

# Proteômica e Sepsis. Novas Perspectivas para o Diagnóstico\*

## *Proteomics and Sepsis. New Perspectives for Diagnosis*

Afonso J. C. Soares<sup>1</sup>, Marise F. Santos<sup>2</sup>, Janete Chung<sup>3</sup>, Cid Marcos N David<sup>4</sup>, Gilberto B. Domont<sup>5</sup>

### RESUMO

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** O diagnóstico e o tratamento da sepsis continuam a desafiar a todos; e desenvolver formas mais precisas de abordagem são absolutamente necessárias. O objetivo deste estudo foi empregar técnicas proteômicas, eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, para verificar a expressão diferencial de proteínas, em soro de pacientes com sepsis comparado com controles saudáveis.

**MÉTODO:** Amostras de soro de 30 pacientes com sepsis, causada por vários tipos de microorganismos e de 30 controles saudáveis foram obtidas para análise. A seguir, foram submetidas a 2D-SDS-PAGE, comparação entre géis, seleção de spots para excisão e digestão com tripsina, sendo os peptídeos analisados por MALDI TOF-TOF. Os espectros obtidos foram processados (Mascot-matrixscience) para identificação de proteínas no NCBI Inr Data Bank.

**RESULTADOS:** A análise das imagens mostrou vários

spots com expressão diferencial nos géis dos pacientes com sepsis em relação aos controles. A identificação de proteínas em alguns destes spots encontrou: precursor Orosomucoide 1, Apolipoproteína A-IV, precursor Apolipoproteína A-IV, precursor Haptoglobina, Haptoglobina, proteína Zinc finger, Amilóide sérico A-1, Transtiretina, Nebulin, Complemento C4, Alfa1-Antitripsina, produto protéico não nominado e outros.

**CONCLUSÕES:** Soros de pacientes com diferentes tipos de sepsis expressam padrão protéico característico por 2D-SDS-PAGE comparado com controles. A maior expressão foi de proteínas de fase aguda e lipoproteínas. É possível que no futuro, com a proteômica, criar painel diagnóstico de proteínas, encontrar novos biomarcadores e alvos para intervenção terapêutica na sepsis. Esta é a primeira descrição, com a proteômica, das alterações na expressão protéica, no soro de pacientes com sepsis.

**Unitermos:** eletroforese bidimensional, espectrometria de massa, proteômica, sepsis

### SUMMARY

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** The diagnostic and treatment of sepsis continue to challenge all, and, more specific forms to approach are absolutely necessary. The objective of this study was to use proteomics techniques, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, to verify the differential protein expression between serum of patients with sepsis and health controls.

**METHODS:** Samples of serum the 30 patients with sepsis, caused for different types of microorganisms and serum of 30 health controls were obtained for analysis. Next, were submitted to 2D-SDS-PAGE, gels compared, selection of spots for excision and digestion with trypsin, being the peptides analyzed for MALDI TOF-TOF. The obtained spectrums were processed (Mascot-matrix science) for protein identification in NCBI Inr Data Bank.

**RESULTS:** Image analyses showed several spots with differential expressions in the gels of the patients with

1. Especialista em Medicina Intensiva pela AMIB, Coordenador Técnico da UTI do HFAG, Doutorando do IQ, UFRJ
2. Química, Professora da UFPR, Doutoranda do IQ, UFRJ
3. Bióloga, Mestranda do IQ, UFRJ
4. Especialista em Medicina Intensiva pela AMIB, Coordenador da Pós-Graduação em Medicina Intensiva da UFRJ, Chefe da UTI do HUCFF, UFRJ. Presidente do Fundo AMIB
5. Professor Emérito da UFRJ, Chefe do Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, IQ, UFRJ. Coordenador da Rede Proteômica do Rio de Janeiro

\*Recebido do Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, IQ da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ

Apresentado em 05 de dezembro de 2006  
Aceito para publicação em 30 de janeiro de 2006

Endereço para correspondência:  
Dr. Afonso José Celente Soares  
Serviço de Terapia Intensiva do HFAG  
Estrada do Galeão 4101, Ilha do Governador  
21941-005. Rio de Janeiro, RJ  
E-mail: cti.consult@openlink.com.br

©Associação de Medicina Intensiva Brasileira, 2007

sepsis in relation to the controls. The protein identification of some of these spots founded: Orosomucoid 1 precursor, Apolipoprotein A-IV, Apolipoprotein A-IV precursor, Haptoglobin protein precursor, Haptoglobin, Zinc finger protein, Serum amyloid A-1, Transthyretin, Nebulin, Complement C4, Alpha1-Antitrypsin, Unnamed protein product and others.

**CONCLUSIONS:** Serum of the patients with different types of sepsis express characteristic protein profiles by 2D-SDS-PAGE compared with controls. The most expressed were from acute phase proteins and lipoproteins. It is possible in the future, with proteomics, create diagnostic panel of proteins, finding news biomarkers and targets for therapeutic interventions in sepsis. This is a first description, with proteomics, of the alterations in protein expression, in serum of the patients with sepsis.

**Key Words:** mass spectrometry, proteomics, sepsis, two-dimensional electrophoresis

## INTRODUÇÃO

A sepse tornou-se um problema de saúde pública devido ao crescente número de casos, alta mortalidade e custo elevado de tratamento<sup>1,2</sup>. Embora tenha havido nestes últimos anos avanços significativos no entendimento da sua patogênese, com a melhor compreensão dos mecanismos de ativação das vias da inflamação e da coagulação, e no tratamento, com o desenvolvimento de novos fármacos e recomendação para uso de protocolos baseados em evidências<sup>3,4</sup>, ainda tem-se problemas no seu manuseio clínico.

