


**SÉRIE EM
BIOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR**

**MÉTODOS EXPERIMENTAIS
NO ESTUDO DE PROTEÍNAS**

**Caroline S. Moraes
Francisco O. R. Oliveira Junior
Gustavo Masson
Karina M. Rebello
Livia O. Santos
Narayana F. P. Bastos
Rozana C. R. Faria**



**SÉRIE EM
BIOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR**

**MÉTODOS EXPERIMENTAIS
NO ESTUDO DE PROTEÍNAS**

Copyright © by Fiocruz, 2013

Todos os direitos desta edição reservados à Fundação Oswaldo Cruz.

Av. Brasil, 4365

Proibida a reprodução total ou parcial deste conteúdo

EDITORES

HELENE SANTOS BARBOSA

MILTON OZORIO MORAES

RUBEM FIGUEIREDO SADOK MENNA BARRETO

COORDENADORES

FERNANDO ARIEL GENTA

RICHARD HEMMI VALENTE

AUTORES

CAROLINE DA SILVA MORAES

FRANCISCO ODENCIO RODRIGUES DE OLIVEIRA JUNIOR

GUSTAVO MASSON

KARINA MASTROPASQUA REBELLO

LÍVIA DE OLIVEIRA SANTOS

NARAYANA FAZOLINI P. BASTOS

ROZANA CÔRTE-REAL FARIA

REVISORES

ANDRÉ TEIXEIRA DA SILVA FERREIRA

CLAUDIA MASINI D'ÁVILA-LEVY

DANIELA GOIS BEGHINI

LUCIANA PIZZATTI BARBOZA

MAGNO RODRIGUES JUNQUEIRA

PROJETO GRÁFICO E CAPA

SIMONE OLIVEIRA

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT/ FIOCRUZ - RJ

M593

Métodos experimentais no estudo de proteínas / Caroline S. Moraes...[et al]. - Rio de Janeiro: IOC, 2013.


84 p. : il. - (Série em biologia celular e molecular)

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-99974-04-9

1. Bioquímica. 2. Proteínas. 3. Enzimas. 4. Purificação de proteínas. 5. Proteômica. I. Moraes, Caroline S. II. Título. III. Série.

CDD: 571.6



Caroline S. Moraes
Francisco O. R. Oliveira Junior
Gustavo Masson
Karina M. Rebello
Lívia O. Santos
Narayana F. P. Bastos
Rozana C. R. Faria

**SÉRIE EM
BIOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR**

**MÉTODOS EXPERIMENTAIS
NO ESTUDO DE PROTEÍNAS**

1ª edição
Rio de Janeiro
IOC - Instituto Oswaldo Cruz

Apresentação à coleção

Os cursos de férias no Instituto Oswaldo Cruz surgiram com o objetivo de oferecer aos estudantes de graduação a oportunidade de estudar em uma Instituição de Pesquisa de excelência, abordando em profundidade temas incomuns à grade curricular da universidade. Agregado a este objetivo principal, a formatação desse curso permitiria o trânsito e vivência dos estudantes no ambiente científico dos diferentes laboratórios do IOC. Além disso, a possibilidade de estimular os estudantes de pós-graduação do IOC a desenvolverem atividades didáticas teórico-práticas, preencheria também uma lacuna importante na formação dos mestres e doutores da nossa instituição que não possui cursos de graduação.

A ideia surgiu em 2007, e desde sua primeira edição, os cursos de férias do IOC versam sobre temas relevantes da área de pesquisa em saúde no Brasil. De 2007 a 2012, foram realizadas 11 edições dos Cursos de Férias, nas versões verão e inverno, tendo sido oferecidas as mais variadas disciplinas, coordenadas por mais de 50 pesquisadores do IOC, envolvendo centenas de mestrandos e doutorandos e mais de 1.000 alunos oriundos de dezenas de universidades de todo o país.

Desde o início, um estímulo adicional aos professores do curso foi o desenvolvimento de material didático original para servir de apoio às aulas teóricas e práticas. O resultado desse esforço coletivo se traduz nesta coleção. Os textos foram desenvolvidos em linguagem simples e objetiva e conteúdo inovador, abordando temas transversais em biociências. Assim, desenvolvemos fascículos para a formação de jovens cientistas na vanguarda do conhecimento em áreas que apresentam hibridismo e multidisciplinaridades absolutamente cruciais para o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Estamos convencidos de que este material permitirá aos leitores acesso rápido e fácil a conteúdos não abordados durante a graduação, além de possibilitar a integração de atividades didáticas e o estímulo à redação científica entre pós-graduandos do IOC. Boa leitura.

*Helene S. Barbosa
Milton O. Moraes
Rubem F. S. Menna-Barreto*

Nota dos organizadores

O curso “Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas” foi um dos primeiros cursos de férias realizados no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), surgindo para suprir a carência de disciplinas didáticas na pós-graduação de uma instituição que não conta com cursos de graduação. Achamos interessante oferecer um curso básico sobre técnicas utilizadas, pretendendo em termos gerais, abordar desde medidas básicas de proteínas e ensaios de atividade enzimática até a purificação de proteínas e análise proteômica.

A concepção e realização das três edições do curso, além de extremamente gratificantes, mostraram-se um exercício de compreensão mútua e diálogo entre coordenadores (pesquisadores do IOC), professores (alunos de pós-graduação do IOC) e alunos (graduandos de diferentes instituições de ensino superior do país). A primeira edição foi realizada no verão de 2009 seguida por outra no inverno do mesmo ano, sendo a última no verão de 2010. Ao longo desses dois anos foi possível acompanhar não só a evolução das aulas teóricas e práticas, mas também o ganho de desenvoltura e desenvolvimento conceitual dos alunos de pós-graduação envolvidos.

A proposta de aulas teóricas em sala seguidas de práticas em laboratório, com experimentos relacionados ao tema de cada aula, mostrou-se um grande desafio e propiciou aos jovens professores a percepção das dificuldades envolvidas no planejamento e na realização de resultados padronizados com o objetivo de demonstrar cada técnica.

Após três edições, observamos que essa fórmula parecia esgotada, sendo o momento de abrir espaço para outros cursos com diferentes temáticas. Entretanto, a oportunidade de apresentar novamente o curso, agora na forma impressa, propiciou aos alunos não só a experiência de sedimentar e organizar o conhecimento adquirido ao longo de sua realização, mas também a chance de divulgar o conteúdo do curso para um público mais amplo.

Os capítulos gerados foram submetidos à revisão por um corpo independente de pesquisadores, ao qual gostaríamos de externar nossos efusivos agradecimentos por terem dedicado seu precioso tempo para a correção dos capítulos, assim como pelas inestimáveis contribuições para o texto. Vale ressaltar que qualquer erro que eventualmente tenha permanecido é de responsabilidade exclusiva dos autores e dos organizadores.

Finalmente, agradecemos não só ao Instituto Oswaldo Cruz, que como instituição propiciou as condições para execução das aulas, como também a todos os envolvidos, que pela boa vontade, energia e inspiração transformaram o nosso curso em uma experiência única e exemplar para todos os participantes.

*Fernando A. Genta
Richard H. Valente*

Sumário

INTRODUÇÃO À BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS	8
1.1. Introdução.....	9
1.2. Aminoácidos	9
1.2.1. Classificação	11
1.2.1.1. Essenciais e não essenciais	11
1.2.1.2. Cadeia lateral	11
1.2.1.2.1. Aminoácidos com cadeias laterais apolares e alifáticas.....	11
1.2.1.2.2. Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas	12
1.2.1.2.3. Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas.....	12
1.2.1.2.4. Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos).....	12
1.2.1.2.5. Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos).....	12
1.3. Proteínas.....	14
1.3.1. Funções	14
1.3.1.1. Proteínas Estruturais.....	14
1.3.1.2. Enzimas	14
1.3.1.3. Proteínas Transportadoras.....	15
1.3.1.4. Proteínas reguladoras.....	15
1.3.2. Classificação	15
1.3.2.1. Composição	15
1.3.2.2. Forma.....	16
1.3.3. Níveis de organização estrutural das proteínas.....	16
1.3.4. Forças envolvidas no enovelamento de proteínas	18
1.4. Métodos de quantificação de proteínas.....	19
1.4.1. Método do biureto (Sensibilidade – 0,5 a 10 mg por mL).....	20
1.4.2. Método de Folin-Lowry (Sensibilidade – 0,1 a 0,3 mg por mL).....	21
1.4.3. Método de BCA (Sensibilidade – 0,1 a 0,5 mg por mL).....	21
1.4.4. Método de Bradford (Sensibilidade – 0,06 a 0,3 mg por mL)	21
ENZIMOLOGIA: ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	24
2.1. Introdução.....	25
2.2. Enzimas.....	25
2.3. Nomenclatura enzimática	28
2.4. Cofatores	29
2.5. Reação enzimática.....	30
2.6. Ensaio enzimáticos	32
2.7. Inibição enzimática	39
2.8. Conclusão.....	40

MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	42
3.1. Propriedades das proteínas	43
3.1.1. Propriedades elétricas.....	43
3.1.2. Solubilidade	44
3.1.3. Solução-Tampão.....	45
3.1.4. Desnaturação protéica	46
3.2. Obtenção do extrato celular	47
3.3. Separação de proteínas.....	49
3.3.1. Centrifugação	49
3.3.2. Diálise.....	51
3.3.3. Cromatografia	53
ELETROFORESE, ZIMOGRÁFIA & WESTERN BLOTTING.....	60
4.1. Histórico	61
4.2. Princípio da técnica e aplicações	61
4.3. Tipos de Eletroforese	63
4.3.1. Eletroforese livre.....	63
4.3.2. Eletroforese com suporte	63
4.3.2.1. Eletroforese em gel de agarose	63
4.3.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	64
4.3.2.3. Eletroforese nativa	65
4.3.2.4. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	65
4.3.3. Eletroforese capilar	67
4.4. Zimografia.....	68
4.5. <i>Western blot / Immuno blot</i>	69
INTRODUÇÃO À PROTEÔMICA	72
5.1. Introdução	73
5.2. Preparação da amostra	75
5.3. 2D-PAGE – Eletroforese Bidimensional	76
5.3.1. Focalização isoelétrica (IEF) – Primeira Dimensão.....	76
5.3.2. SDS-PAGE	78
5.4. Introdução à espectrometria de massas	79



INTRODUÇÃO À BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

FRANCISCO ODENCIO RODRIGUES DE OLIVEIRA JUNIOR

1. INTRODUÇÃO À BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

1.1. Introdução

Uma das principais características dos seres vivos é a capacidade de transformar a matéria; seja matéria presente no meio externo, seja aquela acumulada no próprio organismo, fazendo parte da sua composição. Os fenômenos de transformação da matéria realizados pelos seres vivos dão-se na maior parte dos casos por modificações qualitativas das moléculas (reações químicas) catalizadas por enzimas. Desta forma podemos dizer que os seres vivos são agentes de transformações químicas, sendo responsáveis no ecossistema terrestre por um grande número de conversões de matéria e energia, as quais permitem a vida em nosso planeta. Logo, a Bioquímica é a ciência que estuda as reações químicas produzidas diretamente ou indiretamente pelos seres vivos, que em seu conjunto constituem os processos biológicos.

As proteínas são macromoléculas orgânicas que apresentam a capacidade de atuar em conjunto com íons ou outras moléculas orgânicas, sendo responsáveis por inúmeros fenômenos observados nos seres vivos e, por conseguinte, têm um papel de destaque dentro dos processos biológicos. Desta forma, iremos abordar algumas metodologias bioquímicas clássicas utilizadas para estudar e analisar proteínas. Inicialmente, iremos rever alguns conceitos importantes.

1.2. Aminoácidos

Dentre os inúmeros aminoácidos presentes na natureza, apenas 22 são considerados proteinogênicos. Os aminoácidos proteinogênicos são aqueles que podem ser encontra-

dos como constituintes de proteínas e que tenham sido incorporados à molécula protéica pelo maquinário celular em função da existência de códon especificado no RNA mensageiro. Logo, aminoácidos gerados pela modificação pós-traducional da molécula protéica não são considerados proteínogênicos. Dentre os 22 aminoácidos proteínogênicos, selenocisteína e pirrolisina ocorrem apenas em procariotos, apresentam mecanismo de incorporação à molécula protéica específicos e são pouco abundantes. Por isso, não serão abordados neste texto. Aminoácidos proteínogênicos são moléculas orgânicas também conhecidas como aminoácidos do tipo alfa. Neste tipo de molécula, o carbono alfa está ligado a um grupamento amina ($-\text{NH}_2$), um grupamento de ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), uma cadeia lateral variada e um hidrogênio. As cadeias laterais variam de acordo com suas estruturas, tamanho e carga elétrica, fatores que irão influenciar na solubilidade dos aminoácidos em água.

Em todos os aminoácidos, exceto glicina, o carbono alfa é assimétrico (quiral ou opticamente ativo), ou seja, apresenta um arranjo tetraédrico com quatro grupos substituintes diferentes que podem ocupar disposições espaciais distintas, as quais são entre si imagens espaciais não superponíveis (estereoisômeros). Esta característica faz com que moléculas que contenham centros quirais tenham atividade ótica, ou seja, a propriedade de desviar a luz plano-polarizada, sendo a direção desta rotação diferente para as duas formas. A classificação e nomenclatura dos estereoisômeros foram baseadas em um composto de referência, o gliceraldeído, através de análises por difração de raios-X. Desta forma, as configurações relacionadas àquelas do L-gliceraldeído e do D-gliceraldeído são designadas pela letra L e D, respectivamente (do latim *laevus* que significa esquerda e *dexter* que significa direita). Assim, os dois estereoisômeros dos aminoácidos são designados por L e D aminoácidos (Figura 1.1) em função da sua semelhança com o padrão gliceraldeído. Os aminoácidos que compõem as proteínas são sempre L-estereoisômeros.

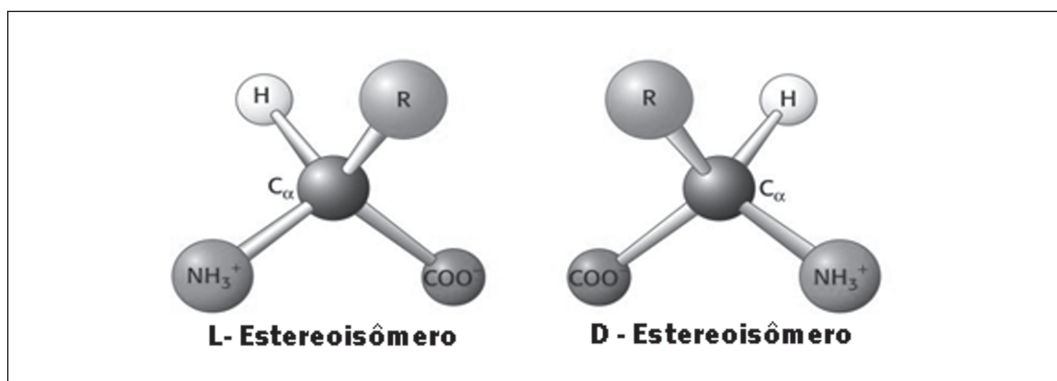


Figura 1.1. Representação esquemática de L e D isômeros de aminoácidos.

1.2.1. Classificação

1.2.1.1. Essenciais e não essenciais

Essenciais, ou indispensáveis, são os aminoácidos que o organismo humano não tem a capacidade de sintetizar. Assim, estes devem ser obrigatoriamente ingeridos através de alimentos. Logo, a alimentação deve ser a mais variada possível para que o organismo obtenha uma diversidade maior destes aminoácidos. A carne, o leite e o ovo são as principais fontes destes aminoácidos. Por outro lado, aminoácidos não-essenciais, ou dispensáveis, são os que nosso organismo pode sintetizar.

Aminoácidos	
Essenciais	Não-Essenciais
Arginina	Alanina
Histidina	Aspargina
Isoleucina	Ácido Aspártico
Leucina	Cisteína
Lisina	Ácido Glutâmico
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

Tabela 1.1. Os vinte aminoácidos proteínogênicos mais conhecidos.

1.2.1.2. Cadeia lateral

Os aminoácidos podem ser classificados de acordo com suas cadeias laterais (Figura 1.2), onde podemos ressaltar principalmente dois critérios de classificação: polaridade e carga destas cadeias. Essas propriedades químicas isoladas das cadeias laterais persistem mesmo após a inserção de resíduos de aminoácidos na cadeia protéica e desta forma o conjunto destes aminoácidos conferirá características peculiares à cada proteína.

1.2.1.2.1. Aminoácidos com cadeias laterais apolares e alifáticas

As cadeias laterais desta classe são hidrocarbonetos (compostos de carbono e hidrogênio) sendo caracterizadas como grupamentos quími-

cos hidrofóbicos apolares. Os aminoácidos pertencentes a este grupo são: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina e prolina.

1.2.1.2.2. Aminoácidos com cadeias laterais aromáticas

A fenilalanina, o triptofano e a tirosina constituem este grupo. Eles são relativamente apolares e apresentam anéis aromáticos em sua estrutura. O triptofano e a tirosina são capazes de absorver luz na região ultravioleta do espectro, fato esse que é responsável pela absorvância da luz, por proteínas contendo estes aminoácidos, no comprimento de onda de 280 nm.

1.2.1.2.3. Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas

As cadeias laterais deste grupo são hidrofílicas, ou seja, interagem bem com a água, por apresentarem grupos funcionais que formam ligações de hidrogênio com a água. São constituintes deste grupo: serina, treonina, cisteína, metionina, asparagina e glutamina. A cisteína contém um grupo sulfidríla (-SH) capaz de formar ligações dissulfeto, as quais são importantes para a manutenção da estrutura tridimensional de algumas proteínas.

1.2.1.2.4. Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)

Em pH neutro, as cadeias laterais desses aminoácidos encontram-se completamente ionizadas, contendo um grupo carboxilato carregado negativamente. São constituintes deste grupo: ácido aspártico e ácido glutâmico.

1.2.1.2.5. Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)

Os aminoácidos deste grupo apresentam suas cadeias laterais com carga positiva quando em pH ácidos. São constituintes deste grupo: histidina, lisina e arginina.

