as quais foram selecionadas por apresentarem a maior variedade de células identificadas pelo patologista. Inicialmente, realizou-se imagens com resolução lateral de 250 μm nas amostras 1001-T, 1067-T e 1149-T. O espectro de massas (ESI(+)-MS) resultante após a aquisição total da imagem apresentou diversos íons; cada íon foi selecionado, e, com isso, obteve-se a imagem correspondente.

Algumas imagens referentes a alguns íons selecionados estão ilustradas na Figura 4.13. Os íons foram marcados com cores (amarelo e vermelho) de acordo com o que havia sido reportado anteriormente pelos dados estatísticos, a fim de facilitar a análise visual e verificar se realmente os dados provenientes dos estudos por perfil proteico foram condizentes com as imagens.

Os íons em amarelo e em vermelho referem-se aos íons que apresentaram maior intensidade nas amostras de pacientes normais e com tumor, respectivamente, a partir das análises estatísticas (Figura 4.13).



* íons em amarelo e em vermelho apresentaram maior intensidade no espectro de massas na análise de amostras de pacientes normais e com tumor, respectivamente, a partir das análises estatísticas.

Figura 4.13: Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas das amostras: 1001-T (esquerda), 1067-T (centro), 1149-T (direita).

Para facilitar ainda mais a visualização e fazer uma comparação direta na análise destas imagens, selecionou-se apenas alguns íons da amostra 1001-T e adicionou-se o *H&E staining* da amostra, que é o método clássico e padrão na análise de células tumorais e normais. A coloração mais escura no H&E staining refere-se a região com células tumorais e a coloração mais clara corresponde a região com células normais (Figura 4.14).

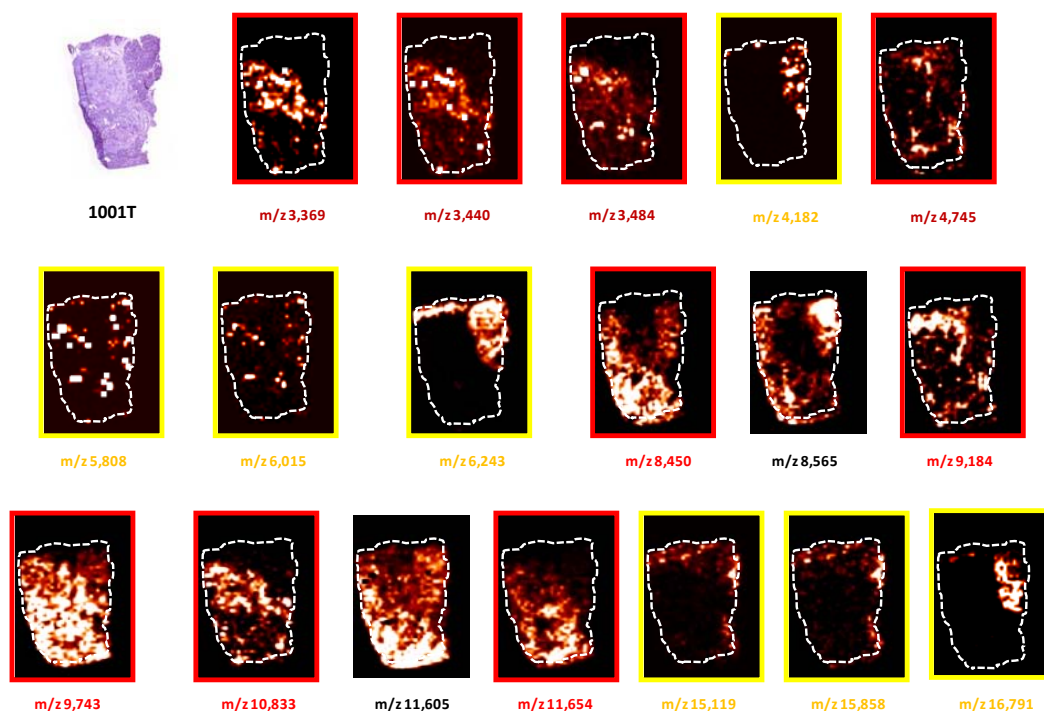


Figura 4.14: Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas da amostra 1001-T.

Analisando-se cuidadosamente, pode-se verificar que o resultado das imagens foi condizente com os resultados observados pelo perfil proteico direcionado pela histologia e pelo *H&E staining*.

Ou seja, ao selecionar o íon m/z 6.243, a imagem correspondente a este íon apresentou uma maior intensidade na parte superior e direita superior do tecido, porém ao selecionar os íons m/z 3.369, 3.440, 3.484, a imagem foi detectada do lado esquerdo e inferior total da amostra, ou seja, complementa a imagem anterior. Comparando estas imagens com *H&E staining*, pode-se observar a mesma correlação. Portanto, o íon m/z 6.243 está presente em amostra de pacientes normais e os íons com m/z 3.369, 3.440 e 3.484 estão presentes em pacientes com tumor, como relatado anteriormente pelas análises de perfil proteico e dados estatísticos.

Outras duas amostras foram também submetidas à MALDI IMS, porém utilizando-se uma resolução lateral menor desta vez (100 μm), para a obtenção de uma

imagem com maior resolução. As amostras testadas foram 1043-T e 1053-T, sendo a primeira com um maior número de células tumorais e a segunda com células normais. Neste caso as amostras com tumor e normais são de pacientes distintos e não do mesmo paciente como no caso anterior.

As imagens de alguns íons selecionados estão ilustradas na figura 4.15, a mesma relação de cores utilizadas anteriormente foi atribuída para estas imagens.



Figura 4.15: Imagens referentes a alguns íons m/z selecionados no espectro de massas das amostras: 1053-T (esquerda), 1043-T (direita).

Para uma melhor visualização e comparação dos resultados, ampliou-se a imagens dos íons com m/z 3.369 e m/z 6.243 (Figura 4.16). O resultado foi similar, e o íon com m/z 3.369 está presente apenas na amostra com tumor e o íon com m/z 6.243 está na amostra normal, porém agora as imagens possuem uma alta resolução lateral.

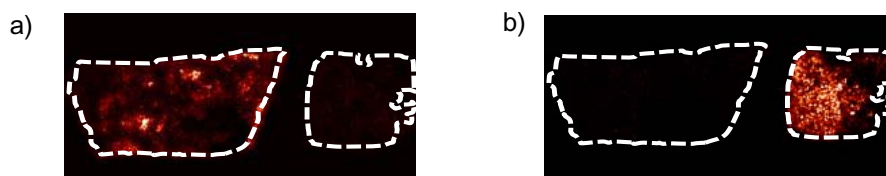
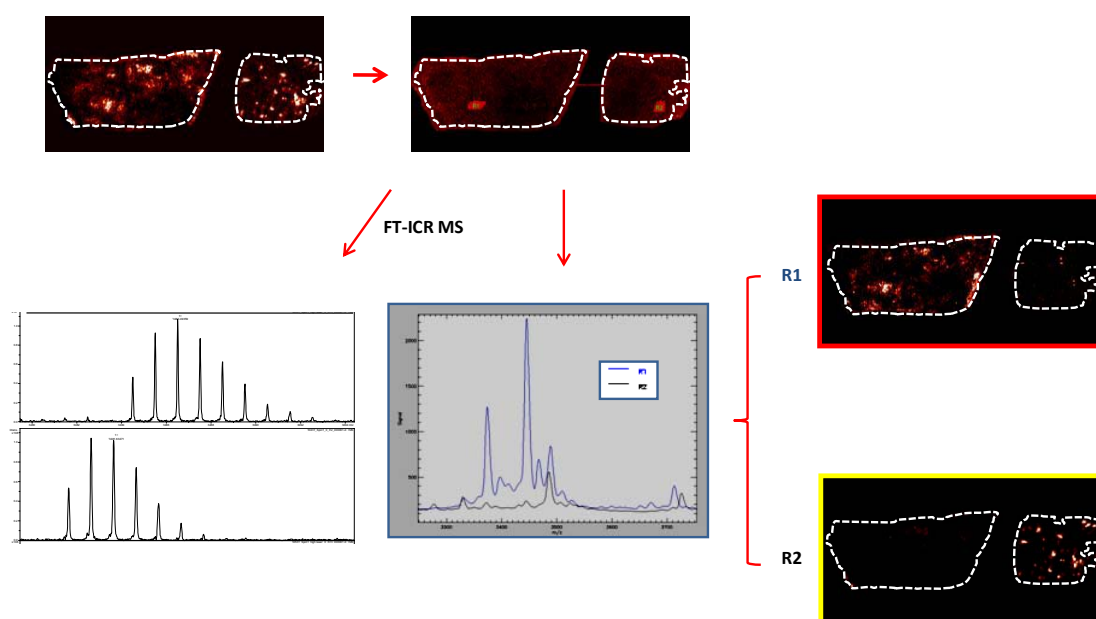


Figura 4.16: MALDI IMS dos tecidos 1043-T (esquerda) e 1053-T (direita); imagem química dos íons: a) m/z 3.369 e b) m/z 6.243.

Os três íons, m/z 3.369, 3.440 e 3.484, apresentaram a mesma imagem química no experimento anterior (Figura 4.15), ou seja, eles estavam presentes na mesma região da amostra analisada referente a parte com tumor. No entanto, quando se verificou a imagem dos íons m/z 3.440 e m/z 3.484, o primeiro apresenta uma imagem correspondente ao íon m/z 3.369, porém o segundo está presente também na amostra normal, o que não foi apresentado pelo experimento anterior (Figura 4.13).

Para investigar melhor este íon, selecionou-se uma região específica em cada amostra, em uma das partes em que o íon de interesse estava com maior intensidade; e o espectro de massas de cada região foi obtido (Esquema 4.6). A região R1 refere-se à amostra com tumor e a região R2 refere-se à amostra normal. O espectro de massas proveniente da região R1 está ilustrado em azul e o espectro de massas da região R2 está em preto. Pode-se notar que os dois espectros de massas são diferentes, o espectro em azul contém os três íons descritos anteriormente, porém o espectro em preto contém apenas um íon na região do íon com m/z 3.369. Este íon não está totalmente sobreposto ao íon nesta mesma região do espectro em azul, ou seja, acredita-se que não se referem ao mesmo íon. Então, selecionou-se apenas a parte direita do pico em azul, na qual não continha o pico em preto, e a imagem correspondente foi denominada R1. Em seguida, selecionou-se a parte esquerda do pico em preto e a imagem foi denominada R2. As imagens foram distintas, a imagem R1 apresentou o íon em toda amostra com tumor, enquanto que a imagem R2 apresentou o íon apenas na amostra normal. Ou seja, trata-se de dois íons com m/z muito próximos, um presente em amostra normal e o outro em amostra com tumor,

porém como o espectrômetro de massas utilizado não possuía alta resolução, os íons não foram claramente distinguíveis e na primeira análise eles foram selecionados como sendo um único íon. Para confirmar esta hipótese, um espectrômetro de massas de alta resolução, um FT-ICR MS, foi utilizado e realmente foi detectada a presença de dois íons com m/z 3.481,63471 e 3.484,49359.



Esquema 4.6: Esquema resumido da análise do íon m/z 3.484 nas amostras 1053-T e 1043-T.

A partir de todos os dados obtidos e correlacionados até o momento, há alguns íons com potencial para serem biomarcadores, uma vez que estão presentes em apenas tecidos normais ou tumorais. A próxima etapa foi identificar estes íons para determinar quais são as proteínas referentes aos mesmos.

4.2.5. Identificação das proteínas de interesse:

O próximo passo foi tentar identificar estes íons de interesse. Para isso foram realizados experimentos de MS/MS e HRMS utilizando-se os instrumentos TOF/TOF e FT-ICR MS, respectivamente. Após a fragmentação do íon, o espectro obtido foi exportado para a base de dados MASCOT e algumas proteínas foram atribuídas. Experimentos tradicionais utilizando gel e LC-MS para separação, purificação e análise de proteínas foram realizados para identificar algumas proteínas não detectadas pelos métodos descritos anteriormente.