A questão do diagnóstico precoce e preciso da sepse em seus estágios iniciais, onde os resultados terapêuticos são mais favoráveis, e também da melhor estratificação dos pacientes, que deve melhor selecionar os pacientes para as novas intervenções de tratamento, ainda são dificuldades. Persiste a procura pelo biomarcador ideal e, vem sendo destacado por vários autores, que os avanços no entendimento e manuseio da sepse necessitam de abordagens mais rigorosas na descrição da doença e sua estratificação<sup>5,6</sup>.

A introdução do conceito de proteoma, termo cunhado em 1995, para definir o complemento protéico total do genoma presente na célula-tecido-organismo, e as revelações do projeto do genoma humano, quando ficou claro que existe um número muito menor de genes no genoma humano (25.000), do que proteínas em seu proteoma (estimativas de até alguns milhões de espécies protéicas diferentes) são marcos vitais. As razões

que justificam tal magnitude do proteoma são as variações na clivagem do RNA e/ou modificações pós-traducionais, que o torna várias vezes maior e complexo que o genoma correspondente. Modificações na abundância (quantidade) das proteínas com o tempo, com o desenvolvimento do organismo e as alterações do meio ambiente, fazem-no dinâmico<sup>7</sup>.

Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas expressas. Estas ferramentas, passaram então, a ser denominadas instrumentos da "Proteômica", revolucionando a Biologia e inaugurando uma nova forma de fazer ciência, a "Ciência dirigida para a descoberta" (*Discovery-driven Science*), em contraposição à "Ciência dirigida por hipótese" (*Hypothesis-driven Science*), forma clássica do fazer ciência<sup>8</sup>.

Dentre as ferramentas proteômicas utilizadas, a estratégia clássica tem sido separar e quantificar as proteínas de uma amostra (célula, tecido ou fluido) por eletroforese bidimensional (2D)<sup>9</sup> e posteriormente, identificar cada uma das proteínas empregando espectrometria de massa (MS)<sup>10</sup>.

O objetivo deste estudo foi empregar estas técnicas proteômicas para verificar a expressão diferencial de proteínas em soro de pacientes com sepse, comparado-o com controles saudáveis.

## MÉTODO

Após aprovação pela Comissão de Ética do Hospital de Força Aérea do Galeão (HFAG) e assinatura de consentimento livre e esclarecido pelo próprio paciente ou seu responsável legal, amostras de soro de 30 pacientes com diagnóstico de sepse<sup>11</sup> admitidos para tratamento na UTI do HFAG e de 30 controles saudáveis (Tabela 1), foram colhidas e estocadas a -80° C. Além das amostras individuais, foi constituído um *pool* dos soros de cada grupo (sepse e controle) e dos diferentes tipos de sepse (gram-negativo, gram-positivo, fungos e culturas negativas).

O método utilizado está descrito na figura 1. Eletroforese 2D, revelação e análise de imagem: após dosagem de proteínas nas amostras (química seca/biuretina/Vitros/JJ), 1000 µg de proteínas (cerca de 16 µL de soro para os casos de sepse) foram diluídos no tampão de re-hidratação (1,25 mL uréia 9,5M, 0,03 g [(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 2%, 0,015 g dithiothreitol (DTT) 1%, 0,03 mL *buffer* IPG 2% 3-10 não linear, 0,0012 mL de solução de azul de bromofenol 1% / Tris e

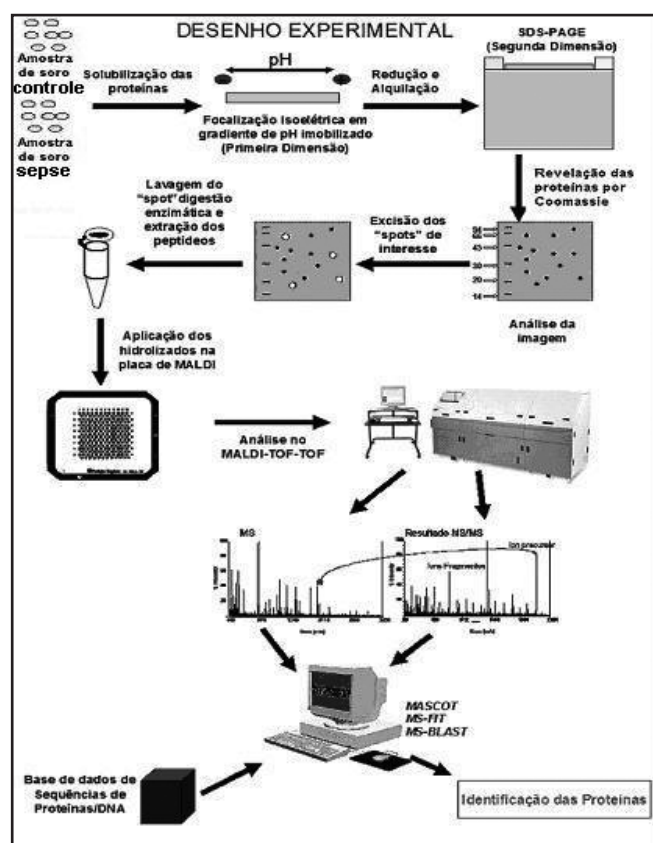


Figura 1 – Após Coleta das Amostras, Seqüência de Eventos Utilizados na Proteômica