1.2.2. Outras funções dos aminoácidos

Os aminoácidos não atuam somente como unidades estruturais para a formação das proteínas, mas também desempenham diversas funções. São precursores de uma série de substâncias biologicamente importantes como

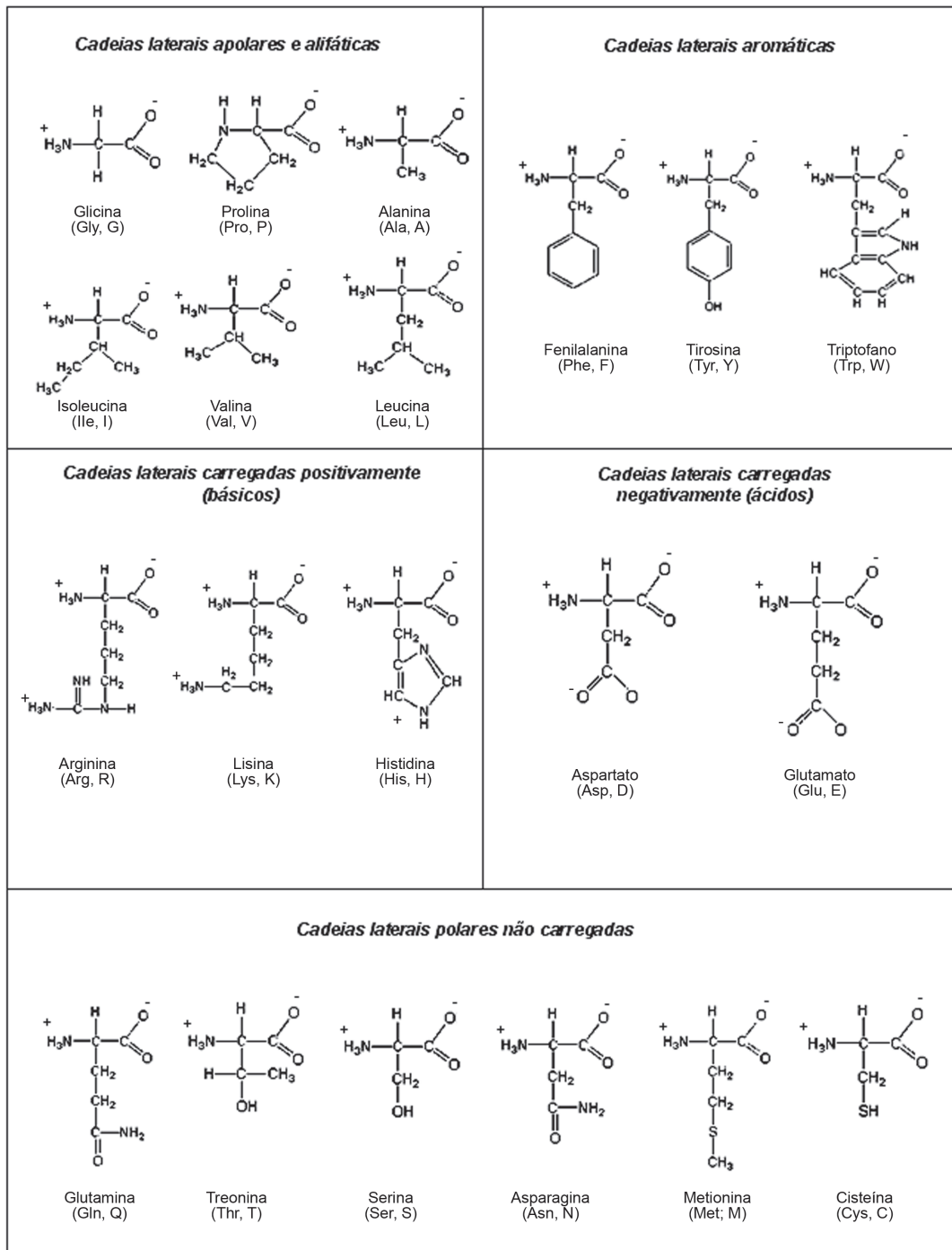


Figura 1.2. Estrutura molecular de 20 aminoácidos proteínogênicos. Entre parênteses estão apresentadas as abreviaturas (de três letras e de uma letra) dos nomes de cada um dos aminoácidos.

hormônios, alcalóides e pigmentos. Dentre outras funções, a glicina, por ser um aminoácido altamente hidrofílico, é frequentemente adicionada a outras moléculas para torná-las mais solúveis, de modo que possam ser, por exemplo, excretadas pela urina.

1.3. Proteínas

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes presentes em todos os sistemas vivos. Elas representam cerca de 50 a 80% do peso seco das células. As proteínas são compostas por uma combinação de até 22 aminoácidos e apresentam uma grande variedade estrutural devido ao número expressivo de possibilidades de sequências de aminoácidos. Em teoria, um decapeptídeo (peptídeo composto por 10 aminoácidos) poderia apresentar $2,2 \times 10^{11}$ (220 trilhões) de sequências (arranjos) diferentes com o mesmo número de resíduos de aminoácidos na molécula.

Mas como os aminoácidos são capazes de formar proteínas? Os aminoácidos apresentam a capacidade de formar ligações covalentes entre os grupos amino (NH_2) de um aminoácido e carboxílico (COOH) de outro, reação que é catalisada por um conjunto de enzimas, formando as chamadas ligações peptídicas. Assim, eles originam cadeias polipeptídicas que ao atingirem uma certa extensão (cerca de 50 resíduos) recebem o nome de proteína.

1.3.1. Funções

Por apresentarem uma grande variedade estrutural, as proteínas desempenham uma série de funções biológicas e podem ser agrupadas de acordo com essas funções.

1.3.1.1. Proteínas Estruturais

Participam da estruturação dos tecidos servindo como filamentos de suporte, cabos ou lâminas para fornecer proteção e resistência a estruturas biológicas. Podemos citar como exemplo o colágeno que é uma proteína altamente resistente a tensões que está presente em cartilagens e tendões e proteínas do citoesqueleto, tais como actina e tubulina.

1.3.1.2. Enzimas

É um grupo altamente variado e especializado de proteínas que exhibe atividade catalítica. Dentre as proteínas com funções enzimáticas podemos citar, entre outras, quinases, amilases, lipases e isomerases.

1.3.1.3. Proteínas Transportadoras

Estas proteínas atuam no transporte eficiente de muitas moléculas, tais como: íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e metabólitos. Estão presentes nas membranas da célula, no espaço intracelular e também no plasma sanguíneo. Um exemplo de proteína transportadora é a hemoglobina dos eritrócitos, que é responsável pelo transporte de O_2 (oxigênio) dos alvéolos pulmonares para os tecidos e CO_2 (dióxido de carbono) dos tecidos para os pulmões, no fenômeno denominado de respiração aeróbica.

1.3.1.4. Proteínas reguladoras

Estas têm participação na regulação da atividade celular ou fisiológica. Entre elas estão presentes muitos hormônios protéicos, que são sintetizados por glândulas endócrinas. Ao serem liberados na corrente sanguínea, podem estimular ou inibir vias metabólicas regulando, desta forma, processos celulares. Podemos citar como exemplo a insulina e o glucagon.

É interessante como um grupo de apenas 20 aminoácidos pode originar uma variedade tão grande de proteínas com propriedades e funções tão diferentes. Vale a pena ressaltar que a mudança de um único aminoácido na cadeia primária pode desorganizar completamente a estrutura da proteína fazendo com que esta perca sua função.

1.3.2. Classificação

1.3.2.1. Composição

Muitas proteínas são constituídas apenas por uma cadeia de aminoácidos, não apresentando nenhum outro grupo químico. Estas são consideradas proteínas simples. Entretanto, existem outras proteínas que além dos aminoácidos apresentam outros componentes químicos e são chamadas de proteínas conjugadas. A parte não aminoacídica de uma proteína conjugada é chamada de grupo prostético. As proteínas conjugadas são classificadas de acordo com a natureza de seus grupos prostéticos, onde lipoproteínas contêm lipídeos, glicoproteínas contêm moléculas de açúcar e metaloproteínas contêm um metal específico. Normalmente este grupo prostético irá desempenhar um papel importante na função da proteína.

1.3.2.2. Forma

- **Proteínas globulares**

A cadeia polipeptídica enovela-se de maneira compacta, resultando em uma molécula esférica e globular; são geralmente solúveis em água e desempenham diversas funções. Ex: enzimas, albumina, globulinas, hemoglobina.

- **Proteínas fibrosas**

A cadeia polipeptídica é arranjada em forma de longos cordões ou em forma de folhas; são geralmente insolúveis em água. Ex: actina, tubulina, colágeno e α -queratina.

1.3.3. Níveis de organização estrutural das proteínas

Muitas conformações diferentes são possíveis para uma macromolécula como no caso de proteínas. Entretanto, poucas destas conformações possuem atividade biológica; que são chamadas conformações nativas. Conceitualmente, a estrutura das proteínas pode ser dividida em quatro diferentes níveis de organização: primário, secundário, terciário e quaternário (Figura 1.3).

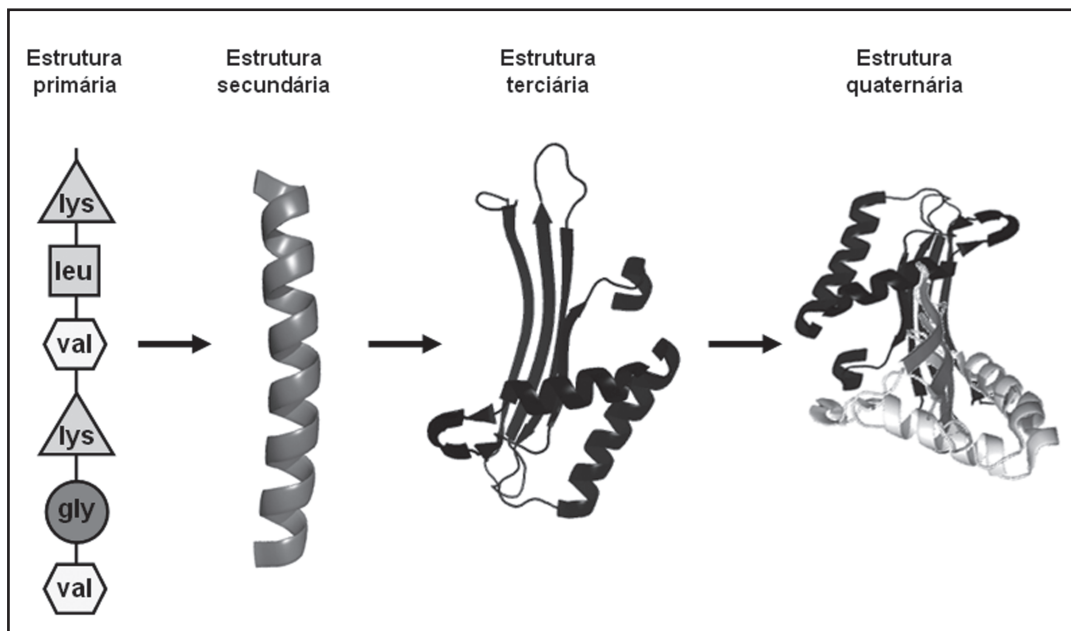


Figura 1.3. Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas.

Estrutura primária – A sequência linear dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas determina a estrutura primária das proteínas. Esta estrutura resulta em uma longa cadeia de aminoácidos, com uma extremidade amino terminal (NH_2) e uma extremidade carboxi terminal (COOH). Sua estrutura primária pode ser desfeita através de hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas, gerando peptídeos ou aminoácidos livres. Esta sequência primária contém toda a informação necessária para que a proteína se enovele alcançando sua conformação nativa.

Estrutura secundária - Refere-se ao dobramento regular de regiões da cadeia polipeptídica. Os dois tipos mais comuns de estrutura secundária são: alfa-hélice e folha beta-pregueada (Figura 1.4). As estruturas em alfa-hélice apresentam-se em aspecto cilíndrico com arranjo helicoidal dos aminoácidos, que é mantido pelas ligações de hidrogênio paralelas ao eixo da hélice. Nas estruturas em folha beta-pregueada, as ligações de hidrogênio formam-se entre as regiões adjacentes do polipeptídeo que estão na mesma direção (paralelas) ou em direções opostas (antiparalelas).

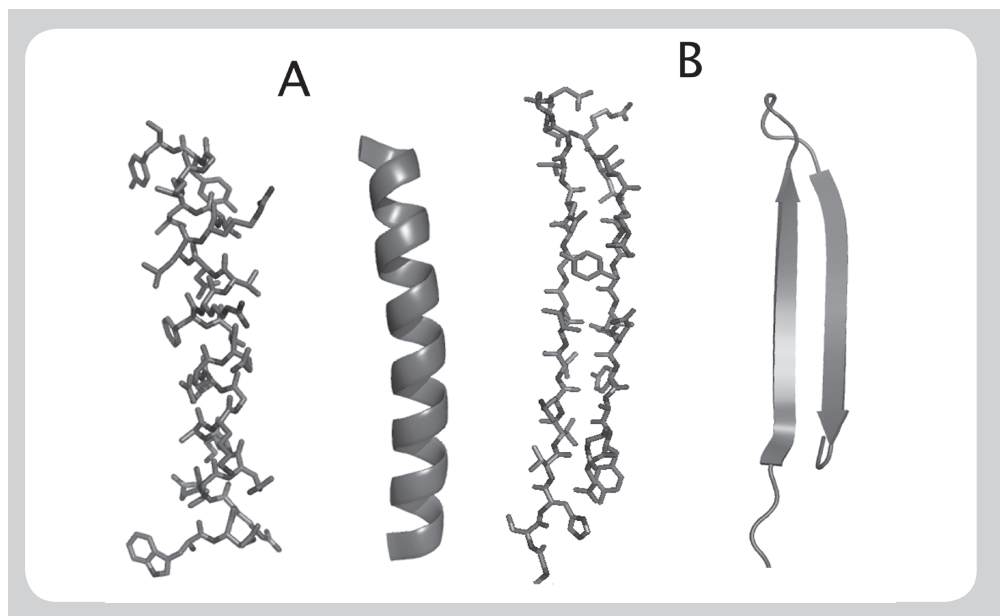


Figura 1.4. Representação esquemática de estruturas secundárias. (A) alfa-hélice e (B) folha beta-pregueada.

Estrutura terciária - Refere-se ao arranjo tridimensional de todos os aminoácidos da cadeia polipeptídica. A conformação nativa é mantida pelas múltiplas interações não covalentes que se formam entre os resíduos ou grupamentos prostéticos da proteína. A proteína precisa ainda estabelecer uma série de ligações não-covalentes entre diferen-

tes porções da cadeia polipeptídica. Em alguns casos, ainda é necessária a formação de ligações covalentes do tipo dissulfeto. As ligações dissulfeto (covalentes) entre resíduos de cisteína são incluídas na estrutura terciária.

Estrutura quaternária – Refere-se ao arranjo espacial entre duas ou mais cadeias polipeptídicas com estruturas terciárias definidas. A natureza da interação entre as diferentes cadeias é do tipo não-covalente gerando desde um dímero (duas cadeias) até um oligômero (mais de duas cadeias). Cada unidade de uma estrutura quaternária é denominada de subunidade. Oligômeros podem ser do tipo homo oligômeros (subunidades com mesma estrutura primária) ou hetero oligômeros (diferentes estruturas primárias).

1.3.4. Forças envolvidas no enovelamento de proteínas

Conforme mencionado anteriormente, a estrutura primária de uma proteína, que é a ordem dos aminoácidos na cadeia polipeptídica, depende da formação de ligações covalentes (ligações peptídicas). Entretanto, as demais estruturas (secundária e terciária), cujos níveis de organização são mais complexos, dependem de interações fracas, do tipo não-covalentes, que ocorrem em maior número. Estas interações fracas irão contribuir para que as proteínas adotem uma conformação mais estável com um nível menor de energia livre e assim atinjam sua conformação nativa funcional.

Neste ponto devemos levar em consideração as características das cadeias laterais de cada aminoácido. Entretanto, quando os aminoácidos estão compondo uma cadeia polipeptídica, não podemos considerá-los como moléculas independentes como fazemos quando estes estão isolados, uma vez que eles influenciam e sofrem influência dos outros aminoácidos que compõem a molécula. Em seguida iremos discutir algumas das interações que são importantes no enovelamento e manutenção da estrutura tridimensional das proteínas.

Aminoácidos que apresentam cadeias laterais apolares tendem a se agrupar no centro da estrutura, como resultado de interações hidrofóbicas evitando desta forma o contato com a água. As ligações de hidrogênio são observadas entre grupos polares e têm uma grande importância na arquitetura da estrutura secundária (interação entre carbonilas e aminas da cadeia polipeptídica) e terciária (interação entre cadeias laterais). Outra interação importante observada entre os aminoácidos são as atrações eletrostáticas, que se dão através de cadeias laterais polares carregadas (por exemplo, pontes salinas, interações íon-dipolo) ou mesmo entre cadeias laterais neutras (interações de Van der Waals).

Como resultado desse enovelamento os resíduos que estão próximos e interagindo entre si na estrutura terciária, podem estar muito distantes fisicamente na estrutura primária. Além disso, é importante ressaltar que a conformação nativa de uma proteína pode ser alterada devido à variação das condições às quais esta proteína está submetida. Isto se deve a perturbações nas interações não-covalentes que estabilizam uma determinada estrutura.

1.4. Métodos de quantificação de proteínas

Agora que fizemos uma pequena revisão sobre as principais características dos aminoácidos e das proteínas iremos abordar as principais metodologias utilizadas para quantificação de proteínas. A quantificação de proteínas é um método empregado em análises clínicas, nutrição animal, ciência de alimentos, bioquímica de proteínas, entre outros. Na química de proteínas, a quantificação é um passo fundamental para o acompanhamento do processo de purificação, bem como auxilia as análises físico-químicas posteriores das proteínas purificadas. O padrão-ouro em quantificação de proteínas é estabelecido pela técnica de análise de aminoácidos. Entretanto, esta técnica é muito laboriosa e custosa para uso rotineiro. Por isso, os métodos espectrofotométricos utilizando comprimentos de onda na região do ultravioleta ou do visível são mais utilizados (métodos colorimétricos ou colorimetria).

