

NEUROPROTEÓMICA: À PROCURA DO (DES)CONHECIDO!

BRUNO MANADAS*

A neuroproteômica é uma área de investigação que integra o conhecimento gerado a partir de expedições de procura de informação (proteínas) em tecidos do sistema nervoso com o papel que essa informação representa e desempenha. A grande maioria do conhecimento alcançado nesta área passa pela utilização da espectrometria de massa enquanto recurso para a obtenção de informação estrutural de proteínas e/ou péptidos. O desenvolvimento observado nos últimos anos na preparação das amostras, análise por espectrometria de massa e a integração da enorme quantidade de dados gerados com os mecanismos fisiológicos e patofisiológicos, representam um salto quantitativo e qualitativo significativo no nosso conhecimento. A espectrometria de massa é hoje uma ferramenta não só essencial, mas imprescindível para o conhecimento do cérebro e de todo o sistema nervoso.

O cérebro é um órgão fascinante pelo seu nível de complexidade e capacidade. É constituído por diversos tecidos e tipos de células. Entre estas contam-se mais de 10 mil milhões de neurónios que comunicam entre si por mais de 100 biliões de sinapses. Cada sinapse é um elemento chave no fluxo contínuo de informação e assume uma identidade única com subdomínios de especialização (Figura 1A-E). Este nível de especialização é sem dúvida fascinante, mas dificulta a caracterização destes domínios pelo seu reduzido conteúdo proteico. O estudo da composição proteica do cérebro, de tecidos, de células, ou mesmo de compartimentos específicos, envolve a decisão da escolha do método de fracionamento com potencial de gerar mais e melhores resultados. Do ponto de vista de diminuição da complexidade proteica, a escolha do melhor método não será certamente consensual. Os diversos métodos disponíveis apresentarão as suas vantagens e desvantagens, possivelmente com o fracionamento por gel de SDS (1D-SDS-PAGE) como exemplo de um método simples e rápido de executar. Técnicas mais elaboradas como os géis bidimensionais (2D-SDS-PAGE) podem demorar vários dias a concluir, possuindo no entanto um maior poder de resolução. Para além destas, são atualmente utilizadas múltiplas separações cromatográficas (Figura 2),

diferentes técnicas de centrifugação, filtração, isolamento de organelos, hidrofobicidade, entre outras.

O fracionamento proteico permite assim diminuir a complexidade da amostra inicial antes do processo de digestão, normalmente com recurso à enzima tripsina. Uma mistura complexa de péptidos é posteriormente analisada, quer diretamente por espectrometria de massa, quer por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). Os espectros obtidos são posteriormente relacionados com

bases de dados que permitem a identificação do complemento proteico do genoma (Figura 1F-I). Este processo poderá assim ser indicado como o fluxo de trabalho na área da neuroproteômica, cujo principal objetivo é o da identificação do proteoma em tecidos do sistema nervoso. No entanto, esta definição “simplista” encontra-se longe de fazer jus à complexidade dos estudos envolvidos.

Independentemente das técnicas usadas para o fracionamento das proteínas, a espectrometria de massa é