134  $\mu$ L de água MilliQ) para um volume final de 350  $\mu$ L. Materiais insolúveis foram removidos por centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. A amostra foi incubada por 30 min e levada para re-hidratação ativa na tira de focalização isoeétrica de 18 cm x 3 mm com gradiente de pH imobilizado (IPG gel strip) de faixa de pH de 3 a 10, não linear, por 12 horas a 60 volts no equipamento Ettan™ IPGPhor™ (GE-Healthcare) e focalizada com o seguinte programa: IEF 20° C 50  $\mu$ A/strip e vários ciclos seqüenciais até atingir 80.000Vhs totais. Após a focalização (1ª dimensão), as tiras de gel IPG eram seladas em plástico e estocadas -80° C. Antes de proceder a segunda dimensão, cada tira foi equilibrada em presença de SDS e submetida à redução com 100 mg de DTT por 20 minutos e, em seguida, alquilada com 250 mg de IAA em solução de equilíbrio (uréia 6 M, 30% de glicerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) e Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8) por 20 minutos. Em seguida, a tira foi transferida para um gel de poli(acrilamida) homogêneo de 12,5%, selado com agarose (*low melting* 0.5%) e submetida à segunda dimensão no sistema SDS-PAGE Etamm DALTsix (GE-healthcare) sistema

vertical a 20° C - 2,5 W/ gel por 45 minutos e 100 W até completar a corrida, em solução de *buffer* contendo 25 mM Tris, 192 mM glycina, and 0,1% (w/v) SDS<sup>12,13</sup>.

O gel foi corado por 12 horas em solução a 1% de azul de Coomassie R-250<sup>14</sup> e descorado em metanol: ácido acético:água (40:10:50 v/v) em 3 lavagens de 30 minutos e deixados por 12 horas em solução de ácido acético a 5% em água até a revelação das manchas (*spots*), e, que, a princípio, cada *spot* corresponde a uma única espécie de cadeia polipeptídica. Os géis foram digitalizados utilizando-se o programa Labscan v3.0 (Amersham Bioscience) no Umax scanner com sistema integrado de transparência. Após este passo, os géis foram guardados em solução de ácido acético a 5% em plástico selado. As imagens foram analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences) por uma combinação de detecção automática dos *spots* feita pelo programa e detecção manual. Intensidade, volume e saliência dos *spots* (grande, pequeno, intenso, fraco) são inicialmente observados em área delimitada do gel (*preview mode*) e os parâmetros modificados, para melhor visualização dos *spots*, antes de sua detecção final (número de *smooths*, 2-3, *saliency* em torno de 10-30 e *maximum minimal area*). Pelo programa foram estimados as massas moleculares e os pontos isoeletricos. A comparação entre géis foi feita de forma automática depois de identificar vários pontos de referência nos géis. O *software* permite localizar, quantificar e fazer *matching* dos *spots* de proteínas entre os géis. Para a determinação da quantidade relativa de cada *spot* foi usado o método de normalização do volume. Neste método o volume de cada *spot* foi dividido pelo volume total de todos os *spots* no gel e multiplicado por um fator constante de valor 100, que produz uma porcentagem de volume de cada *spot*. Para processamento, é gerada uma lista de todos os *spots* visualizados contendo dados como área, volume, volume normalizado (% de cada *spot*), intensidade normalizada (% de cada *spot*), *background* e os valores experimentais do pI da 1ª dimensão e massa molecular da 2ª dimensão de todos os *spots* (pI e MW teóricos), permitindo a comparação com os dados obtidos de outros géis, a quantidade relativa de cada proteína e identificando os *spots* diferenciais.

Processamento dos *spots* para espectrometria de massa: os *spots* selecionados, foram manualmente excisados, cortados em pedaços de 1 mm<sup>3</sup>, descorados em solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM / acetonitrila (1:1) em três

lavagens de 30 minutos e desidratados com acetoneitrila (100%) por 5 minutos. O solvente remanescente foi removido dos pedaços de gel por centrifugação a vácuo no *Speed Vac* (Savant). As proteínas foram rehidratadas no gelo por 15 minutos, em 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 0,2 µg de tripsina "sequence-grade" modificada (Promega, Madison WI, USA). Pedaços do gel foram cobertos com 20 µL do tampão e a digestão (*in-gel*) realizada a 37° C em banho por 16 horas (*overnight*). Em seguida os peptídeos foram extraídos do gel com solução (50%) acetoneitrila (45%) e ácido trifluoroacético (5%) em água e concentrados, até um volume de aproximadamente 5 µL, por centrifugação a vácuo no *Speed Vac* (Savant)<sup>15</sup>.

Espectrometria de massa: feita a co-cristalização da mistura de peptídeos da digestão triptica (300 nL) e solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (matriz) em 50% (v/v) de acetoneitrila / 0,3% de ácido trifluoroacético (300 nL) com a aplicação na placa de MALDI e secagem em temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa. Os espectros de massa foram obtidos usando-se o equipamento ABI 4700 TOF/TOF (Applied Biosystems) onde ocorreu a ionização por desorção a laser auxiliada por matrix e análise por tempo de voo. Laser de nitrogênio (337 nm) foi usado para irradiar a amostra. Os espectros foram obtidos no modo refletor com variações de massa entre 950-3500 m/z e para fragmentos entre 60-20Da de íons parentais. O modo de calibração *default* foi feito antes do uso, da seguinte forma: alinhando-se a placa e com mistura calibrante de peptídeos, que, consistia de des-Arg<sup>1</sup>-Bradykinin, Angiotensin I, Glu<sup>1</sup>-fribinopeptide B, Neurotensin, ACTH (1-17) and ACTH (18-39) de *Sequazyme Peptide Mass Standards* (ABI); para fragmentos, o padrão usado foram fragmentos de Angiotensin I. Foram necessários 4 peptídeos para *matching* mínimo, 0,5 m/z de erro e 10 ppm de desvio para o peptídeo. Para a análise MS/MS, 5 fragmentos foram necessários para *matching* mínimo, usando 0,05 m/z erro. As análises foram feitas em modo automático para fazer o modo MS, escolhendo os 6 peptídeos mais intensos, procedendo então, a análise MS/MS de cada amostra.

