

Rita Azevedo de Paiva<sup>1</sup>, Cid Marcos David<sup>2</sup>, Gilberto Barbosa Domont<sup>3</sup>

## Proteômica na sepse: estudo piloto

*Proteomics in sepsis: a pilot study*

1. Mestre, Professora colaboradora da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.
2. Doutor, Professor Associado II do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.
3. Doutor, Professor Emérito do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

Submetido em 28 de Maio de 2010  
Aceito em 29 de Outubro de 2010

### Autor para correspondência:

Rita Azevedo de Paiva  
Rua Visconde Pirajá nº330 / 1011 – Ipanema  
CEP: 22410-001 - Rio de Janeiro (RJ), Brasil.  
Fone/ Fax: (21) 2521-0368  
E-mail: ritaazevedodepaiva@hotmail.com

### RESUMO

Na sepse ocorre desregulação da expressão gênica. Os marcadores genéticos revelam apenas o genótipo do indivíduo, não sendo afetados pelos processos biológicos decorrentes da ação do ambiente, estes expressos nas proteínas. Este estudo teve como objetivo alcançar maior compreensão sobre as bases moleculares da sepse. Para tal realizou a identificação e análise da expressão diferencial de proteínas no soro de paciente séptico em diferentes estágios de gravidade (sepse, sepse grave e choque séptico) através de técnicas proteômicas. Amostras de soro referentes a cada estágio da sepse foram colhidas e submetidas à eletroforese unidimensional em fitas com gradiente de pH imobilizado seguida de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 12,5%. Os géis obtidos foram corados, escaneados e analisados através do programa ImageMasterPlatinum. As proteínas expressas diferencialmente nos géis foram excisadas, digeridas com tripsina e

identificadas através de espectrometria de massa. Foram identificadas 14 proteínas expressas diferencialmente entre os estágios da sepse, assim como uma proteína não expressa em todos os estágios, sugerindo a existência de um possível biomarcador. Foram elas: amilóide sérico A, apolipoproteína A-1 (2 isoformas), proteína dedo de zinco 222, albumina humana, PRO 2619, imunoglobulina de cadeia leve kappa região VLJ, imunoglobulina M monoclonal de aglutinação a frio e 7 inibidoras de proteases - alfa-1 antitripsina. Os resultados obtidos neste estudo piloto demonstram a participação das vias do complemento e coagulação, do metabolismo lipídico e da informação genética na sepse. A grande maioria de proteínas identificadas está envolvida no sistema imune com predomínio das proteínas inibidoras de proteases.

**Descritores:** Choque séptico; Genoma humano; Eletroforese em gel de poliacrilamida; Espectrometria de massas; Proteômica; Sepse; Relatos de casos

### INTRODUÇÃO

Sepse é a principal causa de morte em unidades de tratamento intensivo não-coronarianas. Pode ocorrer em qualquer idade (maior incidência nos mais idosos), gênero (5% a mais nos homens) e associada a qualquer processo infeccioso sendo responsável por mais de 200.000 mortes por ano nos Estados Unidos da América (EUA).<sup>(1)</sup>

Na sepse ocorre uma resposta inflamatória aguda ao insulto infeccioso. Algumas proteínas liberadas, como as citocinas, podem apresentar efeito autócrino (quando a célula-alvo é a própria célula que secreta a citocina), efeito parácrino (quando a célula-alvo é vizinha) ou efeito endócrino promovendo reações fora dos limites inflamatórios localizados e resultando em manifestações sistêmicas.<sup>(2)</sup> A interação complexa entre citocinas e moléculas neutralizadoras de citocinas provavelmente determina a apresentação clínica e o curso da sepse.

Na sepse, o sucesso e a sobrevivência dependem da precocidade e da adequação do tratamento. Através da análise da expressão de proteínas poder-se-ia obter diagnóstico mais precoce da sepse e predição de efeitos terapêuticos.

Várias moléculas foram investigadas na busca por um biomarcador para a sepse, como a procalcitonina (PCT),<sup>(3)</sup> várias interleucinas incluindo interleucina (IL)-6, IL-8, TNF<sup>(4)</sup> e proteína C reativa (PCR).<sup>(5)</sup> O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) se mostra elevado na sepse e choque séptico, tendo sido relacionado à predição de mortalidade em infecções no centro de tratamento intensivo (CTI).<sup>(6)</sup> Durante a evolução do quadro de sepse ou sepse grave para choque séptico ocorre aumento significativo de sTREM-1 (*soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1*).<sup>(7)</sup> A proteína HMGB-1 – *High Mobility Group B-1* – parece ser mediadora tardia na sepse tendo se mostrado como marcadora de gravidade.<sup>(8)</sup> Até o presente momento ainda não se conhece o marcador ideal da sepse; a combinação de biomarcadores parece ser a melhor maneira de prevê-la e monitorá-la.

Progressos recentes no seqüenciamento do genoma apresentaram impacto significativo nas pesquisas científicas, porém, muito pouco se obteve em relação à informação dos produtos dos genes, as proteínas. A proteômica é a ciência que estuda o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma. A análise das proteínas se faz necessária, pois o estudo genômico não refletiria a estrutura dinâmica das proteínas, onde os processos da doença inicialmente ocorrem.<sup>(9)</sup> Dentre as ferramentas proteômicas utilizadas, a estratégia clássica consiste em separar e quantificar as proteínas de uma amostra (célula, tecido ou fluido) por eletroforese bidimensional (2D) e, posteriormente, identificar cada uma das proteínas através da espectrometria de massa (MS).<sup>(10)</sup> A proteômica se apresenta com a promessa de promover uma compreensão mais global de sistemas biológicos complexos e proporcionar o desenvolvimento de novos biomarcadores e alvos terapêuticos.<sup>(11)</sup>

Este estudo teve como objetivo empregar técnicas proteômicas para analisar a variação de expressão das proteínas séricas em diferentes estágios de gravidade da sepse - sepse, sepse grave e choque séptico - em um mesmo indivíduo, identificando as proteínas expressadas em cada estágio definido da sepse, avaliando a modificação de expressão destas proteínas de um estágio para outro e buscando proteína(s) marcadora(s) de gravidade ou de proteção (biomarcadores).