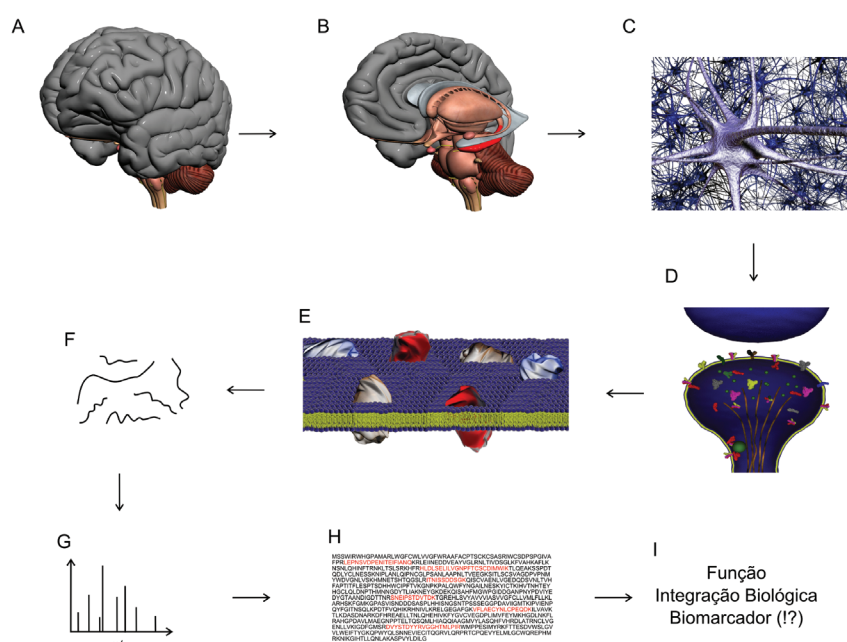


Figura 1 – Fluxo de trabalho em neuroproteômica. Seleção ou isolamento do órgão, tecido, células ou domínios: cérebro (A), hipocampo indicado a vermelho (B), rede neuronal (C), sinapse (D), “lipid-rafts” (E). Os péptidos resultantes da digestão das proteínas (F), são analisados por MS (G), e relacionados com a base de dados para identificação das proteínas (H). Por fim processa-se a análise e integração dos resultados (I)

* Unidade de Proteômica do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra
Biocant, Centro de Inovação em Biotecnologia, Coimbra
E-mail: bmanadas@gmail.com

cada vez mais a ferramenta imprescindível em projetos de neuroproteômica. É possível no entanto encontrar alguns grupos de investigação que desenvolvem projetos de neuroproteômica apenas com recurso a anticorpos (possuindo uma biblioteca com mais de 15.000 anticorpos e os custos daí inerentes).

A espectrometria de massa começou por ser uma ferramenta que permitia obter um espectro de massa ao fim de algumas horas de mestria do operador em frente a um conjunto complexo de botões, e como produto final de uma mescla de muito conhecimento, intuição e uma boa dose de sorte. A evolução da tecnologia permitiu, num curto espaço de tempo, aumentar consideravelmente a capacidade de aquisição de dados, sendo atualmente possível adquirir de forma automática dezenas de espectros de fragmentação por segundo. No caso de amostras complexas analisadas por LC-MS, poderão ser adquiridos numa única análise dezenas de milhares de espectros. Esta quantidade de informação torna incontornável a utilização de programas informáticos que permitam a análise dos dados e sobre a qual é limitada, ou mesmo inexistente, a validação por parte do utilizador.

A automação do processo de identificação de proteínas por espectrometria de massa passou a estar ao alcance de investigadores que não compreendem, nem precisam de compreender na maioria dos casos, conceitos de ionização ou radiofrequências. A simpli-

ficação da identificação de proteínas foi certamente benéfica e abriu portas a uma investigação mais interdisciplinar, havendo agora contacto íntimo entre as áreas da biologia fundamental, química, informática e consequente interpretação e integração do conhecimento.

Assim, um dos maiores avanços da ciência nas últimas décadas talvez não tenha sido a descoberta de novos conceitos e noções fundamentais, ou mesmo do genoma humano, mas sim a quebra das barreiras entre as áreas do conhecimento. Nunca como hoje houve equipas de investigação tão interdisciplinares e onde a variedade de conhecimento dos diversos elementos é uma mais valia ou mesmo uma necessidade.

HBPP – PROJETO DO PROTEOMA DO CÉREBRO HUMANO

Os projetos de larga escala na área da proteômica necessitam de um conjunto de parâmetros de padronização, cujo consenso é normalmente alcançado sob a orientação de organizações científicas, como é o caso da “Human Proteome Organization” (HUPO – www.hupo.org). O projeto do proteoma do cérebro (BPP – www.hbpp.org) pretende assim juntar grupos de investigação que partilham formas de trabalhar semelhantes, com o objetivo de caracterizar o proteoma do cérebro humano e do ratinho. O proteoma do cérebro do ratinho é sem dúvida uma mais valia, considerando os inúmeros modelos de ratinhos para as

diversas doenças humanas. No entanto, como o próprio consórcio indica, “o melhor modelo humano é o Homem”. Mais do que uma simples compilação das proteínas expressas no cérebro num dado momento, é também necessário haver uma integração extensa desta informação com a interação entre as proteínas, sua localização e modificações pós-traducionais, o estágio de desenvolvimento, fenótipo, patologia, entre outros. A integração de todo este conhecimento, ou o potencial que esta integração apresenta, permite sonhar com a compreensão dos fenómenos fisiológicos e fisiopatológicos através da caracterização proteica, incluindo a identificação de modificações pós-traducionais.