Pesquisa no banco de dados: os espectros provenientes de análises combinadas (MS+MS/MS) foram filtrados pela relação sinal / ruído dos picos, que foi de 20 para os dados de MS e 10 para MS/MS, e, levados à busca para comparação por homologia de massa de

peptídeo e seqüência de aminoácidos em bancos de dados de proteínas não redundantes do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) NCBIInr) localmente instalado, de proteínas humanas (*Homo Sapiens*), empregando o *software* da interface MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), que utiliza algoritmo para testar a significância estatística das identificações. Nas buscas, foram incluídos os seguintes parâmetros junto ao MASCOT: carga dos peptídeos protonados +, tolerância máxima permitida de erro na massa 50 ppm, tolerância para MS/MS +/- 0,2 Da, sendo aceita as modificações dos resíduos de cisteína reduzidos e alquilados com iodoacetamida para carbamidometilação, e a oxidação da metionina, que ocorre comumente nos resíduos da metionina durante a SDS-PAGE. Foi utilizado o programa GPS Explorer™ (Applied Biosystems) onde os arquivos txt gerados no espectrômetro, que continha as massas dos picos monoisotópicos de MS e MS/MS, foram processados e submetidos conjuntamente à interface MASCOT, gerando relatórios com os resultados das identificações. As massas do peptídeo *full* foram consideradas para a confiança dos *matches*. Consideradas positivas as identificações onde pelo menos 5 peptídeos foram encontrados e na maioria das vezes as identificações confirmadas com dados de MS/MS de pelo menos 2 peptídeos por proteína; nestes casos um espectro de MS/MS foi escolhido e analisado visualmente para confirmar a seqüência. Em ambos os casos os valores de *ion score* (mínimo de 30) e *protein score* (mínimo de 60) foram levados em consideração como valores estatísticos para identificação. Foi utilizado, também, o programa MS-BLAST, para buscas no caso de identificações duvidosas por seqüenciamento de novo. No programa MS-BLAST foram feitas interpretações automáticas dos espectros de MS/MS utilizando-se o programa *De Novo sequence*™ (Applied Biosystems)<sup>16,17</sup>.

## RESULTADOS

Os controles tinham média de idade menor que os pacientes com sepse. Os níveis de proteínas séricas estavam menores nos pacientes com sepse comparados aos controles (Tabela 1). As características dos pacientes com sepse, relacionadas a: mortalidade; APACHE II; SOFA e tempo de internação, estão descritos tabela 1.

Gel 2D típico do controle, com aplicação de 1000 µg de proteínas, em gel de 12,5% na faixa de pH 3-10NL, com cerca de 700 *spots* corados e visualizados por

Tabela 1 - Características dos Pacientes com Sepse e Controles Saudáveis.

Características	Pacientes com Sepse	Controles Saudáveis
Idade (média/variação)	70 (18 - 89) anos	32 (18 - 56) anos
Masculino / Feminino (n/%)	14 / 16 (46,66% / 53,33%)	15 / 15 (50% / 50%)
Tempo de internação na UTI (média/variação)	14 (8-28) dias	
Mortalidade - 28 dias (n/%)	15 / 30 (50%)	
APACHE II (média/variação)	22 (18 - 26)	
SOFA no 1º dia diagnóstico sepse (média/variação)	6 (4 - 9)	
Proteínas séricas	6 ± 0,6 g/dL	7 ± 0,4 g/dL

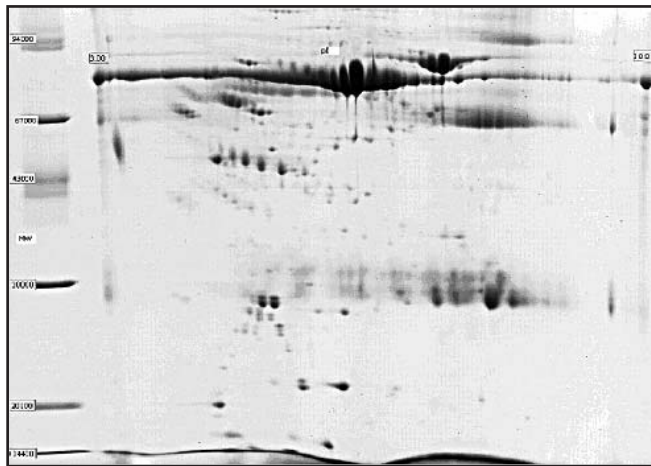


Figura 2 – Gel Bidimensional do Controle. Aplicados 1000 µg de proteínas, IEF (pH 3–10 NL), SDS-PAGE-Dalt a 12,5%. Revelação dos spots com azul de Coomassie.

