UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e
sua aplicação na quantificação de painéis proteicos**

Guilherme Pauperio Lanfredi

Guilherme Pauperio Lanfredi

**Desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e
sua aplicação na quantificação de painéis proteicos**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, área de concentração
Bioquímica.

Versão corrigida da dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica em 01/12/2017. A versão original encontra-se disponível no departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Orientador: Vitor Marcel Faça

Ribeirão Preto/SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lanfredi, Guilherme Pauperio.

Desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e sua aplicação na quantificação de painéis proteicos. Ribeirão Preto, 2017.

70 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Faça, Vitor Marcel.

1. Proteômica 2. Espectrometria de Massas. 3. MRM.
4. Glicólise.

GUILHERME PAUPERIO LANFREDI

Desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e sua aplicação na quantificação de painéis proteicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Bioquímica.

Aprovado em ____/____/____

Orientador:

Prof.Dr.

Vitor Marcel Faça

Instituição: FMRP/USP

Assinatura: _____

Banca Examinadora:

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

Agradeço à minha família que durante toda minha vida sempre deu suporte para que eu buscasse meus sonhos e tivesse sucesso em minhas realizações, avós, tios, primos, irmã e principalmente meus pais cuja atitude perante adversidades é fonte constante de exemplo.

À minha parceira Luciana que com ajuda e afeto tornou mais amena a vida e o trabalho, sempre me inspirando a continuar.

Ao professor e meu orientador Dr. Vitor Marcel Faça por me aceitar em seu laboratório, orientar e com muita paciência me transmitir conhecimento, além de trabalhar pelo progresso mesmo nestes tempos precários para a ciência nacional.

À professora Dra. Luciane Carla Alberici e ao doutorando Carlos R. Porto Dechandt pelo auxílio nos ensaios de Respirometria e Atividade enzimática.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica da FMRP que me auxiliaram e que com tanto empenho levam a tarefa de manutenção do programa de pós-graduação.

Aos tantos colegas de laboratório que vêm e vão contribuindo para meu desenvolvimento científico. Alexander, Aline, Amanda, Ana Paula, Andrea, Anne, Carlos, Carol, Camila, Edson, Gabriela, Germano, Guilherme, Hiago, Lara, Mariana, Max, Silvia, Vera, Verônica, Virgínia, Victor, ...

Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro e suporte ao laboratório.

Resumo

Lanfredi, G.P. **Desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e sua aplicação na quantificação de painéis proteicos**. 70 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2017.

O metabolismo celular é substancialmente alterado durante a oncogênese, progressão tumoral e outros processos patológicos. Tem sido frequentemente analisado para compreensão dos processos que permitem o crescimento dos tecidos, reprodução, manutenção da homeostase e resposta a sinais extracelulares. Dentre os vários métodos para caracterização de alterações metabólicas, a espectrometria de massas tem contribuído significativamente para a identificação e quantificação de proteínas envolvidas no metabolismo, e também para a caracterização do metaboloma. A análise proteômica baseada em espectrometria de massas permite estudos qualitativos em grande escala, adequados para a busca e descoberta de analitos relevantes. A análise proteômica dirigida complementa esse caráter com qualidade quantitativa para proteínas alvo pré-selecionadas. Neste trabalho foram desenvolvidos métodos de proteômica dirigida para o monitoramento de alterações quantitativas nos níveis de proteínas envolvidas na via glicolítica do metabolismo da glicólise. Para tal peptídeos proteotípicos para cada proteína foram identificados e padronizados utilizando a estratégia de monitoramento de reações múltiplas. O painel foi aplicado para obter resultados das alterações que ocorrem em um modelo de progressão tumoral. Com esta estratégia empregada, foi possível selecionar e utilizar vários peptídeos representativos das enzimas da via glicolítica e também de algumas proteínas relevantes ao câncer. A utilização de peptídeos sintéticos facilitou substancialmente o processo de desenvolvimento do método. Por fim, com a metodologia desenvolvida, foi demonstrado para células MCF7, que o fator EGF alterou a expressão das proteínas da via glicolítica, aumento no fluxo para via das pentoses e capacidade aumentada da respiração celular. Este estudo, portanto, sugere uma nova disposição do metabolismo celular dado o conhecimento estabelecido em relação aos efeitos na respiração, como o efeito Warburg.

Palavras-chave: Proteômica, Espectrometria de Massas, MRM, Glicólise.

Abstract

Lanfredi, G.P. **Development of targeted proteomics methods and their application in quantification of protein panels**. 70 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2017.

Cellular metabolism is altered during ontogenesis, cancer progression and several other pathological events. Because of that, the metabolism is constantly analyzed in order to provide further comprehension of processes that allow tissue growth, reproduction, homeostasis maintenance, and response to extracellular signals. Among the methods great diversity of methods used to characterize metabolic alterations, mass spectrometry has been contributing significantly to identify and quantify proteins involved in a diversity of metabolic pathways, but also to monitor the changes in metabolome. Proteomics based on mass spectrometry allows highthroughput in-depth qualitative resources for discovery phases stages, providing the new relevant candidates for further biochemical characterization. In a complementary way, targeted proteomics allows precise quantitative analyses of such selected protein targets. Here, it was developed a targeted proteomics method for multiplex monitoring glycolytic pathway enzymes and relevant cancer-related proteins. For that, proteotypic peptides representing proteins of interest were selected and studied in detail to be incorporated in a multiple reaction monitoring assay. The developed method was applied to monitor the alterations in the glycolytic pathway in a cancer progression model. Using targeted proteomics strategies, we selected and applied for quantification several proteotypic peptides representing glycolytic enzymes and cancer-related proteins. The use of synthetic peptides allowed faster method development and more sensitive methods. The application of such methods, demonstrated alterations in glycolytic pathways and cancer-related proteins promoted in MCF7 cells treated with EGF. Also, an activation of pentose-phosphate pathway was suggested and increase in cellular oxygen consumption. This study, therefore, suggests changes in the cellular metabolism that differs from the classic Warburg effect observed during cancer development.

Keywords: Proteomics, Mass Spectrometry, MRM, Glycolysis.

Sumário

1 – Introdução	9
1.1 - A dinâmica e desafios do proteoma	9
1.2 Espectrometria de Massas na análise proteômica	12
1.3 - Proteômica dirigida	15
1.4 – Proteínas alvo e biomarcadores para diagnóstico do câncer	19
1.5 - Metabolismo energético no câncer	21
2 – Objetivos	25
2.1 - Objetivo Geral	25
2.2 - Objetivos Específicos	25
3 - Materiais e Métodos	26
3.1 - Preparo de amostras e equipamentos	26
3.1.1 - Preparo de amostras	26
3.1.2 - Extração de peptídeos em fase sólida (SPE)	27
3.1.3 - Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas	27
3.2 - Estimativa de reprodutibilidade e sensibilidade da técnica	28
3.3 – Desenvolvimento de métodos e de análise de dados	28
3.3.1 <i>Software</i> Skyline	28
3.3.2 - Painel para monitoramento da glicólise	29
3.3.3 - Painel de proteínas relevantes ao câncer	31
3.4 – Modelo celular para progressão tumoral	32
3.5 - Avaliação funcional do consumo de oxigênio do modelo de progressão tumoral	33
3.5.1 - Consumo de Oxigênio	33
3.5.2 - Atividade enzimática da Citrato sintase	34
4 - Resultados e Discussão	35
4.1 Considerações iniciais	35
4.2 - Estimativa de sensibilidade e reprodutibilidade da técnica	37
4.3 - Monitoramento da glicólise por proteômica dirigida	39
4.3.1 - Aplicação do método	44
4.4 - Respirometria e Atividade da enzima Citrato Sintase	47
4.5 - Método para monitoramento de biomarcadores epiteliais e mesenquimais	50
4.5.1 - Desenvolvimento	50
4.5.2 - Aplicação do método	58
4.6 – Considerações finais sobre o desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e sua aplicação na quantificação de painéis proteicos	61
5 – Conclusões	63
6 - Referências Bibliográficas	65
7 – Anexo	70

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1- Regulação Gênica e Proteica.	9
Figura 2- Propriedades relativas à dinâmica do proteoma.	10
Figura 3- Passos para o desenvolvimento de Métodos de Proteômica Dirigida.	16
Figura 4- Critérios para Seleção de Peptídeos Quantotípicos.	17
Figura 5- Fluxograma de etapas e resultados obtidos no presente estudo.	37
Figura 6- Linearidade da relação área x concentração de peptídeos (BSA).	38
Figura 7- Quantificação relativa dos peptídeos representativos do painel referente à glicólise.	44
Figura 8- Comparação entre sinais cromatográficos obtidos para diferentes peptídeos.	45
Figura 9- Comparativo de consumo de Oxigênio de células MCF7 em diferentes estados.	49
Figura 10- Atividade da enzima citrato sintase de células MCF7.	50
Figura 11- Comparação da variação da área dos picos cromatográficos em diferentes energias de colisão.	53
Figura 12- Consensus spectra do peptídeo GPFPQELVR.	55
Figura 13- Área de cada transição monitorada do peptídeo GPFPQELVR.	55
Figura 14- Consensus spectra do peptídeo ILLAELEQLK.	56
Figura 15- Área de cada transição monitorada do peptídeo ILLAELEQLK.	56
Figura 16- Consensus spectra do peptídeo NTGVISVTTGLDR.	57
Figura 17- Área de cada transição monitorada do peptídeo NTGVISVTTGLDR.	57
Figura 18- Quantificação relativa dos peptídeos representativos do painel referente aos biomarcadores utilizados.	59
Figura 19- Análise de alguns biomarcadores em células de câncer de ovário expostas ao EGF. Adaptado de Grassi et al. 2016.	60
Tabela 1- Proteínas cogitadas para painel representativo da via glicolítica.	29
Tabela 2- Proteínas utilizadas no painel representativo de marcadores epiteliais e mesenquimais.	31
Tabela 3- CV% de cada ponto em diferentes concentrações de peptídeos.	38
Tabela 4- Áreas de branco e ruído de cada peptídeo.	39
Tabela 5- Peptídeos testados para painel representativo da via glicolítica.	42
Tabela 6- Peptídeos representativos de cada proteína retornados por diferentes bancos de dados e obtidos nos testes.	43
Tabela 7- Proteínas e peptídeos selecionados com tempo de retenção estimado e medido (Glicólise).	43
Tabela 8- Peptídeos e seus parâmetros utilizados para análise da via glicolítica.	43
Tabela 9- Proteínas e peptídeos selecionados com tempo de retenção estimado e medido (biomarcadores).	51
Tabela 10- Energias de colisão testadas e respectivas áreas dos picos cromatográficos.	52
Tabela 11- Energia de colisão utilizada para cada transição dos peptídeos.	54
Tabela 12- Peptídeos e seus parâmetros utilizados para análise de biomarcadores.	59

1 – Introdução

1.1 - A dinâmica e desafios do proteoma

O proteoma é o conjunto de proteínas expresso por um tecido ou organismo em um dado instante. O estudo de como ocorre a expressão gênica, seus mecanismos de auto controle e controle de outros processos biológicos tendo como alvo medidas do nível proteico é nomeado proteômica, um conceito mais amplo que abrange o estudo do proteoma (ANDERSON 1998).

O mapeamento do proteoma explorado há décadas, já mostrava indício da diversidade de condições resultantes das variações dos níveis proteicos e pequenas diferenças na expressão de proteínas. Proteínas estão envolvidas no controle de quase todas as funções biológicas e este controle é possibilitado pela modulação das características do proteoma (além das características particulares de cada uma) dada sua dinâmica intrínseca, adquirida antes mesmo da concepção da proteína. Além do conceito genérico de transcrição e tradução linear com um processo seguido pelo outro, com produtos bem determinados e estabelecidos, há inúmeros fatores que determinam a expressão dos genes e finalmente a proteica, incluindo as condições celulares e ambientais (BANKS *et al.* 2000).

O esquema a seguir mostra os processos desde o DNA até a síntese da proteína madura que influenciam a expressão proteica.

Figura 1- Regulação Gênica e Proteica.

Fonte: Banks *et al.* 2000.

Os processos que geram a variabilidade estrutural da proteína e sua expressão anteriormente ilustrados constituem um aspecto importante da dinâmica do proteoma ligado à produção de uma única proteína a partir da informação contida no DNA e em si já implica em diversas possibilidades, adicionalmente há diversas outras propriedades atribuíveis ao proteoma que podem ser biológicas, físicas ou químicas e devem ser levadas em conta no estudo proteômico. Estas propriedades são altamente dinâmicas, se alteram constantemente ao longo da manutenção celular em processos biológicos como proliferação e migração e sua análise é fundamental para compreensão da biologia celular para além da identificação de proteínas (LARANCE & LAMOND 2015).

Abaixo são ilustradas algumas propriedades importantes relacionadas à dinâmica do proteoma e alvos de estudos proteômicos.

Figura 2- Propriedades relativas à dinâmica do proteoma.

Fonte: Larance & Lamond. 2015.

Historicamente a aplicação massiva da proteômica é posterior à genômica, por isso comparações com este outro campo são recorrentes. No entanto, algumas diferenças essenciais são apontadas, como principal temos a mutabilidade do proteoma, enquanto há apenas um único e definitivo genoma no organismo o proteoma pode mudar devido a diferentes condições e diferentes tecidos de um mesmo organismo, e com isso temos que o proteoma não é o produto direto do genoma (WILKINS 1996).

Segundo (ANDERSON 1998) são argumentos para aplicação da proteômica em relação a genômica:

- Correlação proteína-mRNA;

A primeira comparação multigênica de abundância de mRNA vs proteína encontrou um coeficiente de correlação de 0,48, outros posteriores trouxeram valores próximos e a informação de variação entre proteínas. Recentemente um estudo abrangente incluindo tecidos e culturas de células encontrou entre RNA e proteína valores para correlação de Person variando de 0,39 a 0,79, sendo o menor para cultura de células do rim HEK293 e o maior para cultura de células de mama MCF7 (EDFORS *et al.* 2016). Esses valores mostram uma correlação moderada, mas unicamente no quesito abundância;

- Controle dos sistemas celulares:

Alguns eventos chave de processos celulares são observados unicamente no nível proteico, como migrações, clivagens, fosforilações e outras modificações importantes somente percebidas quando empregada a abordagem proteômica;

- Estabilidade:

Comparativamente, as proteínas são mais estáveis que mRNAs e apresentam uma taxa de degradação e renovação mais lenta, incluindo menor disposição para degradação espontânea e enzimática, fatores críticos quando são envolvidas amostras clínicas;

- Função:

Portanto, proteínas estão presentes em praticamente todas as funções biológicas. As medidas envolvendo proteínas são diretamente referentes aos processos biológicos, já as que envolvem mRNA são indiretas.