- Experimentos de MS e HRMS diretamente no tecido:

As primeiras proteínas identificadas foram referentes à hemoglobina, uma vez que os sinais são bem característicos e encontrados em diversas amostras de tecidos humanos. Normalmente, detecta-se a hemoglobina devido à presença de quatro íons (7.565, 7.935, 15.127 e 15.868), estes são referentes às duas subunidades de hemoglobina, os quais estão na forma monocarregada e dicarregada.

Nos experimentos realizados vários tecidos normais apresentaram espectros de massas MALDI(+)-TOF com estes íons característicos. Os dois primeiros íons detectados foram referentes à hemoglobina subunidade α , com $[M+H]^+$ m/z 15.127, e $[M+2H]^{2+}$ m/z 7.565. Os outros dois íons referiam-se à hemoglobina subunidade β , com $[M+H]^+$ m/z 15.868, e $[M+2H]^{2+}$ m/z 7.935. A partir do SwissProt (UniProtKB) foi possível verificar qual o peptídeo relacionado a cada proteína identificada (Figura 4.17).

a)	P69905 [2-142], Hemoglobina subunidade alfa, Homo sapiens (Humano)
	102030405060 MVLSPADKTNVKAANGKVGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG 708090100110120 KKVADALTNAVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLKRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTP 130140 AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR
b)	P6887 [2-147], Hemoglobina subunidade beta, Homo sapiens (Humano)
	102030405060 MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLS TPDAVMGNPK 708090100110120 VKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFTATLS ELHCDKLHVDPENFRLLGMV LVCVLAHHFG 130140 KEFTTPPVQAA YQKVVAGVAN ALAHKYH

Figura 4.17: Seqüência da proteína Hemoglobina a) subunidade α e b) subunidade β e as respectivas seqüências dos peptídeos destacadas em amarelo.

No caso dos três íons presentes (m/z 3.440, 3.369 e 3.484) em tecidos com tumor, os íons referentes a proteínas com maior intensidade do sinal não fragmentaram nos experimentos de MS/MS. Porém a massa exata obtidas nos experimentos de alta resolução (HRMS) utilizando FT-ICR MS indicou que os íons m/z 3.440, 3.369 e 3.484 referem-se às proteínas defensivas presentes em humanos, DEF1 (Defensina neutrofílica 1), DEF2 (Defensina neutrofílica 2) e DEF3 (Defensina neutrofílica 3), respectivamente, pois as massas experimentais e teóricas foram muito próximas.

A partir do SwissProt (UniProtKB) foi possível verificar que a proteína Defensina neutrofílica 1 (DEF1_HUMAN) apresenta os peptídeos defensina neutrofílica 1 e 2 na sua estrutura (Tabela 4.13), bem como a seqüência destes peptídeos (Figura 4.18), as quais possuem as mesmas massas detectadas pelo espectrômetro de massas (m/z 3.440 e 3.369).

Tabela 4.13: Anotações da sequência da proteína DEF1_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.

Anotação da sequência (características)						
	Característica chave	Posição		Descrição	Vista gráfica	Identificador
Processamento molecular						
☐	Peptídeo sinal	1 – 19	19	HP 1-56		
☐	Propeptídeo	20 – 38	19			PRO_0000006771
☐	Cadeira	39 – 94	56			PRO_0000006772
☐	Peptídeo	65 – 94	30			PRO_0000006773
☐	Peptídeo	66 – 94	29			PRO_0000006774

a)

P59665 [65-94], Defensina neutrófila 1, Homo sapiens (Humano)	
102030405060 MRTLAILAAI LLVALQAQAE PLQARADEVA AAPEQIAADI PEVVVSLAWD ESLAPKHPGS 708090 RKNMACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	

b)

P59665 [66-94], Defensina neutrófila 1, Homo sapiens (Humano)	
102030405060 MRTLAILAAI LLVALQAQAE PLQARADEVA AAPEQIAADI PEVVVSLAWD ESLAPKHPGS 708090 RKNMACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWAFCC	

Figura 4.18: Sequência da proteína DEF1_HUMAN e as sequências dos peptídeos a) defensina neutrofílica 1 e b) defensina neutrofílica 2, destacadas em amarelo.

A mesma análise foi relacionada para a proteína Defensina neutrofílica 3 (DEF3_HUMAN), e os dados correspondentes estão na Tabela 4.14 e Figura 4.19.

Tabela 4.14: Anotações da sequência da proteína DEF3_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.

Anotação da sequência (características)					
Característica chave	Posição		Descrição	Vista gráfica	Identificador
Processamento molecular					
☐ Peptídeo sinal	1 – 19	19			
☐ Propeptídeo	20 – 38	19			PRO_0000006777
☐ Cadeira	39 – 94	56	HP 1-56		PRO_0000006778
☐ Peptídeo	65 – 94	30	Defensina Neutrófila 3		PRO_0000006779
☐ Peptídeo	66 – 94	29	Defensina Neutrófila 2		PRO_0000006780

a)

P59666 [65-94], Defensina neutrófila 3, Homo sapiens (Humano)	
10	20
MRTLAILAAI	LLVALQAQAE
30	40
PLQARADEVA	AAPEQIAADI
50	60
PEVVVSLAWD	ESLAPKHPGS
70	80
RKNMDCYCR	PACIAGERRY
90	
GTCIYQGRLW	AFCC

b)

P59666 [66-94], Defensina neutrófila 3, Homo sapiens (Humano)	
10	20
MRTLAILAAI	LLVALQAQAE
30	40
PLQARADEVA	AAPEQIAADI
50	60
PEVVVSLAWD	ESLAPKHPGS
70	80
RKNMDCYCR	PACIAGERRY
90	
GTCIYQGRLW	AFCC

Figura 4.19: Sequência da proteína DEF1_HUMAN e as seqüências dos peptídeos a) defensina neutrófila 1 e b) defensina neutrófila 2, destacadas em amarelo.

Estas proteínas foram descritas na literatura estando presentes em diversos tipos de câncer e relacionadas a processos de inflamação, portanto, faz sentido a presença destas proteínas nas amostras em que foram encontradas tumores. Com estes dados, supõe-se que estas sejam as proteínas referentes aos *m/z* 3.440, 3.369 e 3.484, porém outros experimentos são necessários para confirmação desta hipótese.

- Experimentos de MS/MS diretamente no tecido:

O próximo experimento para a identificação proteica foi à realização de MS/MS dos íons considerados significativos a partir das análises estatísticas e dos experimentos de imagem.

Para os experimentos de MS/MS, o tecido intacto, preparado da mesma maneira dos experimentos de imagem, foi inserido dentro do espectrômetro de massas (UltrafleXtreme, da Bruker). Em seguida o espectro de massas gerado foi submetido a base de dados MASCOT e por fim uma análise foi realizada utilizando SwissProt (UniprotKB).

O primeiro íon identificado foi o de m/z 3.481, para confirmar que era uma proteína diferente da DEF3. O tecido da amostra (normal) 1043-T foi inserido dentro do espectrômetro de massas, o íon de interesse foi selecionado (Figura 4.20) e submetido à colisão. O espectro de massas resultante apresentou vários íons (Figura 4.21) e foi analisado posteriormente via MASCOT.

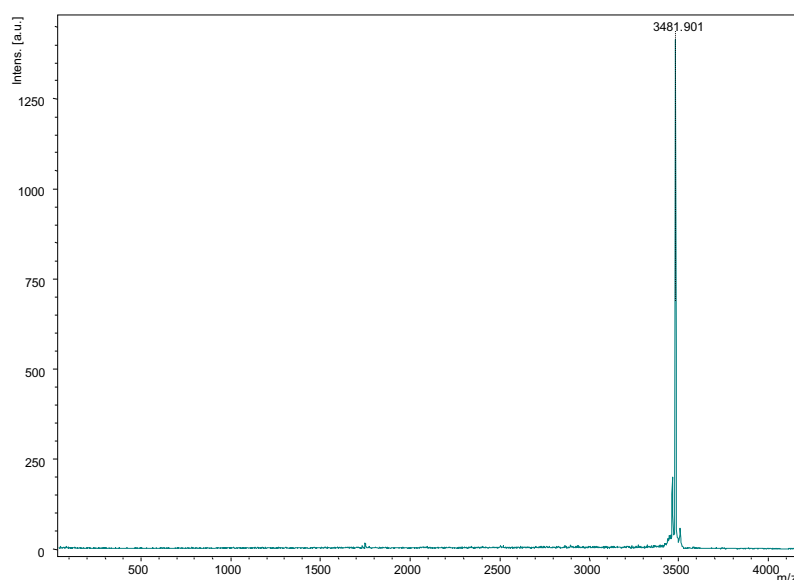


Figura 4.20: Espectro de Massas MALDI(+)-TOF após seleção do íon m/z 3.481.

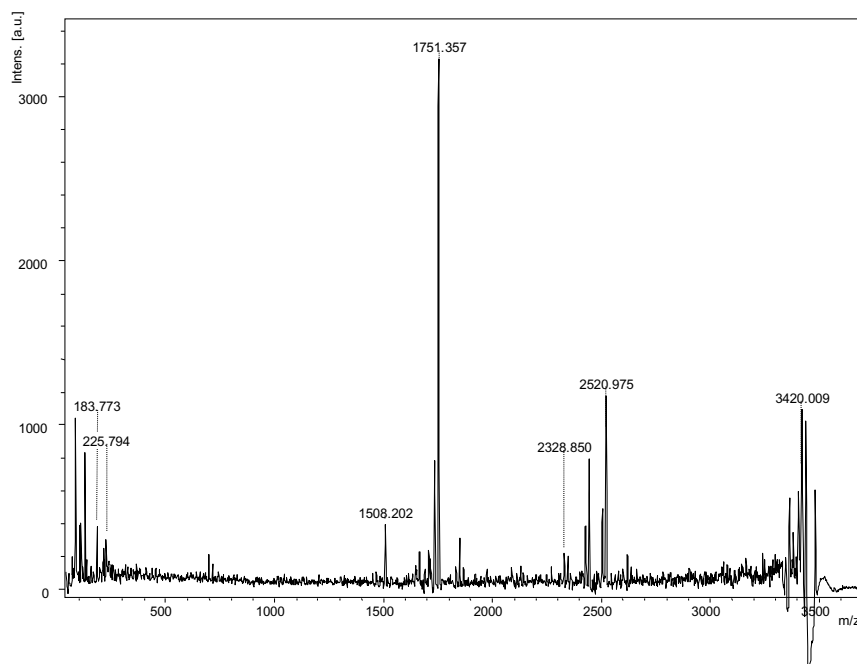


Figura 4.21: Espectro de Massas MALDI(+)-TOF/TOF do íon m/z 3.481.

O MASCOT identificou o espectro de massas como referente à proteína GLUC_HUMAN (HSQGTFTSDYSKYLDSRR AQDFVQWLMNT), o que faz sentido uma vez que a amostra analisada foi pâncreas, o qual produz Glucagon. Após a análise por MASCOT, uma análise utilizando SwissProt (UniprotKB) foi realizada para verificar a sequência da proteína total e a sequência do fragmento detectado, o qual está destacado em amarelo (Figura 4.22).

P01275 [53-81], Glucagon, Homo sapiens (Humano)					
10	20	30	40	50	60
MKSIYFVAGL	FVMLVQGSWQ	RSIQDTEEKS	RSFSASQADP	LSDPDQMNED	KRHSQGTFTS
70	80	90	100	110	120
DYSKYLDSRR	AQDFVQWLMN	TKRNRNNTIAK	RHDEFERHAE	GTFTSDVSSY	LEGQAAKEFI
130	140	150	160	170	180
AWLVKGRGRR	DFPEEVAIVE	ELGRRHADGS	FSDEMNTILD	NLAARDFINW	LIQTKITDRK

Figura 4.22: Sequência da proteína GLUC_HUMAN e sequência do peptídeo (glucagon) destacado em amarelo.