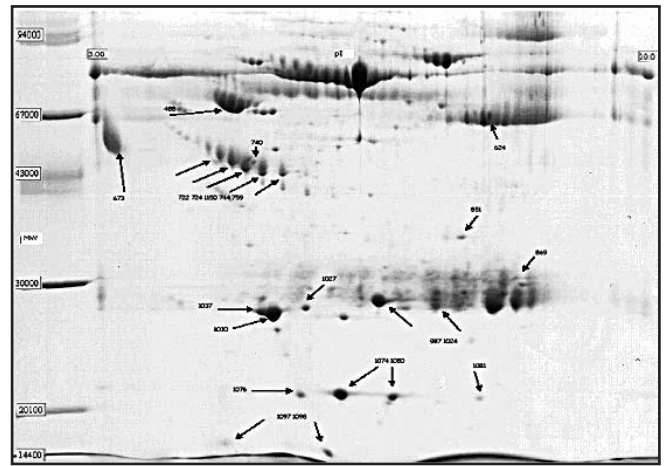


Figura 3 – Gel Bidimensional de Paciente com Sepse por Gram-Positivo.

Assinalados os spots excisados e ID (os números têm relação com outros géis que foram comparados). Aplicados 1000 µg de proteínas, IEF (pH 3–10 NL), SDS-PAGE-Dalt a 12,5%. Revelação dos spots com azul de Coomassie.

Coomassie R-250 está ilustrado na figura 2; as imagens 2D de outros géis de controles foram similares (dados não mostrados).

Imagem representativa do mapa proteômico de paciente com sepse por gram-positivo, com aplicação de 1000µg de proteínas, em gel de 12,5% na faixa de pH 3-10NL, com cerca de 711 spots corados e visualizados por Coomassie R-250 está demonstrado na figura 3; as imagens 2D de outros géis de sepse mostraram semelhanças (dados não mostrados). Os géis obtidos (sepse e controle) foram portanto, reprodutíveis. Para análise comparativa das imagens, foi utilizado o programa *ImageMaster 2D Platinum* (Amersham Biosciences), e, após processamento da lista de todos os spots (dados não mostrados), foram evidenciados vários spots diferencialmente expressos entre os géis dos pacientes com sepse em relação ao controle: proteínas expressadas em apenas um dos géis e proteínas expressadas em ambos os géis, porém com diferenças quantitativas para maior ou menor, sendo alguns selecionados para a excisão, diges-

tão e identificação por espectrometria de massa. Foram processados 22 spots diferenciais, com as proteínas sendo identificadas utilizando-se dados de PMF e MS/MS, com a interface MASCOT, e, submetendo-os em banco local do NCBI (espécie *homo sapiens*), sendo também utilizado o banco de dados do NCBI disponível na Internet, para identificação das proteínas. Nos casos onde foram identificadas proteínas com a seqüência completa, o pl e massa molecular teóricos, de modo geral, coincidiam, com pequenos desvios, com a localização da proteína no gel 2D. Os desvios encontrados (cerca de 10 kDa) podem ser explicados por erros inerentes a técnica ou por modificações pós-traducionais, que não são consideradas para o cálculo teórico das massas. Em relação às identificações das proteínas no MALDI-TOF-TOF, a figura 4 mostra, como exemplo, o espectro obtido de MS/MS do spot 673.

Encontrou-se expressão diferencial de várias proteínas como: precursor Orosomucoide 1 (glicoproteína ácida alfa-1), Apolipoproteína A-IV, precursor Apolipoproteína

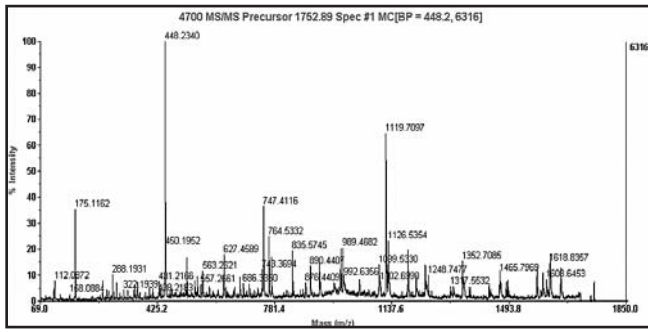


Figura 4 – Espectro Referente ao Spot 673 Mostrando a Análise por MS/MS do Precursor Seleccionado (1762.89) após ser Fragmentado na Câmara de Colisão.

A-IV, precursor Haptoglobina, Haptoglobina, proteína Zinc finger, Amilóide sérico A-1, Transtiretina, Nebulin, Complemento C4, Alfa1-Antitripsina, produto protéico não nominado (tabela 2) e outros. A tabela 2 mostra a lista das identificações com o número do *spot*, *protein score*, *ion score*, melhor seqüência de peptídeos, número de entrada no NCBI da proteína que aparecia no primeiro *hit* quando a seqüência do *cluster* foi submetida ao programa *BLAST-p* para determinação da similaridade com seqüências no banco de dados, nome da proteína e função.

Tabela 2 – Identificação com o Número do *Spot*, *Protein Score*, *Ion Score*, Melhor Seqüência de Peptídeos, Número de Entrada no Banco de Dados, Nome da Proteína e Função.