A informação disponibilizada pelo projeto do genoma humano traz consigo o desafio da aplicabilidade desta informação no estudo proteômico, não apenas com o sequenciamento das proteínas, mas também com o conhecimento das funções e processos, para isto os estudos contam com diversas ferramentas para separação, identificação e caracterização de proteomas. No entanto, desafios técnicos são apresentados a cada etapa de desenvolvimento e de aplicação, alguns comumente identificados são falhas na coleta de amostras, manuseio e armazenamento, fatores metodológicos e baixa qualidade de método analítico. Para estes, recomenda-se o estabelecimento das questões a se elucidar para escolha correta de amostras junto ao protocolo, validação de métodos e uso de controles de qualidade (PAVLOU *et al.* 2013; BANKS *et al.* 2000).

A dinâmica do proteoma também gera desafios. Um dos principais, a variação dinâmica de concentração, compreendendo várias ordens de grandeza e o grande número de proteínas com suas modificações pós-traducionais envolvidas nos processos celulares, resulta em complexidade na identificação completa do proteoma. A variedade de equipamentos possibilita inúmeras abordagens, cada uma mais adequada à determinada aplicação. Assim como as capacidades técnicas, a sensibilidade de cada plataforma e até de cada equipamento, apresentam variação significativa e, portanto, o desafio de lidar com amostras complexas e a detecção de proteínas de baixa abundância, se torna evidente a cada geração tecnológica (BOJA & RODRIGUEZ 2012).

1.2 - Espectrometria de Massas na análise proteômica

Os espectrômetros de massas trabalham com a identificação de íons em fase gasosa e medem a razão massa/carga (m/z). São compostos por uma fonte de ionização, que converte os analitos em íons em fase gasosa, um analisador de massas que separa as espécies ionizadas de acordo com sua razão massa/carga e um detector que registra o número de íons de cada valor m/z . O desenvolvimento das fontes de ionização ESI (*electrospray ionization*) e MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), classificadas como “*soft ionization*” merecem destaque por revolucionar a análise de proteínas. Os espectrômetros são de vários tipos, sendo o analisador de massas principal determinante de sua tecnologia, os mais comuns na proteômica são os de quadrupolo, *ion trap*, *time-of-*

flight e *Fourier-transform ion cyclotron resonance* e seus híbridos que associam estas tecnologias. (revisado por HAN *et al.* 2008).

A proteômica aliada à espectrometria de massas, antes emergente e agora principal tecnologia para descoberta e caracterização do proteoma, formam um meio para identificação de proteínas. O raciocínio é que proteínas possam fornecer padrões de expressão exploráveis pela espectrometria de massas e então podem ser usados em combinação com ferramentas estatísticas para propósitos diagnósticos (RIFAI *et al.* 2006).

A espectrometria de massas atualmente se destaca em termos de sensibilidade, velocidade da aquisição de dados e potencial de análise da dinâmica do proteoma. Outra vantagem é a capacidade em analisar vários peptídeos de cada proteína em um único experimento, equivalente na bioquímica ao uso de vários anticorpos diferentes para cada proteína alvo (LARANCE & LAMOND, 2015).

O emprego da espectrometria de massas em proteômica predominantemente utiliza o conceito "*bottom-up*", a ideia de que a identificação de peptídeos pode resultar na identificação de proteínas, o inverso desse conceito, "*top-down*", enunciado como a identificação direta de proteínas intactas também existe, mas sua aplicação se mostra proibitiva em relação ao custo, se comparado às tecnologias já bem difundidas, além de se mostrar de difícil adequação e compreensão, necessitando equipamentos mais específicos (ZHOU *et al.* 2012).

A identificação de peptídeos "*bottom-up*" em espectrômetros de massa do tipo triplo quadrupolo com CID (*collision induced dissociation*) utiliza preferencialmente os íons produto do tipo y e b, essa fragmentação ocorre no grupamento amida, oferece espécies mais estáveis no ambiente do espectrômetro, é mais útil pela separação nos limites de cada resíduo de aminoácido e esse padrão de fragmentação é utilizado para a identificação do peptídeo (YATES 1998; WYSOCKI *et al.* 2005).

Um experimento proteômico básico utilizando espectrometria de massas envolve o preparo de amostras com a digestão das proteínas, separação e ionização dos peptídeos presentes na amostra, medição da relação massa/carga, e então peptídeos são selecionados e fragmentados, estes fragmentos são analisados remontando a identidade do peptídeo, no entanto há várias estratégias para formulação dos experimentos, coleta de dados e ordem dos processos. Há três estratégias proeminentes, *shotgun*,

directed e *targeted* que diferem na forma como as etapas são feitas e se conectam (YATES 1998; DOMON & AEBERSOLD 2010).

A estratégia *shotgun*, responsável pela maior parte dos dados disponíveis e a mais usada atualmente, se adequa para a descoberta de alvos, identificando extensos painéis de proteínas em amostras complexas sem a necessidade de conhecimento prévio de sua composição. As amostras são analisadas e a elucidação do espectro de fragmentação de alguns íons possibilita a associação com peptídeos e posteriormente proteínas, havendo ainda modos distintos para realização da fragmentação, que pode ser contínua (para todos os íons) ou dependente da intensidade do sinal (apenas alguns íons). Já a abordagem *directed* utiliza ao menos duas análises, a primeira qualitativa identificando os peptídeos a compor a lista de alvos e a segunda quantitativa propriamente identificando as proteínas que mostram uma expressão diferencial entre condições diferentes das amostras. A estratégia *targeted* é dirigida por hipótese e requer informação prévia no desenho do experimento e seleção prévia de alvos, pois para cada peptídeo há parâmetros a serem determinados no método, que incluem tempo de retenção e fragmentos mais intensos que constituirão ao final um painel definitivo para análise de qualquer amostra. Esta estratégia é focada na detecção e quantificação de peptídeos representativos de proteínas de interesse, denominados peptídeos proteotípicos (DOMON & AEBERSOLD 2010).

Portanto, a aplicação da espectrometria de massas nos estudos proteômicos de grande escala para a identificação de proteínas traz respostas a questões biológicas relevantes como interações proteína-proteína, anotação e correção de sequências de DNA e também para expressão proteica de células em condições distintas implicando no esclarecimento da função celular (AEBERSOLD & MANN 2003).

1.3 - Proteômica dirigida

A proteômica e sua evolução alcançada através de estudos em grande escala, com proteínas obtidas por eletroforese bidimensional e identificadas por métodos imunológicos e posteriormente pelo uso da espectrometria de massas, propiciou conhecimento associado a composição, estado e processos

envolvidos em várias condições. Este vasto conhecimento proporcionado pela espectrometria de massas traz consigo seu caráter qualitativo adequado a busca e descoberta de analitos relevantes. Porém, a abordagem “*shotgun*” ainda é incompleta para o esforço quantitativo de interesse, por exemplo, para aplicações translacionais e clínicas, onde muitas amostras independentes precisam ser analisadas. Desse modo, a capacidade consolidada trazida pela abordagem *shotgun* para levantar hipóteses com a identificação de proteínas deve ser complementada com testes que necessitam de medidas sensíveis da quantidade de proteínas de forma precisa, confiável e consistente, em grande número de amostras, o que leva à proteômica “*targeted*” ou dirigida (GILLETTE & CARR 2013).

Além disso, a necessidade na construção do conhecimento da biologia sistêmica de se ter proteínas identificadas e quantificadas é apenas parcialmente suprida pela abordagem *shotgun* onde somente a parte mais abundante de determinado proteoma mostra reprodutibilidade em sua identificação, consequentemente reportando esporadicamente a parte menos abundante. Esta limitação provoca a perda de dados e influencia na qualidade dos dados obtidos nos experimentos. Outra característica limitante é o fracionamento de amostras, chave para a qualidade da cobertura dos estudos proteômicos, mas que se torna impraticável quando há um grande número de amostras a serem analisadas (LANGE *et al.* 2008).

A proteômica dirigida por meio da espectrometria de massas e mais particularmente da aplicação de SRM (*selected reaction monitoring*) também referido como MRM (*multiple reaction monitoring*), para enfatizar a detecção de múltiplos íons produto, realizada em espectrômetros de triplo quadrupolo tem sido empregada de maneira crescente pela sua seletividade, sensibilidade e amplo alcance. Tudo isso garante a eliminação de interferentes provindos da coeluição e assim detecção de componentes com baixa abundância, fator crítico no aumento da sensibilidade quando há comparação com a abordagem *shotgun*. Já em comparação com imunoenaios, destacam-se a simplicidade, rapidez

e capacidade de realização de múltiplas medições ao mesmo tempo (KIYONAMI *et al.* 2010; SCHIESS *et al.* 2010; GILLETTE & CARR 2013).

Figura 3- Passos para o desenvolvimento de Métodos de Proteômica Dirigida.

Fonte: Gallien *et al.* 2011

Como demonstrado na figura acima, o desenvolvimento de método das abordagens de proteômica dirigida inicia-se com a geração da hipótese. Esta pode ser gerada a partir de dados prévios de qualquer técnica ou advinda de outros experimentos de espectrometria de massas, nesses casos utiliza-se como referência as espécies observadas, bastando para esta etapa apenas que a hipótese seja verificável pela aferição das quantidades de proteínas de interesse (LANGE *et al.* 2008).

A escolha do painel de proteínas alvo para responder a hipótese formulada pode ter como base a análise de uma via, uma rede de proteínas ou conjunto de biomarcadores estabelecidos e associados a condição biológica. Este painel define o experimento de MRM e é resultado de conhecimento prévio obtido da literatura ou empiricamente. Neste processo, bases de dados auxiliam na escolha de proteínas relevantes e complementares bem como referenciais para verificação e eventual correção da análise (GALLIEN *et al.* 2011).

Com o painel de proteínas que vão testar a hipótese estabelecido, segue a seleção de peptídeos representativos para cada uma das proteínas. Peptídeos identificados na abordagem *shotgun* podem ser inseridos nesta etapa, caso contrário a seleção deve se apoiar em outros critérios, como repositórios que disponibilizam informação ou até mesmo empiricamente com o teste de cada peptídeo. No entanto, algumas propriedades dos peptídeos são almejadas por proporcionarem melhores resultados, tais como número de aminoácidos ideal, carga, sequência de aminoácidos, ausência de modificações biológicas e/ou químicas, também é recomendável que o peptídeo seja único, isto é, seja encontrado unicamente naquela proteína e não em outras isoformas, por exemplo. Peptídeos que atendem estas características são chamados proteotípicos ou quantotípicos. Abaixo são listadas de forma mais completa critérios para seleção de peptídeos (LIEBLER & ZIMMERMAN 2013; LUDWIG & AEBERSOLD 2014).

<i>Selection criteria</i>	<i>Comments</i>
fully-cleaved	The peptide should not contain a missed or a non-specific cleavage site according to the applied protease.
unique amino acid sequence in the proteome	Usually defined based on the genome, but also splice isoforms, single nucleotide polymorphisms or isobaric peptides might be considered.
MS detectability	Depends on specific physico-chemical properties, as well as on the chemical composition of the background (matrix effect). Information about the best peptide detectabilities per protein can be obtained either from empirical data or by using bioinformatic prediction tools.
peptide length	Ideally in the range of 8 to 25 amino acids.
optimal mass range	2+ and/or 3+ precursor <i>m/z</i> values should be in the accessible mass range of the MS instrument used.
complete proteolysis	For trypsin avoid: <ul style="list-style-type: none"> • dibasic cleavage sites: -K-K-, -R-R-, -R-K-, -K-R- • acidic residues (D and E) in close proximity to the cleavage site • N-terminal proline cleavage: -K-P-, -R-P-
no biological modifications (PTMs)	Avoid: <ul style="list-style-type: none"> • peptides carrying a PTM; search available databases or use prediction tools • glycosylation motive: -N-X-S/T- • N- and C-terminal peptides because these are more easily susceptible to protein proteolysis and degradation
no chemical modifications	Avoid: <ul style="list-style-type: none"> • oxidation: M and W • deamidation: -N-G-, -Q-G- • incomplete alkylation: C • internal peptide backbone fragmentation: -D-P- • N-terminal cyclization: N-terminal Q and E (pyroglutamate), N-terminal carbamidomethylated C

Figura 4- Critérios para Seleção de Peptídeos Quantotípicos.

Fonte: Ludwig, C. & Aebersold, R. 2014.

De acordo com os peptídeos selecionados há uma série de fragmentos associados à sua clivagem por CID que também devem ser selecionados, comumente de 2 a 4. Resumidamente o conjunto destas seleções para o experimento deve conter a informação do painel de proteínas, de seus respectivos

peptídeos com boa resposta ao serem submetidos a ionização e os fragmentos selecionados destes peptídeos que provejam melhor sinal. O par peptídeo e seu fragmento é chamado de transição. Alguns fatores afetam diretamente a eficiência da análise e influenciam a intensidade do sinal e devem ser levados em conta na criação do método, por isso é necessária a validação e otimização das transições selecionadas. Relacionados com a estrutura do peptídeo, temos sua carga predominante e o tipo de fragmento, que devem ser escolhidos visando a maior sensibilidade na detecção e não ocorrência de interferências. Estas informações podem ser obtidas de bancos de dados e análise das condições de ionização e durante a otimização no próprio instrumento, com observação do sinal apresentado. Desta forma, também a determinação da energia de colisão, outro fator, pode ser otimizada proporcionando melhor fragmentação, da mesma forma a determinação do tempo de retenção tem grande impacto ao final do método e para isso há ferramentas que a estimam e *softwares* que a fixam tornando viável a capacidade *multiplex* (LANGE *et al.* 2008; BEREMAN *et al.* 2012; GALLIEN *et al.* 2011).

Por fim, há o estabelecimento de um método dirigido por hipótese apoiado por informações contidas na literatura e refinado empiricamente, que é reproduzível para detecção das proteínas de interesse com a capacidade de detectar e mensurar proteínas em amostras não fracionadas no intervalo de 0.1–10 µg/mL no caso do plasma, com a possibilidade de inclusão de várias proteínas para identificação no mesmo ensaio (LIEBLER & ZIMMERMAN, 2013).

Apesar das abordagens de proteômica dirigida contornarem algumas questões em relação a sensibilidade e seletividade, estes desafios ainda existem e são expressos na forma de interferências nas transições e supressão de íons, processos principalmente acarretados pela complexidade das amostras. Um desafio adicional é a quantificação de cada peptídeo, pois estes apresentam características específicas que propiciam uma aquisição de sinal diferenciada e para sua quantificação é necessária determinação da resposta linear no instrumento, o que exige elaboração de estratégias envolvendo métodos analíticos adicionais e aquisição ou síntese de peptídeos (KIYONAMI *et al.* 2010; GILLETTE & CARR 2013).

1.4 – Proteínas alvo e biomarcadores para diagnóstico do câncer

O câncer sendo uma das maiores causas de mortalidade é de extrema relevância enquanto alvo da proteômica e áreas como sua detecção precoce, descoberta de mecanismos e terapia são vias que recebem esforços constantes, com a detecção precoce sendo especialmente almejada pela capacidade de possibilitar melhores prognósticos.