A colorimetria é uma técnica analítica que avalia a capacidade dos solutos absorverem a luz em comprimentos de onda específicos. A medida da luz absorvida permite inferir sobre a concentração de soluto em uma determinada solução ou material biológico. Este método é conhecido também por fotometria ou espectrofotometria. Ele é indicado para se determinar a concentração de solutos naturalmente corados como também de solutos incolores, mas adquirem cor mediante o emprego ajustado de certo reativo. Assim, concentrações das soluções podem ser determinadas avaliando-se a absorção em um comprimento de onda apropriado. O aparelho utilizado é o espectrofotômetro, cujo esquema geral pode ser visto na Figura 1.5. No espectrofotômetro, os raios luminosos emitidos por uma fonte de luz são linearizados em um colimador que é capaz de emitir um feixe linear para o monocromador. O monocromador permite selecionar o comprimento de onda que incide sobre a solução, usando-se um seletor de comprimento de onda (prisma). O comprimento de onda emitido pelo prisma apresenta maior poder de resolução na cubeta, permitindo análises tanto na região do visível quanto do ultravioleta. Em alguns aparelhos (fotocolorímetros), um filtro ótico deixa passar apenas certas faixas de comprimento de onda, sendo de uso limitado ao espectro da luz visível.

A análise quantitativa é feita tendo como base a lei de Lambert-Beer. A lei de Lambert estabelece que a diminuição da intensidade de um feixe de luz monocromática, em função da espessura do meio absorvente atravessado, é proporcional à intensidade do feixe incidente, ou seja: a quantidade de luz diminui em progressão geométrica (exponencial) e não aritmética. Adicionalmente, a lei de Beer estabelece que a energia deste feixe luminoso decresce de maneira exponencial quando aumenta a concentração do soluto presente no meio absorvente.

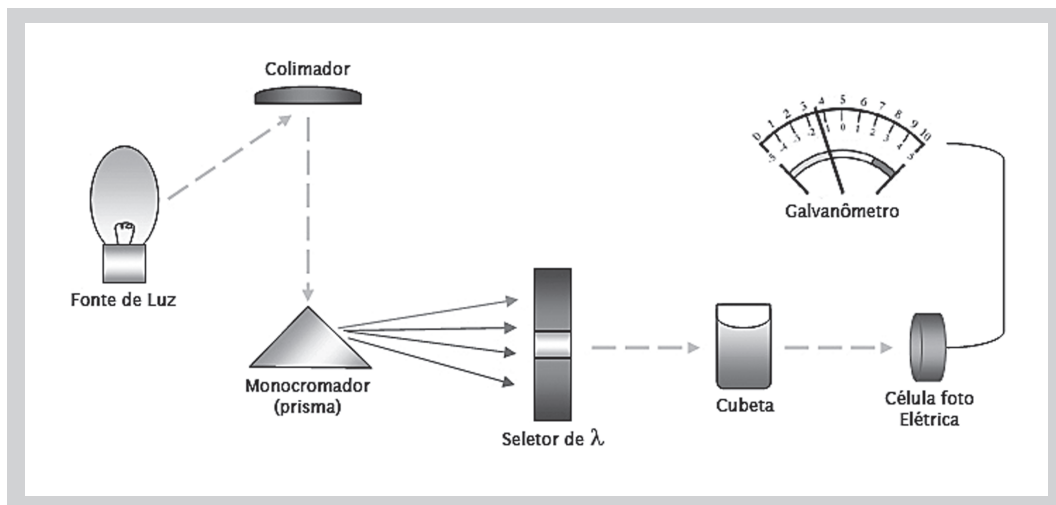


Figura 1.5. Esquema de um espectrofotômetro.

A seguir abordaremos alguns dos métodos colorimétricos mais comumente utilizados para quantificação de proteínas.

1.4.1. Método do biureto (Sensibilidade – 0,5 a 10 mg por mL)

O biureto é um composto formado pelo aquecimento da uréia a 180°C. Quando ele é colocado na presença de uma solução de sulfato de cobre em meio alcalino forma-se um composto de cor azul. A cor é devida à formação de um complexo entre o íon cúprico e os quatro átomos adjacentes de nitrogênio. Este tipo de reação também acontece com peptídeos que contenham no mínimo duas ligações peptídicas e com proteínas em geral. Substâncias que contenham duas carbonilas ligadas diretamente ou por meio de um átomo de nitrogênio também apresentam coloração azulada frente à solução alcalina de sulfato de cobre. O produto corado da reação apresenta absorção máxima a 540 nm.

1.4.2. Método de Folin-Lowry (Sensibilidade – 0,1 a 0,3 mg por mL)

Em condições alcalinas o íon de cobre divalente é capaz de formar um complexo com as ligações peptídicas, sendo reduzido ao íon monovalente (reação do biureto). O íon de cobre monovalente conjuntamente às cadeias laterais de alguns aminoácidos da proteína (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) levam à redução dos componentes ácidos presentes no reagente de Folin amplificando a coloração primeiramente obtida pela reação do biureto. Neste método a absorção máxima ocorre de 650 a 750 nm de comprimento de onda.

1.4.3. Método de BCA (Sensibilidade – 0,1 a 0,5 mg por mL)

Este método também é conhecido como método do ácido bicinchonínico. Este procedimento é muito aplicado para análises em microplacas e é usado para os mesmos objetivos do método de Lowry. Diferentemente do método de Folin-Lowry, o reagente colorimétrico (ácido bicinchonínico) é mais estável em condições alcalinas. O BCA segue o princípio do reagente de Folin no ensaio de Folin-Lowry, ou seja, reage com os complexos entre os íons cobre e o peptídeo para produzir um produto de cor roxa que absorve fortemente a 562 nm. Uma vantagem do BCA é que como o reagente é estável em condições alcalinas, ele pode ser incluído na solução de cobre para permitir um procedimento de uma única etapa, tornando a técnica mais rápida do que a de Folin-Lowry.

1.4.4. Método de Bradford (Sensibilidade – 0,06 a 0,3 mg por mL)

O método de Bradford (de Coomassie) e o de Folin-Lowry são os métodos colorimétricos com maior índice de citação da literatura. Quando em pH ácido, o corante aniônico Coomassie Blue forma complexo com proteínas que contenham aminoácidos básicos e/ou aromáticos. A interação entre a proteína e o corante acarreta na alteração do comprimento de onda de absorção máxima do corante (465 nm – corante livre) para 595 nm (corante complexado à proteína).

Em suma, não existe método de quantificação universal. Recomenda-se que quando da escolha do método a ser utilizado, leve-se em conta:

- 1 A sensibilidade necessária (dependente da concentração protéica);
- 2 A presença/ausência de determinados aminoácidos, em virtude do mecanismo de funcionamento do método a ser escolhido, ou seja, a especificidade do método;

- 3 A natureza e concentração de substâncias não-protéicas (possíveis interferentes);
- 4 A solubilidade protéica nas condições do método;
- 5 Sua facilidade e reprodutibilidade;
- 6 Sua rapidez e custo.

Referências

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2004) *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre. Editor Artes Médicas Sul Ltda, 4ª ed.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*. 177: 751-766.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2003) *Princípios de Bioquímica*. Ed. Sarvier 4ª ed.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265-275.

Sapan, C.V., Lundblad, R.L., Price, N.C. (1999) Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and applied biochemistry*. 29 (Pt 2):99-108.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., et al (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1):76-85.

Stryer, L. (1998). *Bioquímica*. Guanabara Koogan, 4ª ed.

Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Lichtig, J. (1998) Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*. ;21(6):787-793.



ENZIMOLOGIA: ENSAIOS ENZIMÁTICOS

CAROLINE DA SILVA MORAES
LÍVIA DE OLIVEIRA SANTOS

2. ENZIMOLOGIA: ENSAIOS ENZIMÁTICOS

2.1. Introdução

Para que a vida se perpetue, os organismos devem ser capazes de sintetizar moléculas responsáveis pelos processos bioquímicos celulares. Neste contexto, todas as reações metabólicas realizadas em uma célula devem ocorrer em uma velocidade útil às condições fisiológicas. O processo de aumento das velocidades das reações químicas (catálise) em um organismo ocorre majoritariamente por meio de proteínas específicas, denominadas enzimas. As enzimas são responsáveis por quase todos os processos metabólicos celulares, sendo assim, elas podem ser consideradas a centelha motora da vida, conforme veremos a seguir.

2.2. Enzimas

As enzimas foram descobertas no século XIX por uma série de pesquisadores, incluindo Pasteur. Este, ao observar a fermentação do açúcar em álcool pelas leveduras, concluiu que tal fenômeno era catalisado por "fermentos" (as enzimas), que seriam inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo ("en" = dentro; "zima" = levedura, logo, "enzima" = dentro da levedura).

As enzimas estão presentes nos tecidos e órgãos dos mais variados seres vivos, desde vírus até eucariotos superiores como o homem, onde participam de diversos mecanismos biológicos. São consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular, pois são especializadas na catálise de reações biológicas. Praticamente todas as reações que

caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. Como catalisadores celulares extremamente poderosos, as enzimas aceleram a velocidade de uma reação, sem, no entanto, participar dela como reagente ou produto.

O estudo das enzimas tem uma grande importância prática e clínica. Em algumas doenças, mais especificamente nas desordens genéticas herdadas, pode ocorrer a deficiência ou mesmo a ausência total de uma ou mais enzimas. Dentre doenças e erros metabólicos conhecidos que são consequência de uma deficiência enzimática temos como exemplos o albinismo oculocutâneo, a galactosemia e a fenilcetonúria. Outras condições anormais também podem ser causadas pela excessiva atividade de uma enzima, e muitas drogas exercem seu efeito biológico por meio de interações com as mesmas. Enzimas são também, muitas vezes, alvo para o desenvolvimento de fármacos contra agentes infecciosos: vírus, fungos, bactérias ou protozoários. Um exemplo particularmente notável são as proteases do HIV, as quais são inibidas por diferentes drogas com efeito retroviral.

As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas não apenas na medicina, mas também na indústria química (indústria do álcool, detergentes, têxtil, papel e celulose, curtumes e cosméticos), no processamento de alimentos (produção de bebidas alcóolicas, panificação, amido e açúcares) e no tratamento de efluentes e resíduos industriais.

As enzimas são catalisadores de sistemas biológicos responsáveis por transformações químicas moleculares, podendo aumentar a velocidade de uma reação em até 10^{12} vezes (12 ordens de grandeza) em relação à reação não-catalisada. Para que haja uma reação enzimática, dois fatores devem estar intimamente ligados: atividade catalítica e especificidade. Enzimas são altamente específicas em sua atividade e geralmente catalisam uma única reação química ou um conjunto de reações relacionadas entre si.

Além disso, essas notáveis proteínas com atividade catalítica possuem também especificidade na escolha das moléculas que serão transformadas quimicamente (substrato). Esta especificidade enzimática, por sua vez, dá-se por meio da interação físico-química entre enzima e substrato.

Em uma reação bioquímica, o substrato liga-se à enzima, em geral, através de ligações não-covalentes em certa região contendo uma fenda ou bolso na superfície dessa proteína. Esta região é denominada sítio-ativo. Geralmente, as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio-ativo são responsáveis pela ligação ao substrato ou pela catálise da reação (grupos catalíticos).

Para explicar o processo de ligação enzima-substrato, dois modelos são propostos: modelo chave-fechadura, proposto por Emil Fischer (1894) e o modelo do encaixe induzido, proposto por Daniel Koshland (1958).

O primeiro modelo propõe a alta similaridade entre enzima e substrato, onde o substrato possui a forma complementar ao sítio catalítico da enzima (Figura 2.1), como uma chave na fechadura ou uma peça de quebra-cabeça. Atualmente, este modelo de ligação vem sendo substituído pelo segundo modelo já que a hipótese chave-fechadura não leva em consideração a flexibilidade da estrutura tridimensional da proteína.

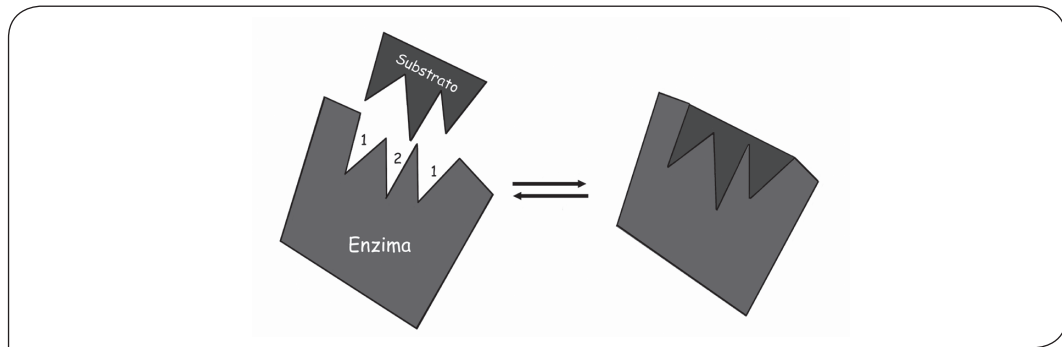


Figura 2.1. Modelo chave-fechadura mostrando a complementaridade enzima-substrato e os sítios de ligação (1) e sítio catalítico da enzima (2).

Por sua vez, o modelo do encaixe induzido assume que o sítio de ligação da enzima possui sua estrutura tridimensional não complementar ao substrato (Figura 2.2). Somente no momento de ligação do substrato ocorre a indução de uma mudança conformacional na enzima permitindo o direcionamento do substrato aos grupos catalíticos da mesma.

Após a formação do complexo enzima-substrato, ocorre a quebra de ligações ou a formação de novas ligações químicas que culminarão na transformação do substrato em produto. Após a catálise, o produto é liberado pela enzima e essa, que pode dar início a outro ciclo de catálise.

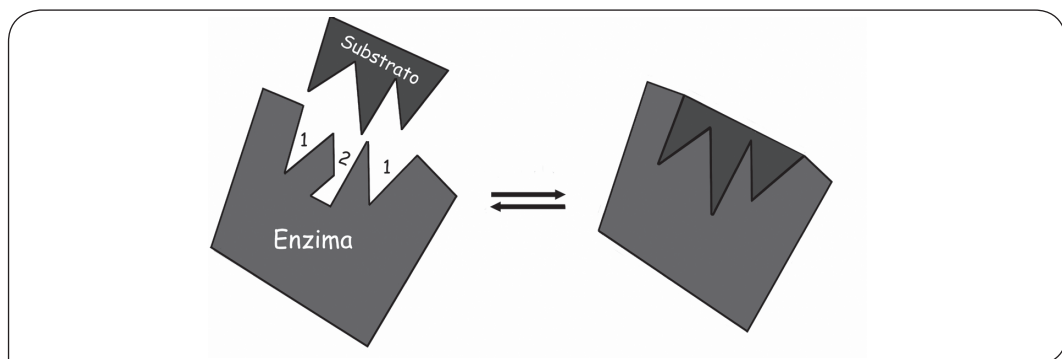


Figura 2.2. Modelo do encaixe induzido mostrando os sítios de ligação (1) e a mudança conformacional no sítio catalítico da enzima (2) antes da ligação com o substrato (esquerda) e após a ligação (direita).

2.3. Nomenclatura enzimática

Em geral, enzimas são nomeadas levando em consideração o tipo de substrato em que atuam ou a palavra que descreve a sua atividade somada ao sufixo "ase". Como exemplo, podemos destacar a ação da amilase sobre o amido ou a DNA polimerase sobre a polimerização de nucleotídeos. Entretanto, algumas enzimas possuem nomes que não estão diretamente ligados ao nome de seu substrato ou ação, como por exemplo, a lisozima (responsável pela hidrólise de carboidratos presentes na parede bacteriana).

Para solucionar tal problema, a União Internacional de Bioquímica adotou a partir do ano de 1964 uma convenção internacional de classificação das enzimas, dividindo-as em seis grandes classes, onde cada classe engloba subclasses. Este sistema de identificação leva em consideração o tipo de reação que é catalisada pela enzima (Tabela 2.1).

Classe	Reação Catalisada	Exemplo
Oxidoredutases	Transferência de elétrons (oxidação ou redução)	Lactato desidrogenase
Transferases	Transferência de grupos nucleosídeo	Monofosfato quinase
Hidrolases	Hidrólise	Amilase
Liases	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações formadas pela remoção de grupos	Fumarase
Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	Triose fosfato isomerase
Ligases	Formação de ligações obtidas pela quebra do adenosil trifosfato (ATP)	Aminoacil-tRNA sintetase

Tabela 2.1. Classes Enzimáticas

Ainda como estipulado no sistema universal de nomenclatura enzimática, cada enzima deve ter um número classificatório contendo quatro dígitos e um nome sistemático formal da enzima que catalisa a reação. Por exemplo, a protease do HIV-1 é identificada segundo seu número na Comissão de Enzimas como E.C 3.4.23.16, onde o primeiro dígito refere-se ao nome da classe (tipo de reação catalisada); o segundo dígito à subclasse (ligação ou grupo química sobre o qual atua); o terceiro dígito à sub-subclasse (mecanismo utilizado) e o quarto dígito significa o número serial (designado sequencialmente conforme as enzimas são identificadas e descritas). Assim sendo, a classificação da protease do HIV-1 por etapas seria feita assim:

EC 3 – Hidrolase;

EC 3.4 – Hidrolase, protease;

EC 3.4.23 - Hidrolase, protease, endopeptidase do tipo aspártico;

EC 3.4.23.16 - Hidrolase, protease, endopeptidase do tipo aspártico, décima sexta enzima deste tipo a ser identificada e descrita.

2.4. Cofatores

A atividade catalítica de inúmeras enzimas depende de moléculas menores, não protéicas, denominadas cofatores. Assim sendo, estas pequenas moléculas ligam-se à enzima durante a atividade catalítica e são liberadas para serem utilizadas em reações futuras. Algumas moléculas podem ainda ligar-se muito fortemente à enzima fazendo parte da sua estrutura. Neste caso, denominamos tais moléculas como grupos prostéticos.