<i>Spot</i> nº	<i>Protein Score</i>	<i>Total Ion Score</i>	<i>Sequences of all Identified Peptides Best</i>	ID (NCBI)	<i>Protein Description</i>	Function
673	302	245	YVGGQEHFALLILR	gi 20070760	<i>Orosomuroid 1, precursor [Homo sapiens]</i>	<i>Binding protein</i>
1030	133	52	THLAPYSDELK	gi 178775	<i>Proapolipoprotein</i>	<i>Innate immunity</i>
722	104	63	SPVGVQPILNEHTFCAG-MSK	gi 34785974	<i>HP protein [Homo sapiens]</i>	<i>Scavenger</i>
724	130	94	YVMLPVADQDQCIR	gi 34785974	<i>HP protein [Homo sapiens]</i>	<i>Scavenger</i>
1150	243	187	SPVGVQPILNEHTFCAG-MSK	gi 34785974	<i>HP protein [Homo sapiens]</i>	<i>Scavenger</i>
740	208	46	SLAELGGHLDQQVEEFR	gi 178779	<i>Apolipoprotein A-IV precursor</i>	<i>Innate immunity</i>
744	164	110	VMPICLPSKDYAEVGR	gi 34785974	<i>HP protein [Homo sapiens]</i>	<i>Scavenger</i>
759	163	106	YVMLPVADQDQCIR	gi 34785974	<i>haptoglobin</i>	<i>Scavenger</i>
488	421	262	FLNEDRR	gi 1942629	<i>Alpha1-Antitrypsin</i>	<i>Protease inhibitor</i>
1037	204	127	DEPPQSPWDR	gi 229513	<i>Protein, lipid binding AI</i>	<i>Innate immunity</i>
1074	203	178	LPECEADDG-CPKPPEIAHGVEHSVR	gi 223976	<i>Haptoglobin Hp2</i>	<i>Scavenger</i>
624	204	123	SGTASVCLLNFFYPR	gi 10835794	<i>Chain C, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin</i>	<i>Host defense</i>
987	192	143	VYACEVTHQGLSSPVTK	gi 45501244	<i>IGKC protein [Homo sapiens]</i>	<i>Host defense</i>
1081	52		VFSVFSVLTKHK	gi 39645637	<i>Zinc finger protein 273 [Homo sapiens]</i>	<i>Transcription factor</i>
1027	268	204	FFGHGAEDSLADQAA-NEWGR	gi 49457476	<i>SAA1 [Homo sapiens]</i>	<i>Scavenger</i>
1097	51	13	YEELQVTAGR	gi 34069	<i>Unnamed protein product [Homo sapiens]</i>	
1098	110	60	YEELQVTAGR	gi 34069	<i>Unnamed protein product [Homo sapiens]</i>	
1076	90	58	ALGISPFHEHAEVFTAN-DSGPR	gi 14719498	<i>Chain B, Transthyretin Thr-119met Protein Stabilisation</i>	<i>Protein carrier</i>
1080	250	162	AVGDKLPECEAVCGKPK	gi 223976	<i>Haptoglobin Hp2</i>	<i>Scavenger</i>
851	89	60	LQNEREYR	gi 4758794	<i>Nebulin [Homo sapiens]</i>	
1024	180	122	TPNIVVRFGDR	gi 1498586	<i>Immunoglobulin heavy chain variable region [Homo sapiens]</i>	<i>Host defense</i>
869	123	92	VEYGFQVK	gi 20141171	<i>C4 complement</i>	<i>Complement component</i>

## DISCUSSÃO

Novas tecnologias para detecção da sepse nos estágios iniciais e estratificação dos pacientes são urgentemente necessárias. A análise das proteínas do soro/plasma para pesquisa de novos biomarcadores em doenças tem sido utilizada há anos, porém, para estudar o conjunto das proteínas expressas deve-se utilizar as ferramentas proteômicas<sup>18</sup>. Neste estudo foram utilizadas a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa em soro de pacientes com diferentes tipos de sepse (bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e culturas negativas) e controles normais, visando identificar padrões de expressão de proteínas diferenciais, para melhor entender os mecanismos patogênicos da sepse. A análise do proteoma com ferramentas de alto desempenho, onde milhares de proteínas são analisadas em único experimento, exige qualidade em todas as fases do processo (separação, quantificação, digestão, identificação) para que conclusões possam ser obtidas. Os géis foram bastante reprodutíveis, com padrão de expressão proteica distinto dos controles. A espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF mostrou-se um método rápido e eficiente na identificação de proteínas principalmente utilizando-se a busca conjunta de dados de MS e MS/MS de cada *spot*.

No estudo, a maioria das proteínas identificadas é de alta abundância e características de reação de fase aguda. Qual o significado destas identificações? De um papel secundário, apenas como indicador inespecífico da reação inflamatória, até um pólo oposto, atuando como mediador dos mecanismos patogênicos da sepse, tudo depende do avanço da ciência relacionado a estas proteínas. Alguns estudos apontam neste sentido, como: a neutralização do LPS em humanos, por peptídeo derivado de aminoácidos entre 27 e 39, do amiloide sérico A (SAA) (proteína com 104 aminoácidos, filogeneticamente conservada (200 milhões de anos))<sup>19</sup>; a antagonização seletiva dos efeitos *in vitro* do LPS, suprimindo a produção de TNF $\alpha$ , modulando a resposta inflamatória, a ativação do monócito, protegendo camundongos dos efeitos induzidos pela endotoxina, com a haptoglobina<sup>20</sup>; a relação entre os níveis do sCD163, um indicador da ativação de macrófagos, ativado pelo complexo haptoglobina-hemoglobina, determinando fenótipo antiinflamatório no macrófago; e, os níveis deste receptor solúvel, quando elevados, são relacionados com elevada mortalidade nos pacientes com sepse por pneumonia pneumocócica abaixo dos 75 anos<sup>21</sup>; a expressão de mRNA alta e temporária em