Uma das melhores formas para o diagnóstico precoce do câncer, prognóstico ou resposta terapêutica é o uso de biomarcadores. Biomarcadores de câncer podem ser DNA, mRNA, metabólitos, processos e proteínas produzidos por tumores ou em resposta à ocorrência de câncer ou fatores associados, podem ser empregados como diagnóstico diferenciando indivíduos enfermos de saudáveis, avaliando o estágio da doença, indicador de prognóstico e monitoramento após intervenções. Para isso muitos requisitos devem ser preenchidos antes da aprovação de um biomarcador para uso clínico. De forma mais geral deve ser facilmente mensurável, confiável e sustentado por um ensaio com alta sensibilidade e especificidade e de forma mais particular para o diagnóstico precoce por exemplo é desejável sua disponibilidade na circulação em quantidade considerável, dado um pequeno e assintomático tumor. Outros requisitos são a alta especificidade em relação ao tecido de origem e produção de níveis mais altos da molécula comparado ao nível basal (KULASINGAM E DIAMANDIS, 2008).

Um dos mais bem conhecidos biomarcadores do câncer é o PSA (antígeno prostático específico) referente a proteína codificada pelo gene KLK3. A utilização do PSA na detecção inicial e triagem, resultou em melhoria no tratamento do câncer de próstata com estudos mostrando que o aumento da concentração de PSA detectada em indivíduos assintomáticos estava associado com maior risco de câncer. Contudo, este biomarcador sofre algumas limitações, pois além de ser encontrado em pacientes com câncer de próstata também pode ser encontrado em indivíduos com uma condição benigna, inflamação ou infecção. Outro biomarcador amplamente utilizado, desta vez para prognóstico e predição de resposta a tratamento é o ER (receptor de estrógeno), encontrado no tecido da mama e que indica a susceptibilidade da resposta do paciente à terapia hormonal que é mais efetiva em pacientes ER positivo em estágios precoces ou avançados da doença. No entanto este biomarcador também não é ideal, pois

um terço dos pacientes com ER positivo se mostra resistente ao tratamento e os que não o são podem eventualmente desenvolver resistência (PAVLOU *et al.* 2013).

A pesquisa para descoberta de candidatos a biomarcadores lida com o uso de recursos da genômica, proteômica e auxílio da literatura, este empenho é propenso a erros pela incapacidade das tecnologias atuais abordarem globalmente o proteoma. O caso particular das proteínas de baixa abundância, ainda mais se buscadas no plasma, é um exemplo da incapacidade mencionada.

O embasamento em informações clínicas na priorização dos candidatos, o que traria maior probabilidade de sucesso é outra questão que se destaca sendo um exemplo disso os candidatos ligados a resposta inflamatória que tem pouco uso pela sua inespecificidade. Com isso a pesquisa cria muitos candidatos que podem contemplar um aspecto ou outro, mas não agrega os requisitos para validação. Um empecilho na forma de seleção de candidatos que atuam nas vias metabólicas é o conhecimento incompleto destas que impede a confiança no método (PAULOVICH *et al.* 2008).

O grande investimento empenhado na indústria e academia na descoberta de biomarcadores contrasta com a utilização destes na clínica, mesmo se tratando de biomarcadores descobertos e validados por meio de técnicas robustas e confiáveis com resultados reprodutíveis e concordantes dentre diferentes estudos, isso se deve a falha na contribuição decisiva ao paciente por trazer apenas uma informação adicional, porém não essencial. Profissionais da clínica usualmente não acham determinadas informações necessárias na decisão de tratamento dos pacientes por vezes preferindo uma espécie de “sobretratamento” ao emprego de biomarcadores, ação justificável pela possibilidade de falsos positivos ou negativos. Este cenário impede que candidatos a biomarcadores se tornem práticos aos diagnósticos e uma saída para isso é sua utilização em combinação com outros de uso melhor difundido (DIAMANDIS 2012).

O longo processo para o estabelecimento do uso de biomarcadores advindo dos requisitos e características desejáveis já mencionadas e particularmente a complexidade encontrada no plasma com milhares de proteínas com variação de dez ordens de magnitude pode ser transferido para descoberta em cultura de células e outros fluídos, como os proximais, que possibilitam um meio menos complexo para as etapas iniciais. Pensa-se que um único marcador pode servir em casos selecionados, mas há um

crescente consenso que múltiplos marcadores usados individualmente ou como parte de painéis integrados serão requeridos pela maioria das aplicações (RIFAI *et al.* 2006).

A malignidade do câncer e associação com maus prognósticos está sujeita, dentre outros fatores, à ocorrência de metástases, tendo a mobilidade como sua característica fundamental, onde o processo da EMT (transição epitélio-mesenquimal) é o responsável pela aquisição desta característica. Assim a determinação da ocorrência de alteração de fenótipo traz a associação com estágios mais avançados de câncer, o que é corroborado pela observação da aquisição de marcadores mesenquimais em carcinomas associada ao aumento do potencial metastático. Estes marcadores compõe uma assinatura com mudanças do citoesqueleto, fatores de transcrição e proteínas de aderência, representando, portanto, um processo com biomarcadores diretamente ao processo de progressão tumoral (ZEISBERG & NEILSON 2009).

Em resposta ao consenso de que o metabolismo celular é substancialmente alterado durante a oncogênese e progressão tumoral Hanahan e Weinberg adicionaram em publicação a desregulação energética como característica do câncer, consolidando a posição a respeito desta propriedade, então o metabolismo do câncer tem sido explorado para compreensão dos processos que permitem seu crescimento, reprodução, manutenção e resposta por meio de vários métodos para caracterização de suas alterações, como a espectrometria de massas para identificação de proteínas (ZHOU *et al.* 2012).

1.5 - Metabolismo energético no câncer

Na maioria das células normais o metabolismo da glicose começa com a via metabólica da glicólise, onde uma molécula de glicose através de reações catalisadas por enzimas encontradas no citosol rende 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de NADH e, em termos de energia, outras 2 moléculas de ATP. Posteriormente no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), que acontece no interior da mitocôndria, as 2 moléculas de piruvato passam por mais uma série de reações que ao final geram NADH e FADH₂, mais moléculas de alta energia. Estas, por sua vez, na presença de oxigênio, são oxidadas por complexos proteicos presentes na membrana mitocondrial pelo processo da

fosforilação oxidativa. Na matriz mitocondrial é criado um gradiente eletroquímico de prótons, que por sua vez, alimentam o complexo da ATP sintase através da força eletromotriz gerando mais ATP, molécula provedora de energia para as reações da célula. (revisado por NGO *et al.* 2015).

Em células de tumor, foi observado por O. Warburg uma maneira distinta para produção de energia sendo a glicólise a via preferencial, resultando na produção de lactato através da fermentação láctica. Apesar da fosforilação oxidativa ser a etapa onde há mais produção de ATP, é de se esperar que o aporte energético diminua utilizando-se apenas a via glicolítica. No entanto, a célula compensa isso com um incremento da captação de glicose, resultando em altas taxas de glicólise e produção de lactato. Esse processo de glicólise aeróbica é conhecido como efeito Warburg (WARBURG 1925).

Os processos ocorridos no efeito Warburg não são exclusivos de células de tumor. Um exemplo clássico vem de nossas células musculares que realizam a fermentação láctica, mas não de forma preferencial, pois só ocorre com deficiência de oxigênio. O que torna o efeito Warburg diferente é a preferência pela glicólise como principal fonte de energia e fermentação láctica mesmo com suprimento de oxigênio. Um exemplo mais próximo do efeito Warburg em células normais é encontrado em fibroblastos de quelóide, estes também mostram alto consumo de glicose, aumento de atividade de enzimas glicolíticas, maior produção de lactato, decréscimo na produção de ATP sob influência de inibidores da glicólise e incremento dessas características quando submetidos a hipóxia (WARBURG 1925; VINCENT *et al.* 2007).

A aquisição de um fenótipo celular onde a glicólise se destaca na produção bioenergética traz algumas vantagens: i) síntese mais rápida de ATP comparada com todo o processo da oxidação completa da glicólise; ii) a sobrevivência em locais mal perfundidos, onde o acesso ao oxigênio é inconstante e o que seria letal para células que contam principalmente com a fosforilação oxidativa para produção de ATP; iii) o aumento da demanda biossintética que o crescimento do tumor exige, utiliza intermediários da glicólise como fonte para vias de biossíntese que emanam da glicólise para produzir lipídios, nucleotídeos e proteínas (LIBERTI & LOCASALE, 2016). Há também produção de lactato como principal produto da glicólise aeróbica, exportado por transportadores e possibilitando o intercâmbio dessa molécula de alto potencial energético para células em regiões melhor perfundidas que possam realizar fosforilação oxidativa. Essa condição favorece a invasão por meio da acidificação do

microambiente provendo condição favorável para ativação de proteases causando degradação da matriz extracelular e suprime efetores imunes anticâncer (HAN *et al.* 2013; KROEMER & POYSSEGUR, 2008). O lactato exportado ainda pode ir para corrente sanguínea e entrar no ciclo de Cori, um processo onde é convertido em glicose no fígado, que por sua vez é disponibilizada para glicólise e assim é criado um loop na geração de ATP. No entanto, este processo se mostra oneroso para o corpo, pois exige muita mobilização de energia do fígado originando o efeito colateral da caquexia do câncer (COURTNAY *et al.* 2015).

Outro papel importante no contexto da geração e manutenção do tumor também é atribuído às espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas tanto por vazamento na cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa, como por NADPH oxidases. Estas espécies são mais conhecidas por causar danos em macromoléculas, mas ao mesmo tempo desempenham a função de regulação por meio de mecanismos de oxidorredução, como acontece com uma enzima chave da glicólise, GAPDH, cuja oxidação de cisteínas por ROS rearranja o fluxo glicolítico (KANG *et al.* 2015). Portanto, há um nível de homeostase a ser mantido para não causar danos a célula nem prejudicar o metabolismo. Um ponto relatado de forma recorrente no controle do efeito Warburg é o efetuado pelo fator induzível por hipóxia (HIF), regulador de genes de 9 das 10 enzimas da glicólise e também de transportadores de glicose (GLUTs). Este fator assiste células tumorais no metabolismo independente de oxigênio (COURTNAY *et al.* 2015).

O efeito Warburg não é a única alteração registrada em células de tumor. O efeito Lisanti ou Warburg reverso é outro frequentemente mencionado. O efeito Warburg reverso emerge de um modelo onde as células epiteliais do câncer modulam seu microambiente tornando as células vizinhas do estroma produtoras de metabólitos de alta energia, como no efeito Warburg, para daí então utilizar esses metabólitos em uma produção eficiente de energia com alto potencial de proliferação, logo o estroma (induzido) “diretamente alimenta as células epiteliais de câncer numa espécie de relação parasita-hospedeiro” (PAVLIDES *et al.* 2009).

As alterações fenotípicas decorrentes do processo de metástase são acompanhadas por alterações metabólicas. Em geral o destacamento das células do tumor prejudica o transporte de nutrientes ocasionando em déficit de produção de ATP, o que conduziria à apoptose. Assim, para

sobreviver, as células metastáticas precisam aumentar sua produção de energia envolvendo a atividade mitocondrial, pois as vantagens observadas na manutenção da glicólise aeróbica no ambiente do tumor primário não têm respaldo no ambiente das células disseminadas e o programa da metástase dá suporte para reestabelecimento do papel chave da mitocôndria (WEBER 2015).

2 – Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolver e aplicar métodos de proteômica dirigida associada à espectrometria de massas para o monitoramento de alterações na via glicolítica e proteínas relevantes ao câncer em modelos de progressão tumoral.

2.2 - Objetivos Específicos

- Definir protocolos para desenvolvimento e aplicação de métodos de proteômica dirigida.
- Selecionar os peptídeos representativos mais adequados para monitoramento da via glicolítica.
- Otimizar parâmetros correspondentes à detecção de peptídeos representativos preestabelecidos referentes a marcadores epiteliais e mesenquimais.
- Verificar alterações na via glicolítica e em alguns marcadores epiteliais no modelo de progressão tumoral de células MCF7 tratadas com fator de crescimento EGF.
- Validar as alterações gerais da via glicolítica através da medição do consumo de oxigênio e da atividade da citrato sintase.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Preparo de amostras e equipamentos

3.1.1 - Preparo de amostras

Para a quantificação precisa de amostras pela abordagem de proteômica dirigida, as etapas de preparo, digestão e alquilação das amostras são fundamentais para garantir a reprodutibilidade das medidas. Um protocolo robusto para esta etapa foi definido (LANFREDI *et al.* 2017). Amostras de proteínas ou de extratos totais celulares ou de tecido, foram quantificadas através do método de Bradford (Quick Start Bradford Kit - Biorad), de acordo com as instruções do fabricante. Um volume equivalente a 100 µg de proteínas totais foi aliquotado, distribuído em tubos de baixa absorvidade de proteínas (LoBind, Eppendorf) e dado o volume de cada amostra e a composição da solução, foi adicionado volume de solução de uréia 8 M (garantindo concentração final mínima de 6 M de ureia) para desnaturação de proteínas. Para redução das pontes dissulfeto foi adicionado 33 µL de ditioneitol 0,1 M (DTT – Bio-Rad) para concentração final de aproximadamente 0,01 M na amostra e mantido a 37°C por 30 minutos, posteriormente foi adicionado 7 µL iodoacetamida 0,5 M (IAA – Sigma- Aldrich) (concentração final de aproximadamente 0,01 M na amostra), reduzida temperatura para 25°C e coberta, para privação da luz, por mais 30 minutos para a alquilação. Após alquilação, as amostras foram diluídas com no mínimo 8 vezes com solução de Tris 0,1 mol/L pH = 8,0 para reduzir a concentração de uréia para menos de 1M e manutenção do pH. Então, adicionou-se 40 µL de tripsina (Sigma-Aldrich) diluída com ácido acético 50 mM na concentração de 0,1 µg/µL, o que representa uma razão de 1:25 enzima/proteínas (m/m) nas amostras, totalizando um volume de aproximadamente 2 mL que foram incubadas por 16h a 37°C sob agitação. Após esse período, as amostras foram congeladas ou diretamente processadas como descrito na seção a seguir.

3.1.2 - Extração de peptídeos em fase sólida (SPE)

As amostras digeridas por tripsina foram purificadas em colunas OASIS-HLB (Waters®) de fase reversa. As colunas foram condicionadas com 600 µl de acetonitrila pura e equilibradas com 600 µl de solução 5% de acetonitrila (v/v) em água. Após equilíbrio, as amostras foram aplicadas, a coluna novamente lavada com 300 µl de solução 5% de acetonitrila (v/v) em água, para remoção de sais e contaminantes hidrofílicos. Os peptídeos de interesse, retidos na coluna, foram eluídos com 750 µl de solução de 70% de acetonitrila (v/v) em água, e coletados em tubos de baixa absorvidade de proteínas (LoBind eppendorf). As amostras foram secas em Speed Vac sem aquecimento e reconstituídas com 50 µL de solução aquosa de 5% de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico (v/v) em água, para análise em LC-MS/MS. A fim de remover eventuais partículas insolúveis, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos, transferindo-se apenas 45 µL de seu volume para os tubos próprios para injeção no sistema (Waters, capacidade 200 µl).