Outro íon seccionado para experimento de MS/MS foi o íon de m/z 2.235. A figura 4.23 representa o espectro de massas *full scan* obtido diretamente do tecido da amostra (normal) 1043-T. O espectro de massas MS/MS (Figura 4.24) apresentou vários íons provenientes após a colisão do precursor com o gás, o que tornou o espectro rico em informações e com resultado mais preciso após a análise pelo MASCOT.

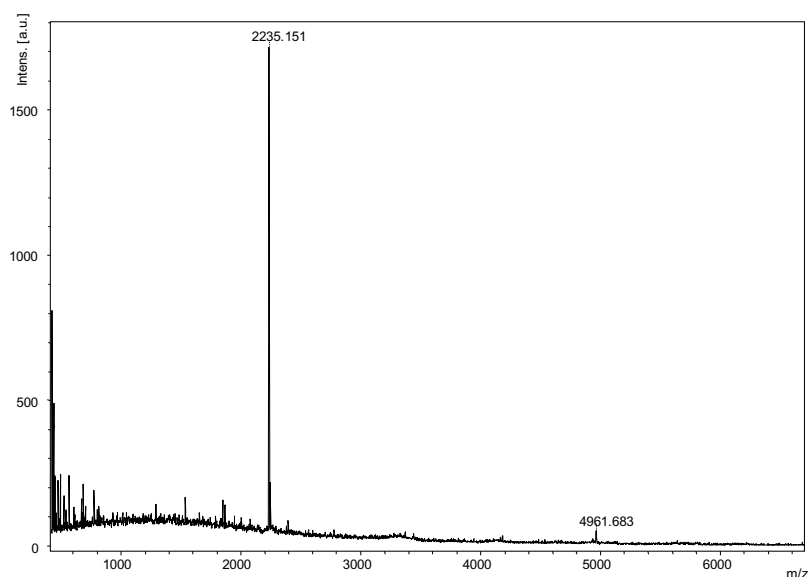


Figura 4.23: Espectro de Massas MALDI(+)-TOF da amostra 1043-T.

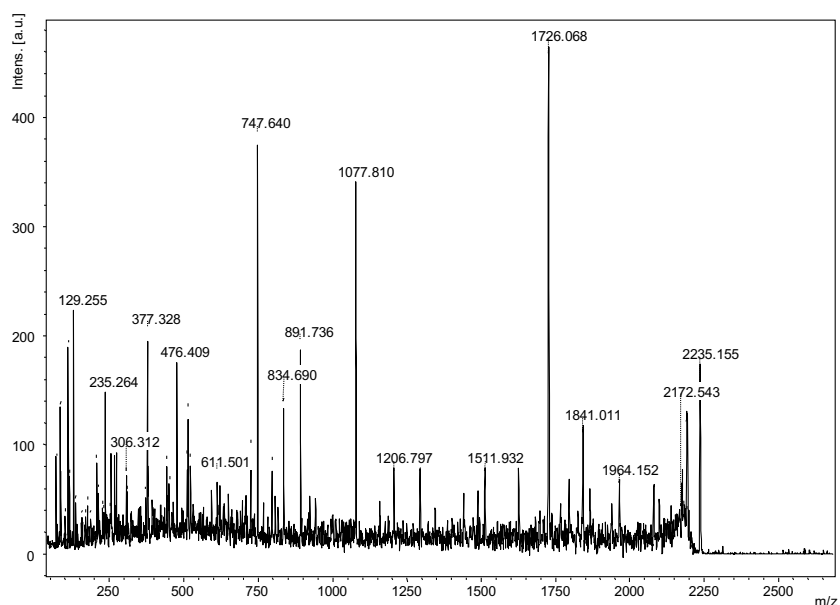


Figura 4.24: Espectro de Massas MALDI(+)-TOF/TOF do íon m/z 2.235.

A análise através do MASCOT indicou a proteína PAHO_HUMAN referente ao íon m/z 2.235. A análise através do SwissProt (Figura 4.25) mostrou que este íon, chamado icosapeptídeo pancreático (HKEDTLAFSEWGSPPHAAVPR), referiu-se a uma sequência peptídica da proteína Prohormônio Pancreático (PAHO_HUMAN).

P01298 [69-88], Prohormônio pancreático, Homo sapiens (Humano)					
10	20	30	40	50	60
MAAARLCLSL	LLSTCVALL	LQPLLGAQGA	PLEPVYPGDN	ATPEQMAQYA	ADLRRYINML
70	80	90			
TRPRYGKRHK	EDTLAFSEWG	SPHAAVPREL	SPLDL		

Figura 4.25: Sequência da proteína PAHO_HUMAN e sequência do peptídeo (icosapeptídeo pancreático) destacado em amarelo.

Como o próprio nome sugere, esta proteína também está presente no pâncreas, o que está condizente com nossa amostra, que foi amostra de pâncreas normal. Ao analisar novamente a imagem referente a esta proteína, verifica-se que esta se encontra apenas na parte superior direita da amostra 1043-T. Outro íon também apresenta uma distribuição espacial similar na amostra, o íon com m/z 4.182 (Figura 4.26).

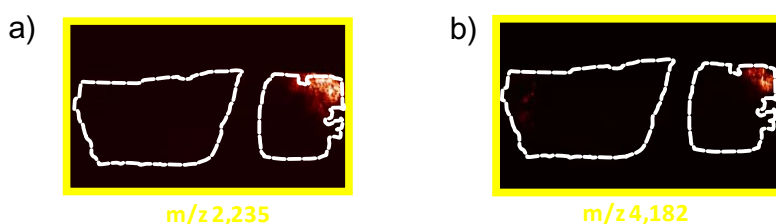


Figura 4.26: Imagens referentes aos íons com a) m/z 2.235 e b) m/z 4.182.

Ao analisar a proteína PAHO_HUMAN pelo SwissProt (UniProtKB), verifica-se que além do peptídeo detectado como icosapeptídeo pancreático m/z 2.235, há outro peptídeo com grande cobertura da proteína contendo 36 AA's, denominado hormônio pancreático (Tabela 4.15).

Tabela 4.15: Anotações da sequência da proteína PAHO_HUMAN e os prováveis peptídeos correlacionados.

Anotação da sequência (características)					
Característica chave	Posição		Descrição	Vista gráfica	Identificador
Processamento molecular					
☐ Peptídeo sinal	1 – 29	29			
☐ Peptídeo	30 – 65	36	Hormônio pancreático		PRO_0000025365
☐ Peptídeo	69 – 88	20	Icosapeptídeo pancreático		PRO_0000025366
☐ Propeptídeo	89 – 95	7			PRO_0000025367

Este peptídeo cuja sequência é APLEPVYPGDNATPEQMAQYA ADLRRYINMLTRPRY, possui m/z 4.182 (Figura 4.27), ou seja, o mesmo valor do íon detectado com imagem similar ao m/z 2.235. Portanto, a partir do experimento de MS/MS e do experimento de imagem pode-se atribuir mais dois peptídeos relacionados a uma proteína pancreática.

P01298 [30-65], Prohormônio pancreático, Homo sapiens (Humano)					
10	20	30	40	50	60
MAAARLCLSL	LLLSTCVALL	LQPLLGAQGA	PLEPVYPGDN	ATPEQMAQYA	ADLRRYINML
70	80	90			
TRPRYGKRHK	EDTLAFSEWG	SPHAAVPREL	SPLDL		

Figura 4.27: Sequência da proteína PAHO_HUMAN e sequência do peptídeo (hormônio pancreático) destacado em amarelo.

O próximo experimento de MS/MS realizado foi selecionando o íon m/z 5.808, presente apenas na amostra (normal) 1043-T. Este íon deve ser referente à insulina humana⁸⁸, uma vez que o pâncreas produz muito esta insulina. Portanto, o experimento de MS/MS foi realizado a fim de comprovar tal hipótese.

O espectro de massas após a colisão do íon com o gás apresentou um número pequeno de íons, ou seja, a molécula não fragmentou muito bem. Isto deve-se ao fato da insulina conter 3 ligações dissulfeto, duas intermolecular e uma intramolecular,

unindo as cadeias α e β (Figura 4.28). O espectro foi enviado à base de dados MASCOT, porém nenhuma proteína foi correlacionada devido a pouca informação espectral.

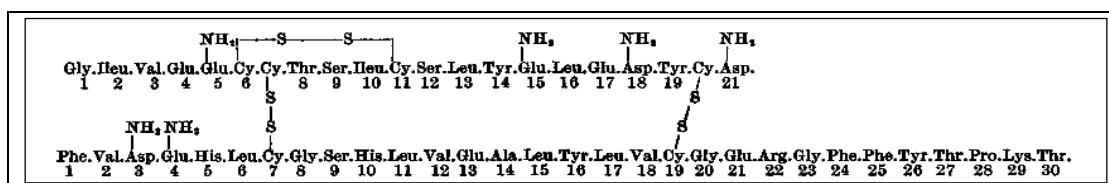


Figura 4.28: Estrutura da Insulina Humana.

Então, aplicou-se em uma placa de MALDI um padrão de insulina humana e matriz (SA) e realizou-se o experimento de MS/MS. O perfil espectral da insulina detectada diretamente no tecido foi o mesmo da proteína padrão (Figura 4.29), confirmando, portanto, que íon com m/z 5.808 refere-se à insulina humana (Cadeia β : FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT, Cadeia α : GIVEQCCTSICSLYQLENYCN e ligações de dissulfeto: β 7- α 7; β 19- α 20; α 6- α 11).

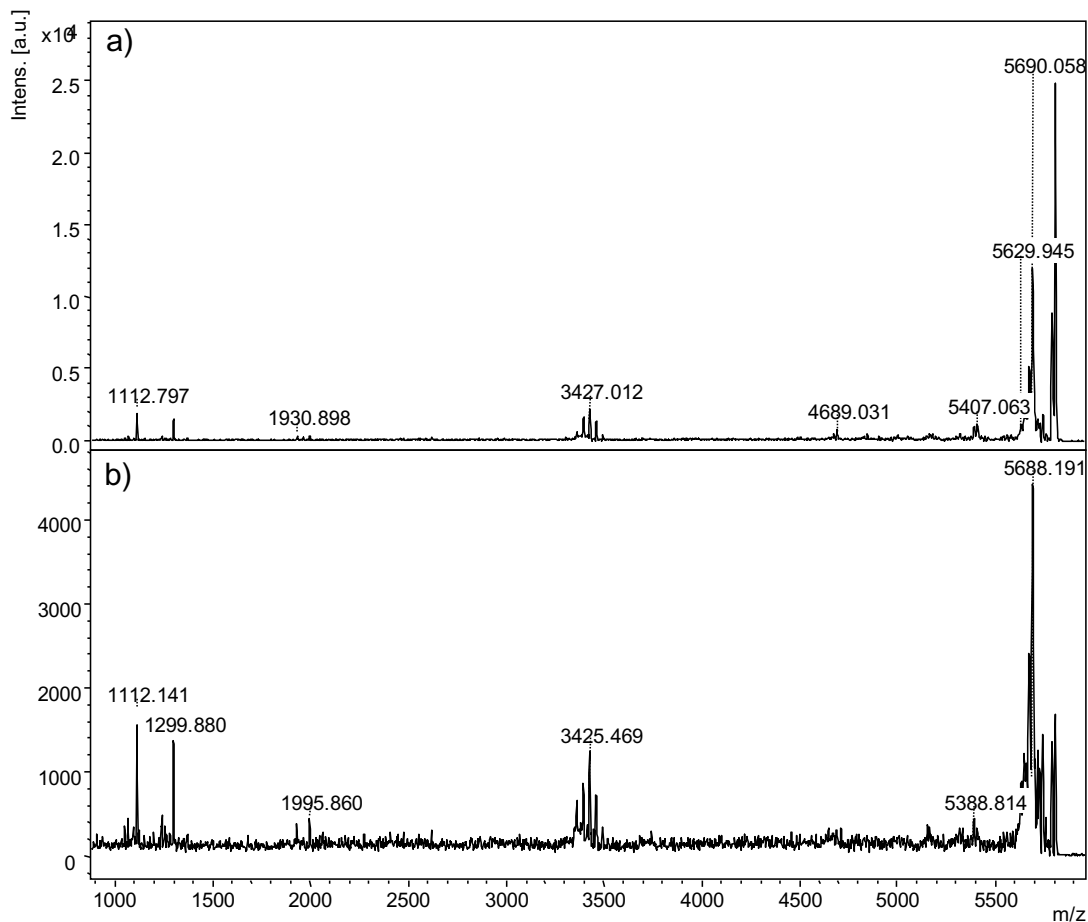


Figura 4.29: Espectro de massas MALDI-TOF/TOF da a) insulina humana padrão e b) da insulina presente na amostra analisada.