Este conhecimento terá o potencial de levantar o véu para a identificação de possíveis marcadores que inequivocamente permitam o diagnóstico precoce, como por exemplo de algumas doenças neurodegenerativas e neurológicas. A ausência destes biomarcadores deve-se em parte ao reduzido número de estudos desenvolvidos em amostras provenientes de doentes ainda numa fase inicial da doença. Nestes estudos, a matéria prima conteria a origem da doença e não as consequências e/ou sintomas da doença. É neste sentido que um dos objetivos propostos na missão do BPP é o da extensa caracterização de amostras provenientes de doentes com patologias neurodegenerativas e neurológicas que permita a identificação de biomarcadores de prognóstico e diagnóstico. Para além da necessidade de diagnosticar estas doenças precocemente, estes projetos pretendem ir mais além com a identificação de um conjunto de biomarcadores que possibilitem a avaliação da resposta do doente à terapia.

IMPACTO SOCIOECONÓMICO

O início do projeto do genoma humano colocou a fasquia do conhecimento que se pretendia alcançar num patamar bastante elevado. Por exemplo, a sociedade esperava que este estudo resultasse em progressos enormes no sentido da cura do cancro. Quando cedo se percebeu que o resultado do projeto era conhecimento e não uma terapia, as proteínas passaram a ser

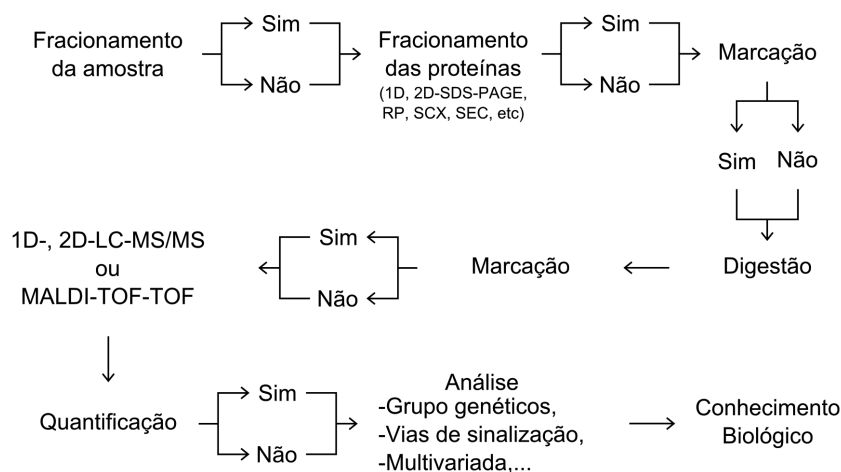


Figura 2 – Diagrama de decisão numa análise proteómica incluindo fracionamento da amostra, fracionamento proteico e decisão do ponto de vista quantitativo com marcação por isótopos

alvos interessantes de análise e apontadas como potenciais alvos terapêuticos, uma vez mais colocando a farsa num ponto mais elevado do que a capacidade atual de resposta. Fazer parte destes projetos, onde o resultado se traduz num benefício direto para a sociedade, será certamente apetecível para muitos investigadores. No entanto, a dimensão destes projetos coloca um peso enorme sobre o investimento necessário. Nos dias de hoje, o resultado destes projetos terá de ser avaliado não apenas com a perspetiva do conhecimento que será gerado, mas também do potencial económico. Com o devido financiamento, um projeto de neuroproteómica poderá ter o potencial de gerar fundos suficientes para sustentar futuros projetos de igual ou maior envergadura.

O paradigma da investigação foi assim alterado nos últimos anos, dado que o crescimento observado na quantidade de investigadores não foi acompanhado pelo correspondente aumento de financiamento público. Por outro lado, a investigação e desenvolvimento representam hoje um enorme potencial económico, levando a que alguns resultados científicos sejam divulgados na forma de patentes, produtos ou serviços disponibilizados ao público. Assim, um projeto de investigação com o objetivo de identificar biomarcadores de diagnóstico, prognóstico ou preditivo de doenças neurodegenerativas ou neurológicas terá um enorme potencial comercial e necessitará do investimento que atualmente está para além das capacidades de investimento público em Portugal.