3.1.3 - Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas

A cromatografia líquida de ultra eficiência foi desenvolvida em sistema ACQUITY Class I UPLC System (Waters Corporation) com coluna de fase reversa de 150 mm de comprimento, diâmetro de 1 mm e partícula de 1,8 µm (coluna HSS T3, Waters). O sistema de solventes foi: solvente A - 94,9% de água, 5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (v/v); solvente B - 99,9% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (v/v). A corrida cromatográfica utilizou fluxo de 0,1 mL por minuto em um gradiente de 5-30% de solvente B, desenvolvido em 25 minutos, com ciclo final de regeneração da coluna em 100% de solvente B. O sistema de cromatografia estava acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo sequencial Xevo TQ-S (Waters Corporation) com fonte de ionização ESI (electrospray), compondo um moderno sistema LC-MS/MS. Os parâmetros básicos utilizados no espectrômetro de massas foram: voltagem capilar = 3,2kV; cone = 50V; temperatura de dessolvatação = 300°C; fluxo de

gás de dessolvatação = 300 (L/h); fluxo de gás do cone (L/Hr); fluxo de gás de colisão = 0.22 mL/min). Demais parâmetros, como energia de colisão e “*dwell time*” foram ajustados especificamente para cada método desenvolvido.

3.2 - Estimativa de reprodutibilidade e sensibilidade da técnica

Para avaliar a reprodutibilidade da técnica, incluindo todo o processo de preparo, bem como a sensibilidade da técnica, foi utilizada a albumina de soro bovino (BSA) como modelo. Também foi avaliado o efeito da matriz na sensibilidade, misturando-se BSA em um extrato celular total de células MCF7. Uma alíquota contendo 100 µg de BSA (Bio Rad) foi digerida e ressuspensa em 1 mL de solução 5% acetonitrila, 0.1% de ácido fórmico (v/v) em água. A partir desta, foram feitas diluições de 1:10 em extrato celular da linhagem MCF7 com concentração de 1 µg/µL de proteínas totais resultando em soluções de 10, 1 ng/µL, 100, 10 e 1 pg/µL de BSA. Um “branco” de análise foi constituído apenas por extrato celular. Os peptídeos selecionados para monitoramento foram **SLHTLFGDELCK** e **AEFVEVTK**, pois constam entre os mais observados no banco de dados PeptideAtlas e são diferentes dos observados na proteína equivalente da espécie humana. Detalhes adicionais sobre a seleção de peptídeos e desenvolvimento do método são apresentados nas seções a seguir.

3.3 – Desenvolvimento de métodos e de análise de dados

3.3.1 - *Software Skyline*

Para todo o processo de desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida, programação do instrumento e análise dos dados foi utilizado o *software Skyline* v 3.6 (MACLEAN *et al.* 2010). Este *software* de livre acesso trabalha com arquivos compatíveis com o *software MassLynx* v. 4.1 (entre

outros), que controla e o instrumento (Waters). Para a criação de métodos de maneira geral, utilizou-se a interface Skyline/MassLynx que possibilitou a padronização de tempos de retenção de cada peptídeo e energia de colisão ótima. A predição de massas de íons precursores dos peptídeos utilizou massa média e para massa monoisotópica os fragmentos. Ao final, para cada conjunto de proteínas estudado, foram definidos métodos multiplex, com modo de coleta de dados “agendado”, baseados no tempo de retenção determinado para cada peptídeo com um intervalo de 2 minutos. Por fim, o método foi editado para garantir um mínimo de 12 pontos de medida para cada pico cromatográfico, com largura estimada de 15 segundos, o que representou um “*dwell time*” no instrumento igual ou superior a 30 ms.

3.3.2 - Painel para monitoramento da glicólise

O desenvolvimento do painel monitoramento da glicólise e outras proteínas de interesse contou com a ferramenta de verificação de peptídeos únicos do *software* Skyline. Esta ferramenta compara as sequências dos peptídeos selecionados com a sequência das proteínas de um proteoma de referência, no caso o proteoma humano, de maneira a garantir a seleção de peptídeos únicos (proteotípicos ou quantitípicos). Tanto a sequência das proteínas de interesse como a sequência do proteoma humano foram obtidas no banco de dados UniprotKB. Abaixo tabela das 11 proteínas que compõe a via glicolítica e que foram testadas para o método.

Tabela 1- Proteínas cogitadas para painel representativo da via glicolítica.

Protein	Protein Gene	Protein Accession
Hexokinase-2	HK2	P52789
Hexokinase-1	HK1	P19367
ATP-dependent 6-phosphofructokinase liver type	PFKL	P17858
ATP-dependent 6-phosphofructokinase muscle type	PFKM	P08237
ATP-dependent 6-phosphofructokinase platelet type	PFKP	Q01813
Pyruvate kinase	PKM	P14618
Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	P11413
Citrate synthase mitochondrial	CS	O75390
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	P04406
L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	P00338
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	P07195

Após a seleção das proteínas, partiu-se para seleção dos peptídeos. A busca pelos peptídeos representativos ocorreu primeiramente no bancos de dados PeptideAtlas e no algoritmo PREGO integrado ao *software* Skyline. No banco de dados disponível no PeptideAtlas foram tomados os peptídeos com maior número de observações e no algoritmo PREGO foi requerida a sugestão dos 5 peptídeos mais responsivos de cada proteína, todos respeitando as regras para seleção de peptídeos trípticos a seguir:

- Apresentar distância de 25 aminoácidos do N-terminal;
- Ter entre 8 e 20 aminoácidos;
- Não conter triptofano;
- Não conter metionina;
- Não iniciar ou conter mais de 2 histidinas;
- Não apresentar Arginina ou Lisina seguidas de prolina.

Como primeiro parâmetro a ser determinado para os peptídeos, selecionou-se a predição do tempo de retenção dos peptídeos, que foi feita com base na calculadora SSRCalc (*Sequence Specific Retention Calculator*). O algoritmo desta calculadora também constante no *software* Skyline determina um valor que corresponde ao tempo de retenção esperado para dado peptídeo. A predição leva em conta a sequência de aminoácidos de cada peptídeo, o tipo de colunas de fase reversa e fatores como modificadores da fase móvel e gradiente utilizado na separação. Para maior acuidade na predição realizada, especificamente determinado para nosso sistema cromatográfico, foram utilizados 68 peptídeos sintéticos diversos adquiridos pelo laboratório, os quais tiveram seus tempos de retenção determinados e foram utilizados como referência para uma correlação com os tempos estimados pelo algoritmo SSRCalc. Além disso, foi determinada uma janela de abrangência para detecção dos peptídeos de interesse com coeficiente de determinação de aproximadamente 90% em janelas de 5.9 minutos, que foi arbitrariamente expandida para 8 minutos a fim de permitir maior abrangência no desenvolvimento de métodos. Foram escolhidas as transições compreendidas no intervalo de 400 a 1200 m/z priorizando os valores maiores que o precursor. Os peptídeos foram então testados empiricamente a partir da injeção de extratos proteicos em busca daqueles que apresentaram maior sinal e melhor comportamento

cromatográfico, avaliados pela área e coesão do pico cromatográfico respectivamente, dentro da janela de tempo estabelecida. Em um processo iterativo, foram feitas novas corridas cromatográficas contendo apenas os melhores peptídeos que restaram após a filtragem realizada com todos os critérios acima citados. Por fim o método foi refinado, apresentando janelas de tempo de aquisição de 2 minutos para aquisição de dados de cada peptídeo.

3.3.3 - Pannel de proteínas relevantes ao câncer

Para acompanhar processos de modificações de expressão proteica ocorridas no modelo de progressão tumoral utilizado, foi selecionado um conjunto de proteínas que definem fenótipos epitelial (característico de tumores primários não metastáticos) e mesenquimal (característico de células metastáticas). Foram selecionadas proteínas já descritas na literatura como E-caderina (CADH1) e N-caderina (CADH2) envolvidas em contatos intracelulares, Vimentina (VIM) que compõe o esqueleto de células mesenquimais e ancora várias organelas, e comumente usada como marcador para alteração de fenótipo característico do câncer, e Snai1, Snai2 e Twist, que são fatores de transcrição e representam a regulação dos processos de associados à metástase. Abaixo proteínas selecionadas para o pannel de biomarcadores epiteliais e mesenquimais.

Tabela 2- Proteínas utilizadas no pannel representativo de marcadores epiteliais e mesenquimais.

Protein	Protein Gene	Protein Accession
Cadherin-1	CDH1	P12830
Cadherin-2	CDH2	P19022
Zinc finger protein SNAI1	SNAI1	O95863
Zinc finger protein SNAI2	SNAI2	O43623
Twist-related protein 1	TWIST1	Q15672
Vimentin	VIM	P08670

Diferentemente da estratégia baseada em bancos de dados e determinação empírica em amostras, utilizada para as proteínas da via glicolítica, os peptídeos representativos escolhidos para estas proteínas foram selecionados de dados proteômicos obtidos pela análise “*shotgun*” em experimentos

anteriores do laboratório. Para cada proteína, foi selecionado o peptídeo mais intenso que foi adquirido comercialmente na forma sintética. Adicionalmente, durante o processo de síntese, foi incorporado como aminoácido C-terminal, isótopo estável de carbono 13 e nitrogênio 15, causando um incremento de massa de 8 unidades no resíduo de aminoácido lisina e 10 unidades no resíduo de arginina, o que permite a utilização do peptídeo como padrão interno.

A disponibilidade destes peptídeos sintéticos possibilitou outra forma de desenvolvimento de método, onde os parâmetros de tempo de retenção e transições mais intensas, e adicionalmente a otimização de energia de colisão para cada peptídeo, foram todas refinadas através da análise dos peptídeos diretamente injetados no sistema LC-MS/MS. A seção de resultados traz todos os detalhes desta etapa.

3.4 – Modelo celular para progressão tumoral

Como modelo experimental para o estudo de alterações proteômicas durante a progressão tumoral foi utilizada a linhagem celular derivada de câncer de mama MCF7. Além disso, também foi utilizado um protocolo de exposição das células ao fator de crescimento EGF que estimula e simula mecanismos iniciais da metástase do câncer. Os procedimentos de cultivo e manutenção da linhagem celular foram realizados em capela de fluxo laminar. As células foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, à temperatura de 37°C e 95% de umidade. A linhagem foi mantida em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (GIBCO) e enriquecido com 10% soro fetal bovino (SFB). Para a exposição ao EGF, as células foram previamente cultivadas em meio contendo 1% de SFB, por 24h e em seguida foram adicionados 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal (EGF) (rhEGF, R&D Systems, cat # 236-EG). Durante 72 horas o meio de cultura foi trocado a cada 24h. A extração das proteínas do extrato total foi realizada em solução de lise contendo uréia 8M, Tris 0,1 M, ortovanadato de sódio 1 mM e 5% de inibidor de proteases (Sigma, P1860). Foram feitos 3 ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique, São Paulo, Brasil) a 45W por 5 minutos cada, intercalando-se a agitação em vórtex e resfriamento da amostra em banho de gelo sem a observação de aquecimento da

amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $20.000\times g$ por 30 minutos com manutenção da temperatura de 4°C . O sobrenadante, contendo a solução de proteínas totais foi coletado e estocado em freezer a -80°C para posterior análise. Para estudos das proteínas envolvida na via glicolítica, foi utilizado apenas a fração citoplasmática da célula. Aproximadamente 1×10^7 células MCF7 tratadas ou não por EGF foram lavadas 2 vezes com tampão PBS gelado e lisadas com o auxílio de rodinho em 150 μL de tampão hipotônico M (HEPES 50 mM pH = 7,4, cloreto de sódio 10 mM, cloreto de magnésio 5 mM, EDTA 0,1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, fluoreto de sódio 1 mM e pirofosfato de sódio deca-hidratado 1mM) e inibidor de protease (Sigma-P1860). A suspensão foi agitada por 20 segundos e passada por uma seringa 20 vezes e homogeneizada (Homogeneizador, Modelo D-130, Biosystems) por 1 minuto. Um pellet nuclear foi sedimentado por centrifugação a $500\times g$ durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então centrifugado a $16.000\times g$ por 15 minutos a 4°C . O pellet desta etapa representa uma fração enriquecida de proteínas de membrana e o sobrenadante coletado contem proteínas citoplasmática e que foram utilizadas neste estudo. Todos os protocolos de exposição ao EGF e fracionamento celular foram padronizados e desenvolvidos pela doutoranda Camila de Souza Palma. Adicionalmente, utilizamos o mesmo painel para monitoramento de modelo semelhante de células de câncer de ovário CaOV3, desenvolvidos pela Dra. Mariana Grassi e recentemente publicados com nossa colaboração (GRASSI *et al.* 2017).

3.5 - Avaliação funcional do consumo de oxigênio do modelo de progressão tumoral

3.5.1 - Consumo de Oxigênio

Exemplares das culturas de células MCF7 controle e exposta ao fator de crescimento EGF foram dissociadas com solução contendo tripsina 0,5%, EDTA 0,2% e NaCl 0,9%, centrifugadas a 1000 RPM em centrífuga clínica e ressuspensas em meio Krebs-Hanseleit (NaCl 119 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 , 1,25 mM, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM). As células foram contadas em câmara de Neubauer para correção do número de células, então volume equivalente a 1×10^6 células foram suspensas em 2,1 mL de meio Krebs-Henseleit contendo glicose 10 mM, pH = 7,3 a 37°C e introduzidas no equipamento O2k

Respirometer (Oroboros) para o ensaio de respirometria de alta resolução com monitoramento *software* DatLab v 5.0 para registro do consumo de oxigênio. O estado *Routine* foi determinado na presença apenas de meio Krebs-Henseleit, o estado *LEAK* (não fosforilativo) na presença de Oligomicina 2 µg/mL para inibir a síntese de ATP, o estado *ETS* (*capacity of the electron transfer system*) na presença de cianeto de carbonilo m-clorofenil-hidrazona (CCCP) 1 µM para induzir o desacoplamento mitocondrial e o estado ROX (*residual oxygen consumption*) na presença de Antimicina A 3 µM, para inibição do complexo III. A velocidade no estado ROX é uma medida do consumo de O₂ não relacionado à atividade da cadeia transportadora de elétrons, desse modo o valor referente ao estado ROX foi subtraído dos demais estados

3.5.2 - Atividade enzimática da Citrato sintase

Após registro do consumo de oxigênio, o meio contido na câmara do equipamento O2k Respirometer foi coletado e sonificado para mensurar a atividade da citrato sintase. Após sonicação os homogenatos foram centrifugados à 12000g a 4 °C durante 10 minutos o sobrenadante foi coletado e em seguida as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. O tampão de reação continha trietanolamina-HCl (0,1 M), pH = 8,0, 0,3 mM de acetil-CoA, 0,5 mM de oxaloacetato, 0,25% de Triton X-100 e 0,1 mM 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A reação foi iniciada pela adição de 10 µg de proteína a 200 µL do tampão de reação e a atividade citrato sintase foi determinada por espectrofotômetro no comprimento de 412nm (SHEPHERD & GARLAND 1966).