Até o momento foram identificadas as proteínas defensinas DEF1, DEF2 e DEF3 em tecidos com tumor e as proteínas hemoglobina subunidades α e β , glucagon, prohormônio pancreático (PAHO) e insulina em tecidos normais após os experimentos de MS, HRMS e MS/MS (Tabela 4.16).

Tabela 4.16: Proteínas identificadas e suas respectivas seqüências, o *m/z* experimental, e o modo de identificação utilizado.

Proteína	Seqüência	<i>m/z</i>	ID
TYB4_HUMAN (Timosina beta-4)	SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKQAGES	4965	MS/MS
GLUC_HUMAN (Glucagon)	HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT	3481.63471	HRMS MS/MS
INS_HUMAN (Insulina)	Insulin B chain: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT Insulin A chain: GIVEQCCTSCISLYQLENYCN Disulfide bond: B7-A7; B19-A20; A6-A11	5808.077	HRMS MS/MS
PAHO_HUMAN (Icosapeptídeo pancreático)	HKEDTLAFSEWGSPPAAVPR	2235.1	MS MS/MS
PAHO_HUMAN (Hormônio pancreático)	APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY	4182.2	MS
HBA_HUMAN (Hemoglobina subunidade alfa)	VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAELERMFLSFPTTKTYF PHFDLSHGSAQVKGHGKKVADALTNAVAHVDDMPNALSASDL HAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTPAVHASLDKFLAS VSTVLT SKYR	15127 7565	MS
HBB_HUMAN (Hemoglobina subunidade beta)	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFE SFGDLSTPDVAMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLNLTGTFA TLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHHFGKEFTPPVQAAY QKVVAGVANALAHKYH	15868 7935	MS
DEF1_HUMAN (Defensina neutrófila 1)	ACYCRIPACIAGERRYGTCTYQGRWAFCC	3440.49092	HRMS
DEF2_HUMAN (Defensina neutrófila 2)	CYCRIPACIAGERRYGTCTYQGRWAFCC	3369.44266	HRMS
DEF3_HUMAN (Defensina neutrófila 3)	DCYCRIPACIAGERRYGTCTYQGRWAFCC	3484.49359	HRMS

- Experimentos tradicionais de identificação proteica:

Algumas proteínas destacadas pelos programas estatísticos não foram possíveis de serem identificadas através do método de MS/MS no próprio tecido, devido à limitação desta técnica. A técnica de MALDI-TOF/TOF diretamente no tecido é utilizada com sucesso para amostras com *m/z* relativamente baixos (até ~ 4,000). Outro problema deste tipo de experimento é que moléculas com várias ligações de dissulfeto são dificilmente quebradas e, portanto, o espectro gerado de MS/MS não contém

muitos fragmentos do íon precursor. Com isso, as técnicas tradicionais de identificação proteica com a homogenização do tecido foram utilizadas nestes casos para alguns íons.

Conforme descrito na parte experimental, duas amostras foram homogenizadas, a 1086-T e 1149-T, as quais foram selecionadas por apresentarem uma maior quantidade dos íons relatados pelos programas estatísticos como interessante. Destaca-se o íon com m/z 6,243, o qual apareceu em grande intensidade em amostras normais e não foi detectado em amostras com tumor. As amostras selecionadas foram as que apresentaram a maior intensidade deste íon após os experimentos de MALDI-TOF.

As amostras foram misturadas e homogenizadas, uma com T-PER (amostra TH) e outra com T-PER com inibitor da protease (amostra PH). Portanto, todo o procedimento foi feito para ambas as amostra TH e PH.

As concentrações de proteínas nestas amostras foram determinadas através de um método colorimétrico para que as soluções fossem concentradas ou diluídas para separação cromatográfica por HPLC. Soluções padrões, brancos e as soluções com concentração desconhecida foram inseridas no espectrofotômetro, conforme descrito na parte experimental (Tabela 4.2), e o resultado foi reportado na tabela seguinte (Tabela 4.17).

Tabela 4.17: Valores de absorbância obtidos pelo método colorimétrico para as soluções padrões e amostras TH com concentrações desconhecidas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.349	0.360	0.414	0.502	0.622	0.801	0.909	1.075	1.163			
B	0.350	0.357	0.425	0.520	0.635	0.733	0.914	1.076	1.173			
C	0.346	0.360	0.449	0.497	0.649	0.822	0.928	1.056	1.133			
D												
E	1.313	0.544	0.346	0.340			0.358	0.233	0.340	0.337		
F	1.338	0.543	0.349	0.350			0.363	0.348	0.352	0.351		
G	1.343	0.519	0.343	0.360			0.367	0.352	0.356	0.371		
H												

A tabela mostrada a seguir (Tabela 4.18) relata os valores de absorbância obtidos para cada concentração em triplicata e quais os desvios observados. Então, a partir desta calibração, o programa gera outra tabela (Tabela 4.19) com os valores de absorbância dos extratos com concentrações desconhecidas e estipula uma concentração em µg/mL (valor relatado na coluna AdjConc.) para cada triplicata.

Tabela 4.18: Valores de absorbância e os desvios das medidas para as soluções padrões.

Padrões (µg/mL)

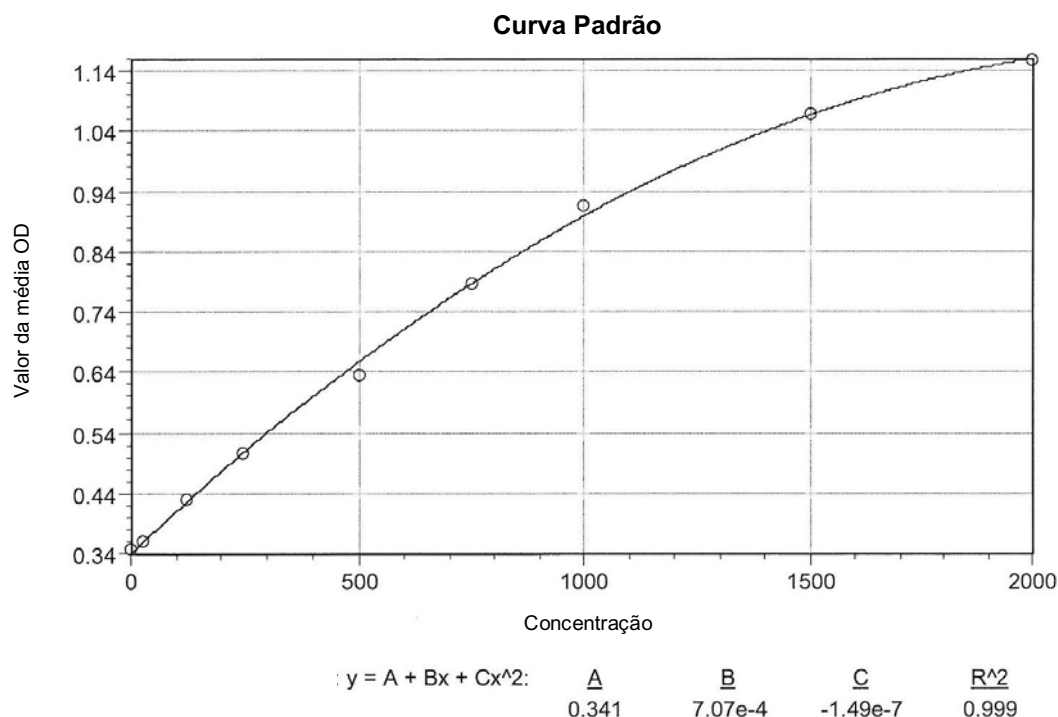
Amostra	Concentração	Calc. Conc.	Poços	OD	Média OD	Desvio	CV
St01	0,000	11,232	A1	0,349	0,348	0,002	0,5
		12,795	B1	0,350			
		7,684	C1	0,346			
St02	25,000	27,908	A2	0,360	0,359	0,002	0,6
		22,622	B2	0,357			
		27,336	C2	0,360			
St03	125,000	106,020	A3	0,414	0,429	0,018	4,1
		121,907	B3	0,425			
		158,410	C3	0,449			
St04	250,000	239,717	A4	0,502	0,506	0,012	2,4
		268,843	B4	0,520			
		232,027	C4	0,497			
St05	500,000	438,225	A5	0,622	0,635	0,013	2,1
		460,538	B5	0,635			
		484,711	C5	0,649			
St06	750,000	778,917	A6	0,801	0,785	0,046	5,9
		641,042	B6	0,733			
		822,187	C6	0,822			
St07	1000,000	1022,961	A7	0,909	0,917	0,010	1,1
		1035,427	B7	0,914			
		1072,252	C7	0,928			
St08	1500,000	1529,793	A8	1,075	1,069	0,011	1,1
		1534,168	B8	1,076			
		1457,876	C8	1,056			
St09	2000,000	2029,341	A9	1,163	1,157	0,021	1,8
		2141,107	B9	1,173			
		1808,485	C9	1,133			

Tabela 4.19: Valores de absorbância e concentrações ajustadas para os extratos proteicos.

Amostra	Poço	OD	Concentração	Média Conc.	Desvio	CV	Diluição	Conc Ajust.
Un01	E2	0,544	307,450	293,671	22,889	7,8	10,0	2936,714
	F2	0,543	306,314					
	G2	0,519	267,250					
Un02	E3	0,346	7,400	7,828	4,201	53,7	100,0	782,797
	F3	0,349	12,226					
	G3	0,343	3,858					
Un03	E4	0,340	-0,810	13,677	14,361	105,0	1000,0	13676,660
	F4	0,350	13,932					
	G4	0,360	27,908					
Un04	E8	0,233	-146,958	-40,502	92,239	227,7	10,0	-405,023
	F8	0,348	9,812					
	G8	0,352	15,639					
Un05	E9	0,340	-0,810	12,435	11,820	95,0	100,0	1243,539
	F9	0,352	16,208					
	G9	0,356	21,908					
Un06	E10	0,337	-5,187	17,384	24,394	140,3	1000,0	17383,672
	F10	0,351	14,074					
	G10	0,371	43,264					

O gráfico relacionando a concentração das soluções padrões com as absorbâncias detectadas após a análise colorimétrica apresentou um $R^2=0.999$, o que representa uma boa correlação e reprodutibilidade nos experimentos e a obtenção de uma leitura de dados com boa confiabilidade.

GRÁFICO 4.5. Absorbância x concentração das soluções padrões analisadas.



A concentração determinada para a amostra TH foi 2.936,714 µg/mL. Como a concentração indicada para injetar no sistema de HPLC utilizado era de 1.000 µg/mL, a solução precisou ser diluída três vezes (98:2 H₂O:ACN, 0,1% TFA). Se a solução tivesse sido injetada sem a determinação de sua concentração, provavelmente haveria uma saturação da coluna. Por isso esta etapa é muito importante. A concentração determinada para a amostra PH foi próxima a da TH, portanto, a mesma diluição foi realizada.