Este estudo inédito fornece contribuições para a ciência médica e levanta questões para posteriores investigações.

## RELATO DE CASO

Estudo prospectivo observacional longitudinal de um paciente séptico internado na unidade de pacientes críticos

(UPC) do Hospital Central do Exército (HCE), Rio de Janeiro, após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo responsável legal e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). A UPC é composta de 20 leitos, tendo sido necessária a coleta de amostras de soro de 11 pacientes diferentes durante três meses consecutivos para obtenção de um paciente que evoluísse seqüencialmente nos três estágios descritos. O trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Química (IQ) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), que faz parte da Rede Proteômica do Rio de Janeiro. Foi utilizada infraestrutura já instalada nas instituições e os recursos existentes foram suficientes para a execução da pesquisa. O tratamento do paciente foi efetivado conforme rotina estabelecida pela UPC, sem nenhuma alteração ou intervenção por parte do estudo.

### Desenho do estudo

A sepse foi estabelecida em três estágios, conforme descrição abaixo:

- Sepse - SIRS associada à identificação ou suspeita de foco infeccioso. Este estágio foi definido como estágio **A**.

- Sepse grave - Sepse associada a manifestações de hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica caracterizada por acidose láctica, oligúria ou alteração do nível de consciência ou ainda por hipotensão arterial com pressão sistólica menor do que 90 mmHg, porém sem a necessidade de agentes vasopressores. Este estágio foi definido como estágio **B**.

- Choque séptico - Hipotensão ou hipoperfusão induzido pela sepse refratária à ressuscitação volêmica adequada e com subsequente necessidade de administração de agentes vasopressores. Este estágio foi definido como estágio **C**.

O paciente evoluiu respectivamente do estágio A para B, do estágio B para C e então para o óbito. As coletas de sangue foram realizadas de forma seqüencial de acordo com a mudança de estágio do paciente totalizando três amostras. O paciente foi comparado a ele mesmo, não havendo caso-controle. Foram realizadas culturas microbianas do paciente (sangue, urina e secreção traqueal), dosagem do teor protéico, realizado o escore *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE II)<sup>(12)</sup> nas primeiras 24 horas de admissão e escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)<sup>(13)</sup> diariamente.

As amostras foram submetidas à eletroforese uni e bi-dimensional sendo obtidos nove géis, três referentes a cada estágio da sepse (triplicata). Estes géis foram corados com azul de *coomassie* revelando diversas proteínas que foram analisadas. Após análise foram escolhidas aquelas que apresentavam expressão diferencial significativa entre os estágios para excisão do gel, digestão com tripsina e identificação por espectrometria de massa.<sup>(14)</sup>

### Preparo para 1ª dimensão

Após dosagem de proteínas nas amostras, cerca de 1000 µg de proteínas (16,1 µL de soro da amostra A e 16,7 µL das amostras B e C) foram diluídos no tampão de re-hidratação - 2,7g uréia 9,0M, 0,1g 3-colamidopropil dimetilamônio-1-propanosulfonato (CHAPS) 2%, 3,5mg ditioneitol (DTT) 1%, 1,75 µL de tampão de Gradientes de pH imobilizado (IPG buffer) 0,5% 3-10 não linear, 10 µL de solução de azul de bromofenol 1% / Tris e 134 µL de água MilliQ - para um volume final de 350 µL. Cada amostra foi colocada no vórtex por 30 minutos com a intenção de agitar e desnaturar as proteínas. Materiais insolúveis foram removidos por centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm.

### 1ª dimensão

Focalização isoeletrica (IEF) em gradiente de pH imobilizado (IPG). Promove a separação das proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). O sistema para focalização isoeletrica empregado foi o equipamento Ettan™ IPGPhor IITM (GE-Healthcare) que possui controle de temperatura e fonte programável. A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o seguinte programa: IEF 20°C 50 µA/fit e vários ciclos seqüenciais até atingir 80.000Vh totais: 1º passo, 30 V por 12:00 h; 2º passo, 200 V por 1:00h e; 3º passo, 500 V por 1:00h; 4º passo, 1000 V por 1:00h; 5º passo 8000V por 10:00 h; corrida: 8.000 V; 82.060 Vht em 25:00h. As tiras de gel IPG foram seladas em plástico e estocadas a -80°C.

### 2ª dimensão

Eletroforese em gel poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 12,5% - equipamentos e reagentes da Amersham Biosciences®. Realiza a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular (MW). Foi utilizado o sistema Ettan Dalt six - sistema de eletroforese vertical com circulador de água para controle da temperatura (Multitemp III®). Antes de proceder à segunda dimensão, cada tira foi retirada do freezer a -80°C, equilibrada em presença de SDS e submetida à redução com 100 mg de ditioneitol (DTT) por 20 minutos. Em seguida foram alquiladas com 250 mg de IAA em solução de equilíbrio (uréia 6 M, 30% de glicerol, 2% SDS e Tris-HCL 0,05 M, pH 8,8) por 20 minutos. Terminado o equilíbrio as tiras foram mergulhadas em tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 1,92M, SDS a 1% e água destilada até completar 1000 mL) por 10 segundos para livrá-las do excesso de solução de equilíbrio. Logo após foram colocadas no topo do gel da segunda dimensão e fixadas com tampão de corrida contendo agar 0,5%, para então serem submetidas à segunda dimensão no sistema SDS-PAGE Etamm DALTsix (GE-HealthCare®), vertical a 20°C. A corrida transcorreu em duas etapas, na primeira utilizamos 1,5 W /gel durante 30 minutos e na segunda 16,6

W /gel por 03h30minh, totalizando 299 v, 96 w, 312 mA.