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Considerações iniciais

Neste estudo, adotamos uma estratégia proteômica moderna para avaliação de conjuntos específicos de proteínas de interesse, neste caso, para a progressão tumoral. Diferentemente da abordagem proteômica de “shotgun”, voltada para qualificação de um conjunto proteico complexo em uma amostra, a abordagem aqui adotada traz a vantagem de desvincular a identificação da quantificação, o que traz mais confiança e sensibilidade na quantificação.

A primeira etapa no desenvolvimento dos métodos de proteômica dirigida é a definição das proteínas alvo e quais são os seus peptídeos trípticos representativos (os peptídeos proteotípicos). Estes peptídeos são utilizados como padrões qualitativos, inicialmente para a definição dos métodos e posteriormente como padrões quantitativos para o monitoramento das proteínas de interesse. Ainda, quando disponíveis na forma sintética e puros, com conhecida concentração, permitem a construção de curvas de calibração para quantificar de forma absoluta e precisa cada amostra analisada. Somado a tudo isso, devemos destacar o caráter multiplex desta análise, pois vários peptídeos proteotípicos podem ser monitorados simultaneamente (DOMON & AEBERSOLD 2010).

Conforme será detalhado a seguir, utilizamos neste estudo, duas estratégias distintas para a definição dos conjuntos de proteínas e os peptídeos proteotípicos. Primeiramente, para o painel de proteínas que representam a via glicolítica, utilizamos uma estratégia iniciada com predições baseadas na sequência de aminoácidos das proteínas de interesse seguido de análises subsequentes de amostras para quantificação dos níveis de todos os peptídeos que respeitaram as restrições citadas na seção 3.3.2. Os peptídeos mais responsivos e que observam o perfil desejado integram o painel de peptídeos refinado para a análise final, voltada para a quantificação das proteínas. Desta forma a primeira etapa possibilita maior eficiência e sensibilidade na identificação de peptídeos em amostras complexas e a segunda etapa assegura a qualidade da quantificação contendo apenas os parâmetros necessários para o reconhecimento de cada peptídeo de forma precisa e não redundante.

Para a análise de proteínas relevantes à progressão tumoral, foi utilizada uma estratégia baseada em peptídeos sintéticos definidos com base em experimentos preliminares de proteômica baseada na estratégia “*shotgun*”. Esta estratégia, também eficiente foi importante para o refinamento de parâmetros relacionados ao sistema de LC-MS/MS utilizado, como tempo de retenção e energias de colisão para obtenção de método mais sensível. Adicionalmente, os peptídeos sintéticos marcados isotopicamente nos resíduos c-terminal (Lys ou Arg), permitiram a estratégia de utiliza-los como padrões internos, ou seja, puderam ser adicionados nas amostras para monitoramento paralelo, garantindo maior confiança principalmente na detecção de proteínas menos abundantes. Tais peptídeos foram adicionados após a ressuspensão das amostras em concentrações variáveis (0,1 – 10 ng/μL) de acordo com a intensidade de sinal do peptídeo endógeno observado previamente, objetivando um valor próximo desta intensidade.

Também não se pode deixar de destacar o desenvolvimento do *software* Skyline, que veio a responder à demanda por uma plataforma de desenvolvimento e análise em experimentos de proteômica dirigida com menos limitações e com capacidade de acelerar este campo tornando possível o compartilhamento de métodos e resultados entre diferentes tipos de equipamentos de diversos fabricantes. O *software* Skyline provê várias maneiras de construção e edição de métodos de proteômica dirigida, como a transferência de sequências de proteínas ou listas de peptídeos, precursores e produtos diretamente ou a inclusão de sequências FASTA com a qual há adição de informações sobre a proteína. A seleção de peptídeos e suas respectivas transições são facilitadas pelas previsões realizadas pelo *software* ou através da análise dos resultados já coletados, tudo facilitado pela exibição de gráficos, cromatogramas e espectros interativos. Por fim, os dados obtidos podem ser exportados com um formato flexível, personalizável e compatível com a distribuição ou publicação (MACLEAN *et al.* 2010).

As análises estatísticas foram feitas através do *software* Graphpad Prism, versão 7.0 (Graphpad Software Incorporation). Os dados foram expressos como média de experimentos em triplicata. O teste “*t*” de Student foi utilizado para comparação entre grupo tratado com EGF e seu respectivo controle. Os resultados com valor de $*p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A fim de sumarizar toda a estratégia desenvolvida neste estudo, será apresentada a seguir a figura 5. Nas seções seguintes, serão detalhados os resultados obtidos em cada etapa.

Figura 5- Fluxograma de etapas e resultados obtidos no presente estudo.

4.2 - Estimativa de sensibilidade e reprodutibilidade da técnica

A fim de respaldar todos os experimentos aqui descritos, realizamos um experimento preliminar com a proteína BSA a fim de avaliar a linearidade de resposta, sensibilidade e reprodutibilidade da técnica. A linearidade na resposta de um método é observada quando a regressão linear dos valores detectados de intensidade versus a concentração de amostra apresenta coeficiente de determinação superior a 0,98. Para construir este gráfico de correlação, apresentado na figura 6, utilizou-se medidas de concentrações conhecidas de BSA. As curvas referentes aos resultados obtidos com os dois peptídeos apresentaram valores suficientes para serem consideradas lineares em pelo menos 3 ordens de grandeza,

sendo o coeficiente de variação inferior a 15% (ver tabela 3) na maioria dos conjuntos de pontos. A exceção encontrou-se no menor ponto de concentração (1 pg/μL), considerado um ponto fora da curva.

Figura 6- Linearidade da relação área x concentração de peptídeos (BSA).

Tabela 3- CV% de cada ponto em diferentes concentrações de peptídeos.

Peptídeo	(CV %) Concentração de BSA em matriz complexa					
	10 ng/μL	1 ng/μL	100 pg/μL	10 pg/μL	1 pg/μL	0
AEFVEVTK	15,4%	8,5%	4,3%	10,9%	2,9%	11,8%
SLHTLFGDELCK	4,8%	4,6%	8,9%	15,5%	34,9%	18,9%

Os valores correspondentes aos limites de detecção e quantificação para determinada proteína devem ser idealmente determinados em uma curva de calibração utilizando-se a própria proteína. No entanto, uma estimativa foi feita com base no ensaio de linearidade, observando os valores de área detectados para a proteína BSA adicionada a uma matriz com características mais próximas a uma amostra real, ou seja um extrato celular. Particularmente, a própria matriz apresentou valor de área acima do ruído do instrumento, resultado provavelmente proveniente do soro fetal bovino residual utilizado para crescimento das células em cultura, portanto, devendo considerar este “background” para os

resultados de quantificação (ver tabela 4). O limite de quantificação representa o menor valor de concentração quantificado com confiabilidade.

Tabela 4- Áreas de branco e ruído de cada peptídeo.

Peptídeo	Área da amostra branco	Área do ruído
AEFVEVTK	10155	19
SLHTLFGDELCK	14044	10

Excetuando-se o rigor da verificação de exatidão e considerando a observação de baixos valores do coeficiente de variação para a maioria dos pontos, estima-se que um valor aceitável é de dez vezes superior ao “background, sendo assim obtido os valores de 0,13 e 0,20 ng/μL como estimativa do limite de quantificação para **AEFVEVTK** e **SLHTLFGDELCK** respectivamente. O limite de detecção, por sua vez, pode ser considerado com valor três vezes superior ao ruído da amostra branco fornecendo os valores de 0,03 e 0,01 ng/μL para **AEFVEVTK** e **SLHTLFGDELCK** respectivamente (Anvisa RDC n. 166/2017).

4.3 - Monitoramento da glicólise por proteômica dirigida

A construção do painel representativo da glicólise e outras enzimas relevantes começou com a pesquisa e compreensão da via glicolítica. Nesta via, as enzimas que não são pontos de regulação apresentam dupla função e sua atividade pode servir tanto para o catabolismo como para o anabolismo da glicose. A escolha destas enzimas para o painel foi priorizada, pois o seu aumento ou diminuição não traria uma resposta efetiva da atividade da via catabólica. Assim, as enzimas de principal foco foram os pontos de regulação cujas reações são irreversíveis, hexoquinase (HXK1), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) com gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como indicador geral. Para a avaliação da demanda biossintética, foi selecionada a enzima glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (G6PD) que representa o sequestro de carbono do metabolismo da glicólise e alimentação da via das

pentoses fosfato que favorece a biossíntese de ácidos nucleicos necessária para divisão celular. Normalmente células do câncer aumentam o fluxo da via das pentoses fosfato regulando a enzima glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (JIANG *et al.* 2014). A inclusão da enzima lactato desidrogenase (LDH) no painel se deve a seu papel ao final da via glicolítica que no efeito Warburg dá vazão ao alto fluxo glicolítico, dessa forma indicando a ocorrência deste efeito e sendo mais uma contribuição na elucidação do empenho na funcionalidade do metabolismo energético da célula. A enzima citrato sintase (CS) integra o painel para indicar o fluxo para o ciclo de Krebs e indicar a densidade mitocondrial (PESTA & GNAIGER 2012).

A introdução das sequências das proteínas referentes ao proteoma humano no *software* Skyline tornou possível a visualização de todos os peptídeos gerados pela digestão por tripsina das proteínas selecionadas para compor o painel (*in silico*). Os parâmetros adicionados restringiram os peptídeos representativos tornando o teste empírico destes mais viável em relação ao números de corridas cromatográficas e qualidade do sinal obtido. Assim, o método gerado pelo *software* Skyline, considerando as restrições do filtro e outras obtidas da literatura ou empiricamente continha 111 peptídeos e todos estes foram submetidos a detecção para seleção utilizada no método final. O estabelecimento de uma janela de tempo de retenção de 8 minutos visou a possibilidade de detecção de todos os peptídeos, porém evitando inclusão de peptídeos com comportamento muito discrepante resultando em difícil manutenção do método em experimentos futuros.

Os fragmentos dos peptídeos selecionados para compor as transições foram obtidas por outro filtro também contido no *software* Skyline no qual foi definido que a massa dos fragmentos apresentasse razão m/z maior que o precursor. Posteriormente, objetivando maior sensibilidade de detecção, outras de razão m/z menor que o precursor também foram selecionadas, mas sempre respeitando o critério de intervalo 400-1200 m/z e não ultrapassando o quantidade de 6 transições por peptídeo, o que poderia comprometer o método em termos de “*dwell-time*”.

O método gerado pelo *software* Skyline foi exportado para o *software* MassLynx com parâmetros definidos para detecção de todos os peptídeos. A análise foi realizada em alíquotas de extrato total das amostras, os resultados foram importados novamente para o *software* Skyline. A tabela 5 indicando os resultados das áreas representativas totais dos picos cromatográficos para cada peptídeo.

Alguns peptídeos, mesmo gerando área maior que outros da mesma proteína, não foram selecionadas por não apresentarem o perfil cromatográfico ideal, como é o caso dos peptídeos a seguir:

GFSIPECQK, apenas uma transição detectada; **GQISETLK**, apenas duas transições detectadas; **NTGHICTIGPASR**, menor intensidade de sinal que outro peptídeo selecionado; **GYLDDPTVPR**, relação ruim de proporção entre transições.

Além disso, os critérios de seleção para análise de peptídeos adotados foram menos restritivos que os observados na literatura (LUDWIG & AEBERSOLD 2014). No caso de alguns peptídeos selecionados como melhores representantes de suas proteínas, a aplicação dos critérios mais restritivos vetaria sua análise. Os peptídeos de maior área e que melhor corresponderam ao perfil desejado para cada proteína foram selecionados e entre as isoformas da mesma proteína, foi mantida apenas uma.

Por fim, foi utilizada para respaldar a seleção empírica, uma busca por peptídeos representativos nas bases de dados PeptideAtlas e do algoritmo PREGO associado ao *software* Skyline. Utilizou-se os mesmos critérios da seleção de peptídeos para o teste empírico, e desta forma, mostrou-se que os resultados desses bancos de dados abrangem os peptídeos selecionados nos testes como pode ser visto na tabela 6. Os peptídeos proteotípicos definidos para utilização neste estudo e que representam enzimas regulatórias importantes da glicólise são apresentados na tabela 7.

Tabela 5- Peptídeos testados para painel representativo da via glicolítica.

Dados experimentais obtidos de extrato celular e adquiridos com método dirigido.

Protein Gene	Peptide Sequence	Total Area	Protein Gene	Peptide Sequence	Total Area
HK2	LSDETLLEISK	794	PFKP	AACNLLQR	52426
HK2	VTDNGLQK	26902	PFKP	ELVVTQLGYDTR	410
HK2	EELLFGGK	1530	PFKP	VTILGHVQR	9786
HK2	LSPELLNTGR	997	PFKP	SFAGNLNTYK	10471
HK2	DISDIEGEK	5475	PFKP	LPDDQIPK	16689
HK2	ICQIVSTR	27262	PFKP	VGIADGHR	102892
HK2	SASLCAATLAAVLQR	244	PFKP	DLQSNVEHLTEK	226
HK2	STIGVDGSVYK	54809	PFKP	NVIFQPVAEK	15597
HK2	LVPgcdVR	2205	PKM	LDIDSPITAR	515828
HK2	ETHASAPVK	928	PKM	NTGIITIGPASR	699501
HK2	GDFLALDLGGTNFR	190	PKM	GSGTAEVELK	33251
HK2	ASGCEGEDVVTLLK	84	PKM	IYVDDGLISLQVK	86189
HK2	NVELVEGEEGR	90	PKM	GADFLVTEVENGGSLGSK	37751
HK2	TEFDVAVDELSLNPGR	24	PKM	GVNLPGAADVLPVASEK	49153
HK2	NILIDFTK	2294	PKM	IENHEGVR	637
HK2	FLSQIESDCLALLQVR	488	PKM	GDLGIEIPAEK	543706
HK2	EVCTVVAR	396	PKM	GDYPLEAVR	265614
HK2	VTVGVDGTLTK	831	PKM	EAEAAIYHLQLFEELR	522
HK2	CDVSFLQSEDGSGK	31	PKM	CCSGAIIVLTK	58235
HK2	GAALITAVACR	92	PKM	APIIAVTR	5335147
HK1	DFNPTATVK	160775	PKM	GIFPVLCR	48653
HK1	SIPDGSEK	4015	G6PD	DGLLPENTFIVGYAR	2921
HK1	GDFIALDLGGSSFR	1209	G6PD	LFYLALPPTVYEAVTK	32402
HK1	LPVGFTFSFPCQSK	715	G6PD	LSNHISLFR	9703
HK1	ASGVEGADVVK	78691	G6PD	DNIACVILTFK	360
HK1	EGLLFEGR	32616	G6PD	EPFGTEGR	1846
HK1	ITPELLTR	287846	G6PD	GGYFDEFGLIR	8961
HK1	FNTSDVSAIEK	363	G6PD	GYLDDPTVPR	114897
HK1	SANLVAATLGAILNR	2065	G6PD	GSTTATFAAVWLYVENER	504
HK1	TTVGVDGSLTK	30114	G6PD	VQPNEAVYTK	668133
HK1	LVPDSVDR	60031	G6PD	VGFQYEGTYK	78587
HK1	FLLSESGSK	31442	CS	DILADLIPK	9185
HK1	QTHNNNAVVK	32	CS	GLVYETSVLDPDEGIR	515
HK1	ATDCVGHADVTLRL	266	CS	GFSIPECQK	128996
HK1	LVDEYSLNAGK	110500	CS	AYAQQISR	78750
HK1	GQISETLK	180165	CS	VVPGYGHAVLR	4622
HK1	FLSQIESDR	1988	CS	IVPNVLEQSK	195958
HK1	AILQQLGLNSTCDDSLVK	34	GAPDH	LIVINGNPITIFQER	12859
HK1	TVCVVSR	10071	GAPDH	AGAHLQGGAK	268
HK1	LNVTVGVDGTLTK	1362	GAPDH	IISNASCTTNCLAPLAK	127445
HK1	CNVSFLLSEDGSGK	13	GAPDH	TVDGPSGK	1542
HK1	GAALITAVGVR	15503	GAPDH	GALQNIIPASTGAAK	2666106
PFKL	FDEATQLR	73307	GAPDH	VIPELNGK	2448661
PFKL	GQLESIVENIR	5184	GAPDH	VPTANVSVDLTCR	444
PFKL	TNVLGHLQGGAPTDFDR	660	GAPDH	QASEGPLK	15264
PFKL	VFANAPDSACVIGLK	1689	LDHA	DLADELALVDVIEDK	1553
PFKL	AVAFSPVTELK	10598	LDHA	DYNVTANSK	3808
PFKM	VGIFTGAR	20683	LDHA	LVIITAGAR	3000421
PFKM	ITDEEATK	1635	LDHA	FIIPNVVK	607309
PFKM	LNIIIVAEGAIDK	79	LDHA	TLHPDLGTDK	10362
PFKM	IGLIQGNR	25888	LDHA	QVVESAYEVIK	5913
PFKM	VLVHHDGFELAK	1644	LDHA	VTLTSEEEAR	569012
PFKM	SFEQISANITK	828	LDHB	IVVVTAGVR	1297138
PFKM	DLQANVEHLVQK	251	LDHB	FIIPQIVK	2176
PFKM	ALVFQPVAEK	6899	LDHB	GLTSVINQK	36075
PFKM	DQTDFEHR	10247			

Tabela 6- Peptídeos representativos de cada proteína retornados por diferentes bancos de dados e obtidos nos testes.