Após as amostras estarem com a concentração ideal para a injeção no HPLC, o experimento de separação cromatográfica foi realizado. As amostras foram injetadas em triplicatas (TH_S01, TH_S02, TH_S03; PH_S01, PH_S02, utilizando comprimento de onda no detector de UV de 214 nm e 280 nm. Os cromatogramas obtidos para cada amostra estão ilustrados a seguir (Figura 4.30 e 4.31).

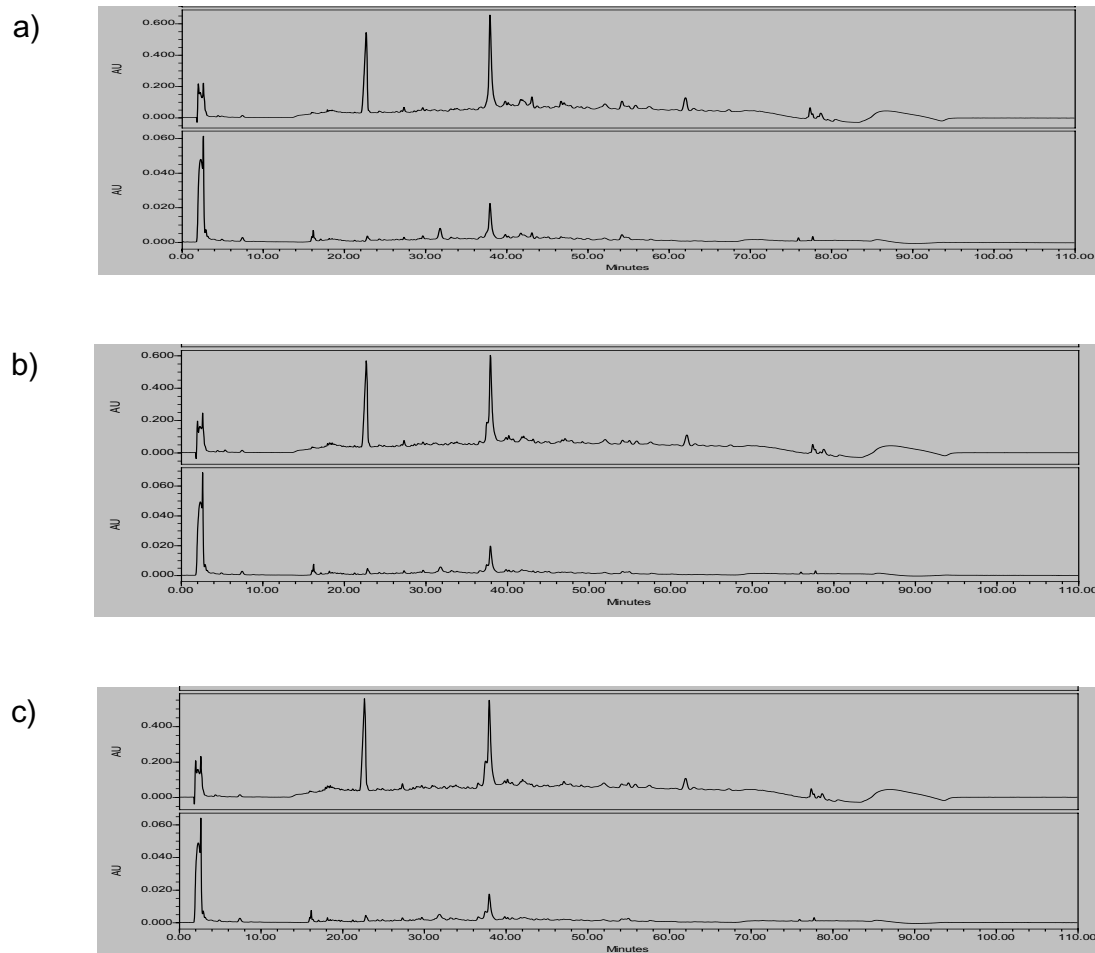


Figura 4.30: Cromatogramas das amostras a) TH_S01, b) TH_S02 e c) TH_S03 utilizando os comprimentos de onda 214nm e 280 nm no detector de UV.

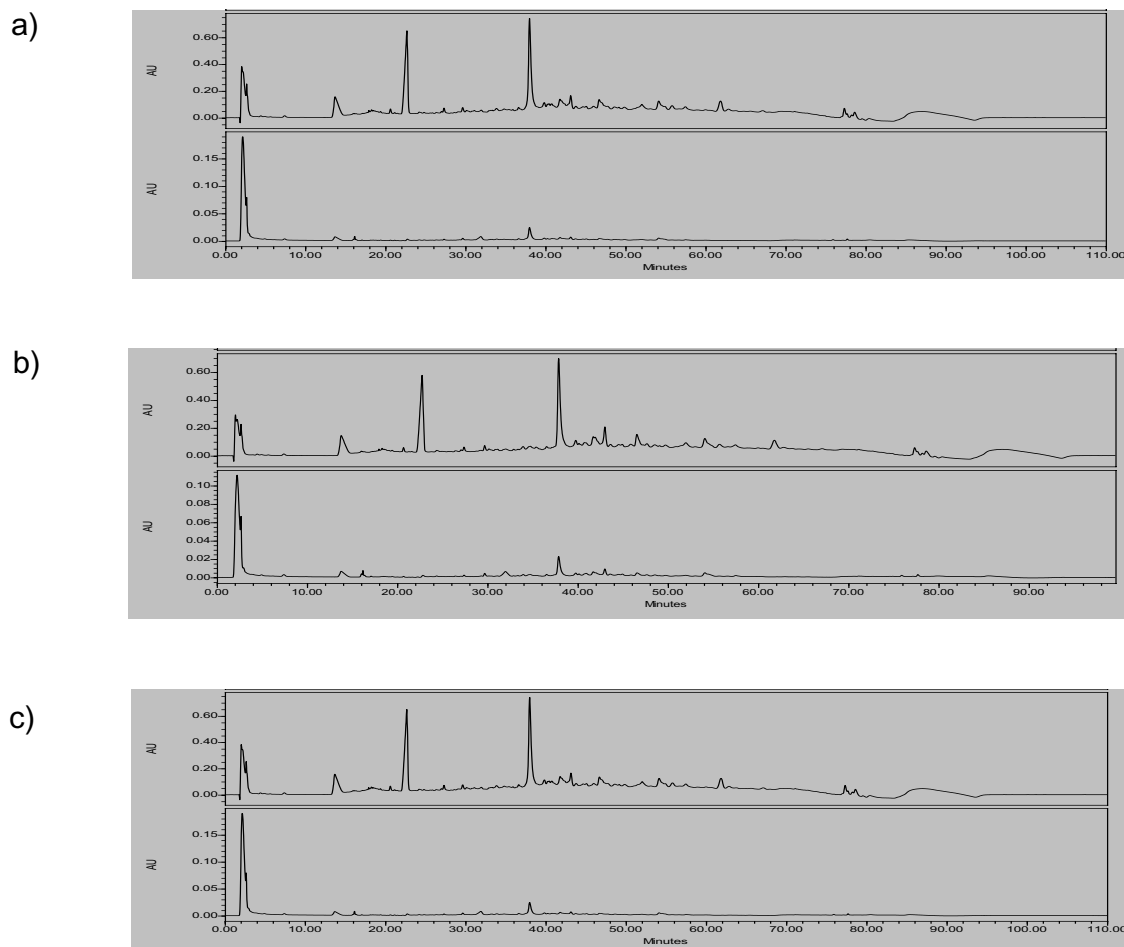


Figura 4.31: Cromatogramas das amostras a) PH_S01, b) PH_S02 e c) PH_S03 utilizando os comprimentos de onda 214nm e 280 nm no detector de UV.

Para cada amostra injetada no HPLC-UV, 96 frações foram coletadas em uma microplaca. A cada 1 min de corrida o sistema automático coletou uma fração em um poço da microplaca, portanto, a posição A1 corresponde a 1 min, B1 a 2 min, C1 a 3 min e assim sucessivamente. A microplaca era 8 x 12, portanto, as posições eram de A1 a H12.

Após a coleta das frações, todo o solvente da fase móvel da corrida foi evaporado e a amostra foi redissolvida em um solvente apropriado para a análise por MALDI. Cada amostra presente em um poço foi aplicada na placa de MALDI. Abaixo segue uma tabela (Tabela 4.20) com cada fração coletada na microplaca após o HPLC

Ambas as amostras TH_S01 e PH_S01 foram aplicadas intercaladamente na mesma placa de MALDI, apesar de terem sido coletadas em diferentes corridas. Como observado na Tabela 4.20, as frações referentes à amostra TH foram aplicadas nas posições A, C, E, G, I, K, M e O enquanto que as frações da amostra PH foram aplicadas nas posições B, D, F, H, J, L, N e P.

a)

Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.		
A1	A1	1	A2	A2	16	A3	A3	17	A4	A4	32	A5	A5	33	A6	A6	48	A7	A7	49	A8	A8	64	A9	A9	65	A10	A10	80	A11	A11	81	A12	A12	96
B1	C1	2	B2	C2	15	B3	C3	18	B4	C4	31	B5	C5	34	B6	C6	47	B7	C7	50	B8	C8	63	B9	C9	66	B10	C10	79	B11	C11	82	B12	C12	95
C1	E1	3	C2	E2	14	C3	E3	19	C4	E4	30	C5	E5	35	C6	E6	46	C7	E7	51	C8	E8	62	C9	E9	67	C10	E10	78	C11	E11	83	C12	E12	94
D1	G1	4	D2	G2	13	D3	G3	20	D4	G4	29	D5	G5	36	D6	G6	45	D7	G7	52	D8	G8	61	D9	G9	68	D10	G10	77	D11	G11	84	D12	G12	93
E1	I1	5	E2	I2	12	E3	I3	21	E4	I4	28	E5	I5	37	E6	I6	44	E7	I7	53	E8	I8	60	E9	I9	69	E10	I10	76	E11	I11	85	E12	I12	92
F1	K1	6	F2	K2	11	F3	K3	22	F4	K4	27	F5	K5	38	F6	K6	43	F7	K7	54	F8	K8	59	F9	K9	70	F10	K10	75	F11	K11	86	F12	K12	97
G1	M1	7	G2	M2	10	G3	M3	23	G4	M4	26	G5	M5	39	G6	M6	42	G7	M7	55	G8	M8	58	G9	M9	71	G10	M10	74	G11	M11	87	G12	M12	90
H1	O1	8	H2	O2	9	H3	O3	24	H4	O4	25	H5	O5	40	H6	O6	41	H7	O7	56	H8	O8	57	H9	O9	72	H10	O10	73	H11	O11	88	H12	O12	89

Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.			Min.								
A1	B1	1	A2	B2	16	A3	B3	17	A4	B4	32	A5	B5	33	A6	B6	48	A7	B7	49	A8	B8	64	A9	B9	65	A10	B10	80	A11	B11	81	A12	B12	96
B1	D1	2	B2	D2	15	B3	D3	18	B4	D4	31	B5	D5	34	B6	D6	47	B7	D7	50	B8	D8	63	B9	D9	66	B10	D10	79	B11	D11	82	B12	D12	95
C1	F1	3	C2	F2	14	C3	F3	19	C4	F4	30	C5	F5	35	C6	F6	46	C7	F7	51	C8	F8	62	C9	F9	67	C10	F10	78	C11	F11	83	C12	F12	94
D1	H1	4	D2	H2	13	D3	H3	20	D4	H4	29	D5	H5	36	D6	H6	45	D7	H7	52	D8	H8	61	D9	H9	68	D10	H10	77	D11	H11	84	D12	H12	93
E1	J1	5	E2	J2	12	E3	J3	21	E4	J4	28	E5	J5	37	E6	J6	44	E7	J7	53	E8	J8	60	E9	J9	69	E10	J10	76	E11	J11	85	E12	J12	92
F1	L1	6	F2	L2	11	F3	L3	22	F4	L4	27	F5	L5	38	F6	L6	43	F7	L7	54	F8	L8	59	F9	L9	70	F10	L10	75	F11	L11	86	F12	L12	91
G1	N1	7	G2	N2	10	G3	N3	23	G4	N4	26	G5	N5	39	G6	N6	42	G7	N7	55	G8	N8	58	G9	N9	71	G10	N10	74	G11	N11	87	G12	N12	90
H1	P1	8	H2	P2	9	H3	P3	24	H4	P4	25	H5	P5	40	H6	P6	41	H7	P7	56	H8	P8	57	H9	P9	72	H10	P10	73	H11	P11	88	H12	P12	89

154

depois a PH_S01. Após a análise, o equipamento indica quais as posições apresentaram um espectro de massas com sinais (círculo verde) e as que não apresentaram sinais significativos, apenas ruídos (círculo laranja) (Figura 4.32).