De acordo com os cofatores conhecidos, podemos agrupar essas moléculas em duas classes: a dos íons metálicos e a das coenzimas (compostos orgânicos, sendo geralmente vitaminas) (Tabela 2.2).

Tipos de Cofatores	
Íons Metálicos	Coenzimas
Zn	Biotina
Mg	Coenzima A
Ni	Coenzima de flavinas
Mo	Ácido lipóico
Mn	Pirofosfato Tiamina
K	Coenzima de nicotinamida adenina

Tabela 2.2. Cofatores envolvidos na atividade catalítica.

De acordo com o seu estado de ligação com os cofatores ou coenzimas, as enzimas podem ser nomeadas como: apoenzimas e holoenzimas.

Dizemos que uma enzima é uma apoenzima quando ela não está ligada ao seu cofator. Entretanto, quando a enzima encontra-se ligada ao seu cofator, é denominada holoenzima.

Apoenzima + cofator = holoenzima

2.5. Reação enzimática

Uma reação enzimática simples pode ser representada pela seguinte seqüência de reações químicas:



onde E, S e P significam: Enzima, Substrato e Produto, respectivamente; ES e EP são os complexos enzima-substrato e enzima-produto.

Para entendermos os aspectos cinéticos de uma reação enzimática, é preciso ter em mente a diferença entre velocidade de reação e equilíbrio de reação. Assim sendo, é importante ressaltar que as enzimas aumentam a velocidade de reação mas não alteram o equilíbrio da mesma.

Para compreender os aspectos necessários para o início de uma reação enzimática, é importante considerar tanto a diferença na energia livre entre os produtos (estado final) e os reagentes (estado inicial) como a quantidade de energia necessária para transformar o reagente em produto (energia de ativação).

Graficamente, conseguimos visualizar esses conceitos utilizando o diagrama das coordenadas (Figura 2.3). Este diagrama descreve as mudanças de energia ocorridas durante uma reação química, onde o eixo das abscissas (representando coordenadas da reação) reflete o progresso de uma dada reação enzimática, ou seja, as mudanças químicas ocorridas para a transformação do substrato em produto. O eixo das ordenadas, por sua vez, mostra a energia livre dessa reação. O ponto de início e de término de uma dada reação é chamado de estado fundamental e representa a contribuição de uma molécula (substrato e produto) para a energia livre do sistema. No ponto máximo da curva, encontramos o estado de transição que está relacionado com a quantidade de energia necessária para que o substrato seja transformado em produto.

A diferença entre os níveis de energia do estado fundamental e do estado de transição é chamada de energia de ativação. Assim sendo, catalisadores reduzem a barreira energética entre substrato e produto em um dado sistema, diminuindo a energia de ativação da reação.

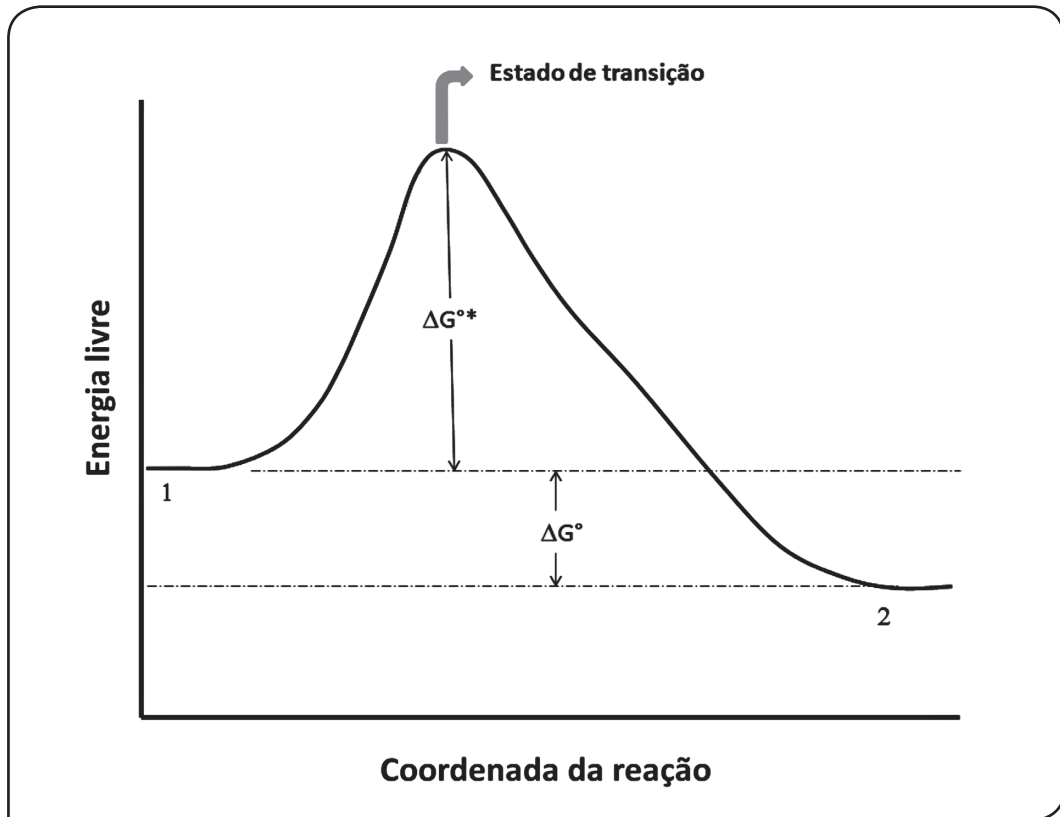


Figura 2.3. Diagrama das coordenadas. O perfil da energia de ativação, onde ΔG^{\ddagger} mostra a energia de ativação da reação, ΔG° indica a variação da energia livre. O número 1 diz respeito ao estado fundamental do substrato e 2 ao estado fundamental do produto. Uma característica importante nas reações enzimáticas é a diminuição da energia de ativação quando comparada a uma reação não enzimática.

A velocidade de qualquer reação está intrinsecamente ligada à concentração do substrato e à constante de velocidade, esta geralmente representada pelo símbolo k .

Quando a reação enzimática depende apenas da concentração de um reagente (ou substrato), ou seja, uma reação unimolecular $S \rightarrow P$, dizemos que esta é uma reação de primeira ordem. Neste caso, a velocidade da reação (v) pode ser descrita como a quantidade de substrato que reage por uma unidade de tempo, sendo expressa pela equação:

$$v = k[s]$$

Entretanto, se a velocidade da reação depende da concentração de dois reagentes, dizemos que é uma reação de segunda ordem, sendo expressa pela seguinte equação:

$$v = k[s_1] [s_2]$$

2.6. Ensaios enzimáticos

Estudos enzimáticos *in vitro* são constantemente desenvolvidos em laboratório para o estudo do mecanismo catalítico de enzimas. Para isso, adiciona-se ao ensaio pequenas concentrações da enzima de interesse, cerca de 10^{-12} a 10^{-7} M e concentrações maiores de substrato, geralmente 10^{-6} a 10^{-2} M.

Em muitas reações enzimáticas, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de enzima e do substrato. Assim sendo, a velocidade de uma dada reação pode ocorrer de forma linear, ou seja, a concentração do produto é diretamente proporcional ao intervalo de tempo da reação.

Dessa maneira, podemos representar uma velocidade de reação de acordo com a seguinte equação:

$$v = \Delta P / \Delta T \text{ ou } \Delta S / \Delta T$$

Graficamente, esta dada equação para uma velocidade de reação linear poder ser representada pela Figura 2.4.

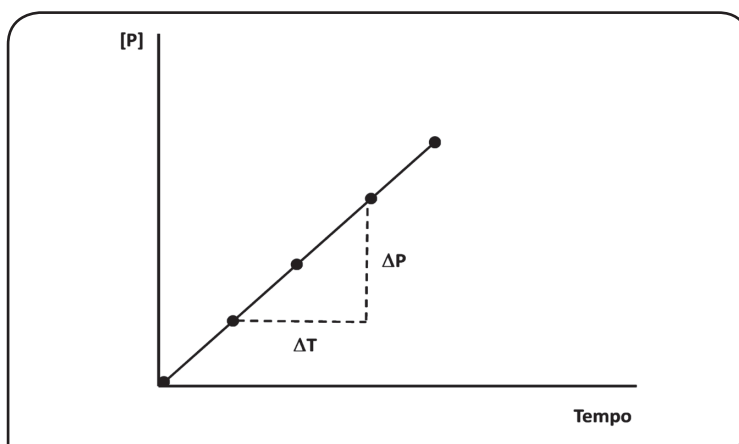


Figura 2.4 Reação Enzimática Linear.

Iniciar um estudo enzimático em laboratório nem sempre é uma tarefa fácil, pois é necessário padronizar as condições de ensaio de forma minuciosa. Vários fatores podem influenciar de forma negativa a linearidade de um ensaio. Dentre eles, a baixa concentração de enzima, baixa concentração do substrato, pouco tempo de incubação, utilização de tampões incorretos, entre outras coisas. Além disso, devemos conseguir quantificar o produto da reação sem que a concentração do substrato altere a quantificação do ensaio.

Em geral, as quantificações dos produtos em uma determinada reação são feitas utilizando leituras em equipamentos de laboratório que medem a absorvância ou fluorescência.

Assim sendo, as quantificações dos produtos obtidos nos ensaios utilizando a enzima de interesse devem ser comparadas à uma curva padrão. Nesta curva, adicionaremos quantidades crescentes da molécula representada como produto da catálise em concentrações pré-determinadas.

Para exemplificar, tomemos como base a amilase. Esta enzima é caracterizada como uma hidrolase responsável pela clivagem do amido em açúcares simples, tendo como produto, entre outros açúcares, a glicose. Nesse contexto, a curva padrão da amilase pode ser feita com glicose em concentrações molares conhecidas (Figura 2.5).

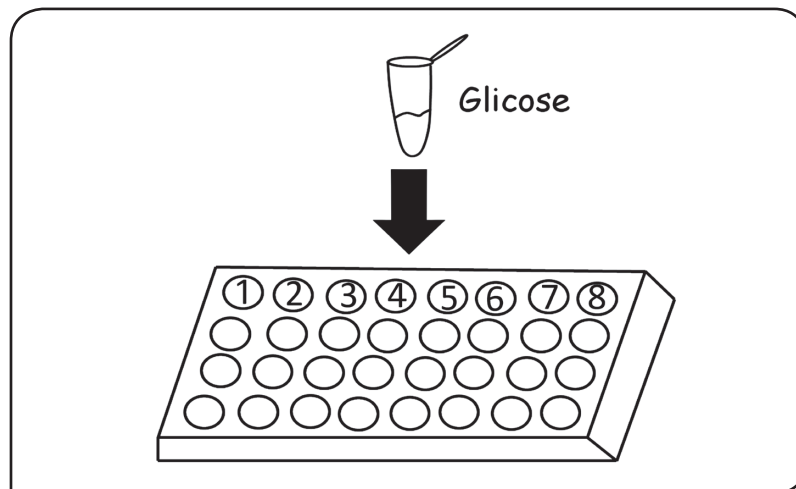


Figura 2.5. Curva Padrão de Glicose. Conforme mostra a figura, a curva deve ser feita utilizando uma solução estoque de glicose de concentração conhecida (10 mM). Por exemplo, poço número 1 - controle sem glicose; poço 2 - 10 μL ; no poço 3 - 20 μL ; poço 4 - 30 μL ; poço 5 - 40 μL ; poço 6 - 50 μL ; poço 7 - 60 μL e no poço 8 - 70 μL . Após normalização dos volumes finais em cada poço para 100 μL e detecção colorimétrica de açúcares, pode ser construída uma correlação entre concentração (de 0 a 7 mM), ou quantidade de glicose (de 100 a 700 nmol), e absorvância.

Após a leitura das absorvâncias dos poços, o gráfico deve ser plotado e seus valores comparados aos valores obtidos nos ensaios da amilase. As absorvâncias dos ensaios de atividade enzimática devem estar entre o limite inferior e superior da curva padrão. Se obtivermos como resultado do ensaio enzimático valores de absorvância maiores do que o ponto mais alto da curva padrão, as amostras devem ser diluídas e o ensaio deve ser repetido. Em contrapartida, se as absorvâncias dos ensaios enzimáticos forem inferiores ao menor ponto da curva padrão, as amostras devem ser concentradas e o ensaio também deve ser repetido. As condições de ensaio devem ser sempre padronizadas buscando a linearidade da reação.

Uma vez padronizadas as condições ótimas de ensaio, temos ainda um segundo problema: não conhecemos a concentração molar da nossa enzima de interesse. Consequentemente, a concentração dessa enzima deve ser determinada utilizando como parâmetro a sua atividade.

Para quantificar a atividade enzimática, a União Internacional de Bioquímica definiu que:

Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de produto por minuto.

Nesta etapa de estudo, alguns conceitos devem ser ressaltados:

- Inclinação
- Intercepto
- Concentração de atividade
- Atividade específica

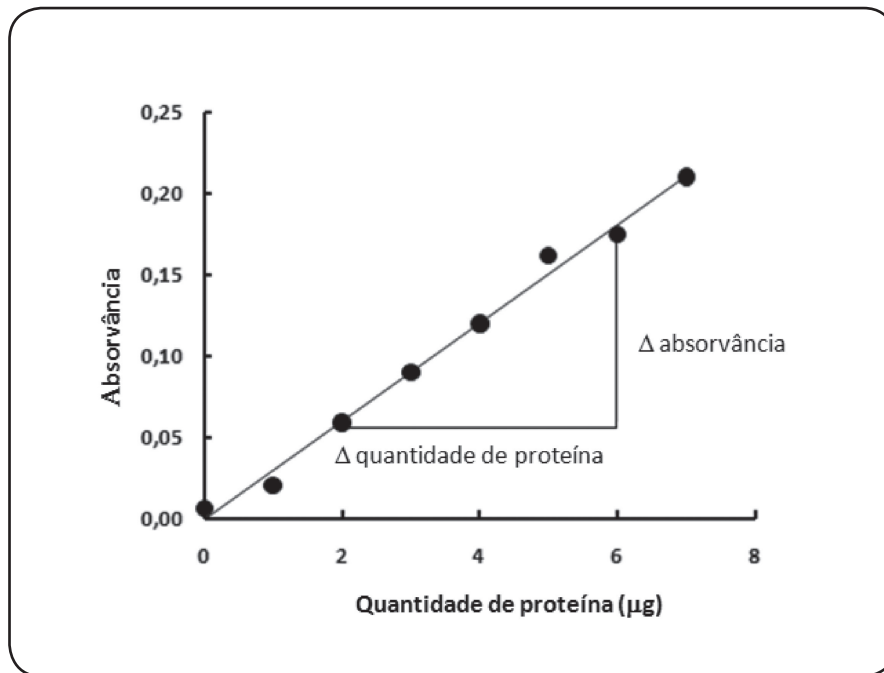
Para exemplificar esses conceitos, suponhamos que em um determinado experimento, foram obtidos os seguintes resultados:

Absorvância da Curva Padrão de Proteína (albumina)

massa de proteína (μg)	Absorvância 595 nm
0	0,006
1	0,020
2	0,059
3	0,090
4	0,120
5	0,162
6	0,175
7	0,210

Utilizando esses valores na construção de um gráfico, obtemos a seguinte figura:

Curva Padrão de Proteína



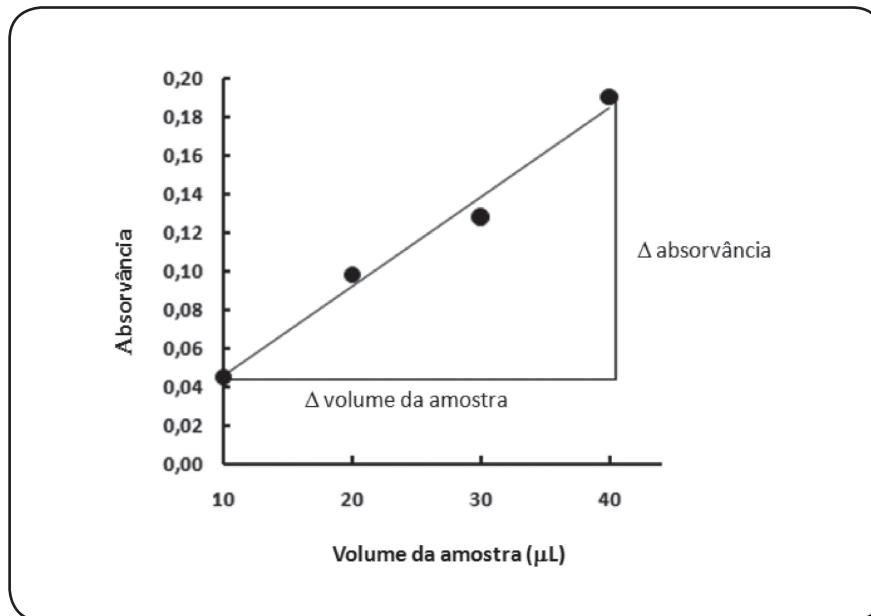
Calculando a inclinação da reta no gráfico da curva padrão, temos:

Inclinação = Δ absorvância / Δ da quantidade de proteína, então, com os valores fornecidos no exemplo, a inclinação é igual a 0,029 Abs/ μ g de ptn.

Posteriormente, a concentração de proteína presente na amostra é dada na seguinte tabela:

Volume da amostra (μ L)	Absorvância 595 nm
10	0,045
20	0,098
30	0,128
40	0,190

Construindo o gráfico de acordo com esses valores, temos:



Quantidade de Proteína na Amostra

Calculando a inclinação da reta no gráfico de quantidade de proteína na amostra, temos:

Inclinação = Δ absorvância / Δ do volume da amostra, então com os valores fornecidos no exemplo, a inclinação é igual a 0,005 Abs/ μ L de amostra.