Terminada a corrida, cada gel foi colocado em solução de fixação com etanol: ácido acético: água (4h10min: 50 v/v/v) durante três horas, corado por 24 horas em solução a 1% de azul de Coomassie R-350 e descorados com metanol: ácido acético: água (40:10:50 v/v/v) em três lavagens de 30 minutos. Após, foram deixados por 24 horas em solução de ácido acético a 5% em água até a revelação das manchas, onde, a princípio, cada mancha corresponderia a uma única espécie de cadeia polipeptídica.

Os nove géis gerados foram digitalizados utilizando-se o programa Labscan v 3.0 (Amersham Bioscience) no escaneador Umax com sistema integrado de transparência e guardados em solução de ácido acético a 5% em plástico selado. As imagens foram digitalizadas e analisadas determinando a massa molecular e os pontos isoeletricos (pIs) das proteínas a partir de padrões e da análise da faixa de pH do tampão de Gradientes de pH imobilizado utilizado. O programa utilizado para análise dos géis foi o ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences) por uma combinação de detecção automática das manchas feita pelo programa e detecção manual. Foram detectadas 636 manchas. Apenas foram consideradas para análise as proteínas que apresentaram percentual de volume maior que 0,5. Proteínas com intensidade aumentada ou diminuída foram selecionadas para identificação. A seleção foi baseada na variação de intensidade entre elas. Aquelas que apresentaram entre si a razão de pelo menos duas vezes de aumento ou redução de intensidade (% volume) foram selecionadas. A comparação entre géis foi feita de forma automática depois de identificar vários pontos de referência nos géis. Após digitalização as proteínas específicas em cada gel foram comparadas a proteínas correspondentes no gel de referência. Após edição e comparação entre os géis (total de nove géis, três de cada estágio da sepse), foi iniciado processo para a elaboração de um gel único sintético, representativo de cada estágio. Cada três géis referentes ao estágio A deram origem a um gel único sintético representativo do estágio A, e assim igualmente com os três géis referentes às fases B e C. A construção de três géis referentes a um mesmo estágio foi feita para demonstrar a reprodutibilidade do experimento. Novamente foi feita a comparação (análise diferencial) entre géis, dessa vez entre cada gel sintético representativo de cada estágio (A, B e C).

As proteínas de interesse foram excisadas manualmente dos géis bidimensionais em pedaços de 1 mm<sup>3</sup> com o auxílio de um bisturi e transferidas para tubos de ensaio. As proteínas foram então descoradas em solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM / acetoneitrila (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 (29).

As proteínas foram re-hidratadas no gelo por 15 minutos, em 15 µL de solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 0,2 µg de tripsina modificada. Pedacos do gel foram cobertos com 20 µL do tampão e a digestão foi realizada a 37°C em banho por 16 horas. Em seguida os peptídeos foram extraídos do gel com solução acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (5%) em água e concentrados, até um volume de aproximadamente 5 µL, por centrifugação a vácuo.

### Espectrometria de massa

Após seleção, excisão e hidrólise das proteínas, a mistura de peptídeos da digestão triptica foi misturada 1:1, 5 com uma solução saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% / ácido trifluoroacético 0,3% em água. Um µL da mistura foi aplicado na placa de MALDI e a cristalização da matriz ocorreu à 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*). Foi usado o modo interativo onde todas as amostras eram analisadas, automaticamente, no modo refletor MS sendo, posteriormente, os seis picos mais intensos submetidos à análise posterior por MS/MS. A intensidade do laser utilizada foi 4800 para o modo MS e 5200 para o modo MS/MS e a célula de colisão configurada para 1 kV em pressão de  $1 \times 10^{-6}$  torr em presença de gás atmosférico.

Os espectros provenientes de análises combinadas (MS e 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 (*National Center for Biotechnology Information* - [www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI)). Foi empregado o *software* da interface MASCOT (*Matrix Science Ltd.*), que utiliza algoritmo para testar a significância estatística das identificações. Os valores de escore do íon (mínimo de 30) e de escore da proteína (mínimo de 70) 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.<sup>(15)</sup>

### DISCUSSÃO

O patógeno identificado nas hemoculturas colhidas em cada estágio definido pelo desenho do estudo, o escore SOFA, calculado em cada momento de coleta das amostras, a dosagem do teor protéico e demais dados sobre o paciente encontram-se descritos no quadro 1.

Foram separados para identificação 15 proteínas que, nesta análise, apresentaram a razão entre o maior e o menor valor do volume (*range ratio*) maior do que 2. As proteínas expressas diferencialmente estão identificadas na figura 1.

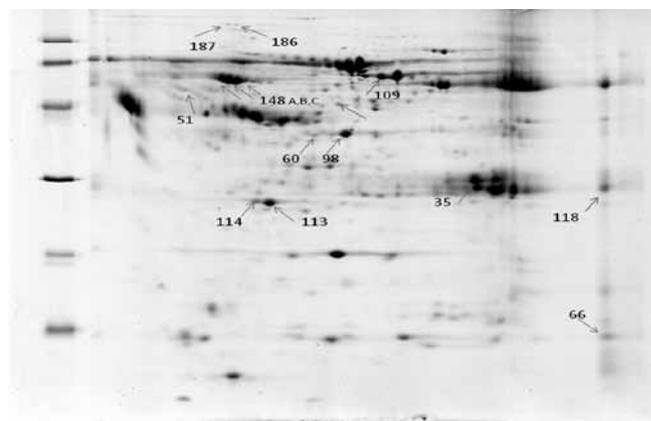


Figura 1 - Gel 2D referente à fase B com os spots excisados identificados.