DESAFIOS

O sistema nervoso resulta de um processo de diferenciação complexo e é também nele que ocorre uma longa lista de doenças (por exemplo: Alzheimer, Parkinson, Esclerose Múltipla, Huntington, Esquizofrenia, Epilepsia, entre outras). A neuroproteómica será certamente uma das disciplinas mais complexas, considerando que se pretende compreender as alterações que ocorrem no proteoma das diversas células que constituem o sistema nervoso.

Os desafios que são colocados à neuroproteómica passam primeiro por uma alteração da matéria prima em estudo. A análise do cérebro como um todo deixa de fazer sentido e é necessário uma análise ao nível dos tecidos, células, compartimentos, ou mesmo regiões específicas, como os "lipid rafts". Neste campo, os desafios ao nível da espectrometria de massa estão, não só no aumento da sensibilidade (para que seja possível dar resposta com a reduzida quantidade de matéria prima normalmente disponível), como também no aumento do intervalo dinâmico (possibilitando na mesma amostra detetar a imensa quantidade de actina e/ou tubulina e as proteínas presentes em apenas algumas cópias por célula). A diminuição dos passos de pré-processamento das amostras é crucial para evitar perdas da amostra e tentar colocá-la o quanto antes no sistema LC-MS. Na presença de grandes quantidades de amostra é possível dar largas à imaginação com diversos passos de fracionamento, como por exemplo isolar organelos ou densidades pós-sinápticas, entre outros. Este tipo de análise encontra-se no entanto longe de poder ser utilizada no "último grito" da proteómica: a "single-cell proteomics", onde cada célula é uma entidade funcional única e possui um proteoma distinto da célula adjacente (como por exemplo, a primeira célula a sofrer uma mutação que resultará no desenvolvimento de um tumor).

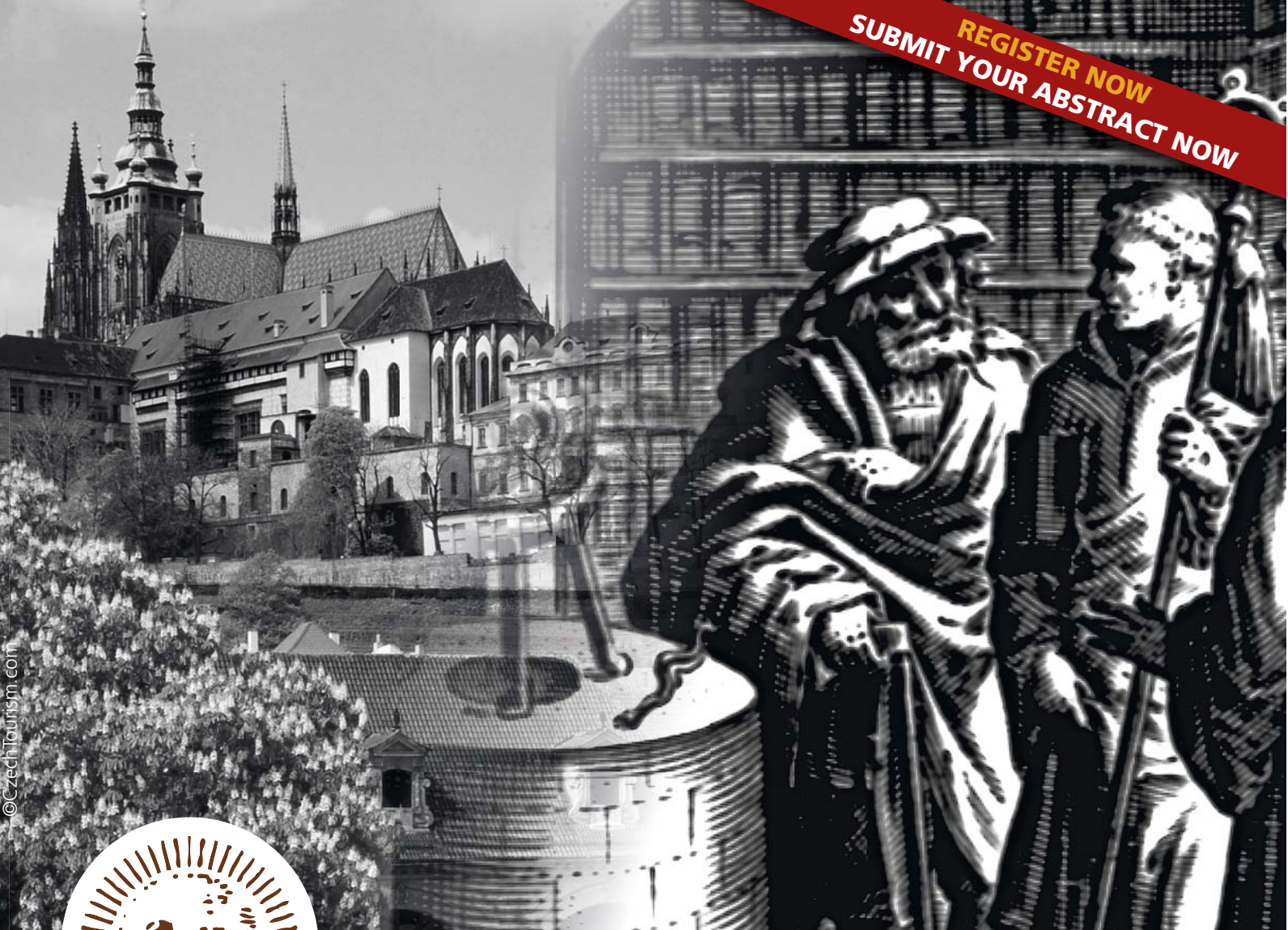
De acordo com algumas definições iniciais, o proteoma de uma dada célula é representado pelo conjunto de proteínas que essa célula contém. Este encontra-se em constante alteração: ao longo do processo de desenvolvimento, no ciclo celular, em condições de stress, ou mesmo em diferentes momentos ao longo do dia. Atualmente, estudar toda esta dinâmica ao nível de um único neurónio é impossível. É impossível com as técnicas atuais recolher todas as proteínas de uma única célula neuronal e proceder à sua completa caracterização proteica. As técnicas atuais não possuem um intervalo dinâmico tão vasto, encontrando-se algumas proteínas abaixo do limite de deteção dos