Sendo assim, podemos calcular a concentração de proteína na amostra pela seguinte fórmula:

Inclinação na detecção da amostra
Inclinação na curva padrão de proteína

$$0,005 \text{ Abs}/\mu\text{L} = 0,172 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$0,029 \text{ Abs}/\mu\text{g}$$

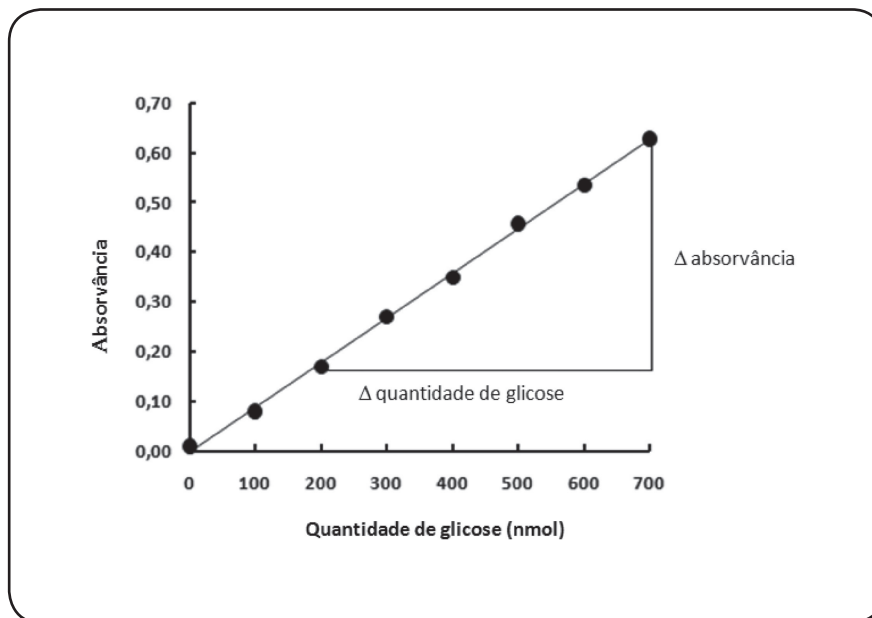
Utilizando os valores obtidos no exemplo, calculamos:

Analisando a Curva Padrão de glicose, temos:

Absorvância da Curva Padrão de glicose

nmol de Glicose	Absorvância 550 nm
0	0,010
100	0,080
200	0,170
300	0,270
400	0,350
500	0,457
600	0,535
700	0,628

Construindo o gráfico da curva padrão, obtemos:



Curva Padrão de glicose

Calculando a inclinação da curva padrão de glicose, temos:

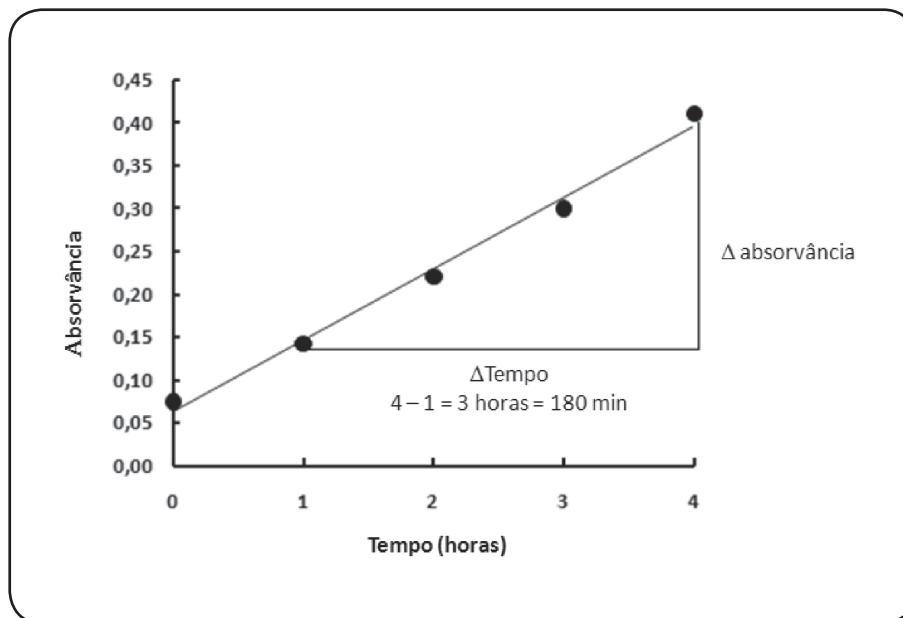
Inclinação = Δ absorvância / Δ da quantidade de glicose, então utilizando os valores do exemplo acima, a inclinação é igual a 0,0009 Abs/ nmol de glicose.

A seguir, as condições experimentais para o estudo da atividade da amilase foram padronizadas e utilizamos 25 μ L (exemplo) de amostra. Nos ensaios enzimáticos foram obtidos os seguintes dados:

Tempo de incubação (horas)	Absorvância 550 nm
0	0,075
1	0,142
2	0,220
3	0,300
4	0,410

Assim, devemos também plotar o gráfico dessa atividade e verificar se a mesma ocorre de forma linear, conforme mostra a figura abaixo.

Atividade da Amilase



Para calcular a inclinação temos:

Inclinação = Δ absorvância / Δ intervalo de tempo (em min) = 0,00148 Abs/min.

Para calcular a concentração da atividade enzimática, levamos em consideração a seguinte fórmula:

Inclinação no ensaio da atividade enzimática

Inclinação da curva padrão de glicose

Sendo assim, calculamos:

$$\underline{0,00148 \text{ Abs/min}} = 1,64 \text{ nmol/min (ou mU) para } 25 \mu\text{L de amostra}$$

$$\underline{0,0009 \text{ Abs/nmol}}$$

Levando em consideração que $1\text{mU} = 1\text{nmol/min}$, em $1 \mu\text{L}$ de amostra temos que:

$$\text{Concentração de atividade} = 1,64\text{mU} / 25 \mu\text{L} \text{ que equivale a } 0,07 \text{ mU}/\mu\text{L}.$$

Sabemos que a atividade específica = concentração de atividade/ concentração de proteína, então:

$$\text{Atividade específica} = \frac{0,07 \text{ mU} / \mu\text{L}}{0,172 \mu\text{g} / \mu\text{L}} = 0,407 \text{ mU} / \mu\text{g} = 407 \text{ mU/mg}$$

2.7. Inibição enzimática

A atividade de uma reação enzimática pode ser alterada através da ligação de pequenas moléculas específicas e/ou íons, que podem associar-se aos sítios catalíticos ou de ligação de uma enzima. Enzimas também podem sofrer mudanças químicas, as quais afetam a sua atividade – neste caso, a diminuição da atividade enzimática é chamada de inativação (no caso de diminuição da atividade) ou modificação.

As inibições enzimáticas geralmente são reversíveis e ocorrem através de inibidores enzimáticos. Uma inibição reversível é caracterizada pela diminuição da velocidade de reação e rápida dissociação do complexo enzima-inibidor. No caso de mudanças irreversíveis, através de modificadores químicos, o complexo enzima-modificador pode estar fortemente ligado através de ligações covalentes, não ocorrendo mais a dissociação do complexo, ou a alteração química causada na enzima pelo modificador não pode ser revertida.

Em geral, podemos classificar inibidores reversíveis de acordo com o sítio de ligação na enzima. Sendo assim, dentre os vários tipos existentes, iremos descrever duas formas de inibição bem conhecidas: competitiva e não competitiva.

Nas inibições competitivas, o inibidor possui estrutura muito similar à do substrato, podendo ligar-se ao sítio-ativo da enzima e bloquear o acesso do substrato. Em outras palavras, em uma inibição competitiva o inibidor compete com o substrato pelo sítio-ativo da enzima.

Em uma inibição não-competitiva, o inibidor liga-se em um local diferente do sítio-ativo da enzima, tendo como resultado a mudança conformacional da mesma, principal-

mente próximo ao seu sítio-ativo. Após esta mudança, o substrato até pode ligar-se ao sítio-ativo da enzima; entretanto, a enzima não poderá catalisar a reação de forma tão eficiente.

As figuras abaixo exemplificam as inibições enzimáticas reversíveis competitivas (A) e não-competitivas (B).

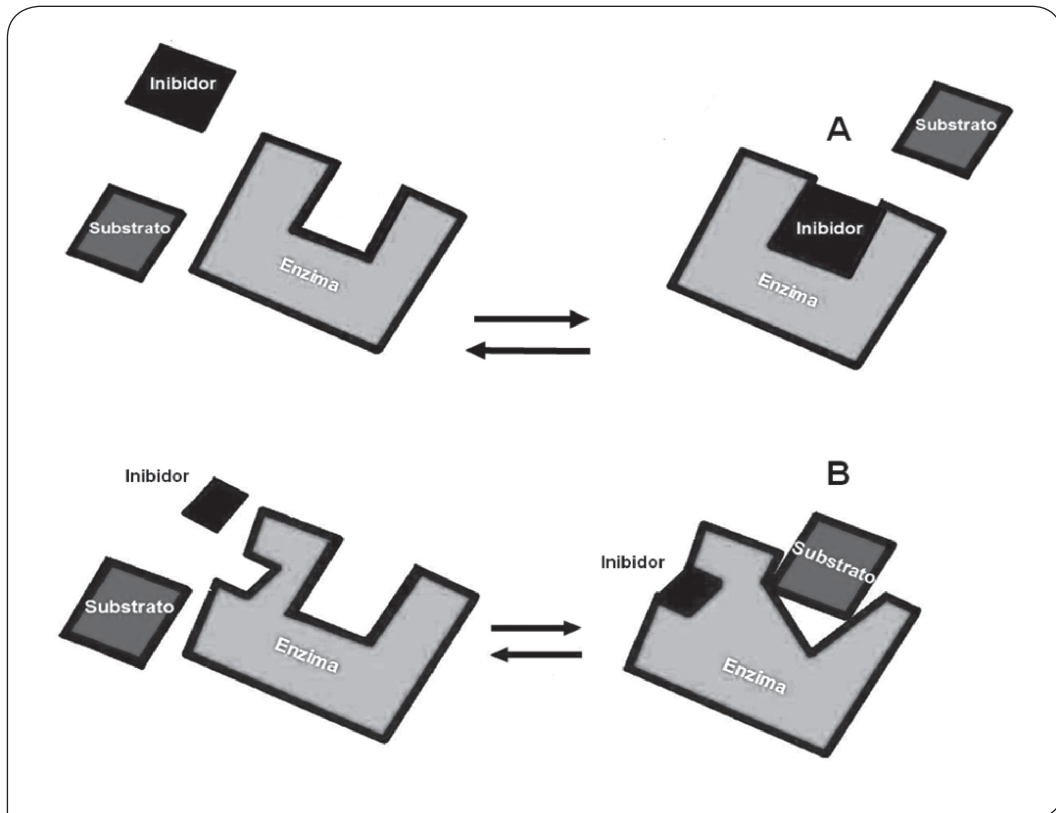


Figura 2.6. Tipos de inibições enzimáticas reversíveis. (A) Inibição Competitiva e (B) Inibição não-Competitiva.

2.8. Conclusão

O metabolismo celular de todo organismo pode ser caracterizado como um conjunto de reações bioquímicas que, por sua vez, depende da ação contínua de catalisadores biológicos, ou seja, das enzimas.

Tendo em vista a sua grande importância à vida, as enzimas devem ser amplamente estudadas, pois além de serem proteínas fundamentais nos processos fisiológicos, podem também contribuir de inúmeras maneiras para o avanço tecnológico.

Assim sendo, o estudo minucioso das enzimas proporciona um conhecimento fundamental para tratamento de doenças, assim como para o desenvolvimento de poderosos e eficientes fármacos. Um exemplo clássico é o desenvolvimento de drogas que podem inibir uma determinada enzima de um patógeno, como é o caso da zidovudina (AZT) no controle do vírus HIV pela inibição de uma aspártico protease.

Em síntese, compreender o funcionamento das enzimas significa compreender o funcionamento de peças fundamentais ao organismo.

Referências Bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4ª ed. New York and London: Garland Science.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry*. 5ª ed. New York: W H Freeman and Co.

Campbell, M.K. (2000) *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.

Nelson, D.L., Cox, M.M. (2006) *Princípios de Bioquímica*. 4 ed. Artmed.



MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

ROZANA CÔRTE-REAL FARIA

3. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

3.1. Propriedades das proteínas

Por que e como purificar proteínas? Como armazenar proteínas? Como avaliar a purificação? Para entendermos e respondermos estas perguntas precisamos rever alguns conceitos importantes sobre como obter e manter proteínas de interesse em condições apropriadas para posteriormente serem submetidas aos ensaios experimentais. Assim, nos lembraremos algumas propriedades importantes das proteínas que ajudarão a entender seu comportamento.

3.1.1. Propriedades elétricas

As cadeias laterais de alguns aminoácidos possuem a capacidade de se ionizar em condição ácida ou básica. Desta forma, proteínas com composição de aminoácidos diferentes poderão ter cargas distintas de acordo com a condição a que forem submetidas. Devemos lembrar que aminoácidos apresentam propriedades características quando isolados, mas formando um polipeptídeo eles podem interferir uns nos outros e conseqüentemente no comportamento total da proteína. As proteínas, assim como os peptídeos e aminoácidos, possuem pontos isoelétricos característicos, nos quais elas possuem carga líquida (soma das cargas positivas e negativas) igual a zero.

3.1.2. Solubilidade

Diversos fatores podem influenciar a solubilidade das proteínas. A solubilidade é dependente diretamente da composição de aminoácidos da cadeia primária e de sua estrutura tridimensional, por influenciar no arranjo de cargas e dipolos presentes na molécula. Além das cargas devemos considerar o tamanho da molécula ou partícula dissolvida, lembrando que em físico-química as diferenças entre solução verdadeira, coloidal ou suspensão estão diretamente relacionadas ao tamanho do agente disperso (no caso aqui a proteína), e à forma, em função da superfície de contato estabelecida entre a proteína e o solvente. Estes fatores mudam radicalmente com a formação de agregados ou de proteínas com estrutura quaternária, devido aos contatos proteína-proteína.

Grupamentos prostéticos em proteínas, ou seja, a parte não protéica (lipídeos, carboidratos, fosfatos etc.), também afetam sua solubilidade. No caso de proteínas glicosiladas ou fosfatadas estes grupos, por serem polares, podem fazer interações com o solvente (aumentando a solubilidade) ou mesmo facilitar a interação com outras proteínas. Grupamentos lipídicos, pelo contrário, geralmente não interagem bem com a água e, frequentemente, são responsáveis pela fixação de proteínas a membranas lipídicas, fazendo com que não sejam solúveis em água. A solubilidade de proteínas de uma maneira geral pode ser modificada por fatores como:

► pH

O pH afeta a natureza e a distribuição de cargas de uma proteína. Em geral, as proteínas são mais solúveis em pH baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos) devido ao excesso de cargas de mesmo sinal, as quais irão produzir repulsão entre as moléculas, o que diminui a formação de agregados (por interação eletrostática) e, além disso, contribui para uma maior solvatação. Entretanto, valores extremos de pH podem induzir a uma desnaturação protéica, expondo regiões hidrofóbicas, o que poderá gerar agregados (por interação hidrofóbica) levando à precipitação. Por outro lado, quando uma proteína se encontra em meio com pH igual a seu ponto isoelétrico, ou seja, quando apresenta carga líquida nula, a repulsão eletrostática entre partículas diminui, possibilitando interações proteína-proteína, gerando uma condição favorável para que as moléculas de proteína se aproximem, agreguem e precipitem.

► Força iônica

A solubilidade de uma proteína pode variar de acordo com a concentração de sal a que ela é submetida. Em baixa concentração de sal, observamos um aumento na solubilidade das proteínas com a presença de íons. Este fenômeno é chamado de *salting in*, onde ocorre uma interação entre os íons salinos e os grupamentos carregados das proteínas diminuindo as interações eletrostáticas intermoleculares proteína-proteína (responsáveis pela diminuição da solubilidade protéica). Por outro lado, em elevada concentração salina, observamos uma redução na solubilidade das proteínas. Este processo é chamado de *salting out*, aonde alguns sais, ao interagir com a água, removem a camada de solvatação das proteínas, o que facilita a formação de agregados e leva à sua precipitação.

► Temperatura

Uma grande parte das proteínas é solúvel à temperatura ambiente. O aumento da temperatura até 40°C em geral favorece a sua solubilidade. O aumento da energia cinética favorece a interação do soluto com o solvente, fazendo com que se alcance um equilíbrio dinâmico, o qual permite que a mesma quantidade de solvente presente no sistema possa participar na solvatação de uma maior quantidade de soluto. Entretanto, de uma maneira geral, temperaturas acima deste valor podem desnaturar proteínas, o que na maior parte dos casos leva à formação de agregados e precipitação. É interessante observar que a desnaturação também pode ocorrer em baixas temperaturas, sendo que cada proteína terá uma determinada estabilidade para uma dada temperatura. Além disso, mudanças bruscas de temperatura podem levar à desnaturação protéica afetando seu funcionamento e solubilidade.

3.1.3. Solução-Tampão

Um tampão é uma solução de um ácido ou de uma base fracos, a qual resiste a mudanças de pH quando se adicionam quantidades moderadas de ácido ou base. Esta solução consiste na mistura de um par conjugado ácido-base, capaz de doar ou receber prótons. Proteínas possuem certo efeito tamponante, devido a alguns grupos ionizáveis dos aminoácidos (COO⁻, NH₂ etc.), que são ácidos ou bases fracos. Entretanto, os valores de pKa desses grupos são muito distantes de 7,4. Os únicos aminoácidos

que apresentam um grupo com pKa compatível com o tamponamento a pH fisiológico são a histidina e a cisteína. Adicionalmente, as proteínas apresentam um pequeno efeito tamponante, pois estão presentes em baixas concentrações.

3.1.4. Desnaturação protéica

Na maioria dos casos, o papel fisiológico de uma proteína está intimamente ligado à manutenção da sua estrutura nativa. Entretanto, algumas análises bioquímicas necessitam que as proteínas estejam em sua forma desnaturada. A desnaturação protéica é resultante do desdobramento e da desorganização de sua estrutura tridimensional sem que ocorra hidrólise das ligações peptídicas. A desnaturação tem como resultado uma mudança na conformação das proteínas, por perturbar as interações que estabilizam boa parte desta estrutura, o que irá alterar suas propriedades fisiológicas. Dessa forma, as proteínas se tornam menos solúveis. A desnaturação pode ser reversível e, neste caso, ao se retirar o agente desnaturante a proteína retorna à sua conformação nativa. Entretanto, as proteínas, em sua maioria, uma vez desnaturadas, ficam permanentemente alteradas (desnaturação irreversível).