As proteínas cujas expressões diferenciais foram consideradas significativas foram: amilóide sérico A, duas isoformas de apolipoproteína A1, sete membros da família das serpinas, proteína dedo de zinco 222, albumina sérica, PRO 2619 (superfamília albuminóide), imunoglobulina de cadeia leve kappa região VLJ e imunoglobulina M monoclonal de aglutinação a frio. As proteínas integrantes da família das serpinas identificadas foram respectivamente três isoformas de alfa-1 antitripsina, serpina, inibidor de peptidase, classe A (antiprotease alfa-1, antitripsina), membro 1, duas isoformas de Inibidor de serina protease, classe A, (alfa-1 antiprotease, antitripsina), membro 1 e estrutura cristalizada de complexo serpina-protease, cadeia A.

No quadro 2 encontramos as proteínas identificadas com o número da mancha (*spot*), ponto isoelétrico e peso mo-

### Quadro 1 – Características demográficas e clínicas do paciente em estudo

Gênero	Idade	APACHE II	Amostras	Patógeno	Fase	SOFA	Proteína sérica (g/dL)
Masculino	57	18	D1	<i>E. coli</i>	A	2	6,2
			D11	<i>E. coli</i>	B	4	6,0
			D15	<i>E. coli</i>	C	6	6,0

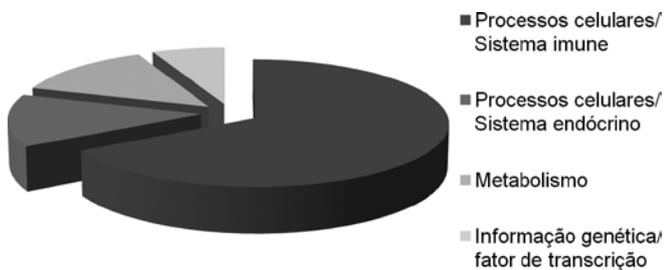
APACHE - *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*; g/dL- gramas por decilitro; D1 - dia 1; *E. Coli* - *Escherichia coli*.

**Quadro 2 – Identificação e descrição das proteínas diferencialmente expressas no estudo**

Grupo de identificação	Ecore de proteínas/ Escore de íons	Sequência de peptídeos	Número de acesso	Descrição da proteína	Função	Varição de expressão
66	196/174	GPGGAWAAEVISNAR SFFSFLGEAFD GAR EQLGPVTQEFWDNLEK	gi 337743	Amilóide sérico A	<i>Scavenger</i>	C<B>A
113	449/370	THLAPYSDEL R WQEEMEL YR DEPPQSPWDR EQLGPVTQEFWDNLEK	gi 90108664	Apolipoproteína A-1	Imunidade inata	A>B>C
114	448/378	THLAPYSDEL R WQEEMEL YR ITPNLAEF AFSLYR	gi 90108664	Apolipoproteína A-1	Imunidade inata	A>B>C
98	342/291	LYHSEAF TVNFGDTEEAKK VFSNGAD LSGVTEEAPLK VFDEFKPLVEEPQNLIK	gi 11514321	Estrutura cristalizada de complexo serpina-protease, cadeia A	Inibidor de protease	C<B>A
133	168/100	FQNALLVR HPYFYAPELLFFAK	gi 23307793	Albumina sérica	Metabolismo de aminoácido	A>B>C
109	481/342	HPDYSV VLLLR VFDEFKPLVEEPQNLIK RPCFSALEVDETYVPK	gi 11493459	PRO 2619 (superfamília albuminóide)	Metabolismo de aminoácido	A>B>C
60	100/-	EKPFQGENCK SFCLRSSLR SGTASV VCLLNNFYPR	gi 20988840	Proteína zinc finger 222	Fator de transcrição	C<B>A
118	200/191	VYACEV THQGLSSPVTK TVAAPSV FIFPPSDEQLK	gi 21669353	Imunoglobulina de cadeia leve kappa região VLJ	Defesa do hospedeiro	C>B>A
186	209/142	VFSNGAD LSGVTEEAPLK DTEEDFHVDQVTTK	gi 50363217	Inibidor de serina protease, classe A, (alfa-1 antiprotease, antitripsina), membro 1	Inibidor de protease	C>B>A
187	191/143	ITPNLAEF AFSLYR LYHSEAF TVNFGDTEEAKK	gi 50363217	Inibidor de serina protease, classe A, (alfa-1 antiprotease, antitripsina), membro 1	Inibidor de protease	C>B>A
35	150/140	SGTASV VCLLNNFYPR VYACEV THQGLSSPVTK TVAAPSV FIFPPSDEQLK	gi 10835792	Imunoglobulina M monoclonal de aglutinação a frio	Defesa do hospedeiro	C>B>A
51	172/143	ITPNLAEF AFSLYR VFSNGAD LSGVTEEAPLK	gi 15080499	Serpina, inibidor de peptidase, classe A (antiprotease alfa-1, antitripsina), membro 1	Inibidor de protease	C>B>A
148 A	229/181	LYHSEAF TVNFGDTEEAKK LYHSEAF TVNFGDTEEAK LYHSEAF TVNFGDTEEAKK	gi 177831	Alfa-1- antitripsina	Inibidor de protease	C>B>A
148 B	376/318	LQHLENEL THDIITK VFSNGAD LSGVTEEAPLK LQHLENEL THDIITK	gi 6137432	Alfa-1- antitripsina	Inibidor de protease	C>B>A
148 C	396/355	LYHSEAF TVNFGDTEEAKK LQHLENEL THDIITK TDTSHHDQDHPTFNK GKWERPFEVK	gi 224224	Alfa-1- antitripsina	Inibidor de protease	C>B>A

lecular teórico e experimental, escore da proteína (mínimo de 70), escore do íon (mínimo de 30), melhor Sequência de Peptídeos, número de entrada para acesso nos bancos de dados do NCBI, função da proteína e expressão diferencial nos estágios da sepse.