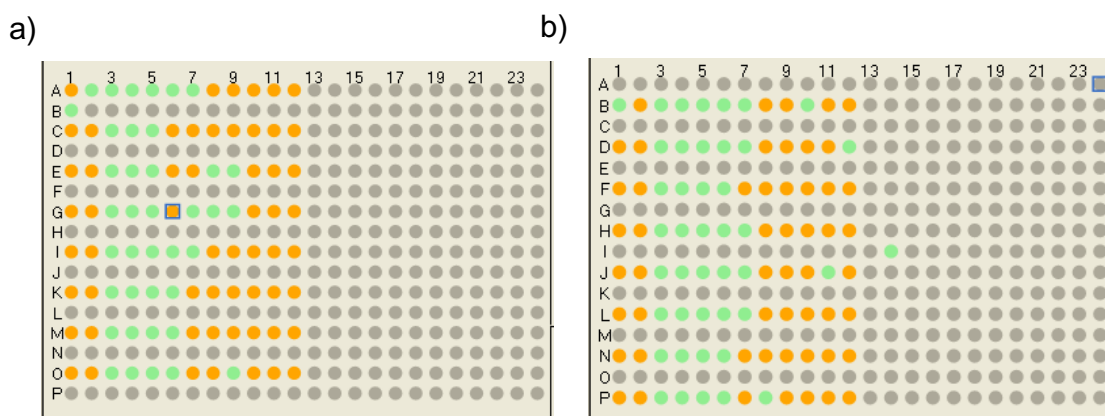


Figura 4.32: Posições na placa de MALDI que foram analisadas e que geraram (verde) ou não (laranja) espectros de massas com sinais, nos experimentos com as amostras a) TH_S01 e b) PH_S01.

Todos os espectros foram abertos simultaneamente no programa *FlexAnalysis* e as regiões dos íons de interesse foram ampliadas. A partir disso, foi possível identificar qual a posição na placa de MALDI referente à fração com o íon de interesse e conseqüentemente qual a posição da fração na microplaca de 96 poços e o tempo de coleta da mesma. Alguns íons de interesse foram detectados e o mais interessante foi que os íons estavam presentes em apenas um poço e o espectro de massas continha majoritariamente o íon desejado com poucos interferentes, ou seja, a separação cromatográfica foi realizada com boas condições para as amostras.

A tabela 4.21 representa os íons relatados como significativos a partir dos dois tratamentos estatísticos, ProTS Data e ClinProTools. Os íons circulados são os íons identificados previamente pelos métodos descritos anteriormente, como HRMS e MS/MS. Os íons com uma linha horizontal azul referem-se aos íons que foram indicados pelos tratamentos estatísticos como relevantes, mas que quando analisou-se

os espectros de massas, tratavam-se apenas de ruídos e *outliers*. As indicações em vermelho indicam a fração correspondente de cada íon detectado na placa de MALDI. No entanto, 4 íons (m/z 12.547, 12.504, 16.077 e 16.037) apesar de corresponderem a íons de interesse não foram detectados nesta amostra e estão denotados como ND (em preto). Observe que neste caso, como as amostras selecionadas para a etapa de identificação proteica por métodos clássicos foram amostras de pacientes com tecidos normais, apenas os íons referentes as colunas “Normal” e “Pancreatite” foram investigados.

Tabela 4.21. Íons detectados como significativos nas análises de ProTS Data e ClinProTools, e íons presentes em frações após a análise por MALDI .

Epitélio			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
11.654	6.243 G3, H3	11.653	G3, H3 6.242
11.044	6.448	10.838	14.836
8.417	15.27	8.453	ND 12.547
8.453	4.181 L4	13.156	ND 12.504
12.692	16.801	5.066	16.077
11.074	6.224	9.748	ND 16.037
13.157	6.013 I4, J4	5.044	15.127
10.838	5.808 I4, J4		4.182
9.748			15.869
9.779			4.199
9.764			
5.054			
5.067			
8.403			
5.045			
7.765			
9.91			

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Normal	Tumor	Normal
9.748	6.243 G3, H3	9.749	G3, H3 6.243
4.747	16.082 J6	3.439	J6 16.079
3.439	7.565	10.838	7.566
4.675	15.129	3.462	15.129
12.692	15.868	13.157	15.871
10.838	7.935	3.482	7.937
13.157		3.368	P4 14.837
5.417		3.407	J6, B5 8.041
3.368		3.394	
9.187			
3.482			

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Tumor	Pancreatite	Tumor	Pancreatite
5.067	5.808	5.067	5.808
	6.242 G3, H3	13.157	G3, H3 6.242
	6.014 I4, J4	10.838	
	5.825	3.434	
	6.631 P3		

Estroma			
ProTS		ClinProTools	
Maior intensidade em		Maior intensidade em	
Pancreatite	Normal	Pancreatite	Normal
3.482 G3, H3	5.044 D6	3.368	J6 16.078
3.368 G3, H3	16.083 J6	3.439	15.870
9.748	7.935	3.482	7.936
3.439 G3, H3	5.052 D5		16.494
	7.565		7.566
	15.868		15.128

* Íons em azul referem-se aos íons também encontrados na análise feita pelo ProTS Data, além da análise pelo Clin ProTools
 • ND = íons que apesar de serem interessantes não foram encontrados em nenhuma fração desta amostra

Os íons de interesse detectados e a posição do mesmo na placa de MALDI foram denominados como a posição na microplaca de 96 poços prosseguido da amostra em que está presente. O íon com m/z 6.243, por exemplo, foi detectado na mesma posição (D3) tanto na amostra TH_S01 (placa de MALDI G3) quanto na

amostra PH_S01 (placa de MALDI H3), portanto, D3_TH_S01 e D3_PH_S01. A detecção do íon na mesma posição faz sentido, pois as condições experimentais utilizadas foram as mesmas.

Com os dados pode-se observar que mais íons foram detectados na amostra que utilizou-se o reagente T-PER com inibidor de protease na etapa de homogenização, ou seja, quando não colocou inibidor, provavelmente, houve degradação da amostra. Além disso, os dois íons detectados sem a utilização do inibidor foram também detectados utilizando o inibidor (Tabela 4.22). Portanto, a utilização do inibidor realmente é necessária e muito útil.

Tabela 4.22: Íons de interesse selecionados após a detecção por MALDI-TOF, e respectivas as posições na microplaca de 96 poços e na placa de MALDI.

Íon m/z	Microplaca de 96 poços	Placa de MALDI
6,243	D3_PH_S01	H3
3,440	D3_PH_S01	H3
3,440	D3_PH_S01	H3
3,484	D3_PH_S01	H3
6,243	D3_TH_S01	G3
3,440	D3_TH_S01	G3
3,484	D3_TH_S01	G3
3,484	D3_TH_S01	G3
4,181	F4_PH_S01	L4
6,013	E4_TH_S01	I4
5,808	E4_PH_S01	J4
4,562	B5_PH_S01	D5
5,052	B5_PH_S01	D5
14,831	H4_PH_S01	P4
3,271	H4_PH_S01	P4
16,079	E6_PH_S01	J6
8,041	E6_PH_S01	J6
8,041	A5_PH_S01	B5
5,044	B6_PH_S01	D6
6,631	H3 PH 01	P3

A partir deste momento, o nome de cada amostra analisada referente ao íon de interesse será o apresentado na coluna da microplaca de 96 poços (Tabela 4.22) para facilitar a identificação e localização, pois é o lugar onde as amostras se encontram e em qual microplaca, a da amostra TH_S01 ou PH_S01.

As amostras foram então purificadas através da eletroforese em gel 1D. Conforme foi descrito anteriormente, o sistema utilizado pode correr dois géis simultaneamente. A partir do nosso esquema de aplicação de amostra intercalada e aplicação do padrão, analisou-se 4 amostras em cada gel, um total de 8 amostras por corrida. Dos íons interessantes apresentados na tabela 4.22, foram selecionadas as amostras que apresentavam mais de um íon de interesse, as quais apresentaram um sinal do íon com alta intensidade nos espectros de massas (íons pouco intensos não foram selecionados) e no caso de íons que estava em mais de uma amostra, apenas uma delas foi selecionada, pois este era um experimento teste e se não funcionasse perderia a amostra. Vale ressaltar também que os experimentos de análise de MALDI-TOF e eletroforese por gel 1D foi realizado apenas para a primeira injeção das amostras TH e PH, as microplacas de 96 poços das outras injeções (S02 e S03) das amostras foram armazenadas no freezer a - 80°C caso estes experimentos não apresentassem bons resultados e fosse necessário modificar algumas condições.

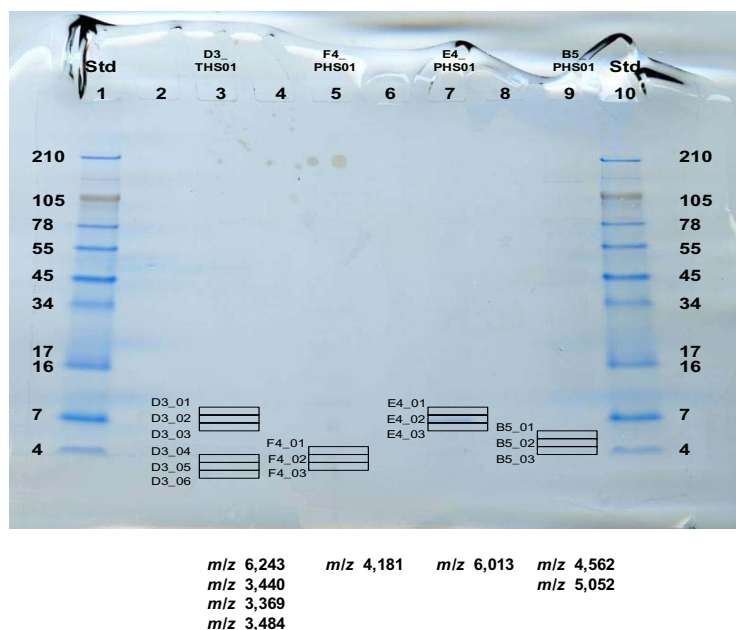
As amostras selecionadas e a respectiva posição aplicada no gel estão ilustradas na tabela a seguir (Tabela 4.23).

Tabela 4.23: Posição de cada amostra aplicada no gel 1 e 2.