As proteínas podem ser desnaturadas pela utilização de métodos físicos como aquecimento, agitação, radiações ultravioleta ou visível, raios x, ou de agentes químicos como ácidos e bases fortes, solventes orgânicos (como etanol ou acetona), detergentes, soluções concentradas de uréia e cloreto de guanidina e metais pesados (como chumbo ou mercúrio).

Os fatores descritos nos itens anteriores são importantes para manter as proteínas em sua estrutura nativa (Figura 3.1), pois em condições desfavoráveis as interações que as mantêm em sua conformação nativa (ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals) poderão se desestabilizar, prejudicando a sua funcionalidade.

O conhecimento das propriedades de uma amostra protéica pode ajudar na manutenção de sua integridade, pois assim podemos evitar a sua exposição a condições desnaturantes.

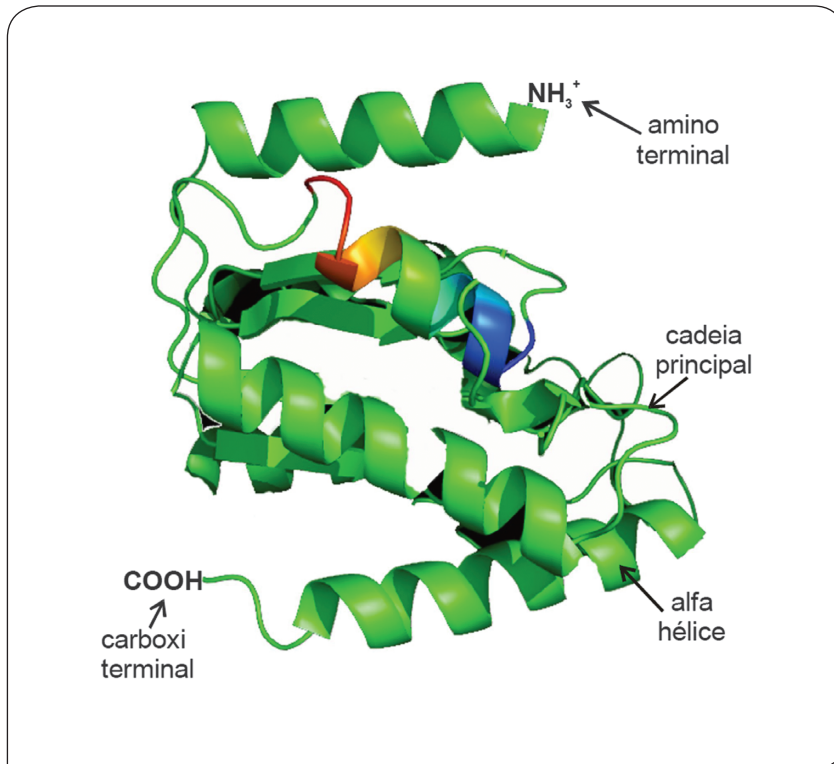


Figura 3.1. Representação esquemática de uma proteína enovelada na sua forma nativa.

3.2. Obtenção do extrato celular

Um ponto crucial para se trabalhar com proteínas é a sua obtenção a partir de um determinado material biológico. Assim, muitas vezes é necessário dissecar o tecido ou órgão, homogeneizá-lo provocando a lise celular pela ruptura da membrana plasmática, com conseqüente liberação do conteúdo celular, obtendo-se então uma solução chamada de extrato celular bruto. A lise celular é relativamente fácil de realizar a partir de células animais, em comparação a leveduras, bactérias, esporos e células vegetais, que possuem paredes celulares rígidas. Para este procedimento podem ser utilizados métodos físicos e/ou químicos.

► Métodos físico

Pode ser feito com máquinas que levam a diferentes graus de ruptura, como nos exemplos a seguir:

- (a) Prensa de French – Nesta metodologia, as células são forçadas a passar através de um orifício estreito, causando estresse e uma descompressão explosiva forte o suficiente para romper a parede celular;
- (b) Maceração (*blender* ou *potter*) – Esta técnica consiste na utilização de um homogeneizador para provocar a lise celular de forma mecânica. O homogeneizador é composto por um pistão que é inserido em um tubo de vidro ficando muito próximo da parede do tubo, de modo que, pelo processo de fricção do tecido, as células são obrigadas a passar pelo espaço entre o pistão e o vidro, sendo maceradas e tendo sua membrana plasmática rompida;
- (c) Choque térmico – As células são rompidas por variações bruscas de temperatura através de ciclos de congelamento e descongelamento;
- (d) Processador ultra-sônico (sonicador) – As ondas de pressão criam micro bolhas, que além de quebrar as células, podem romper moléculas de DNA e desnaturar proteínas;
- (e) Homogeneizador com partículas de moagem – Microorganismos e vegetais são agitados em um tubo cilíndrico contendo partículas esféricas de vidro ou de cerâmica. Estes movimentos fazem com que as células se rompam, mesmo as células mais resistentes.

► **Métodos químicos**

- (a) Lise osmótica – A osmose envolve a passagem de moléculas do solvente (água, em sistemas biológicos) por uma membrana semi-permeável. Sendo assim, se colocarmos células em uma solução hipotônica a tendência é que elas absorvam água. A pressão gerada pela entrada de solvente no interior da célula provoca então o seu rompimento. Este método de extração não é muito eficiente para células vegetais, bactérias e fungos, pois estes possuem uma parede celular que protege a célula;
- (b) Detergentes – Os detergentes, por possuírem a capacidade de solubilizar lipídeos de membrana e extrair as proteínas integrais, são capazes de formar poros na membrana das células eucarióticas, provocando seu rompimento. Exemplos: Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton, CHAPS, Tween-20.

► Métodos Enzimáticos

Para facilitar o rompimento de células bacterianas pode-se adicionar lisozima ao tampão de lise. Analogamente, para a lise de células vegetais são usadas enzimas como celulase e hemicelulases e para a lise de células fúngicas são usadas enzimas líticas como beta-glucanases e quitinases.

3.3. Separação de proteínas

As células são constituídas por uma grande variedade de proteínas. Para que possamos estudar uma proteína específica determinando suas propriedades físico-químicas são necessárias preparações homogêneas, com diferentes graus de pureza (dependendo dos objetivos, acima de 99%). Os métodos de purificação de proteínas utilizam o conjunto de propriedades características de cada proteína, para distingui-las e separá-las umas das outras. Estas propriedades envolvem seu volume molecular, carga superficial, hidrofobicidade e afinidade por ligantes. Dessa maneira, foram desenvolvidos inúmeros métodos para se purificar proteínas.

Iremos abordar as metodologias mais clássicas, como centrifugação, diálise e alguns tipos de cromatografias (exclusão molecular, troca iônica, fase reversa, interação hidrofóbica e afinidade).

Estas metodologias são, em geral, usadas sequencialmente de modo que a preparação purificada obtida numa fase anterior é o ponto de partida para o passo seguinte. A prática da purificação de proteínas tem levado a sucessivos melhoramentos nas diversas técnicas e procedimentos.

3.3.1. Centrifugação

A centrifugação é uma técnica que torna possível a obtenção de frações subcelulares e/ou organelas. Nesta técnica, a separação de pequenas e grandes partículas ocorre pela aplicação de diferentes forças centrífugas ao extrato celular. As partículas maiores e mais densas sedimentam primeiro, ficando no sobrenadante as partículas pequenas e menos densas (Figura 3.2).

Para isolar organelas utilizam-se centrifugações diferenciais aumentando a força centrífuga.

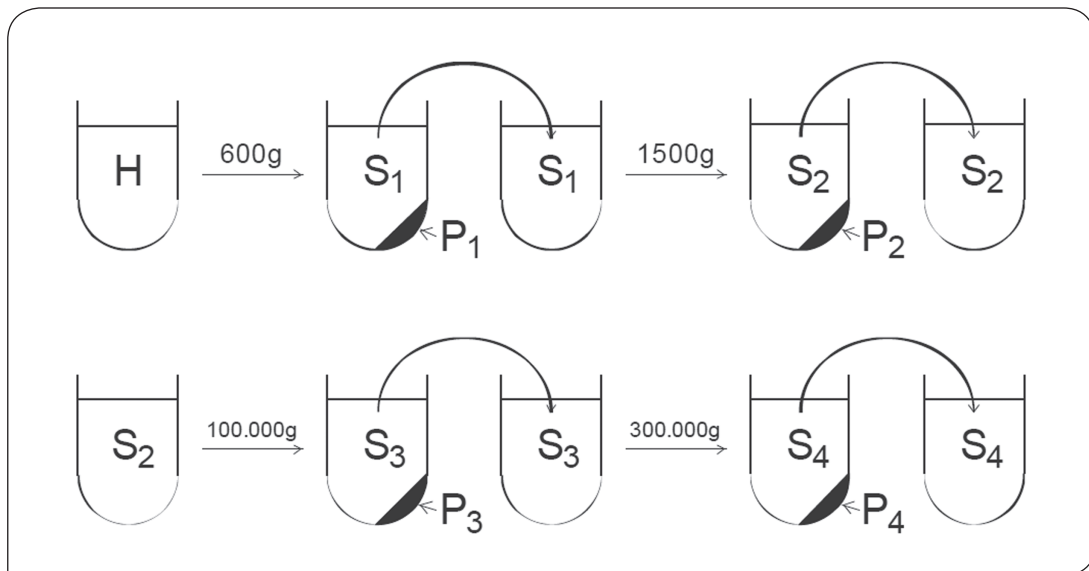


Figura 3.2. Sedimentação diferencial por centrifugação de homogeneizado celular a diferentes forças centrífugas relativas (em g). H = homogeneizado; S = Sobrenadante; P = precipitado ou sedimento ou *pellet*.

O homogeneizado submetido a diferentes forças centrífugas (Figura 3.2) será separado de acordo com a densidade ou tamanho das partículas presentes em cada sedimento (ou precipitado). Por exemplo: o homogeneizado submetido a 600g (força centrífuga relativa, em gravidade) apresentará um sedimento (P_1) rico em núcleos e células que não lisaram (partículas maiores). O sobrenadante da primeira centrifugação (S_1), sendo submetido a 1.500g, resultará em um sedimento (P_2) rico em mitocôndrias, cloroplastos, lisossomos e peroxissomos (todos com densidades semelhantes). O sobrenadante da segunda centrifugação (S_2), ao ser submetido a 100.000g, apresentará membranas plasmáticas e fragmentos do retículo no precipitado (P_3). O sobrenadante da terceira centrifugação (S_3), ao ser submetido a 300.000g, formará um sedimento rico em ribossomos (P_4) e um último sobrenadante (S_4) que irá conter partes solúveis do citoplasma.

Outra possibilidade de separação por centrifugação é da utilização de um gradiente de densidade. Nesta centrifugação, é construído um gradiente de densidade com substâncias mais ou menos inertes como a sacarose, com a densidade aumentando do topo para a base (Figura 3.3). A mistura de organelas é então aplicada no topo do gradiente de densidade e o tubo é submetido à centrifugação sob força centrífuga relativa única. As organelas irão sedimentar separadamente até que a densidade de flutuação se iguale à do gradiente. Posteriormente, as frações referentes aos gradientes podem ser recolhidas separadamente.

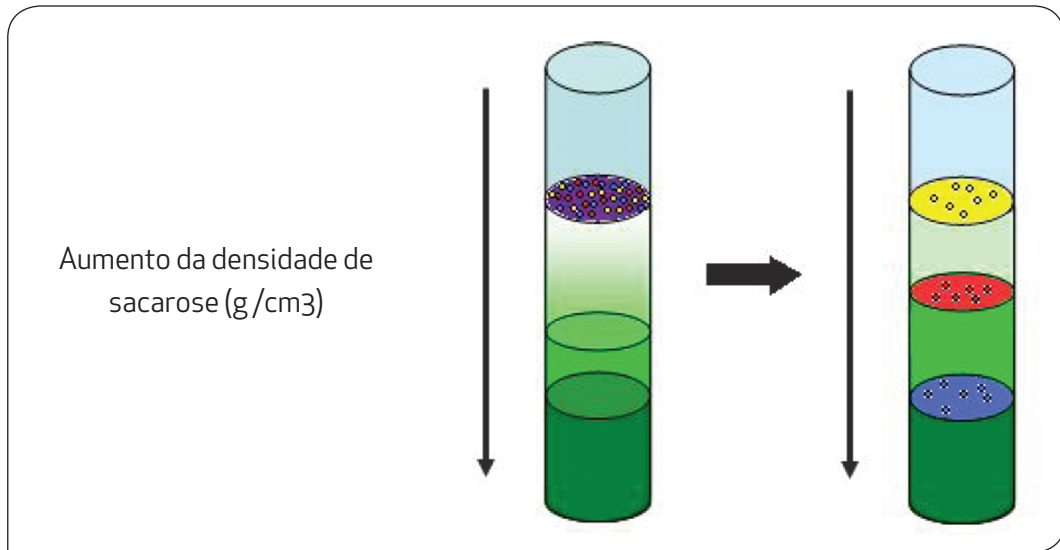


Figura 3.3. Gradiente de densidade feito com sacarose.

3.3.2. Diálise

A diálise é um método utilizado para separar moléculas através do seu tamanho utilizando uma membrana semipermeável com tamanho do poro definido, de maneira a permitir a passagem seletiva de moléculas. Na prática, uma mistura heterogênea composta por moléculas grandes e pequenas é colocada em um saco de diálise, o qual é posteriormente imerso em um grande volume de solvente aquoso. As pequenas moléculas podem atravessar a membrana para o fluido externo e as moléculas maiores são retidas (Figura 3.4). O fenômeno que favorece a passagem de moléculas pequenas pela membrana é a difusão destas, propiciada pela diferença de concentração destas entre a solução presente no interior do saco de diálise e no seu exterior. O fluxo de difusão destas partículas ocorre de acordo com o seu gradiente de concentração, indo da região de maior concentração para uma de menor concentração até que se atinja o equilíbrio, com concentrações iguais nos dois compartimentos. Assim sendo, as moléculas que são capazes de atravessar a membrana diluem-se por todo o recipiente. Se trocarmos apenas a solução externa, pode-se continuar a diálise, pois o efluxo de moléculas pequenas do interior do saco é novamente retomado, atingindo-se uma concentração ainda menor após o equilíbrio. A eficiência de uma diálise depende,

portanto, dos volumes e da concentração do soluto a ser retirado nos dois compartimentos, tanto no interior da membrana como no recipiente externo.

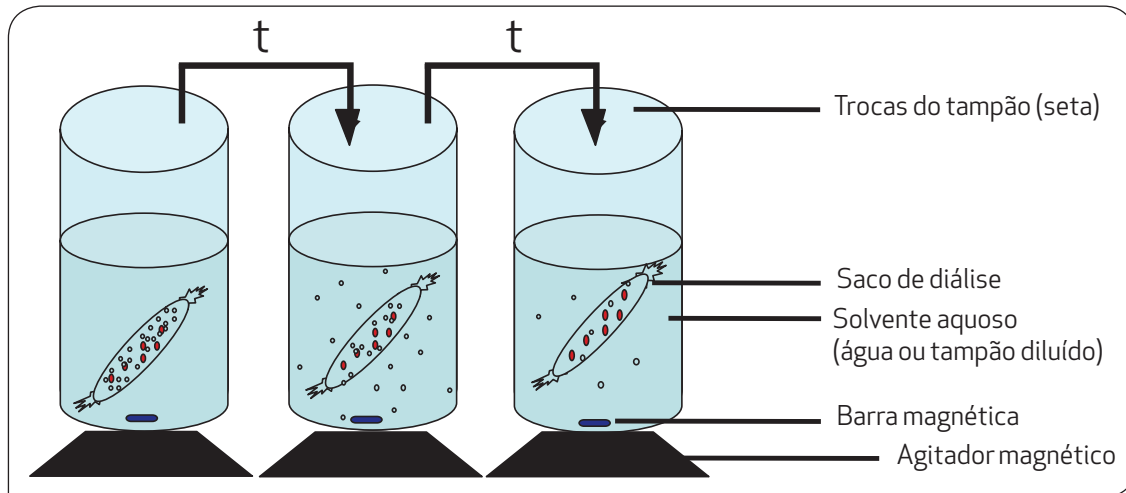


Figura 3.4. Esquema da separação de moléculas por diálise. O saco de diálise, composto por uma membrana semipermeável, contém uma mistura de proteínas imersa em tampão.

A eficiência da diálise é dependente de vários fatores como:

- Permeabilidade da membrana - quanto mais permeável a membrana às partículas do soluto em questão, maior será a taxa de difusão destas para o compartimento externo.
- Natureza do solvente - solventes muito viscosos tendem a apresentar taxas de difusão menores.
- Temperatura - quanto maior a temperatura maior a taxa de difusão.
- Gradiente de concentração - quanto maior a diferença entre as concentrações nos dois compartimentos, maior será a taxa de passagem de partículas do soluto.
- Número de trocas do tampão e diluição - quanto maior o número de trocas da solução externa, maior será a remoção das partículas do soluto, pois ocorrerá uma diluição seriada. A razão entre os volumes dos compartimentos define a diluição do soluto no equilíbrio. Desta forma, utilizam-se compartimentos externos grandes (da ordem de 1 litro) para amostras contidas em sacos de diálise pequenos (da ordem de 1 mililitro).
- Agitação do solvente - é absolutamente necessário que o solvente no compartimento externo esteja com agitação, para que o equilíbrio entre os dois compartimentos seja atingido em um tempo razoável (algumas horas).

3.3.3. Cromatografia

A palavra cromatografia, de origem grega, onde “chroma” significa cor e “grafein” significa escrita, ou seja, escrita em cores, envolve uma série de processos de separação de misturas. O termo cromatografia foi empregado primeiramente em 1906, sendo sua utilização atribuída ao botânico russo, Mikhail Semyonovich Tswet. Em seu estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária) permitiu a separação em faixas coloridas de pigmentos vegetais obtidos de um extrato de folhas de plantas.