Cada proteína identificada foi classificada em uma das categorias funcionais estabelecidas: metabolismo, processamento de informação genética, processamento de informação ambiental, processos celulares e doenças humanas. Foi considerada a classificação adotada pela Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas -www.genome.jp/kegg/ - KEGG. As proteínas foram classificadas nas categorias processos celulares/sistema imune (66,6%), processos celulares/ sistema endócrino (13,3%), metabolismo (13,3) e informação genética/fator de transcrição (6,6%) conforme ilustrado na figura 2 abaixo.



**Figura 2 - Distribuição funcional relativa das proteínas identificadas. As categorias de classificação foram previamente reportadas pelo *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.**

A relativa abundância de proteínas envolvidas nos processos celulares referentes ao sistema imune pode estar associada à reação do organismo ao processo infeccioso instalado. Estas proteínas estão presentes nas vias das cascatas de coagulação e do sistema complemento. Os resultados indicam um foco significativo nestas vias, conhecidas como de papel relevante na sepse.<sup>(16)</sup> Os demais sistemas envolvidos no estudo foram o sistema endócrino com as vias de sinalização PPAR (13,3%), metabolismo (13,3%) e processamento de informação genética/fator de transcrição (6,6%). A via de sinalização PPAR está envolvida no metabolismo lipídico (KEGG).

### Proteínas identificadas

A apolipoproteína A-1 (APO A-1) é o principal componente proteico do HDL (Lipoproteína de Alta Densidade). A APO A-1 se liga a lipopolissacarídeos ou endotoxinas apresentando papel relevante na função anti-endotoxina do HDL.<sup>(17)</sup> Ela interage com a proteína de ligação do LPS, a LBP, e circula no plasma modulando a ligação do LPS ao HDL atuando como co-fator na neutralização do LPS. As lipoproteínas estariam implicadas na imunidade inata, redu-

zindo a resposta de citocinas em modelos animais de sepse.<sup>(18)</sup> A APO A-1 apresentou expressão decrescente no estudo conforme evolução da gravidade do quadro séptico. Este achado pode significar redução da ação da imunidade inata e efeitos anti-endotoxinas.

O amiloide sérico A (SAA) é uma apolipoproteína do complexo HDL. O SAA atua redirecionando o LPS/neutralizado/HDL da via de ativação do CD14 em macrófago para o fígado, com rápida depuração e conseqüente diminuição dos níveis de HDL. Assim, sua capacidade de neutralização do LPS durante a reação de fase aguda fica reduzida, perpetuando a resposta inflamatória sistêmica e contribuindo para a falência de órgãos e óbito dos pacientes.<sup>(19)</sup> O SAA no presente estudo não foi detectado no estágio inicial da sepse e apresentou expressão maior no estágio B (sepse grave), decrescendo sua expressão para o estágio C do estudo. Possivelmente esses dados refletem uma menor expressão devido à menor necessidade no estágio C de deslocamento da APO A-1 ou a redução da capacidade do fígado em secretá-la.

Também identificada no estudo e incluída na categoria do sistema imune e parte das cascatas de coagulação e complemento encontra-se a imunoglobulina kappa de cadeia leve região VLJ. As imunoglobulinas são parte integrante do sistema imune humoral. Contribuem para a imunidade de três formas principais: previnem a entrada de patógenos na célula ligando-se a eles; estimulam a remoção de um patógeno pelos macrófagos cobrindo-o e podem desencadear a destruição direta do patógeno através do estímulo de outras respostas imunes como ativação da via do complemento.<sup>(20)</sup> Outra imunoglobulina identificada no estudo foi a imunoglobulina M monoclonal de aglutinação a frio. As aglutininas a frio são auto-anticorpos IgM caracterizados por sua habilidade em se aglutinar em temperaturas baixas com os glóbulos vermelhos *in vitro* (4-22°C).<sup>(21)</sup> As duas diferentes imunoglobulinas identificadas no estudo apresentaram maior expressão no estágio C, decrescendo até o estágio A, portanto mais expressas nos estágios mais graves do processo infeccioso.

A proteína dedo de zinco 222 (ZNF 222) é um fator de transcrição e pertence à família da proteína *krueppel* tipo C2H2 dedo de zinco.<sup>(22)</sup> Um fator de transcrição é a proteína que liga o DNA a sítios específicos onde ele pode regular a transcrição. Através de dados obtidos pelo NCBI, o fator de transcrição dedo de zinco 222 teria suposto papel de repressão transcricional, regulando a transcrição, divisão celular e partição de cromossomas. Sua expressão aumenta do estágio A para o estágio B e em seguida diminui no estágio C. Seu comportamento na evolução da sepse pode refletir a tentativa do organismo de bloquear a produção de proteínas cujos efeitos possam ser prejudiciais ao organismo (citocinas, p.ex). Com a redução em sua concentração no estágio C haveria

menor repressão da transcrição destas proteínas instalando-se o choque. O mesmo se aplicaria à regeneração tecidual, também parte de sua função.