instrumentos. Algo que poderá tornar uma análise de neuroproteómica ainda mais complexa passa pela identificação da isoforma e/ou modificação pós-traducional da proteína. Esta questão poderá no entanto levantar uma discussão interessante: o que é na verdade a identificação de uma proteína? A resposta poderá ser dada de acordo com uma das definições de proteoma, onde as proteínas são identificadas como o complemento proteico do genoma. Sendo o genoma conhecido, as proteínas seriam apenas a identificação do "produto proteico do gene X". No entanto, uma isoforma ou modificação pós-traducional transforma essa proteína numa nova identidade. Assim, a identificação da proteína teria de ser "produto proteico do gene X com as modificações A, B e C nos resíduos X, Y e Z". Na ausência desta informação, os projetos de proteómica permitem a identificação de proteínas que na verdade são ainda identidades desconhecidas, mesmo depois de identificadas.

Os desafios colocados à proteómica no passado são ainda atuais: maior sensibilidade, maior velocidade, maior resolução, maior cobertura do proteoma, maior intervalo dinâmico, melhores algoritmos para a identificação de proteínas, análise de ontologias e de vias de sinalização. Um dos maiores desafios talvez passe pela maior capacidade de análise dos dados gerados pelos espectrómetros de massa, que ultrapassa a capacidade de processamento dos utilizadores. Neste campo é necessário questionar: porque razão uma dada amostra processada por LC-MS gera milhares de espectros sem no entanto haver uma correspondência com a base de dados (até agora!)?

No futuro, esperamos que a proteómica possa contribuir com mais e melhor conhecimento ao nível da dinâmica do proteoma e interatoma, apresentar mais biomarcadores e apoiar a medicina personalizada. É necessário aumentar o conhecimento com os dados que foram, são e serão adquiridos. É ainda necessário haver mais e melhor ligação entre o proteoma detetado e o fenótipo.

**REGISTER NOW
SUBMIT YOUR ABSTRACT NOW**



©CzechTourism.com



4th EuCheMS Chemistry Congress

**August 26–30, 2012
Prague, Czech Republic**



3rd Announcement CALL FOR ABSTRACTS

www.euchems-prague2012.cz