Os peptídeos exibidos no banco de dados PeptideAtlas são os que respeitam os critérios de seleção (seção 3.3.2), e apresentam maior número de observações. O algoritmo PREGO também exibe unicamente peptídeos dentro dos critérios estabelecidos (seção 3.3.2).

	PKM	HXK1	PFKP	LDHA	G6PD	GAPDH	CS
Peptide Atlas	GADFLVTEVENGGSLGSK	SANLVAATLGAILNR	DLQSNVEHLTEK	DLADELALVDVIEDK	LQFHDVAGDIFHQQCK	LIVINGNPITIFQER	GLVYETSVLDPDEGIR
	IYVDDGLISLQVK	HIDLVEGDEGR	SFAGNLNTYK	VIGSGCNLDSAR	LKLEDFAR	GALQNIIPASTGAAK	IVPNVLEQ GK
	LDIDSPITAR	LVDEYSLNAGK	NVIFQPVAELK	QVVESAYEVIK	NSYVAGQYDDAASYQF	VPTANVSVVDLTCR	DILADLIPK
	EAEAAIYHLQLFEELR	QIEETLAHFHLTK	FTTDDICVLGISK	VTLTSEEEAR	LFYLALPPTVYEAVTK	IISNASCTTNCLAPLAK	VVPGYGHAVLR
PREGO	NTGIICTIGPASR	ATDCVGHVVTLLR	ELVVTQLGYDTR	LVIITAGAR	GGYFDEFGIIR	AGAHLQGGAK	ASASSTNLKDILADLIPK
	LDIDSPITAR	DFNPTATVK	ELVVTQLGYDTR	LVIITAGAR	EPFGTEGR	AGAHLQGGAK	DILADLIPK
	GDLGIEIPA EK	EGLLFEGR	VTILGHVQR	FIIPNVVK	GGYFDEFGIIR	TVDGPS GK	GFSIPECQK
	GDYPLEAVR	ITPELLTR	GGTPSAFDR	VIGSGCNLDSAR	GYLDDPTVPR	VIPELNGK	AYAQGISR
	APIIAVTR	FLLSESGSGK	LPDDQIPK	TLHPDLGTDK	VQPNEAVYTK	VPTANVSVVDLTCR	VVPGYGHAVLR
Testes	GIFPVLCK	GAALITAVGVR	NVIFQPVAELK	VTLTSEEEAR	VGFQYEGTYK	QASEGPLK	IVPNVLEQ GK
	GDLGIEIPA EK	DFNPTATVK	AACNLLQR*	LVIITAGAR	VQPNEAVYTK	GALQNIIPASTGAAK	AYAQGISR
	APIIAVTR	ITPELLTR	VGIADGHR*	FIIPNVVK	VGFQYEGTYK	VIPELNGK	IVPNVLEQ GK

Tabela 7- Proteínas e peptídeos selecionados com tempo de retenção estimado pelo *software* Skyline e medido (Glicólise). Para estimativa do tempo de retenção o *software* Skyline foi provido de tempos de retenção experimentais de diversos peptídeos sintéticos adquiridos pelo laboratório.

Protein Gene	Peptide Sequence	Predicted Retention Time (min)	Average Measured Retention Time (min)
PKM	GDLGIEIPA EK	12,98	12,12
PKM	APIIAVTR	9,24	7,82
HK1	DFNPTATVK	7,12	7,04
HK1	ITPELLTR	11,28	10,13
PFKP	AACNLLQR	6,99	6,08
PFKP	VGIADGHR	2,37	1,55
LDHA	LVIITAGAR	10,31	9,73
LDHA	FIIPNVVK	14,55	15,2
G6PD	VQPNEAVYTK	5,23	3,42
G6PD	VGFQYEGTYK	10,82	8,88
GAPDH	GALQNIIPASTGAAK	13,07	12,17
GAPDH	VIPELNGK	7,81	7,06
CS	AYAQGISR	4,29	2,02
CS	IVPNVLEQ GK	13,84	12,58

Tabela 8- Peptídeos e seus parâmetros utilizados para análise da via glicolítica.

Protein Accession	Protein Gene	Peptide Sequence	Precursor Mz	Precursor Charge	Collision Energy	Product Charge	Transit. 1	Transit. 2	Transit. 3	Transit. 4	Dwell Time (s)
P14618	PKM	GDLGIEIPA EK	571,646806	2	20,1	1	856,4775	686,4000	557,3293	444,2453	0,101
P14618	PKM	APIIAVTR	421,021206	2	14,5	1	769,4931	672,4403	559,3562	446,2722	0,075
P19367	HK1	DFNPTATVK	497,052256	2	17,3	1	877,4778	730,4094	616,3665	519,3137	0,075
P19367	HK1	ITPELLTR	472,065826	2	16,4	1	829,4778	728,4301	631,3774	502,3348	0,114
Q01813	PFKP	AACNLLQR	473,559186	2	16,5	1	803,4192	643,3886	529,3457	416,2616	0,075
Q01813	PFKP	VGIADGHR	412,958266	2	14,2	1	725,3689	668,3474	555,2634	484,2263	0,101
P00338	LDHA	LVIITAGAR	457,568321	2	15,9	1	800,4989	701,4305	588,3464	475,2623	0,114
P00338	LDHA	FIIPNVVK	465,589046	2	16,2	1	782,5135	669,4294	556,3453	459,2926	0,309
P11413	G6PD	VQPNEAVYTK	575,143971	2	20,2	1	921,4676	824,4149	710,3719	581,3293	0,101
P11413	G6PD	VGFQYEGTYK	596,655836	2	21	1	1092,4997	888,4098	760,3512	597,2879	0,075
P04406	GAPDH	GALQNIIPASTGAAK	706,813321	2	25,1	1	1042,5891	928,5462	815,4621	702,3781	0,101
P04406	GAPDH	VIPELNGK	435,518711	2	15	1	770,4407	657,3566	560,3039	431,2613	0,075
O75390	CS	AYAQGISR	433,482801	2	15	1	794,4155	631,3522	560,3151	432,2565	0,101
O75390	CS	IVPNVLEQ GK	605,728871	2	21,3	1	997,5677	900,5149	786,4720	687,4036	0,101

4.3.1 - Aplicação do método

O método gerado, conforme descrito nas seções anteriores, foi utilizado no monitoramento das alterações da via promovidas no modelo de progressão tumoral em células MCF7 expostas ao fator de crescimento EGF. A análise compreendeu 56 transições que representaram 14 peptídeos referentes a 7 proteínas, com 2 peptídeos por proteína e 4 transições por peptídeo. As análises foram realizadas para fração citoplasmática de amostras e em triplicata para o devido tratamento estatístico. Excepcionalmente, os peptídeos **AYAQGISR** e **IVPNVLEQ GK** referentes a proteína citrato sintase (CS), foram analisados no extrato total, por representar uma enzima mitocondrial. O gráfico apresentado na figura 7 sumariza os resultados obtidos.

Figura 7- Quantificação relativa dos peptídeos representativos do painel referente à glicólise. Com * relativo a $p < 0,05$.

Como pode ser observado nos resultados, o tratamento com o EGF das células MCF7, derivadas de câncer de mama, causou mudanças consistentes nos níveis de alguns peptídeos e consequentemente das proteínas por eles representadas. O resultado indica um incremento de intensidade na maior parte dos peptídeos analisados. Este incremento foi significativo para os peptídeos **GDLGIEIPAEK** e **APIIAVTR** representativos da proteína PKM, **LVIITAGAR** e **FIIPNVVK** representativos da proteína LDHA, **VGFQYEGTYK** da proteína G6PD e **VIPELNGK** da proteína GAPDH. Apenas para os peptídeos **AYAQGISR** e **IVPNVLEQ GK**, representativos da proteína citrato sintase, foi observado modesto incremento, mas não estatisticamente significativo. Os peptídeos representativos de HXK e PFK tiveram aumento, mas não atingiu significância estatística ($p < 0.05$).

Para exemplificar o tipo de resultado obtido e sumariado na figura anterior, é apresentado na figura 8 o perfil cromatográfico para o peptídeo **GDLGIEIPAEK** (PKM) e **DFNPTATVK** (HK1). Nota-se a grande diferença de resposta entre os peptídeos, superior a 30 vezes em intensidade, que pode representar a diferença de concentração de proteína na célula, mas também diferenças na ionização e estabilidade dos fragmentos dada as características próprias de cada peptídeo. Para estes peptídeos de baixa intensidade de resposta (**DFNPTATVK**, **ITPELLTR**, **AACNLLQR**, **AYAQGISR** e **IVPNVLEQ GK**), observa-se também um maior coeficiente de variação entre amostras.

Figura 8- Comparação entre sinais cromatográficos obtidos para diferentes peptídeos. a) Perfil de sinal mais comumente observado nas análises deste painel. b) Perfil de sinal exibido por alguns peptídeos, notavelmente menos intenso, o que pode comprometer sua análise.

O incremento notado na maioria dos peptídeos, tomado aqui como um indicativo do aumento dos níveis totais da proteína de proteínas reguladoras da glicólise, em decorrência do tratamento com o fator EGF, são condizentes com dados obtidos por outros grupos. Os padrões de atividade enzimática desta via em amostras de metástases comparados a tumores primários se mostram mais altos para hexoquinase, aldolase. Existe alguma discordância para a enzima piruvato quinase entre diferentes tipos de tumores e correlação com recorrência (HENNIPMAN *et al.* 1988). A expressão de mRNA acompanhada por análise em *western blotting* também aponta aumento significativo da enzima lactato desidrogenase em células MCF7 induzidas ao processo de transição epitélio-mesenquimal (KONDAVEETI *et al.* 2015). Além disso, também em células MCF7 expostas ao fator de crescimento IGF (*insulin-like growth factor*) e analisadas por proteômica dirigida, houve aumento geral nos níveis das enzimas glicolíticas, com destaque para o final da via e lactato desidrogenase (MURPHY & PINTO 2011).

O aumento de aquisição de glicose com alta produção de lactato foi observado em células de tumor por O. Warburg. O desacoplamento entre via glicolítica e fosforilação oxidativa é um recurso utilizado por células em hipóxia com aumento de atividade da lactato desidrogenase para manutenção de NAD^+ no passo que envolve a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (PAYEN *et al.* 2015).

A aquisição de um fenótipo celular onde a glicólise se destaca na produção bioenergética traz algumas vantagens competitivas no microambiente tumoral. Dentre entre elas, podemos destacar:

- síntese mais rápida de ATP comparada com todo o processo da oxidação completa da glicólise;
- a sobrevivência em locais mal perfundidos, onde o acesso ao oxigênio é inconstante, o que seria letal para células que contam principalmente com a fosforilação oxidativa para produção de ATP;
- o suprimento da demanda biossintética que o crescimento do tumor exige, o aumento do consumo de glicose é usado como fonte para vias de biossíntese que emanam da glicólise para produzir lipídeos, nucleotídeos e proteínas (LIBERTI & LOCASALE, 2016).

O lactato é o principal produto da glicólise aeróbica e é exportado por transportadores que possibilitam o intercâmbio dessa molécula de alto potencial energético para células do microambiente e

que possam realizar fosforilação oxidativa. Já foi demonstrado que a acidificação do microambiente promove condição favorável para ativação de proteases responsáveis pela degradação da matriz extracelular e que suprime efetores imunes anticâncer (HAN *et al.* 2013; KROEMER e POYSSEGUR, 2008).

O emprego de métodos em espectrometria de massas voltados para aquisição de informações de uma via ou processo em particular extrai a informação de forma mais minuciosa com as tecnologias disponíveis, pois objetiva contornar as questões técnicas emergentes quando se lida com amostras complexas e a espectrometria de massas em si, conforme aqui demonstrado.

Um dos principais benefícios deste tipo de abordagem pode aqui ser destacado com a aplicação do mesmo método de proteômica dirigida desenvolvido para o estudo de outras amostras, modelos, ou até mesmo outras condições patológicas. Particularmente o método aqui descrito, com pequenas modificações, foi utilizado no monitoramento de proteínas da via glicolítica em amostras de tecido cerebral *post-mortem* (LANFREDI *et al.* 2017). Neste estudo, apresentado como **Anexo 1**, foi possível mostrar a viabilidade de aplicação da estratégia proteômica dirigida para quantificar alterações da via glicolítica o que posteriormente será correlacionado com a patologia.

4.4 - Respirimetria e Atividade da enzima Citrato Sintase

A fim de estender e validar os dados obtidos por proteômica dirigida, que indicam o aumento do fluxo da via glicolítica, foi utilizado o ensaio de respirometria para avaliar a capacidade mitocondrial nas culturas de células MCF7. Trata-se de uma forma dinâmica de mensurar o fluxo metabólico diferentemente da medição de quantidade de proteínas ou metabólitos que mostram as características de maneira estática. Essa medição é interessante neste caso específico para verificar as hipóteses estabelecidas para o metabolismo energético de células de tumor. Esta medição dinâmica também é abrangente avaliando o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons em conjunto a fosforilação oxidativa, refletindo o resultado final das alterações em vias metabólicas.