A albumina é a mais abundante proteína plasmática, totalizando 50% das proteínas do soro humano.<sup>(23)</sup> A albumina foi identificada nesse estudo reduzindo sua expressão com a piora do quadro séptico. Uma das importantes funções da albumina é a manutenção do volume plasmático circulante, devido ao seu peso molecular relativamente baixo e sua alta concentração. A albumina desempenha também papel na manutenção do equilíbrio ácido-básico, no transporte de uma variedade de substâncias fisiológicas, na distribuição e metabolismo de diferentes substâncias endógenas e exógenas e ainda atua como reservatório de aminoácidos.<sup>(24)</sup>

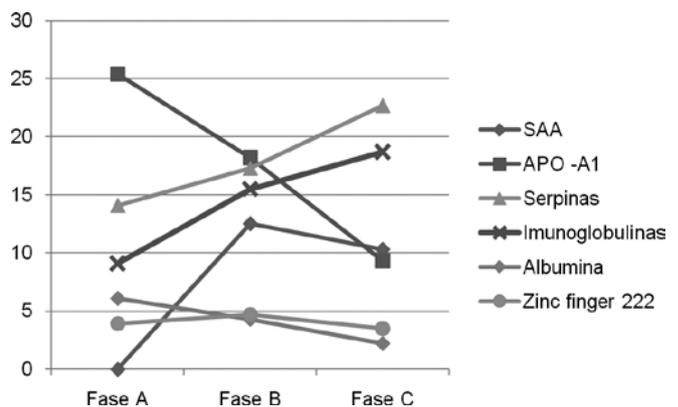
A proteína PRO 2619 pertence à família albuminóide, sendo um precursor sérico da albumina. Como tal, durante a evolução da sepse para estágios mais graves, também decresceu sua expressão.

Várias proteínas relacionadas à família das serpinas foram identificadas nesse estudo. Nome dado à família dos inibidores de proteases, as serpinas compartilham uma estrutura terciária complexa e bem conservada. Estão contidas neste estudo as seguintes proteínas integrantes da família serpina: inibidor de serina protease, classe A, (alfa-1 antiprotease, antitripsina), membro 1; alfa-1 antitripsina e a cadeia A da serpina presente em um complexo serpina-protease cristalino. A alfa-1 antitripsina é uma glicoproteína conhecida como inibidora de tripsina e exerce papel central no controle da homeostase neutralizando os efeitos deletérios da elastase, enzima poderosa encontrada nos glóbulos brancos. Como inibidoras das proteases, as serpinas têm um arranjo de funções incluindo regulação da coagulação sanguínea, remodelação e motilidade celular, regulação da pressão sanguínea e angiogênese.<sup>(25)</sup> A serpina identificada no banco de dados como parte de um complexo serpina-protease apresentou aumento de expressão do estágio inicial de sepse para o estágio de sepse grave, decrescendo a seguir. Este fato pode sugerir, por tratar-se de um complexo envolvendo proteases, que no choque séptico estas enzimas encontravam-se reduzidas, ou, de outra forma, que a quantidade de enzimas permaneceria a mesma havendo em contrapartida menor expressão da serpina. As demais serpinas apresentaram grau de expressão aumentado conforme a piora do quadro infeccioso do paciente, isto é, expressão crescente dos estágios A para B e B para C respectivamente. Este perfil apresentado demonstrou envolvimento do sistema imune e vias de cascata de coagulação e complemento na evolução da sepse, abrangendo mecanismos de reparo de tecidos e proteção pulmonar. Este quadro ocorreu possivelmente conseqüente ao episódio de SARA desenvolvido pelo paciente com concomitante elevação na concentração de elastase.

Isoformas de alfa-1 antitripsina foram isoladas. As isoformas, que normalmente estão presentes em baixa concentração, têm seu nível aumentado em mais de 100 vezes sob condições inflamatórias<sup>(26)</sup> indo ao encontro dos resultados desse estudo. O aumento pode ser resultado da fragmentação da alfa-1 antitripsina, que tem papel importante na função pulmonar. A fragmentação desta proteína pode ser um fator na patogênese da SARA, indicando que seu aumento pode ser relevante e marcador biológico útil para o diagnóstico da SARA.

Igualmente foram identificadas isoformas de apolipoproteína A-1. Variações no percentual dos diferentes tipos de isoformas de APO A-1 podem ocorrer devido à modificação na taxa catabólica fracional desta apolipoproteína.<sup>(27)</sup> A expressão decrescente destas isoformas no estudo conforme evolução de gravidade do quadro séptico pode significar redução da capacidade de atuação da imunidade inata, dos efeitos anti-endotoxinas e da proteção cardiovascular

Foi abordado o significado funcional destas proteínas. Enquanto muitas delas sejam biomarcadores de inflamação e de resposta aguda, a lista de proteínas que está expressa para mais ou para menos neste estudo demonstra que a sepse tem efeitos importantes sobre a coagulação, sistema imune, metabolismo lipídico, apoptose e informação genética, confirmando dados já previamente demonstrados em estudos anteriores. A figura 3 ilustra o perfil apresentado pelas proteínas identificadas no estudo de acordo com as variações de expressão entre os estágios.



**Figura 3 - Gráfico representativo das variações de expressão entre as proteínas em % de volume nas fases A, B e C.**

Na figura 3 observa-se a franca variação na expressão das proteínas entre os estágios da sepse estudados. A apolipoproteína A-1 e a albumina decrescem sua expressão do estágio A para o estágio C enquanto as serpinas e as imunoglobulinas aumentam. Níveis crescentes dos inibidores de proteases neste caso podem representar a tentativa do organismo de inibir

quantidades cada vez maiores de elastase expressadas durante o episódio de SARA.

A SAA não está presente no estágio A, surgindo no estágio B e reduzindo sua expressão para o estágio C. Este comportamento pode ser explicado possivelmente pela menor necessidade na fase C de deslocamento da APO A-1, que já se apresentava neste momento em menor quantidade ou na menor capacidade do fígado em secretá-la.

A proteína dedo de zinco 222 aumenta sua expressão do estágio A para o estágio B decrescendo a seguir para o estágio C. Por tratar-se de fator repressor de transcrição, a redução em sua expressão e, portanto, diminuição da repressão sobre alguma proteína com ação deletéria pode ter contribuído para o estabelecimento da fase de choque séptico.