O método foi descrito em 30 de dezembro de 1901 no 11º Congresso de Médicos e Naturalistas em São Petersburgo. Em 1907, Tswet demonstrou sua cromatografia para a Sociedade Botânica Alemã. Em 1952, Archer John Porter Martin e Richard Laurence Millington Synge ganharam o Prêmio Nobel de Química pela invenção da cromatografia de partição. Desde então, a tecnologia tem avançado rapidamente.

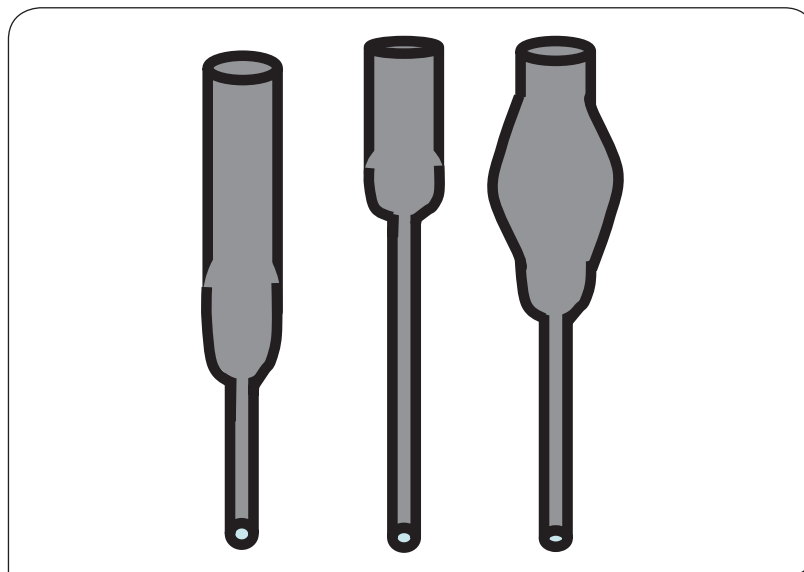


Figura 3.5. Desenho das colunas usadas por M.S. Tswet.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Este método visa a migração diferencial dos componentes de uma mistura, através de uma fase móvel e uma estacionária. Diferentes forças intermoleculares irão influenciar na interação entre os componentes da mistura e das duas fases.

► Fase móvel

A fase móvel é o material que se move através da fase estacionária, carreando a amostra. São observadas três tipos de fase móvel: gasosa, líquida e supercrítica.

A líquida se subdivide em: clássica, onde a fase móvel passa através da coluna pela força da gravidade apenas ou é empurrada por bombeamento de baixa pressão, e a cromatografia líquida de alta eficiência, aonde é utilizado um dispositivo de alta pressão que bombeia a fase móvel através de uma tubulação capilar e de uma matriz porosa.

Na cromatografia gasosa são separados compostos voláteis, os quais devem apresentar uma razoável pressão de vapor na temperatura de trabalho. Na cromatografia gasosa de alta resolução usam-se colunas capilares, enquanto na cromatografia gasosa habitual utilizam-se colunas com um diâmetro maior.

Na cromatografia supercrítica emprega-se um fenômeno denominado de ponto crítico (capacidade de um líquido passar para vapor) em condições de pressão, tipo de gás utilizado, temperatura crítica e densidade.

► Fase estacionária

A fase estacionária pode apresentar-se como sólida, líquida ou quimicamente ligada.

► Técnica cromatográfica

A fase estacionária pode ser depositada em suportes planos (cromatografia planar) ou em colunas, as quais são comumente cilíndricas.

Temos como cromatografias planares a cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada. Nestas técnicas o tipo de cromatografia é de partição e o suporte é um papel ou uma placa de vidro (camada delgada). Na cromatografia em papel a água que solvata as fibras de celulose é a fase estacionária e na camada delgada um gel ou silicato que é depositado sobre a placa de vidro. Na cromatografia de camada delgada o suporte mais utilizado atualmente para deposição da fase estacionária é uma folha de alumínio. Apesar das cromatografias planares serem muito utilizadas para análise de açúcares, lipídeos e outros produtos naturais, não são utilizadas para purificação de proteínas.

Na cromatografia em coluna, uma mistura de proteínas é aplicada em um suporte cilíndrico, o qual está preenchido por uma matriz (resina) hidratada que pode, ou não, apresentar determinado tipo de grupamento químico funcional acoplado à ela. A matriz é então percolada com uma solução apropriada para eluir diferencialmente as proteínas de interesse. As diferentes proteínas migrarão através da coluna em velocidades diferentes, que dependerão do grau de interação com a matriz, o que permite a sua separação. Os vários métodos de cromatografia em coluna disponíveis diferem quanto à matriz utilizada e são classificados de acordo com as propriedades físicas ou químicas nas quais se baseia o processo de diferenciação e separação

de proteínas da amostra. São conhecidas cromatografias baseadas no volume molecular (cromatografia de exclusão molecular), polaridade (cromatografia de troca iônica, hidróxiapatita e de carvão ativado), hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica e de fase reversa) e especificidade de ligação (cromatografia de afinidade).

► Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel separa proteínas pelos seus diferentes volumes moleculares. A matriz é constituída por esferas com poros de tamanho bem definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros penetram nas esferas, ao passo que as maiores são forçadas a percorrerem um caminho diferente, por fora das esferas. Deste modo, as moléculas menores percorrem, ao longo de uma coluna, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão da coluna em primeiro lugar (Figura 3.6). Um material comumente empregado para a fabricação de géis cromatográficos é a *dextrana*, um polímero de glicose, comercialmente disponível com o nome de *Sephadex*; este produto é sintetizado com diferentes tamanhos de poros, permitindo a exclusão de moléculas em um amplo intervalo de volume molecular. A filtração em gel também pode ser utilizada para diminuir a concentração de sais de uma solução de proteína, por exemplo, quando ela é precipitada com sulfato de amônio.

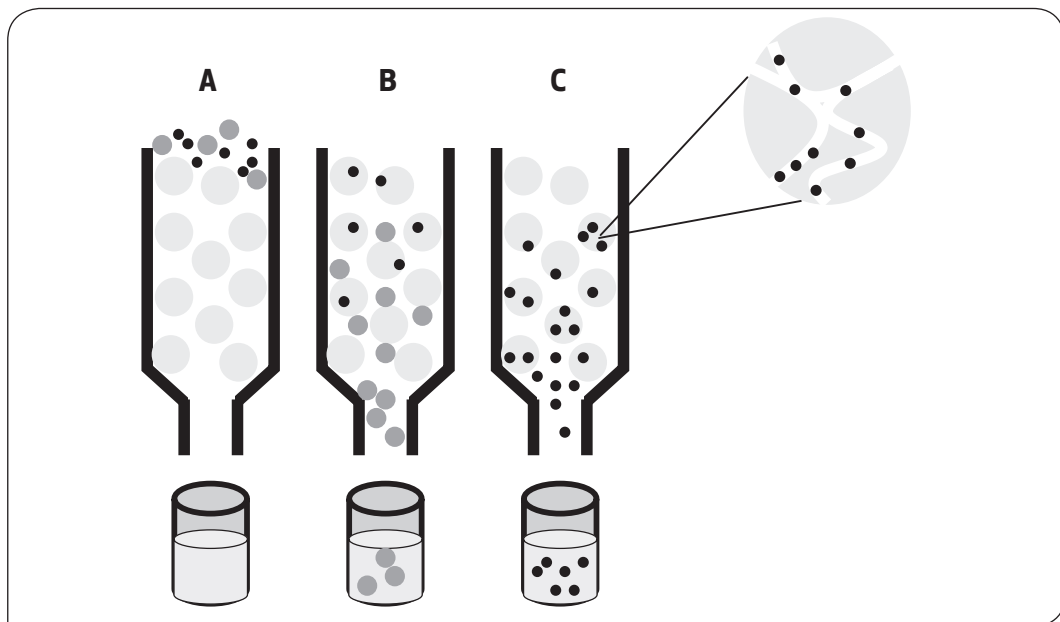


Figura 3.6. Esquema da cromatografia de exclusão molecular. (A) Aplicação da amostra à coluna. (B) Percurso das moléculas de diferentes volumes moleculares, resultando na eluição das moléculas maiores; (C) Eluição das moléculas de menor volume molecular e no detalhe o poro da matriz retardando a passagem das moléculas.

► Cromatografia de troca iônica

As primeiras observações registradas na literatura, referentes à troca iônica, foram feitas por Way e Thompson em 1850. Os autores descobriram a capacidade do solo de remover NH_4^+ de soluções, substituindo por quantidades equivalentes de Ca^{2+} . Em 1917, foram relatadas as primeiras tentativas do processo de troca iônica para resolver problemas na área da bioquímica. Por volta de 1935, as resinas de trocadores de íons começaram a ser produzidas, sendo muito mais eficientes e passando a constituir um meio químico de separação com um alto valor em processos analíticos.

A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação entre cargas (positivas ou negativas) da proteína que está sendo isolada com uma matriz contendo moléculas ionizáveis de carga oposta (trocadores iônicos, cujos sítios de interação estão carregados positiva ou negativamente), que compõem a coluna. Os trocadores de íons, de natureza complexa, são polímeros que quando possuem carga positiva (cátions), efetuam uma cromatografia de troca aniônica e quando possuem carga negativa (ânions), de troca catiônica (Figura 3.7). Moléculas apresentando carga de

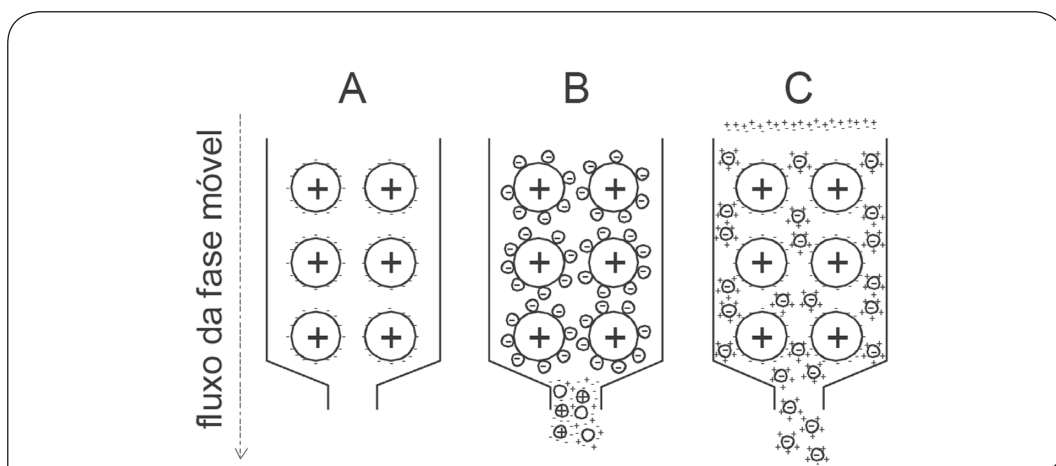


Figura 3.7. Cromatografia de troca iônica. Os passos representam algumas etapas de uma troca aniônica. Esferas maiores representam grânulos da matriz (fase estacionária), esferas menores, proteínas, e sinais livres são íons em solução. Moléculas do solvente não estão representadas. Em uma troca catiônica, as cargas da matriz e das proteínas seriam opostas. (A) A fase estacionária está equilibrada com contra-íons negativos presentes no tampão. (B) Após a aplicação da amostra, proteínas com carga superficial negativa ligam-se à matriz. Proteínas com carga superficial positiva ou zero não interagem com a coluna e são eluídas junto com contra-íons. (C) A aplicação de uma solução salina concentrada desfaz a ligação entre proteínas e fase estacionária, recarregando a matriz com contra-íons negativos e propiciando a eluição das proteínas que estavam interagindo com a coluna.

mesmo sinal que os da matriz não interagem com ela, passando livremente por toda a coluna. Entretanto, as moléculas de cargas opostas irão se ligar a matriz sendo eluídas em uma ordem definida pela magnitude da carga apresentada pelas proteínas, nas condições da cromatografia. A eluição das proteínas é realizada, em geral, com a passagem de um gradiente crescente de sal (contra-íon) através da matriz. As proteínas com maior carga permanecerão ligadas mais fortemente à matriz da coluna e conseqüentemente serão eluídas nas concentrações mais elevadas de contra-íon. Outras vezes, um gradiente de pH é utilizado para eluição das moléculas protéicas de maneira seletiva.

Os trabalhos na separação de aminoácidos, peptídeos, ácidos nucléicos e outros tipos de amostras, mostram o valor do processo de troca iônica na área da bioquímica.

► **Cromatografia de Interação Hidrofóbica**

A cromatografia por interação hidrofóbica é um método que se baseia nas propriedades hidrofóbicas das proteínas para separá-las. A mistura de proteínas é aplicada à coluna na presença de altas concentrações de sulfato de amônio (sal comumente utilizado). Este sal remove a camada de solvatação das proteínas, expondo as regiões hidrofóbicas das mesmas, que irão interagir com as regiões hidrofóbicas da matriz da coluna. Ao reduzir a concentração de sal na coluna, reconstituindo a camada de solvatação, as proteínas com menor hidrofobicidade serão eluídas primeiro e em seguida as proteínas com maior hidrofobicidade.

► **Cromatografia de Fase Reversa**

Assim como a cromatografia de interação hidrofóbica, a cromatografia de fase reversa utiliza a hidrofobicidade das proteínas para separá-las. Esta técnica baseia-se na utilização de uma fase estacionária apolar contendo cadeias longas de hidrocarbonetos e uma fase móvel polar. As proteínas irão se ligar às cadeias de carbono presentes na matriz de acordo com seu grau de hidrofobicidade. As proteínas adsorvidas na matriz serão eluídas em gradiente crescente de solvente apolar (Ex. acetonitrila), sendo as proteínas com menor hidrofobicidade eluídas primeiro (Figura 3.8). Em comparação à interação hidrofóbica, a cromatografia em fase reversa apresenta uma matriz cromatográfica altamente hidrofóbica. A utilização de solventes orgânicos pode levar à desnaturação da proteína de interesse durante a cromatografia; por isso, este tipo de cromatografia não se aplica a um grande número de casos.

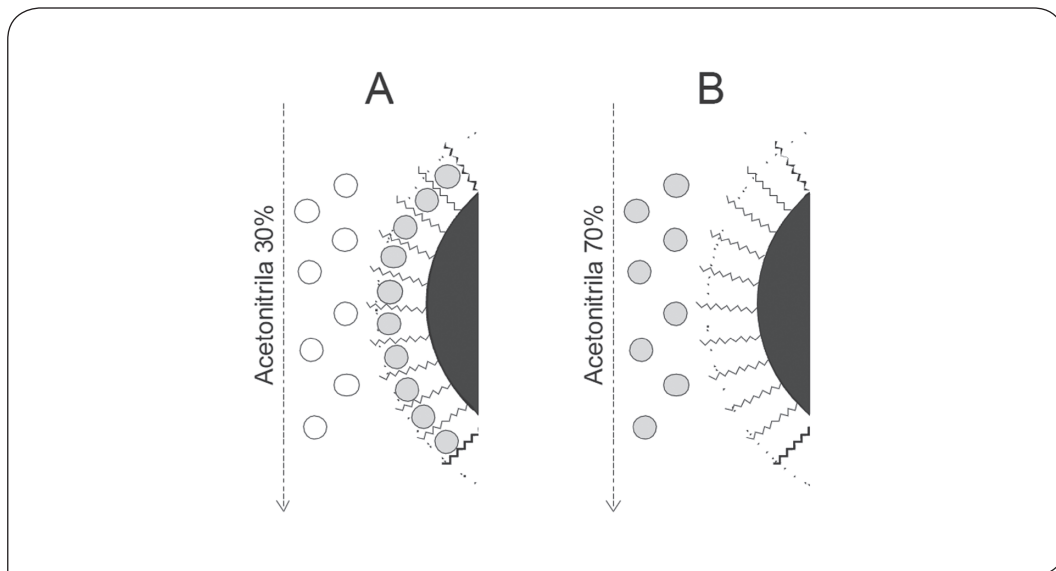


Figura 3.8. Princípio de separação na cromatografia de fase reversa. (A) Em baixa concentração de solvente (meio com maior polaridade), proteínas mais hidrofóbicas (esferas cinza) são adsorvidas à fase estacionária apolar (cadeias de hidrocarbonetos). Proteínas polares (esferas brancas), mais hidrofílicas, são arrastadas pela fase móvel. (B) Em uma concentração maior de solvente orgânico, mais apolar, proteínas hidrofóbicas que antes estavam adsorvidas são dissolvidas pela fase móvel e eluídas.

► Cromatografia de Afinidade

Esta técnica consiste em imobilizar na matriz cromatográfica, através de ligação covalente, determinada molécula (ligante) pela qual a proteína que queremos purificar tenha afinidade. Posteriormente, nosso extrato protéico é aplicado à coluna. Todas as proteínas com afinidade para o ligante ficarão retidas na coluna e as outras proteínas passarão através da coluna sem nenhum tipo de interação (Figura 3.9). As proteínas adsorvidas à coluna poderão ser eluídas com concentrações crescentes de sal ou em valores extremos de pH. Em alguns casos a eluição é feita com uma solução concentrada do próprio ligante (eluição por deslocamento de equilíbrio).

O receptor de insulina, uma proteína da superfície celular, foi isolado por cromatografia de afinidade em agarose contendo insulina covalentemente ligada. A cromatografia de afinidade tem, frequentemente, um poder de enriquecimento muito maior que os outros métodos cromatográficos, embora seja restrita a uma classe especial de proteínas.