Gel 1									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Padrão		D3_TH_S01		F4_PH_S01		E4_PH_S01		B5_PH_S01	Padrão
Gel 2									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Padrão		H4_TH_S01		E6_PH_S01		B6_PH_S01		H3_PH_S01	Padrão

Logo após todo o procedimento de eletroforese capilar, os géis foram analisados. Como foram utilizados os padrões de massas, em cada extremidade do gel está indicada a massa referente ao composto detectado. A partir disto, as regiões referentes à massa do íon analisado foram marcadas e recortadas com uma margem de erro acima e abaixo da massa esperada, para evitar perda da substância. Cada mancha foi marcada em ordem numérica começando sempre pela mancha com massa mais alta. Algumas amostras continham mais de um íon de interesse, como, por exemplo, a D3_TH_S01 que apresentou o íon m/z 6.243 e os íons m/z 3.440, 3.369 e 3.884, por isso, mais de uma região foram cortadas do gel (Figura 4.33). Abaixo do gel e de cada amostra está indicado os íons de interesses detectados por MALDI-TOF, para facilitar ao cortar a região correta do gel.

a)



b)

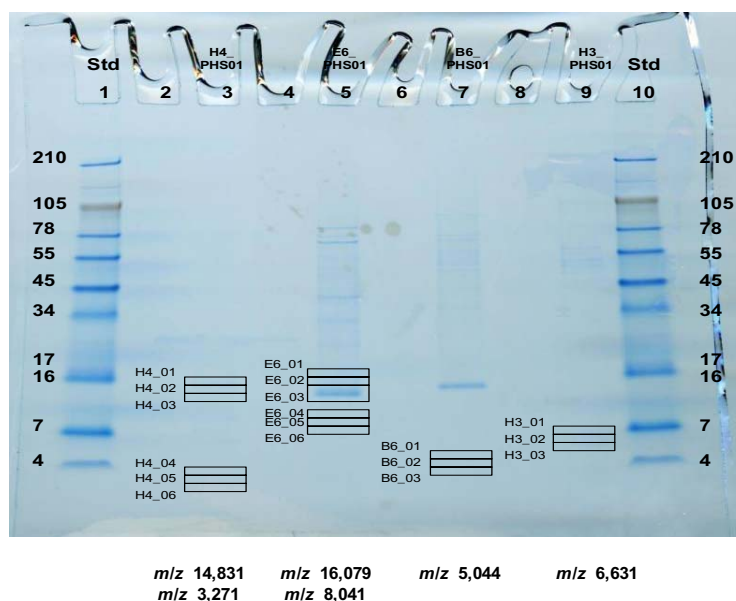


Figura 4.33: a) Gel 1 e b) Gel 2 após eletroforese em gel 1D.

Após a mancha ser recortada, realizou-se a digestão trípica para remoção da proteína. Com isso, uma solução peptídica foi obtida para cada pedaço de gel extraído e esta foi injetada no sistema de nanoLC-MS/MS. Inicialmente, foram analisadas as amostras com maior interesse: D3_01_TH a D3_06_TH; E4_02_PH; E6_03_PH;

F4_02_PH e B5_02_PH. No dia seguinte foram analisadas as amostras: H4_02_PH; H4_05_PH; E6_05_PH; B6_02_PH; H3_02_PH; E6_02_PH; B5_01_PH; H4_01_PH; E4_01_PH; F4_03_PH e H4_04_PH.

Após aquisição dos espectros de massas, os arquivos foram submetidos a base de dados MASCOT, com tolerância 1.2 para peptídeo e 0.6 para MS/MS, com as modificações possíveis de Carbamidometil (C) e Oxidação (M) e procura na base de dados de Homo-Sapiens.

Como resultado, as proteínas defensinas DEF_1 e DEF_3 foram detectadas na amostra D3_04_TH_S01, o que confirma então a suposição inicial destas proteínas serem referentes aos m/z 3,440, 3,369 e 3,484 que foram apresentados em maior intensidade em amostras com tumor. A proteína referente ao m/z 6.243 também foi identificada, porém encontra-se em sigilo até a confirmação exata da mesma.

5. CONCLUSÃO:

A idéia inicial do projeto foi determinar reações específicas para os diferentes AA's a temperatura ambiente, principalmente, reações que diferenciasssem os isômeros, lisina e glutamina. Uma reação descrita com sucesso na literatura é a conversão do íon pirílio ao piridínio, a partir da reação com uma amina. Realizou-se esta reação inicialmente em fase aquosa, para então realizar a reação *in situ*, utilizando as técnicas de FD-ESI e EASI. Outras reações foram testadas também, mas sem sucesso, uma vez que o produto reacional não era o esperado e a intensidade dos sinais era muito baixa. A técnica de EASI foi a que apresentou uma melhor sensibilidade na detecção do produto formado da reação do íon pirílio e lisina. A serina também reagiu, porém com uma menor intensidade, e os demais AA não apresentaram sinais referentes aos produtos de reação. Ou seja, a partir de uma reação *in situ* de um reagente e AA, utilizando a fonte de EASI, foi possível verificar uma reação específica para a lisina, com o pirílio, o que é muito interessante, uma vez que a reação não ocorre com o isômero glutamina. Este dado é promissor e sua aplicabilidade será objeto de estudos em nosso grupo de trabalho.

Os estudos estrutura/reactividade dos íons fragmentos a, b e y de peptídeos padrões foram realizados utilizando-se reações em fase gasosa e mobilidade iônica. O estudo reacional indicou que a reatividade do íon, independente da sua estrutura química, diminui drasticamente à medida que sua cadeia molecular cresce. Os resultados obtidos após o estudo reacional indicaram que quanto maior a estrutura do íon fragmento, menor a reatividade e isto provavelmente se deve ao fato de que quando maior o íon, sua conformação começa a se enovelar, e conseqüentemente, o sítio reacional fica mais protegido, dificultando ou impedindo a reação. Outro fator que pode diminuir a reatividade dos íons com o aumento da sua cadeia é que há uma chance, cada vez maior, do reagente colidir com a cadeia inerte da molécula ao invés do sítio reacional.

Com os experimentos de mobilidade iônica, foi possível determinar a mobilidade de cada íon fragmento dos peptídeos analisados e verificar que quanto maior o íon, mais tempo este leva para atravessar a cela de *tri-wave* do equipamento. No entanto, quando se investigou a correlação entre a razão m/z do íon e o tempo que o íon levou para atravessar a cela (*drift time*), uma razão linear ou logarítmica foi detectada, ambas

com $R^2 \sim 1$. Ou seja, não foi possível concluir se o tamanho do íon está relacionado diretamente com o tempo de retenção e com isso a estrutura seria linear, ou se o íon atravessa mais rápido do que o esperado conforme aumenta o seu tamanho, o que indicaria uma estrutura enovelada. Cálculos teóricos para determinar a estrutura mais estável de cada íon α , β e γ da Angiotensina II na forma enovelada e linear foram realizados bem como cálculos para a determinação da mobilidade teórica de cada íon, porém os valores obtidos foram muito próximos para os íons testados e nenhum dado conclusivo foi obtido. O ideal seria realizar o experimento para íons fragmentos de peptídeos maiores, pois ao extrapolar as retas de correlação entre m/z e *drift time* observou-se que para íons maiores, o tempo que o íon leva a atravessar a cela é muito diferente e claramente distinguível.

A utilização da espectrometria de massas por imageamento químico seletivo na busca de biomarcadores proteicos foi realizada em tecidos com câncer pancreático. Foi possível comparar amostras removidas de pacientes com pâncreas normal, com tumor e com pancreatite a nível celular, como por exemplo, estroma e epitélio. Proteínas candidatas a biomarcadores foram detectadas e algumas foram inclusive identificadas a partir de experimentos *MS/MS* e *HRMS* no tecido intacto, como a Insulina, Hemoglobina, PAHO e Glucagon, com a vantagem de manter a posição espacial das proteínas no tecido analisado. Estudos de identificação proteica após a homogenização do tecido e preparação de um extrato também foram realizados. Utilizou-se métodos tradicionais para separação da proteína por HPLC e gel 1D e identificou-se os peptídeos extraídos por experimentos de *MS/MS*. A partir destes experimentos foi possível detectar outras proteínas que apresentaram potenciais a ser um biomarcador, como as defensinas DEF 1, DEF 2 e DEF3.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- [1] Slemmon, J.R.; Hughes, C.M.; Campbell, G.A.; Flood, D.G. *J. Neurosci.*, **1994**, 4 (4), 2225-35.
- [2] Schulte, I.; Tammen, H.; Selle, H.; Jnappe, P.S. *Exp. Rev. Moll. Diag.*, **2005**, 5 (2), 145-157.
- [3] Westerlund-Wikstrom B. *Int. J. Med. Microbiolog.*, **2000**, 290 (3), 223-230.
- [4] Haqqe, Z.U. *Royal Society of Chem.*, **1991**, 82, 159-170.
- [5] Frank, R. *J. of Immunological Methods*, **2002**, 267 (1), 13-26.
- [6] LeBaron, R.G.; Athanasion, K.A. *Tissue Engineering*, **2000**, 6 (2), 85-103.
- [7] Boggiano, C.; Reixach, N.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E. *Biopolymers*, **2003**, 71(2), 103-116.
- [8] Aebersold, R.; Mann, M. *Nature*, **2003**, 422, 198-207.
- [9] Steen, H.; Mann, M. *Molecular Cell Biology*, **2004**, 5, 699-711.
- [10] Eng, J.K.; McCormack, A.L.; Yates, J.R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 976-989
- [11] Amott, D.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. *Clin. Chem.*, **1993**, 2005-2010.
- [12] Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M.; *Science*, **2006**, 311 (5767), 1566-70.
- [13]- Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 2901-2905.
- [14] Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; Sá, G. F.; Souza, V.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (20), 7882-7886.
- [14a] Haddad, R.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2007**, 80, 898-903.
- [14b] Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (8), 2744-2750.
- [14c] Eberlin, L. S.; Abdelnur, P. V.; Passero, A.; Sá, G. F.; Souza, V.; Eberlin, M. N. *Analyst* **2009**, 134, 1652-1657.
- [15] Shieh, I. F.; Lee, C. Y.; Shiea, J. *J. of Prot. Res.*, **2005**, 4, 606-612.
- [16] Chang, D.-Y.; Lee, C.-C.; Shiea, J. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2465.
- [17] Eberlin, M. N.; Corilo, Y. E.; Catharino, R. R.; Abdelnur, P. V. *55th ASMS Conference on Mass Spectrometry*, **2007**, Indianapolis, IN, USA.
- [18] Eberlin, L. S.; Xia, Y.; Chen, H.; Cooks, R. G.; *J. of Am. Soc. of Mass Spectr.*, **2008**, 19 (12), 1897-1905.
- [19] Roth, K. D. W.; Huang, Z. H.; Sadagopan, N.; Watson, J. T. *Mass Spectr. Reviews*, **1998**, 17, 255-274.
- [20] Yalcin, T.; Khouw, C.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G. *J. of Am. Soc. for Mass Spectr.*, **1995**, 6, 1165-1174.
- [21] Tang, X. J.; Boyd, R. K. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, **1994**, 8, 678-686.