O estágio A caracterizou-se pela predominância de APO A-1 e albuminas, representando resposta protetora e de manutenção da homeostase na sepse. No estágio B predominou o fator de transcrição dedo de zinco 222 e SAA, demonstrando atividade inflamatória intensa pelo deslocamento da APO A-1 e tentativa de repressão de proteínas. O estágio C caracterizou-se pela expressão maior de inibidores de proteases e imunoglobulinas, proteínas funcionalmente responsáveis pela defesa do organismo.

As proteínas identificadas guardam relação com aquelas descritas em estudos proteômicos previamente realizados em sepse. Neste estudo, porém, foi feita uma abordagem longitudinal do mesmo paciente. Este estudo apresenta como limitação a análise de apenas um paciente, o que não permite a inferência dos resultados. Em contrapartida, o estudo de um único paciente sem a formação de uma mistura de amostras torna-se de maior valor pela inexistência de fatores de confundimento decorrentes da mistura de soros de pacientes de diferentes gêneros, idades, origens raciais (africana, asiática, européia, p.ex), microorganismos infectantes, resposta imunológica ao agente agressor, hábitos alimentares, fatores estes capazes de influenciar a expressão protéica. Vários trabalhos anteriores empregaram esta técnica possivelmente fragilizando os resultados obtidos.

Uma das grandes possibilidades vislumbradas através do estudo proteômico é caracterizar diferenças na expressão protéica para identificar potenciais alvos de drogas e biomarcadores de doenças, ampliando nossa compreensão dos processos biológicos. A abordagem da proteômica funcional poderia fornecer dados sobre a rede de sinalização inflamatória na sepse identificando nós regulatórios críticos. Mas, como os dados proteômicos irão nos ajudar a direcionar nossos tratamentos a uma via de sinalização específica ou a um entroncamento crítico entre as vias de

conexão que seja responsável pela manutenção do estado séptico? O desafio futuro será traduzir o que estes dados obtidos nas pesquisas trarão para o diagnóstico clínico, promovendo grande impacto nas tomadas de decisão no tratamento do paciente.

Este trabalho demonstra a possibilidade do uso de técnicas proteômicas - eletroforese bidimensional e espectrometria de massa - no estudo da sepse.

Esta é a primeira descrição, com a proteômica, das alterações evolutivas da sepse em um mesmo paciente. A despeito das limitações apresentadas neste estudo, ele torna-se de grande valor por representar um ponto de partida para a realização de outros trabalhos nesta linha que possam validar estas conclusões por ora desenhadas sobre o padrão da expressão protéica na sepse.

---

## ABSTRACT

Gene expression is disrupted by sepsis. Genetic markers can only reveal a patient's genotype, and they are not affected by environmental biological processes. These processes are expressed by proteins.

This study was aimed to advance the insight into the molecular foundations of sepsis. It employed proteomic techniques to identify and analyze differential serum protein expressions taken from a patient throughout the stages of sepsis (sepsis, severe sepsis and septic shock).

Serum samples were collected at each stage of sepsis and submitted to one-dimensional electrophoresis, on gradient strips of immobilized pH, followed by two-dimensional 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gels obtained were stained, scanned and analyzed by the ImageMasterPlatinum program. Proteins that were differentially expressed in the gels were excised, digested with trypsin and identified through mass spectrometry. Fourteen differentially expressed proteins were identified throughout the stages of sepsis, as well as a protein that was not expressed in all stages, suggesting the potential existence of a biomarker. The differentially expressed proteins identified were: serum amyloid A, apolipoprotein A-1 (2 isoforms), zinc finger protein 222, human albumin, PRO 2619, immunoglobulin kappa light chain VLJ region, monoclonal immunoglobulin M cold agglutinin, 7 proteinase inhibitors - alpha-1 antitrypsin.

The findings of this pilot study demonstrate the involvement of the complement and coagulation pathways, of the lipid metabolism and of genetic information in sepsis. The vast majority of proteins identified are involved in the immune system and the proteinase inhibitor proteins are predominant.

**Keywords:** Shock, septic; Human genome; Mass spectrometry; Electrophoresis, polyacrylamide gel; Proteomics; Sepsis; Case reports