grânulos de neutrófilos, provavelmente servem como origem primária e local da proteína alfa 1 ácido glicoproteína (AGP) (orosomucóide) no local de lesão / infecção<sup>22</sup>; a possibilidade da AGP modificar diretamente a resposta da célula endotelial, mantendo sua função de barreira, reduzindo a formação de edema, acúmulo de neutrófilos e peroxidação de lipídeos, após sua adição em fluido de reanimação para tratamento de choque, prevenindo a lesão capilar<sup>23</sup>; a estabilização do complexo com o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), após interação com a AGP, estabilizando sua conformação<sup>24</sup>; a administração de AGP previamente e após dose letal de *B. anthracis* teve efeito protetor em estudo experimental em animais, interferindo nas concentrações de interferon gama e TNF $\alpha$ <sup>25</sup>. A significância destes estudos, mostrando uma visão distinta para estas proteínas, pode trazer novas luzes na patogênese da sepse.

Encontrou-se expressão diferencial de lipoproteínas e o papel destas proteínas tem merecido destaque na sepse. A Apolipoproteína A-1 (apoA-1) é uma proteína constituinte do HDL e interage com a proteína de ligação ao LPS, a LBP. A LBP circula no plasma associada com a ApoA-1 e modula a ligação do LPS ao HDL, atuando como co-fator na neutralização do LPS. LBP tem papel na ligação do LPS ao CD14, o receptor para o LPS presente em várias células do sistema imune (monócitos, macrófagos e neutrófilos), mediando a ativação destas células. LBP, CD14, HDL e ApoA-1 têm papel crucial no balanço entre neutralização do LPS e ativação imune. Outra proteína que pode se associar ao HDL é o SAA, que desloca a apoA-1 e torna-se a apolipoproteína predominante do HDL, causando sua remodelação (HDL3 para HDL2). Proteínas de transferência de lipídeos podem aumentar a captação de LPS pelo HDL, podendo o SAA redirecionar o LPS/neutralizado/HDL da via de ativação do CD14 em macrófago, para o fígado, com rápida depuração, levando a diminuição dos níveis de HDL e sua capacidade de neutralização do LPS durante a reação de fase aguda, desta forma perpetuando a resposta inflamatória sistêmica, contribuindo para a falência de órgãos e óbito dos pacientes<sup>26</sup>. A hipocolesterolemia é associada com aumento da morbidade e mortalidade na sepse, tendo os portadores do polimorfismo ApoE apresentado aumento da mortalidade na sepse<sup>27</sup>. Um aumento da proporção de proapolipoproteína A-1 (proapoA-1) em relação a apoA-1 pode ocorrer em processos inflamatórios, com o fígado participando deste processo<sup>28</sup>. A conversão de proapoA-1 em apoA-1 é um processo lento media-

do por enzima dependente de cálcio e magnésio presente na superfície de partículas de lipoproteínas, células endoteliais e hepáticas<sup>29</sup>. Revisão recente discutiu a neutralização do LPS pelas lipoproteínas e seus exatos mecanismos, ainda desconhecidos, e que a modulação do seu metabolismo pode ter papel importante na resposta inflamatória na sepse. Que as lipoproteínas são implicadas na imunidade inata, reduzindo a resposta de citocinas e mortalidade em modelos animais de sepse, porém ainda não sendo identificada relação entre pacientes sobreviventes e não-sobreviventes e seus níveis<sup>30</sup>. Neste estudo, as lipoproteínas também apresentavam expressão diferencial nos casos de sepse, com expressão menor no caso da apoA-IV e expressão maior na sua forma de precursor.

Outras publicações, com a proteômica, descrevem a expressão de proteínas em modelos de indução de sepse e para diagnóstico de infecções. Após estímulo de neutrófilos humanos por LPS, observou-se a análise da transcrição gênica e expressão protéica. A análise proteômica revelou moduladores da inflamação, moléculas de sinalização e proteínas do citoesqueleto, havendo pouca concordância entre o transcriptoma e as proteínas expressadas. Os autores concluíram que os resultados confirmaram a teoria, que “as proteínas reguladas pelo LPS identificadas por PMF (*peptide mass fingerprint*) tem concordância pobre com o encontrado ao nível de “mRNA”<sup>31,32</sup>. Após provocar lesão térmica (20%) e administração de endotoxina em camundongos, comparando com controles normais, géis com pH 3-8 foram separados e corados com SYPRO Ruby. Os peptídeos trípticos analisados levaram a identificação de 38 produtos gênicos diferenciais, desde proteínas de fase aguda, como haptoglobina, amilóide sérico A e P e também proteínas não descritas no mapa humano e do camundongo, como o receptor do fator de crescimento epidérmico. A análise de imagem revelou diferenças na expressão de proteínas inflamatórias dependendo do estímulo, lesão térmica ou LPS, sugerindo que o SAA possa diferenciar os estímulos inflamatórios<sup>33</sup>. Após indução de sepse por CLP em camundongos e observou-se a expressão de proteínas após 4 e 24 horas do início da sepse, encontrando, após 24 h, *spots* diferenciais em 2D, que, identificados por MS revelaram ser proteínas como apolipoproteínas, transtiretina, alfa-1 antitripsina, hemopexina, plasminogênio entre outras também de reação de fase aguda<sup>34</sup>. Formas truncadas da alfa-1 antitripsina (TF- $\alpha(1)$ -AT) estão aumentadas em pacientes com SARS, e, seu nível foi correlacionado com outros parâmetros clínico-patoló-

gicos. O aumento pode ser resultado da degradação da alfa-1 antitripsina, que tem papel importante na função pulmonar, e, sua degradação pode ser um fator na patogênese da SARS, indicando que seu aumento pode ser terapeuticamente relevante e marcador biológico útil para o diagnóstico da SARS<sup>35</sup>. Embora muitas das identificações encontradas neste estudo já tenham sido previamente descritas, todas foram em modelos experimentais de indução de sepse e não em pacientes com sepse.