O gráfico (figura 9) mostra a respiração de células não-permeabilizadas que utilizam substratos endógenos (reservas intracelulares) ou glicose obtida do meio exógeno de respiração como substrato

oxidável. O estado *Routine* reflete a respiração celular controlada pela demanda energética (suprimento de ATP) e/ou pelo desacoplamento intrínseco da fosforilação oxidativa. Neste estado, já é notável alguma diferença, apesar de não significativa, entre as células controle e as expostas ao fator de crescimento EGF, sendo que as células tratadas exibem maior demanda respiratória, avaliada pela maior velocidade de consumo de oxigênio.

No estado *Leak*, quando a ATP sintase é inibida pela oligomicina, a velocidade de consumo de O₂ reflete o desacoplamento intrínseco da fosforilação oxidativa. Nesse estado, a diferença da demanda de oxigênio entre as células controle e as expostas ao fator de crescimento EGF não é considerável apesar de uma pequena elevação vista nas células EGF.

Já no estado ETS, o desacoplador químico CCCP possibilita o retorno dos H⁺ à matriz mitocondrial e assim acelera a passagem de elétrons pela cadeia respiratória em seu fluxo máximo. Nesse estado pode-se observar um maior consumo de oxigênio pelas células tratadas com EGF comparadas às controles, indicando mudanças metabólicas. De todos os estados foi subtraído o estado ROX, assegurando a medição exclusiva do consumo de O₂ mitocondrial (PESTA & GNAIGER 2012).

Figura 9- Comparativo de consumo de Oxigênio de células MCF7 em diferentes estados. Com * relativo a $p < 0,05$.

A fim de complementar esses resultados a enzima Citrato Sintase foi utilizada como marcador mitocondrial e a medida de sua atividade foi tomada como um indicativo da quantidade de mitocôndrias nas células (WILLIAMS *et al.* 1986). Esta medida permite verificar se o aumento no consumo de oxigênio é decorrente de uma maior densidade mitocondrial.

O resultado exibido (figura 10) evidencia a maior atividade da Citrato Sintase nas células tratadas com fator de crescimento, com 57% de aumento em relação ao controle na média. Este resultado associado ao maior consumo de oxigênio permite o entendimento de que as células tratadas apresentam maior capacidade de respiração.

Figura 10- Atividade da enzima citrato sintase de células MCF7. Com * relativo a $p < 0,05$.

4.5 - Método para monitoramento de biomarcadores epiteliais e mesenquimais

4.5.1 - Desenvolvimento

O desenvolvimento do método de monitoramento para biomarcadores epiteliais e mesenquimais condiz com a abordagem *targeted* que tem como principal característica ser dirigida pela hipótese, ou seja, o desenvolvimento do método é baseado no conhecimento existente sobre o fenômeno a ser estudado e seus parâmetros são obtidos de bases de dados sem prévia identificação e caracterização das amostras, o que leva a outra característica do método, necessidade de informação prévia, deve haver informação sobre as proteínas envolvidas e seus peptídeos representativos para definição dos parâmetros da análise, parâmetros que por sua vez podem ser obtidos, refinados e também verificados com o uso de bibliotecas de peptídeos sintéticos. A informação gerada com aplicação da abordagem *targeted* consiste unicamente na quantificação dos níveis das proteínas de interesse (DOMON & AEBERSOLD 2010).

A escolha da abordagem *targeted* por suas vantagens implica na definição de parâmetros ótimos, o que consiste um desafio para seu emprego, neste sentido há necessidade de construção de bancos de

dados que proporcionem bons ensaios. O projeto SRMatlas desenvolveu um banco de dados para a identificação e quantificação de proteínas por experimentos de MRM com cobertura de 99,7% do proteoma humano, contando com alta resolução e espectros de fragmentação de alta qualidade (KUSEBAUCH *et al.* 2016).

Neste trabalho a hipótese abordada foi a possibilidade de observar alterações ocorridas no fenótipo da célula, a transição de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal, este processo já conta com biomarcadores bem conhecidos para sua validação poupando a etapa de seleção de proteínas empiricamente sendo necessário apenas a inserção destas no *software* Skyline e seleção dos peptídeos adquiridos pelo laboratório.

A primeira etapa na análise dos peptídeos deste painel foi a determinação de seu tempo de retenção, que se deu com a previsão feita como já descrito anteriormente, nesta análise todos os peptídeos foram detectados dentro da janela determinada exibindo o comportamento esperado necessário para aplicação em métodos futuros.

A análise foi feita com uma mistura de todos os peptídeos que compunham o painel na concentração de 10 ng/μL por peptídeo.

Tabela 9- Proteínas e peptídeos selecionados com tempo de retenção estimado e medido (biomarcadores).

Protein Gene	Peptide Sequence	Predicted Retention Time (min)	Avg. Measured Retention Time (min)
CDH1	NTGVISVVTGLDR	13,58	14,8
CDH2	GPFPQELVR	12,22	12,15
VIM	ILLAELEQLK	16,74	18,18
SNAI1	EYLSLGALK	12,54	13,75
TWIST1	IIPTLPSDK	9,11	9,61
SNAI2	EYVSLGALK	10,77	11,61

A próxima etapa foi a otimização da energia de colisão, nesta etapa todas as transições compreendendo o intervalo 400-1200 m/z foram selecionadas e diferentes energias de colisão foram testadas tendo como referencial a energia sugerida pelo *software* Skyline, foram estabelecidas 2 variações para energias menores e maiores com intervalo de 2 unidades entre elas. O resultado da

aplicação de diferentes energias de colisão em cada peptídeo é expresso na tabela 10 e pode ser visualizado nos exemplos.

Tabela 10- Energias de colisão testadas e respectivas áreas dos picos cromatográficos obtidos.

Protein Gene	Peptide Sequence	Opt Collision Energy	Total Area
CDH1	NTGVISVTTGLDR	21,5	221173344
		23,5	192796336
		25,5	178723040
		27,5	159046368
		29,5	123667000
CDH2	GPFPQELVR	14,3	139522400
		16,3	181606208
		18,3	204355424
		20,3	177897056
		22,3	156182112
VIM	ILLAELEQLK	16,6	358306528
		18,6	328649664
		20,6	277993760
		22,6	193303664
		24,6	122807256
SNAI1	EYLSLGALK	13,3	2158762496
		15,3	2179710208
		17,3	1721016576
		19,3	1286160128
		21,3	857612928
TWIST1	IIPTLPSDK	13,2	864967808
		15,2	861976576
		17,2	798825600
		19,2	813073600
		21,2	726644480
SNAI2	EYVSLGALK	13,1	1441709568
		15,1	1503536640
		17,1	1173319680
		19,1	887744256
		21,1	578743680

O intervalo de variação de energia de colisão utilizado para alguns peptídeos exibiu um padrão onde é possível observar a máxima intensidade, para outros peptídeos este máximo não foi observável dentro do intervalo determinado.

Figura 11- Comparação da variação da área dos picos cromatográficos em diferentes energias de colisão.

a)Dentre as variações de energia de colisão é observado um valor máximo de área. b)O valor máximo de área se encontra no extremo das variações, deixando a possibilidade de haver valores mais adequados para as energias de colisão deste peptídeo.

A otimização das energias de colisão foi seguida pela seleção das transições mais intensas de cada peptídeo com resultados na tabela 11.

Tabela 11- Energia de colisão utilizada para cada transição dos peptídeos.

Peptide Sequence	Fragment Ion	Used Collision Energy
NTGVISVTTGLDR	y10	23,46
	y9	21,46
	y7	21,46
GPFQELVR	y7	18,25
	y6	18,25
	y5	22,25
ILLAELEQLK	y8	16,61
	y7	18,61
	y6	18,61
EYLSLGALK	y7	15,34
	y6	15,34
	y5	13,34
IIPTLPSDK	y7	13,16
	y5	19,16
	y4	21,16
EYVSLGALK	y7	15,09
	y6	15,09
	y5	13,09

O *software* Skyline possibilita a otimização de energia de colisão individual para os íons produto com comparação visual, esta otimização por transição, mostra ganho de sinal indistinguível quando comparada a otimização feita por precursor em experimentos proteômicos onde são comparadas múltiplas injeções, em parte pelo ganho ser sobreposto a variação do ruído existente (MACLEAN *et al.* 2010).

Os peptídeos deste painel que possuíam *consensus spectra* no repositório SRMatlas (NTGVISVTTGLDR, GPFQELVR e ILLAELEQLK) tiveram seus espectros comparados com os valores das áreas de cada transição obtidas experimentalmente na análise a fim de atestar sua identidade.

Figura 12- Consensus spectra do peptídeo GFPQELVR.
Fonte: SRMatlas

Figura 13- Área obtida experimentalmente de cada transição monitorada do peptídeo GFPQELVR.

Figura 15- Consensus spectra do peptídeo ILLAELEQLK

Fonte: SRMATlas

Figura 14- Área obtida experimentalmente de cada transição monitorada do peptídeo ILLAELEQLK.

Figura 16- Consensus spectra do peptídeo NTGVISVTTGLDR.
Fonte: SRMatlas

Figura 17- Área obtida experimentalmente de cada transição monitorada do peptídeo NTGVISVTTGLDR.

4.5.2 - Aplicação do método

O método para este painel contou com 18 transições, 6 peptídeos referentes a 6 proteínas, 1 peptídeo por proteína e 3 transições por peptídeo, as análises foram feitas em extrato total de células expostas ao fator de crescimento com triplicata de injeção. A janela de aquisição de dados para cada peptídeo foi de 2 minutos, o resultado é exibido na figura 16.

O resultado observado não mostra diferença significativa na variação dos níveis de peptídeos das proteínas selecionadas, o peptídeo **IIPTLPSDK** representativo da proteína TWIST1 mostra o maior aumento, com 25,7% de variação, porém também não significativo.

As alterações moleculares que acontecem durante a metástase permite células epiteliais polarizadas serem submetidas a múltiplas mudanças bioquímicas que as habilitam a assumir capacidade migratória, de invasão, resistência a apoptose e produção aumentada de componentes da matriz extracelular (KALLURI & WEINBERG, 2009). Tais alterações foram observadas de maneira sutil para algumas proteínas no modelo de progressão das células MCF7. Ao mesmo tempo, alterações mais evidentes foram observadas no modelo das células CaOV3.

O controle genético exige a expressão coordenada de vários genes, a expressão de Snai1 induz a conversão de fenótipo, perda de E-caderina e promoção do comportamento invasivo e migratório. Slug (SNAI2), outro membro da família Snai1 contribui para a manutenção do fenótipo mesenquimal (BOYER *et al.* 2000). Os fatores TWIST assim como Snai1 ativam a expressão de genes mesenquimais e desativa os epiteliais, TWIST1 reprime E-caderina e induz a expressão de N-Caderina que é produzida em alguns carcinomas e proporciona um sistema de adesão fraco (THIERY 2002).

A manutenção dos mesmos níveis dos marcadores em células controle e tratadas com fator de crescimento indicam a não ocorrência da transição completa no tempo do experimento, outra possibilidade é reversão do processo. Os níveis de CDH1 mantidos estáveis demonstram que não houve degradação nas células tratadas, por outro lado o nível de CDH2 expressivo já nas células controle mostra uma característica prévia do fenótipo metastático sem a ocorrência do tratamento com EGF.

Como este trabalho aborda somente a aplicação do método desenvolvido para verificação de alguns biomarcadores, a correlação biológica e validação desses resultados serão tópicos abordados em outros estudos.

Tabela 12- Peptídeos e seus parâmetros utilizados para análise de biomarcadores.

Protein Accession	Protein Gene	Peptide Sequence	Precursor Mz	Precursor Charge	Product Charge	Transit. 1	Transit. 2	Transit. 3	Dwell Time (s)
P12830	CDH1	NTGVISVTTGLDR	716,80730	2	1	1060,5997	947,5156	761,4152	0,257
P19022	CDH2	GPFPQELVR	522,10508	2	1	888,4938	741,4254	644,3726	0,075
P08670	VIM	ILLAELEQLK	585,71675	2	1	943,5459	830,4618	759,4247	0,413
O95863	SNAI1	EYSLGALK	497,58785	2	1	701,4556	588,3715	501,3395	0,075
Q15672	TWIST1	IITLPSDK	492,59036	2	1	757,4090	559,3086	446,2245	0,122
O43623	SNAI2	EYVSLGALK	490,57448	2	1	687,4400	588,3715	501,3395	0,075

Figura 18- Quantificação relativa dos peptídeos representativos do painel referente aos biomarcadores utilizados.

Figura 19- Análise de alguns biomarcadores em células de câncer de ovário expostas ao EGF. Adaptado de Grassi *et al.* 2016.

4.6 – Considerações finais sobre o desenvolvimento de métodos de proteômica dirigida e sua aplicação na quantificação de painéis proteicos

O emprego do estudo proteômico através da espectrometria de massas é resultado da compreensão de vários fenômenos de origem biológica e química, a integração destes conhecimentos assim como a pesquisa constante para sua complementação é de extrema importância para manutenção do potencial deste estudo. Os resultados aqui apresentados ilustram a aplicação de uma nova abordagem proteômica para respostas de questões biológicas específicas. Como já discutido anteriormente, as limitações técnicas da proteômica “*shotgun*” impedem que grande número de amostras possam ser analisadas em paralelo, a um custo razoável, para permitir a quantificação de conjuntos de proteínas. Este tipo de aplicação apresentado é essencial, por exemplo para o estudo de biomarcadores biológicos.

Proteínas de vias metabólicas centrais, como a glicólise, com conhecimento consolidado, abundantes e portadoras de outras características que não conferem especificidade não representam em si uma fonte de biomarcadores clássica, mas neste trabalho foi buscado através do monitoramento de seu fluxo, observar alterações em um contexto biológico e assim usá-la como um complemento às outras características já difundidas deste contexto, que por sua vez encontram respaldo, portanto também relevantes para inserção nos novos métodos.

Deve-se destacar que a proteômica dirigida também tem limitações: i) desenvolvimento de métodos anterior à aquisição de dados; ii) produção de lista de transições relevantes às proteínas alvo; iii) os dados adquiridos são exclusivos para os alvos selecionados impossibilitando o uso destes dados para futuros alvos (revisado por VIDOVA & SPACIL 2017).

Novas estratégias vem surgindo que tentam resolver algumas dessas limitações, principalmente baseadas em novos avanços tecnológicos de instrumentos de alta resolução, como espectrômetros concebidos com quadrupolos acoplados a orbitraps, ou triplo-TOF, que permite estratégias novas denominadas independentes de dados como SWATH (“*Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra*”) e PRM (“*Parallel Reaction Monitoring*”). A estratégia SWATH permite a fragmentação de todos os íons gerados dividindo-os em janelas estreitas de massas e assim produzir espectros híbridos

da identidade de todos os peptídeos, sem prévia seleção, enriquecendo assim a possibilidade de identificação de peptídeos e paralelamente medir sua intensidade. Como se pode imaginar, por consequência esta estratégia torna a análise mais complexa (GILLET *et al.* 2012). Já a estratégia PRM torna possível a aquisição de todos os fragmentos de um dado precursor simultaneamente, com alta resolução, o que elimina a necessidade de seleção de transições específicas, como ocorre na estratégia MRM (GALLIEN *et al.* 2015).