- [22] Yagüe, J.; Paradela, A.; Ramos, M.; Ogueta, S.; Marina, A.; Barahona, F.; de Castro, J. A. Lopes; Vázquez. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 1524-1535.
- [23] Harrison, A. G.; Young, A. B.; Bleiholder, C.; Suhai, S.; Paizs, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 10364-10365.
- [24] Garcia, I., R.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Gaskell, S. J. *J. of Am. Soc. for Mass Spectr.*, **2008**, 19, 609-613.
- [25] Garcia, I., R.; Giles, K.; Bateman, R. H.; Gaskell, S. J. *J. of Am. Soc. for Mass Spectr.*, **2008**, 19, 1781-1787.
- [26] Meurer, E. C.; Moraes, L. A. B.; Eberlin, M. N. *Intern. Journal of Mass Spectr.*, **2001**, 212, 445-454.
- [27] Tholassinos, K.; Grabenauer, M.; Slade, S. E.; Hilton, G. R.; Bowers, M. T.; Scrivens, J. H. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(1), 248-254.
- [28] Scarff, C. A.; Patel, V. J.; Thalassinos, K.; Scrivens, J. H. *J. of Am. Soc. for Mass Spectr.*, **2009**, 20, 625-631.
- [29] Frisch, M. J., *et al. J. A.Pople, Gaussian 03, Revision B.05*; Pittsburgh, PA, **2003**.
- [30] Mesleh, M. F., *et al. J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 16082-16086.
- [31] Shvartsburg, A. A.; Jarrold, M. F. *Chem. Phys. Lett.*, **1996**, 261, 86-91.
- [32] Rifai, N.; Gillette, M. A.; Carr, S. A. *Nature Biotechnology*, **2006**, 24, 971-983.
- [33] Aebersold, R.; Anderson, L.; Caprioli, R.; Druker, B.; Hartwell, L.; Smith, R. *J Proteome Res.*, **2005**, 4, 1104-1109.
- [34] Blennow, K. *J. of Amer. Society for Experim.I Neurotherap.*, **2004**, 1, 213-225.
- [35] Oe, T.; Ackermann, B. L.; Inoue, K.; Berna, M. J.; Garner, C. O.; Gelfanova, V.; Dean, R. A.; Siemers, E. R.; Holtzman, D. M.; Farlow, M. R.; Blair, I. A. *Rapid Commun.Mass Spectr.*, **2006**, 20, 3723-3735.
- [36] Nagalla, S. R.; Canick, J. A.; Jacob, T.; Schneider, K. A.; Reddy, A. P.; Thomas, A.; Dasari, S.; Lu, X.; Lapidus, J. A.; Lambert-Messerlian, J. M.; Gravett, M. G.; Roberts-Jr., C. T.; Luthy, D.; Malone, F. D.; D'Alton, M. E. *J Proteome Res*, **2007**, 6, 1245-1257.
- [37] Metz, T. O.; Qian, W.-J.; Jacobs, J. M.; Gritsenko, M. A.; Moore, R. J.; Polpitiya, A. D.; Monroe, M. E.; Camp II, D. G.; Mueller, P. W.; Smith, R. D. *J Proteome Res*, **2008**, 7, 698-707.
- [38] Lam, T. C.; Li, K.-K.; Lo, S. C. L.; Guggenheim, J. A.; To, X. Y.; *J Proteome Res*, **2007**, 6, 4135-4149.
- [39] Kim, N.; Lee, Y.; Kim, H.; Joo, H.; Youm, J. B.; Park, W. S.; Warda, W.; Han, D. V. C. *Proteomics*, **2006**, 6, 1237-1249.

- [40] Vivanco, F.; Martin-Ventura, J. L.; Duran, M. C.; Barderas, M. G.; Blanco-Colio, L.; Dardé, V. M.; Mas, S.; Meilhac, O.; Michel, J. B.; Tuñón, J.; Egido, J. *J Proteome Res*, **2005**, 4, 1181-1191.
- [41] Ferri, N.; Paoletti, R.; Corsini, A. *Biomarkers*, **2005**, 10, 219-237.
- [42] Leman, E. S.; Getzenberg, R. H. *J. Cell. Biochem.*, **2002**, 86, 213-223.
- [43] Grossklaus, D. J.; Smith-Jr., J. A.; Shappell, S.B.; Coffey, C. S.; Chang, S. S.; Cookson, M. S. *Urol. Oncol.*, **2002**, 7, 195–198.
- [44] Barnidge, D. R.; Goodmanson, M. K.; Klee, G. G.; Muddiman, D. C. *J Proteome Res*, **2004**, 3, 644-652.
- [45] Hutchinson, L. M.; Chang, E. L.; Becker, C. M.; Ushiyama, N.; Behonick, D.; Shih, M.-C.; DeWolf, W. C.; Gaston, S. M.; Zetter, B. R. *Clin. Biochem.*, **2005**, 38, 558-571.
- [46] Chen, R.; Yi, E. C.; Donohoe, E.; Pan, S.; Eng, J.; Cooke, K.; Crispin, D. A.; Lane, Z.; Goodlett, D. R.; Bronner, M. P.; Aebersold, R. *Gastroent.*, **2005**, 129, 1187–1197.
- [47] Grønborg, M.; Kristiansen, T. Z.; Iwahori, A.; Chang, R.; Reddy, R.; Sato, N.; Molina, H.; Jensen, O. N.; Hruban, R. H.; Goggins, M. G.; Maitra, A.; Pandey, A. *Mol. & Cell. Proteomics*, **2006**, 5, 157–171.
- [48] Chen, R.; Brentnall, T. A.; Pan, S.; Cooke, K.; Moyes, K. W.; Lane, Z.; Crispin, D. A.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Bronner, M. P. *Mol. & Cell. Proteomics*, **2007**, 6, 1331–1342.
- [49] Heo, S.-H.; Lee, S.-J.; Ryoo, H.-M.; Park, J.-Y.; Cho, J.-Y. *Proteomics*, **2007**, 7, 4292–4302.
- [50] Ueda, K.; Katagiri, T.; Shimada, T.; Irie, S.; Sato, T.-A.; Nakamura, Y.; Daigo, Y. *J Proteome Res*, **2007**, 6, 3475-3483.
- [51] Williams, T. I.; Troups, K. L.; Saggese, D. A.; Kalli, K. R.; Cliby, W. A.; Muddiman, D. C. *J Proteome Res*, **2007**, 6, 2936-2962.
- [52] Ye, B.; Cramer, D. W.; Skates, S. J.; Gygi, S. P.; Pratomo, V.; Fu, L.; Horick, N. K.; Licklider, L. J.; Schorge, J. O.; Berkowitz, R. S.; Mok, S. C. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 2904-2911.
- [53] Snyder, M. *J Proteome Res*, **2008**, 7, 19-21.
- [54] Gortzak-Uzan, L.; Ignatchenko, A.; Evangelou, A. I.; Agochiya, M.; Brown, K. A.; St-Onge, P.; Kireeva, I.; Schmitt-Ulms, G.; Brown, T. J.; Murphy, J.; Rosen, B.; Shaw, P.; Jurisica, I.; Kislinger, T. *J Proteome Res*, **2008**, 7, 339-351.
- [55] Umar, A.; Luidier, T. M.; Foekens, J. A.; Pasă-Tolic, L. *Proteomics*, **2007**, 7, 323-329.

- [56] Song, X. C.; Fu, G.; Yang, X.; Jiang, Z.; Wang, Y.; Zhou, G. W. *Mol. & Cel. Proteomics*, **2008**, 7, 163-169.
- [57] Ricolleau, G.; Charbonnel, C.; Lodé, L.; Loussouarn, D.; Joalland, M/-P.; Bogumil, R.; Jourdain, S.; Minvielle, S.; Campone, M.; Déporte-Fety, R.; Campion, L.; Jézéquel, P. *Proteomics*, **2006**, 6, 1963–1975.
- [58] Ross, J. R.; Fletcher, J. A.; Linette, G. P.; Stec, J.; Clark, E.; Ayers, M.; Symmans, W. F.; Pusztai, L.; Bloom, K. J. *The Oncologist*, **2003**, 8, 307-325.
- [59] Sun, S.; Lee, N. P. Y.; Poon, R. T. P.; Fan, S.-T.; He, Q. Y.; Lau, G. K.; Luk, J. M. *Liver Intern.*, **2007**, 1021-1038.
- [60] Feng, J.-T.; Liu, Y.-K.; Song, H.-Y.; Dai, Z.; Qin, L.-X.; Almofti, M.-R.; Fang, C.-Y.; Lu, H.-J.; Yang, P.-Y.; Tang, Z.-Y. *Proteomics*, **2005**, 5, 4581–4588.
- [61] Yi, X.; Luk, J. M.; Lee, N. P.; Peng, J.; Leng, X.; Guan, X.-Y.; Lau, G. K.; Beretta, L.; Fan, S.T. *Mol. & Cell. Proteomics*, **2008**, MCP 7, 315-25.
- [62] Theodorescu, D.; Wittke, S.; Ross, M. M.; Walden, M.; Conaway, M.; Just, I.; Mischak, H.; Frierson, H. F. *Lancet Oncol.*, **2006**, 7, 230–240.
- [63] Melle, C.; Bogumil, R.; Ernst, G.; Schimmel, B.; Bleul, A.; vonEggeling, F. *Proteomics*, **2006**, 6, 2600–2608.
- [64] Abdul-Salam, V. B.; Paul, G. A.; Ali, J. A.; Gibbs, S. R.; Rahman, D.; Taylor, G. W.; Wilkins, M. R.; Edwards, R. J. *Proteomics*, **2006**, 6, 2286–2294.
- [65] Seliger, B.; Dressler, S. P.; Lichtenfels, R.; Kellner, R. *Proteomics*, **2007**, 7, 4601–4612.
- [66] Li, H.; DeSouza, L. V.; Ghanny, S.; Li, W.; Romaschin, A. D.; Colgan, T. J.; Siu, O. K. W. M. *J Proteome Res*, **2007**, 6, 2615-2622.
- [67] Pereira, L.; Reddy, A. P.; Jacob, T.; Thomas, A.; Schneider, K. A.; Dasari, S.; Lapidus, J. A.; Lu, X.; Rodland, M.; Roberts-Jr, X. T.; Gravett, M. G.; Nagalla, S. R. *J. of Prot. Res*, **2007**, 6, 1269-1276.
- [68] Ruetschi, U.; Rosen, A.; Karlsson, G.; Zetterberg, H.; Rymo, L.; Hagberg, H.; Jacobsson, B. *J Proteome Res*, **2005**, 4, 2236-2242.
- [69] Vissers, J. P. C.; Langridge, J.; Aerts, J. M. F. G. *Mol. & Cell. Proteomics*, **2007**, 6, 755–766.
- [70] Liang, S.-L.; Chan, D. W. *Clinica Chimica Acta*, **2007**, 381, 93-97.
- [71] Seibert, V.; Mathias, P. A.; Buschmann, T. *Briefings in functional genomics and proteomics*, **2005**, 4, 16-26.
- [72] Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Curr Opin Chem Biol*, **2007**, 11(1), 29-35.

- [73] Caprioli, R. M. *Proteomics*, **2008**, 8, 3679-3680.
- [74] Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat Med*, **2001**, 7(4), 493-496.
- [75] Andersson, M.; Groseclose, M. R.; Deutch, A. Y.; Caprioli, R. M. *Nat. Methods*, **2008**, 5(1), 101-8.
- [76] Chaurand, P.; Schriver, K. E.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom*, **2007**, 42(4), 476-89.
- [77] Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Nat Methods*, **2007**, 4(10), 828-33.
- [78] Cornett, D. S.; Frappier, S. L.; Caprioli, R. M. *Anal Chem*, **2008**, 80(14), 5648-53.
- [79] McLean, J.A.; Ridenour, W.B.; Caprioli, R.M. *J Mass Spectrom*, **2007**, 42(8), 1099-105.
- [80] Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom*, **2007**, 42(2), 254-62.
- [81] Chaurand, P.; Latham, J. C.; Lane, K. B.; Mobley, J. A.; Polosukhin, V. V.; Wirth, P. S.; Nanney, L. B.; Caprioli, R. M. *J Proteome Res*, **2008**, 7(8), 3543-3555.
- [82] Groseclose, M. R.; Massion, P. P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics*, **2008**, 8(18), 3715-24.
- [83] Burnum, K. E.; Tranguch, S.; Mi, D.; Daikoku, T.; Dey, S. K.; Caprioli, R. M. *Endocrinology*, **2008**, 149(7), 3274-8.
- [84] Andersson, M.; Groseclose, M. R.; Deutch, A. Y.; Caprioli, R. M. *Nat Methods*, **2008**, 5(1), 101-8.
- [85] Sinha, T. K.; Khatib-Shahidi, S.; Yankeelov, T. E.; Mapara, K.; Ehtesham, M.; Cornett, D. S.; Dawant, B. M.; Caprioli, R. M.; Gore, J. C. *Nat Methods*, **2008**, 5(1), 57-9.
- [86] Grey, A. C.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M.; Schey, K. L. *J Proteome Res*, **2009**, 8(7), 3278-83.
- [87] Cooks, R. G.; Chen, H.; Eberlin, M. N.; Zheng, X.; Tao, A. *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 188-211.
- [88] Bell, G. I.; Pictet, R. L.; Rutter, W. J.; Cordell, B.; Tischer, E.; Goodman, H. M. *Nature*, **1980**, 284, 26-32.