## REFERÊNCIAS

1. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
2. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-43. Review.
3. Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*. 2008;36(3):941-52.
4. Tili E, Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*. 2007;179(8):5082-9.
5. Müller B, Schuetz P, Trampuz A. Circulating biomarkers as surrogates for bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30 Suppl 1:S16-23.
6. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*. 2000;6(2):164-70.
7. Phua J, Koay ES, Zhang D, Tai LK, Boo XL, Lim KC, Lim TK. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in acute respiratory infections. *Eur Respir J*. 2006;28(4):695-702.
8. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999;285(5425):248-51.
9. Ciero L, Bellato CM. Proteoma: avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. *Biotecnol Ciênc Desenvolv*. 2002;5(29):158-64.
10. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437-73. Review.
11. Hoehn GT, Suffredini AF. Proteomics. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S444-8. Review.
12. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13(10):818-29.
13. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. 1996;22(7):707-10.
14. Jenö P, Mini T, Moes S, Hintermann E, Horst M. Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1995;224(1):75-82.
15. Habermann B, Oegema J, Sunyaev S, Shevchenko A. The power and the limitations of cross-species protein identification by mass spectrometry-driven sequence similarity searches. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(3):238-49.
16. Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, Gentle TM, Siuzdak G. Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, three-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res*. 2006;5(11):3154-60.
17. Harris HW. Apolipoprotein E: from Alzheimer's to sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33(11):2696-7.
18. van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2003;31(5):1359-66.
19. van Leeuwen HJ, van Beek AP, Dallinga-Thie GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. The role of high density lipoprotein in sepsis. *Neth J Med*. 2001;59(3):102-10.
20. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90.
21. Ciejka JZ, Cook EB, Lawler D, Martin J, Woodson RD, Graziano F. Severe cold agglutinin disease and cryoglobulinemia secondary to a monoclonal anti-Pr2 IgM lambda cryoagglutinin. *Clin Exp Rheumatol*. 1999;17(2):227-31.
22. Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, Shenmen CM, Grouse LH, Schuler G, Klein SL, Old S, Rasooly R, Good P, Guyer M, Peck AM, Derge JG, Lipman D, Collins FS, Jang W, Sherry S, Feolo M, Misquitta L, Lee E, Rotmistrovsky K, Greenhut SF, Schaefer CF, Buetow K, Bonner TI, Haussler D, Kent J, Kiekhuis M, Furey T, Brent M, Prange C, Schreiber K, Shapiro N, Bhat NK, Hopkins RF, Hsie F, Driscoll T, Soares MB, Casavant TL, Scheetz TE, Brown-stein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Piao Y, Dudekula DB, Ko MS, Kawakami K, Suzuki Y, Sugano S, Gruber CE, Smith MR, Simmons B, Moore T, Waterman R, Johnson SL, Ruan Y, Wei CL, Mathavan S, Gunaratne PH, Wu J, Garcia AM, Hulyk SW, Fuh E, Yuan Y, Sneed A, Kowis C, Hodgson A, Muzny DM, McPherson J, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madari A, Young AC, Wetherby KD, Granite SJ, Kwong PN, Brinkley CP, Pearson RL, Bouffard GG, Blakesly RW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Griffith M, Griffith OL, Krzywinski MI, Liao N, Morin R, Palmquist D, Petrescu AS, Skalska U, Smailus DE, Stott JM, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Holt RA, Baross A, Marra MA, Clifton S, Makowski KA, Bosak S, Malek J; MGC Project Team. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA

- project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res.* 2004;14(10B):2121-7. Erratum in: *Genome Res.* 2006;16(6):804. Morrin, Ryan [corrected to Morin, Ryan].
23. Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1991;15(2):207-11. Review.
  24. Whicher J, Spence C. When is serum albumin worth measuring? *Ann Clin Biochem.* 1987;24(Pt 6):572-580. Review.
  25. Barret AJ, Salvesen G, editors. *Proteinase inhibitors.* Amsterdam: Elsevier; 1986.
  26. Ferrero S, Gillott D, Anserini P, Remorgida V, Price K, Ragni N, Grudzinskas J. 168: Alpha1-Antitrypsin isoforms in endometriosis: a proteomic study. *J Minim Invasive Gynecol.* 2005; 12(5 Suppl 1):70.
  27. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(8):1578-83.

## ERRATA

No Suplemento de 2010 – Resumos dos trabalhos científicos apresentados no XV Congresso Brasileiro de Medicina Intensiva – Brasília 2010, página S11, onde se lê AO - 37, leia-se:

### PO – 370

“Perfil de sobreviventes da síndrome da angústia respiratória aguda em Vitória - ES” - Andre Luiz da Fonseca Potratz, José Roberto Pereira da Fonseca, Felipe da Fonseca Potratz, Heidi Shiho Nagatani Feitoza, Thúlio Mina Vago, Eliana Bernadete Caser, Ana Maria Casati Nogueira da Gama, Carmen Silvia Valente Barbas

Considerar como trabalho apresentado oralmente o resumo abaixo (não impresso no Suplemento 2010)

### AO – 37

#### Sobreviventes da síndrome da angústia respiratória aguda em Vitória/ES

Eliana Caser, André Fonseca Potratz, Ana Casati Gama, José Pereira Fonseca, Heidi Shiho Feitoza, Thúlio Mina Vago, Beatriz Dalcomo Leão, Carmen Sílvia Barbas  
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES - Vitória (ES), Brasil, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP- São Paulo (SP), Brasil.

**Objetivos:** Avaliar a função respiratória, tomografia computadorizada de tórax de alta resolução (TCAR) e estado

mental dos sobreviventes da SARA.

**Métodos:** Foram recrutados pacientes de 14 unidades de terapias intensivas que receberam alta hospitalar após desenvolver SARA (64 sobreviventes de 128 pacientes). Foram realizados espirometria, teste da caminhada 6 minutos, TCAR, gasometria arterial e exame do estado mental.

**Resultados:** Dos 64 pacientes sobreviventes, 22 foram avaliados. A idade média foi  $40 \pm 13$  anos, 14 do sexo masculino. O tempo médio pós alta hospitalar =  $880 \pm 150$  dias. Dezesesseis entre os 22 pacientes retornaram ao trabalho com tempo médio =  $7,1 \pm 7$  meses. Vinte pacientes realizaram espirometria: FVC% médio (% predita) = 97,85% (65 a 181%), FEV1% médio = 93,16 (40 a 126%), FEF25-75% médio = 83,05% (13 a 167%), pico de fluxo = 93,58% (26 a 175%). Distância média após caminhada 6 minutos 443,4 (220 a 528) metros, SpO2 média após 6 minutos foi 98,68% (95 a 99%), FC média após 6 minutos 109,7 (83 a 155), PIM média  $95,56 \pm 27,09$  cmH2O e PEM média  $104,9 \pm 24,26$  cmH2O. PaO2/FIO2 média foi  $503 \pm 92$  (ar ambiente). TCAR revelaram opacidades discretas em vidro fosco 5/20, sinais aprisionamento de ar 5/20, atelectasia subsegmentar 6/20 e bronquiectasia em 3/20. O escore médio do mini-mental foi 25,91 (7 a 30). Disfunções cognitivas estiveram presentes 7/22 pacientes.

**Conclusão:** Os sobreviventes da SARA apresentaram algumas alterações funcionais persistentes após a alta hospitalar. No entanto, dos 22 pacientes, 16 retornaram ao trabalho.