Devemos reconhecer que a proteômica se beneficiou bastante do desenvolvimento de *softwares*, atualmente tão importantes para viabilizar a análise quanto o próprio desenvolvimento de instrumentação. O *software* Skyline aqui utilizado é um ótimo exemplo disso, pois simplifica a análise por meio de uma interface simples, interativa e capaz de atuar em diferentes equipamentos. Vale a pena destacar que um esforço importante foi feito para o domínio desta plataforma.

Não podemos deixar de destacar o importante papel dos avanços da cromatografia líquida, no presente caso baseado em um moderno sistema de UPLC (*Ultra-performance liquid chromatography*) capaz de proporcionar, entre outras vantagens, melhor reprodutibilidade e resolução dada a maior capacidade de separação de peptídeos, utilizando colunas cromatográficas bastante robustas, que permitem milhares de análises com qualidade. A cromatografia líquida não foi objetivo de grande investimento neste estudo, pois o sistema utilizado já garantiu excelentes condições de análise.

Por fim, devemos destacar que a partir do grande investimento em desenvolvimento metodológico aqui descrito, foram definidos painéis proteicos para monitoramento de conjuntos de proteínas relevantes. Tais conjuntos, estabelecidos com base em hipóteses biológicas enseja aplicação a um grande número de amostras, incluindo amostras biológicas de pacientes e como resultado, alguns trabalhos de nosso grupo já se beneficiaram desta estratégia (Grassi *et al.* 2017; Poersch *et al.* 2016; Lanfredi *et al.* 2017-Anexo I).

5 – Conclusões

- Foi possível selecionar os peptídeos representativos da glicólise e outras proteínas de interesse com facilidade devido à alta abundância destas proteínas, o que resultou em cromatogramas bem definidos, os que apresentaram maior intensidade compuseram o método final.
- A disponibilidade de peptídeos sintetizados representando biomarcadores epiteliais e mesenquimais facilitou o processo de desenvolvimento do método proporcionando quesitos adicionais na identificação de peptídeos, o que resultou na confirmação de sua identidade em comparação com espectros disponíveis em bases de dados.
- A exposição das células da linhagem MCF7 ao fator EGF alterou a expressão das proteínas da via glicolítica, fato notável mais sensivelmente nas análises de extrato total e de forma mais pronunciada na fração do citosol indicando um aumento nos níveis de proteína dessa via e também no fluxo para via das pentoses.
- A medição do consumo de O_2 em diferentes estados permitiu verificar uma capacidade aumentada para respiração, de forma mais significativa no estado ETS, fato que possivelmente revela uma nova disposição do metabolismo celular dado o conhecimento estabelecido em relação a efeitos na respiração, como o Warburg.
- A medição da atividade enzimática da citrato sintase acolhida como indicador da densidade mitocondrial mostra que a maior capacidade respiratória se deve ao maior número de mitocôndrias disponíveis nas células, exibindo possivelmente outro efeito da exposição ao fator de crescimento EGF.

- Os níveis de expressão dos biomarcadores escolhidos para desenvolvimento de métodos sofreram alterações condizentes com o fenótipo que o modelo celular está associado.

6 - Referências Bibliográficas

- Adam, R. M.; Yang, W.; Di Vizio, D.; Mukhopadhyay, N. K.; Steen, H. Rapid preparation of nuclei-depleted detergent-resistant membrane fractions suitable for proteomics analysis. *BMC Cell Biology* 9:30. 2008.
- Aebersold, R.; Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics, *Nature*. V.422, P. 198-207, 2003.
- Anderson, N.L. & Anderson, N.G. Proteome And Proteomics: New Technologies, New Concepts, And New Words. *Electrophoresis*. V.19, P. 1853-1861, 1998.
- Banks, R. E.; Dunn, M. J.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C.; Blackstock, W.; Pappin, D.J.; Selby, P.J. Proteomics: New Perspectives, New Biomedical Opportunities. *The Lancet*. V. 356, P. 1749-1756, 2000.
- Boja, E.S.; Rodriguez, H. Mass Spectrometry-Based Targeted Quantitative Proteomics: Achieving Sensitive And Reproducible Detection Of Proteins. *Proteomics*. V. 8, P. 1093-1100, 2012.
- Boyer, B.; Vallés, A.M.; Edme, N. Induction And Regulation Of Epithelial - Mesenchymal Transitions. *Biochemical Pharmacology*. V.60, P. 1091-1099, 2000.
- Courtney, R.; Ngo, D.C.; Malik, N.; Ververis, K.; Tortorella, S. M.; Karagiannis, T. C. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep* V. 42, P. 841-851, 2015
- Diamandis, E.P. The Failure Of Protein Cancer Biomarkers To Reach The Clinic: Why, And What Can Be Done To Address The Problem? *E.P. BMC Med*. 10:87, 2012.
- Domon, B. & Aebersold, R. Options And Considerations When Selecting A Quantitative Proteomics Strategy. *Nature Biotechnology*. V.28, P. 710-721, 2010.
- Edfors, F.; Danielsson, F.; Hallström, B. M.; Käll, L.; Lundberg, E.; Pontén, F.; Forsström, B.; Uhlén, M. Gene-Specific Correlation Of Rna And Protein Levels In Human Cells And Tissues. *Molecular Systems Biology*. V.12, P. 1-10, 2016.
- Gallien, S.; Duriez, E.; Domon, B. Selected Reaction Monitoring Applied To Proteomics. *Journal Of Mass Spectrometry*. V. 46, P 298-312, 2011.
- Gallien, S.; Kim, S. Y.; Domon, B. Large-scale targeted proteomics using internal standard triggered-parallel reaction monitoring (IS-PRM). *Mol. Cell. Proteom* V. 14, P. 1630-1644, 2015.

Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Rost, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted data extraction MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteom.* V. 11, 2012.

Gillette, M. A.; Carr, S. A. Quantitative Analysis Of Peptides And Proteins In Biomedicine By Targeted Mass Spectrometry, *Nature Methods.* V. 10, P. 28-34, 2012.

Grassi, M. L.; Palma, C. S.; Thome, C. H.; Lanfredi, G. P.; Poersch, A. Faça, V. M.; Proteomic Analysis Of Ovarian Cancer Cells During Epithelial-Mesenchymal Transition (Emt) Induced By Epidermal Growth Factor (Egf) Reveals Mechanisms Of Cell Cycle Control, *Journal Of Proteomics*, (2016).

Han, T.; Kang, D.; Ji, D.; Wang, X.; Zhan, W.; Fu, M.; Xin, H.B.; Wang, J.B.; How Does Cancer Cell Metabolism Affect Tumor Migration And Invasion? *Cell And Migr.* V. 7, P. 395-403, 2013.

Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J. R. Mass Spectrometry For Proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* V. 12, P. 483-490, 2008.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, V.144, n.5, P.646-74, 2011.

Jiang, P.; Wenjing, D.; Wu, M. Regulation Of The Pentose Phosphate Pathway In Cancer. *Protein Cell.* V. 5, P. 592-602, 2014.

Kalluri, R & Weinberg, R.A. The Basics Of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Invest.* V. 119, P. 1420-1428, 2009

Kang, S.W.; Lee, S.; Lee, E.K. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Arch. Pharm. Res.* V. 38: 338-345, 2015

Kiyonami, R. & Domon, B. Selected Reaction Monitoring Applied To Quantitative Proteomics, *Methods In Molecular Biology.* V. 658, P 155-166, 2010.

Kondaveeti, Y.; Reed, I.K.G.; White, B.A. Epithelial–Mesenchymal Transition Induces Similar Metabolic Alterations In Two Independent Breast Cancer Cell Lines. V. 364, P. 44-58, 2015.

Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’s Heel. *Cancer Cell.* V.13, P. 472-482, 2008

Kusebauch, U.; Campbell, D.S.; Deutsch, E.W.; Chu, C.S.; Spicer, D.A.; Brusniak, M.Y.; Slagel, J.; Sun, Z.; Stevens, J.; Grimes, B.; Shteynberg, D.; Hoopmann, M.R.; Blattmann, P.; Ratushny, A.V.; Rinner, O.; Picotti, P.; Carapito, C.; Huang, C.Y.; Kapousouz, M.; Lam, H.; Tran, T.; Demir, E.; Aitchison, J.D.; Sander, C.; Hood, L.; Aebersold, R.; Moritz, R.L.; Human SrmAtlas: A Resource Of Targeted Assays To Quantify The Complete Human Proteome. *Hhs Public Access*, V. 166, P. 766-778, 2016.

Lanfredi, G.; Reis-De-Oliveira, G.; Saia-Cereda, V. M.; Guest, P. C.; Martins-De-Souza, D.; Faça, V. M. Ch. 16: Selective Reaction Monitoring Mass Spectrometry For Quantitation Of Glycolytic Enzymes In Postmortem Brain Samples. In: Guest, P. C. *Proteomic Methods In Neuropsychiatric Research*. Springer, Cham. P. 205-212. 2017

Lange, V.; Picotti, P.; Domon, D.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring For Quantitative Proteomics: A Tutorial, *Mol Syst Biol*. V. 4, P 222, 2008.

Larance, M & Lamond, A.I. Multidimensional Proteomics For Cell Biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. V.16, P. 269-280, 2015.

Liberti, M.V. & Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does It Benefit Cancer Cells? *Trends In Biochemical Sciences Special Issue: Mitochondria & Metabolism*. V.41, P. 211-218, 2016.

Liebler, D.C.; Zimmerman, L.J, Targeted Quantitation Of Proteins By Mass Spectrometry. *Biochemistry* . V. 52, P 3797-3806, 2013.

Ludwig, C.; Aebersold, R. Ch. 4: Getting Absolute: Determining Absolute Protein Quantities Via Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. In: Evers, C. E.; Gaskell S. *Quantitative Proteomics*. Royal Society Of Chemistry. P. 99. 2014.

Maclean, B.; Tomazela, D.M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G.L.; Frewen, B.; Kern, R.; Tabb, D. L.; Liebler, D.C.; Maccoss, M.J. Skyline: Na Open Source Document Editor For Creating And Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics*. V. 26, P. 966-968, 2010.

Murphy, J.P. & Pinto, D.M. Targeted Proteomic Analysis Of Glycolysis in cancer Cells. *Journal Of Proteome*. V. 10, P. 604-613, 2011.

Ngo, D.C.; Ververis, K.; Tortorella, S.M; Karagiannis, T. C. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. *Mol Biol Rep* V. 42 P. 819-823, 2015.

Paulovich, A.G.; Whiteaker, J. R.; Hoofnagle, A. N.; Wang, P. The Interface Between Biomarker Discovery And Clinical Validation: The Tar Pit Of The Protein Biomarker Pipeline. *Proteomics Clinical Applications*. V. 2, P 1386-1402, 2008.

Pavlidis, S.; Whitaker-Menezes, D.; Castello-Cros, R.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A. K.; Frank, P.G.; Casimiro, M.C.; Wang, C.; Fortina, P.; Addya, S.; Pestell, R.G.; Martinez-Outschoorn, U.E.; Sotgia, F.; Lisanti, M.P. The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*. V.8, p. 3984-4001, 2009.

Pavlou, M.P.; Diamandis, E.P.; Blasuting, I.M. The Long Journey Of Câncer Biomarkers From The Bench To The Clinic. *Clinical Chemistry*. V. 59, P. 147-157, 2013.

Payen, V.L.; Brisson, L.; Dewhirst, M.W.; Sonveaux, P. Common Responses Of Tumors And Wounds To Hypoxia. *J. Cancer*. V. 21, P. 75-87, 2015.

Pesta, D & Gnaiger, E. High-Resolution Respirometry: Oxphos Protocols For Human Cells And Permeabilized Fibers From Small Biopsies Of Human Muscle. *Methods In Molecular Biology*. V. 810, P. 25-58, 2011.

Rifai, N.; Gillette, M.A.; Carr, S. A. Protein Biomarker Discovery And Validation: The Long And Uncertain Path To Clinical Utility. *Nature Biotechnology*. V.24, P. 971-983, 2006.

Schiess, R.; Wollscheid, B.; Aebersold, A. Targeted Proteomic Strategy For Clinical Biomarker Discovery. *Molecular Oncology*. V. 3(1), P 33-44, 2009

Shepherd. D & Garland, P. B. Atp Controlled Aceoacetate And Citrate Synthesis By Rat Liver Mitochondria Oxidizing Palmitoyl-Carnitine, And The Inhibition Of Citrate Synthase By Atp. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. V. 22, P. 89–93, 1966.

Thiery, J.P. Epithelial-Mesenchymal Transitions In Tumour Progression. *Nature Reviews*. V. 2, P. 442-454, 2002.

Vidova, V. & Spacil, Z. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. *Analytica Chimica Acta*. V. 964 P. 7-23, 2017.

Vincent A.S.;Phan T.T.;Mukhopadhyay A.;Lim H.Y.;Halliwell B.;Wong K.P. Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *Journal of Investigative Dermatology*.V. 128 p. 702-709, 2008

Warburg, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*.V.9, P.148-163,1925.

Weber, G.F. Metabolism in cancer metastasis. *International Journal of Cancer*. V.138, p. 2061–2066, 2015

Wilkins, M.R.; Sanchez, J.C.; Gooley, A.A.; Appel, R.D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L. Progress With Proteome Projects: Why All Proteins Expressed By A Genome Should Be Identified And How To Do It. *Biotechnology And Genetic Engineering Reviews*. V.13, P. 19-50, 1996.

Williams, R.S.; Salmons, S.; Newsholme, E.; Kaufman, R.E.; Mellor, J. Regulation Of Nuclear And Mitochondrial Gene Expression By Contractile Activity In Skeletal Muscle. *J Biol Chem*. V. 261, P. 376-380. 1986.

Wysocki, V.H.; Resing, K.A.; Zhang, Q.; Cheng, G.; Mass Spectrometry Of Peptides And Proteins. *Methods*. V.35, P. 211-222, 2005.

Yates, J. R. Mass Spectrometry And The Age Of The Proteome. *Journal Of Mass Spectrometry*. V.33, P. 1-19, 1998.

Zeisberg, M.; Neilson, E.G. Biomarkers For Epithelial-Mesenchymal Transitions. *J Clin Invest*. V. 119, P 1429-1437, 2009.

Zhou, H.; Ning, Z.; Starr, A.; Abu-Farha, M.; Figeys, D. Advancements in Top-Down Proteomics. *A. Chemistry*. V. 84, P. 720-734, 2012.

Zhou, W.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F. Cancer Metabolism: What We Can Learn From Proteomic Analysis By Mass Spectrometry. *Cancer Genomics & Proteomics*. V. 9, P 373-382, 2012.

7 – Anexo

Anexo 1: Selective Reaction Monitoring Mass Spectrometry for Quantitation of Glycolytic Enzymes in Postmortem Brain Samples.