Pode-se concluir que a ocorrência de sepse determina nos pacientes a expressão de padrão protéico típico, que foi identificada por tecnologia que permite a análise em larga escala de proteínas, a proteômica. Cabe ressaltar que, apesar de encontrar-se expressão diferencial de algumas proteínas, não foi possível identificar, até o momento, conjunto de proteínas expressas que possa ser considerado único de um tipo específico de sepse, com os géis obtidos. A proteômica se apresenta como opção para estudo da expressão protéica na sepse e pode trazer subsídios para a identificação de novos biomarcadores, perfil de espectro típico, construção de painel de proteínas diagnóstico e novos alvos para intervenção terapêutica. Esta é a primeira descrição, com a proteômica, das alterações em pacientes sépticos.

## REFERÊNCIAS

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J et al - Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001;29:1303-1310.
2. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC et al - Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*, 2004;8:R251-R260.
3. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF et al - Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 2001;344:699-709.
4. Dellinger RP, Vincent JL - The Surviving Sepsis Campaign sepsis change bundles and clinical practice. *Crit Care*, 2005;9:653-654.
5. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP et al - Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med*, 2003;31:1560-1567.
6. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al - 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 2003;31:1250-1256.
7. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD et al - From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, 1996;14:61-65.
8. Aebersold R, Hood LE, Watts JD - Equipping scientists for the new biology. *Nat Biotechnol* 2000;18:359.
9. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ - Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004;4:3665-3685.
10. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A - Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*, 2001;70:437-473.
11. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 1992;20:864-874.



12. Werner WE - Run parameters affecting protein patterns from second dimension electrophoresis gels. *Anal Biochem*, 2003;317:280-283.
13. Berkelman T, Stenstedt T - 2-D Electrophoresis using immobilized gradients. Edition AB, Amersham Biosciences, 2002.
14. Candiano G, Bruschi M, Musante L et al - Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004;25:1327-1333.
15. Jenö P, Mini T, Moes S et al - Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1995;224:75-82.
16. Habermann B, Oegema J, Sunyaev S et al - The power and the limitations of cross-species protein identification by mass spectrometry-driven sequence similarity searches. *Mol Cell Proteomics*, 2004;3:238-249.
17. Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A et al - Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Anal Chem*, 2001;73:1917-1926.
18. Petricoin EF, Ornstein DK, Liotta LA - Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. *Urol Oncol*, 2004;22:322-328.
19. de Haas CJ, van der Zee R, Benaissa-Trouw B et al - Lipopolysaccharide (LPS)-binding synthetic peptides derived from serum amyloid P component neutralize LPS. *Infect Immun*, 1999;67:2790-2796.
20. Arredouani MS, Kasran A, Vanoirbeek JA et al - Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology*, 2005;114:263-271.
21. Møller HJ, Møestrup SK, Weis N et al - Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163. *Crit Care Med*, 2006;34:2561-2566.
22. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Rasmussen T et al - Highly glycosylated alpha1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2005;78:462-470.
23. Kuebler JF, Toth B, Yokoyama Y et al - Alpha1-acid-glycoprotein protects against trauma-hemorrhagic shock. *J Surg Res*, 2004;119:21-28.
24. Smolarczyk K, Gils A, Boncela J et al - Function-stabilizing mechanism of plasminogen activator inhibitor type 1 induced upon binding to alpha1-acid glycoprotein. *Biochemistry*, 2005;44:12384-12390.
25. Shemyakin IG, Pukhalsky AL, Stepanshina VN et al - Preventive and therapeutic effects of alpha-acid glycoprotein in mice infected with *B. anthracis*. *Bull Exp Biol Med*, 2005;140:439-444.
26. van Leeuwen HJ, van Beek AP, Dallinga-Thie GM et al - The role of high density lipoprotein in sepsis. *Neth J Med*, 2001;59:102-110.
27. Harris HW - Apolipoprotein E: from Alzheimer's to sepsis. *Crit Care Med*, 2005;33:2696-2697.
28. Matsuura T, Koga S, Ibayashi H - Increased proportion of proapolipoprotein A-I in HDL from patients with liver cirrhosis and hepatitis. *Gastroenterol Jpn*, 1988;23:394-400.
29. Kooistra T, van Hinsbergh V, Havekes L et al - In vitro studies on origin and site of action of enzyme activity responsible for conversion of human proapolipoprotein A-I into apolipoprotein A-I. *FEBS Lett*, 1984;170:109-113.
30. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM et al - Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*, 2003;31:1359-1366.
31. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR et al - Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 1999;19:1720-1730.
32. Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW et al - A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002;277:31291-31302.
33. Duan X, Yarmush DM, Berthiaume F et al - A mouse serum two-dimensional gel map: application to profiling burn injury and infection. *Electrophoresis*, 2004;25:3055-3065.
34. McDunn JE, Husain KD, Coopersmith CM et al - Comparison of the plasma proteome during gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Journal of the American College of Surgeons Surgical Forum Abstracts 2004 Clinical Congress 2004*;199:(Suppl3):42-43.
35. Ren Y, He QY, Fan J et al - The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. *Proteomics*, 2004;4:3477-3484.