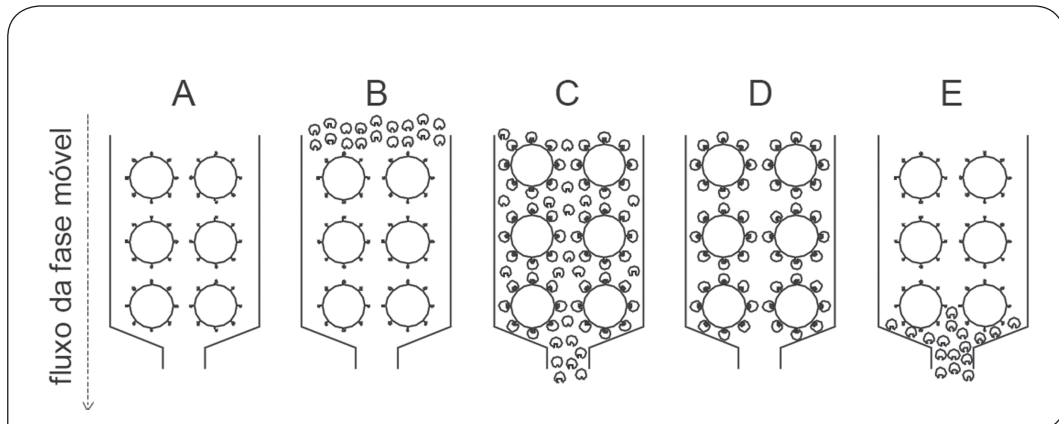


Figura 3.9. Cromatografia de afinidade. (A) Matriz cromatográfica com ligantes covalentemente presos à fase estacionária. (B) Proteínas com diferentes afinidades, ou sítios de ligação, estão presentes na amostra aplicada. (C) Apenas as proteínas capazes de reconhecer o ligante da matriz interagem com a fase estacionária. Proteínas sem afinidade com a matriz são eluídas no lavado. (D) Proteínas ligadas à coluna com alta afinidade permanecem aderidas à matriz mesmo após a lavagem da coluna. (E) Após alguma alteração nas condições físico químicas da fase móvel (pH, concentração de sais, presença de solventes orgânicos ou do próprio ligante na forma solúvel), as proteínas de interesse são eluídas da coluna.

Referências Bibliográficas

Amersham, Pharmacia Biotechnology AB, (1999) Protein Purification Handbook, USA.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) Molecular biology of the cell, edição Garland Science, 4ª ed.

Collins, C.H.; Braga, G.L., Bonato, P.S. (1995) Introdução a métodos cromatográficos, Editora da Unicamp, 6ª ed.

Nogueira, J., Mikhail, T. (2005) Um legado para a cromatografia moderna, Destaque100, Universidade de Lisboa, Portugal.

Lehninger, A. (1986) Princípios de Bioquímica, editora Sarvier.

Radler, F., Nunes, D. (2003). Cromatografia princípios básicos e técnicas afins, editora Interciência.



ELETROFORESE, ZIMOGRAFIA & *WESTERN BLOTTING*

NARAYANA FAZOLINI PAULA BASTOS
GUSTAVO MASSON

4. ELETROFORESE, ZIMOGRAFIA & WESTERN BLOTTING

4.1. Histórico

O termo eletroforese foi introduzido por Michaelis em 1909, para descrever o movimento de colóides sob a influência de um campo elétrico. Esta técnica de separação baseada na migração de moléculas carregadas foi realizada por Arne Tiselius, pela primeira vez, em 1937, onde criou o método denominado eletroforese em campo livre. Este trabalho lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1948.

Este método era bastante limitado devido à instabilidade do equipamento e, principalmente, pelos efeitos de difusão e aquecimento gerados pelo campo elétrico, os quais comprometiam a separação dos compostos. Estes efeitos foram minimizados com a introdução de um suporte (gel ou papel) que ajudou a conter o movimento livre das moléculas, de forma que o efeito da difusão fosse reduzido.

4.2. Princípio da técnica e aplicações

O princípio físico-químico que norteia a eletroforese é a capacidade de moléculas carregadas migrarem sob influência de um campo elétrico. Esta migração segue a Lei de Coulomb, onde partículas de carga positiva migram para o pólo negativo (catodo) e partículas de carga negativa migram para o pólo positivo (anodo). A velocidade de migração das moléculas é proporcional ao campo elétrico e inversamente proporcional ao seu volume molecular. Assim, uma amostra submetida à eletroforese terá cada molécula constituinte localizada em uma zona do gel, onde moléculas com menor volume molecular irão migrar mais rapidamente e as que possuem maior volume molecular irão migrar mais lentamente.

O objetivo principal desta técnica é separar moléculas orgânicas, como DNA, RNA e proteínas, de acordo com sua carga elétrica e volume molecular.

A técnica pode ser conduzida em diferentes meios-suporte tais como papel de filtro, gel de sílica, membranas de acetato de celulose, géis de agarose, acrilamida etc. Atualmente existem dois modelos mais utilizados de eletroforese: um baseado em gel de agarose e outro em gel de poliacrilamida. Estes polímeros formam tramas de poros com tamanhos variáveis.

Dois componentes básicos são necessários para se realizar uma eletroforese: um campo elétrico (obtido através de uma fonte de corrente contínua) e a própria molécula carregada.

Para visualização das moléculas separadas (na forma de bandas eletroforéticas) são utilizados corantes específicos para proteínas, como Coomassie Blue, e soluções específicas contendo os componentes necessários (substratos, coenzimas, solução-tampão e sais) para revelação das bandas de atividade enzimática. No caso de moléculas de DNA e RNA, diversos sistemas de revelação de bandas são empregados. Já no caso do corante brometo de etídio, a detecção da amostra é feita através da fluorescência emitida por esse corante em presença da luz ultravioleta. As bandas podem ser detectadas também por radioatividade, nitrato de prata ou quimioluminescência.

Na técnica, utiliza-se uma cuba com dois compartimentos separados. Os eletrodos determinam os pólos positivo e negativo em cada compartimento, onde é adicionada uma solução-tampão com sal, que conduz eletricidade. O gel é montado entre os dois compartimentos de tal forma que a única conexão elétrica entre os compartimentos seja através do gel.

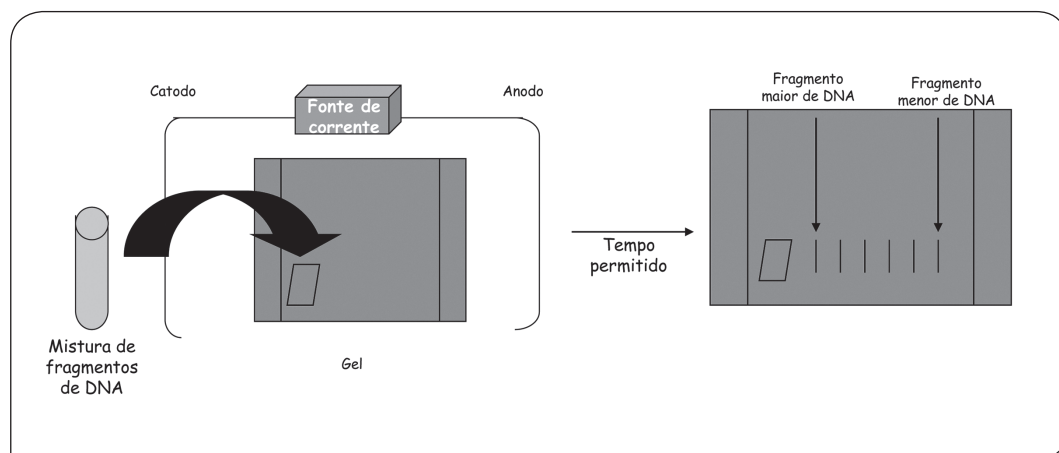


Figura 4.1. Esquema representativo da eletroforese em gel horizontal.

4.3. Tipos de Eletroforese

Todo o processo de eletroforese é realizado empregando uma solução-tampão apropriada, a qual é essencial para manter um estado constante de ionização das moléculas a serem separadas. Qualquer variação no pH pode alterar a carga e então a mobilidade (taxa de migração no campo elétrico aplicado) das moléculas que estão sendo separadas.

4.3.1. Eletroforese livre

Este é um tipo de eletroforese onde as substâncias a serem separadas estão em suspensão ou solução, não empregando um suporte. A força de fricção das partículas constitui único obstáculo mecânico. Com a passagem da corrente elétrica, há aquecimento da solução resultando em movimentos hidrodinâmicos de convecção. Este movimento hídrico espalha e distorce a distribuição geográfica dos elementos a serem separados, prejudicando a separação. Este tipo de eletroforese necessita de instalações dispendiosas e o manuseio é muito trabalhoso; está praticamente restrito à obtenção de valores físico-químicos de macromoléculas. Esta técnica foi desenvolvida por Tiselius e atualmente está praticamente abandonada.

4.3.2. Eletroforese com suporte

Os componentes básicos para a realização desta técnica são: o campo elétrico, o suporte e a molécula carregada. O suporte geralmente consiste em um gel onde as moléculas se deslocarão; a densidade do gel e o volume molecular influenciarão na velocidade de movimentação das moléculas. Desta forma, a eletroforese pode ser classificada de acordo com o suporte do gel, uma vez que cada tipo de suporte será mais indicado para um determinado tipo de molécula, pois estas moléculas, como DNA e proteínas, diferem no que diz respeito ao seu volume molecular.

4.3.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose, por possuírem poros mais largos, são normalmente usados para separar macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas maiores ou complexos protéicos. Este tipo de gel é também usado em técnicas como imuno eletroforese ou focalização isoeletrica, onde as proteínas são solicitadas a mover-se de forma livre na matriz do gel de acordo com sua carga nativa. O gel é

formado entre dois vidros, tendo geralmente dimensões da ordem de 10 x 15 cm.

4.3.2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE¹)

O suporte amplamente utilizado nessa técnica para proteínas é a poliacrilamida, formada por uma malha transparente estável, gerada pela copolimerização química de monômeros de acrilamida com N,N'-metilenobisacrilamida (Bis-acrilamida) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). O TEMED catalisa a liberação de radicais livres do persulfato que, por sua vez, iniciam e aceleram a polimerização.

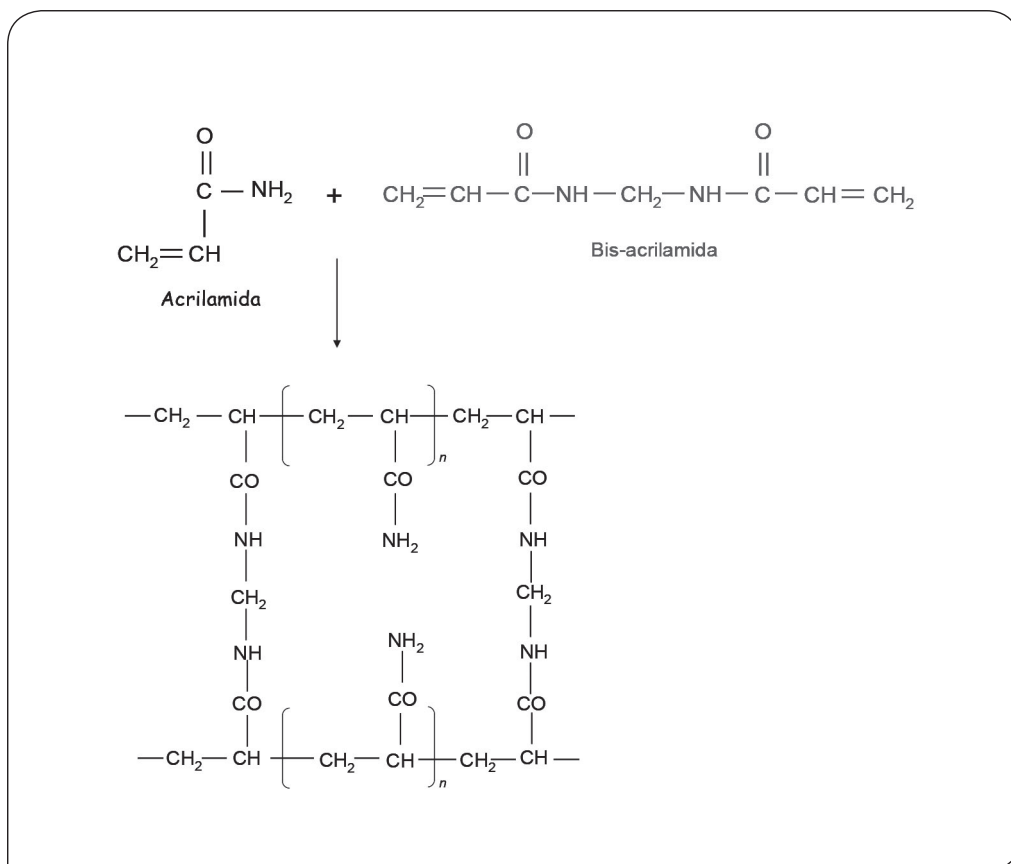


Figura 4.2. Formação da malha de poliacrilamida (suporte); quanto maior a concentração de acrilamida, menores os poros formados.

¹ Do inglês PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Esta forma de eletroforese em gel de poliacrilamida é o método mais utilizado para análise de misturas de proteínas de forma qualitativa. Este método é baseado na separação de proteínas de acordo com a carga e o volume molecular; em uma de suas variantes (SDS-PAGE) pode ser utilizado na determinação da massa molecular relativa de proteínas.

Eventualmente, podemos utilizar géis contendo um gradiente de poliacrilamida, onde a concentração do polímero (acrilamida) e o tamanho dos poros varia uniformemente ao longo do gel (ex: 5 % acrilamida no topo do gel aumentando até 25% ao final do gel). A vantagem da utilização destes géis consiste no seu poder de separação de proteínas com volumes moleculares muito similares. Este tipo de gel pode ser utilizado tanto na eletroforese nativa quanto na eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

4.3.2.3. Eletroforese nativa

Atualmente, este tipo de eletroforese é mais utilizado com o objetivo de medir a atividade enzimática e, em alguns casos, para determinar a formação de complexos entre duas proteínas. Neste tipo de eletroforese, as proteínas presentes na amostra são separadas de acordo com sua carga líquida nativa e seu volume molecular. Por exemplo, uma enzima de interesse pode ser identificada incubando o gel em uma solução com substrato adequado, produzindo um produto corado devido à reação com o sítio da enzima. Este tipo de eletroforese deve ser empregado quando a estrutura nativa da proteína é importante para as análises.

4.3.2.4. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS²) forma interações hidrofóbicas com as proteínas na proporção de uma molécula de detergente para cada dois resíduos de aminoácidos das mesmas. O SDS então adiciona carga negativa em grande

² Do inglês Sodium Dodecyl Sulfate.

quantidade às proteínas, conferindo-lhes uma carga negativa homogênea. Além disso, o SDS é um agente desnaturante capaz de desfazer parcialmente a estrutura tridimensional de proteínas. Entretanto, o detergente não é capaz de romper ligações covalentes como as pontes dissulfeto.

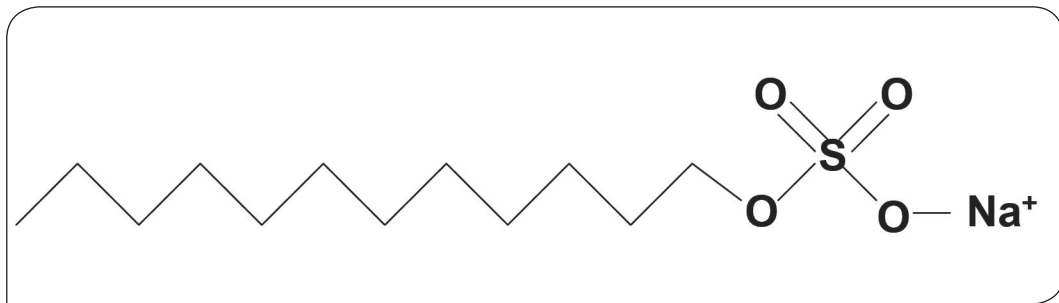


Figura 4.3. O detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS).

O SDS-PAGE é uma técnica freqüentemente utilizada na bioquímica e biologia molecular para determinação das massas moleculares relativas das proteínas presentes em uma amostra. Este tipo de eletroforese pode ainda ocorrer em condições redutoras, através da adição de agentes redutores como ditioneitol ou beta-mercaptoetanol. Estes agentes complementam a desnaturação das proteínas através da redução de ligações dissulfeto finalizando o processo de dismantelamento das estruturas terciárias e quaternárias (eventuais), previamente à separação eletroforética.

As proteínas podem ser detectadas em amostras de células (homogenato) ou em extratos de tecidos. Estas amostras são preparadas através da lise celular, promovendo o rompimento das células e das organelas. O tampão de lise celular é tradicionalmente composto por um detergente, como o SDS ou Triton X-100, associado a um coquetel de inibidores de proteases. Então, a solução é centrifugada e ao sobrenadante (material solúvel) é adicionado um tampão de amostra que, geralmente, contém um corante, um composto redutor (betameraptoetanol) e detergente (SDS). Este tampão possibilitará o desenovelamento das proteínas, pois a estrutura terciária será desfeita devido à desestruturção de interações hidrofóbicas (detergente) e rompimento de ligações dissulfeto (composto redutor). Além disso, a amostra ainda é fervida, o que favorece a desnaturação protéica.

Anteriormente à adição do tampão de amostra, a concentração de proteínas é determinada para a padronização do volume da amostra que deverá ser aplicado na eletroforese unidimensional. No caso de cultura de células, o número de células também pode ser utilizado como indicador da concentração de proteínas da amostra.

4.3.3. Eletroforese capilar

A técnica de eletroforese capilar foi introduzida em 1981 por Jorgenson e Lukacs e se tornou um importante método analítico, possibilitando o desenvolvimento de outras técnicas, como o seqüenciamento automático de DNA. Neste tipo de eletroforese emprega-se um tubo capilar preenchido com uma solução de eletrólito, assemelhando-se à técnica original descrita por Tiselius, sendo empregada na determinação de amostras como proteínas, peptídeos, hidrocarbonetos, vitaminas, dentre outras. O equipamento de eletroforese capilar envolve aplicação de alta voltagem em um capilar de diâmetro reduzido gerando correntes de 10 a 100 mA e um intenso campo elétrico (permitido pela alta resistência elétrica do capilar), que por sua vez favorece a diminuição do tempo de análise, sua eficiência e sua capacidade resolutiva. Também são utilizados neste tipo de eletroforese, capilares cheios de gel com a aplicação de campos elétricos elevados.

Na eletroforese capilar, uma solução tampão é adicionada ao capilar e suas extremidades são imersas em recipientes contendo a solução-tampão, que permite a aplicação de um campo elétrico,

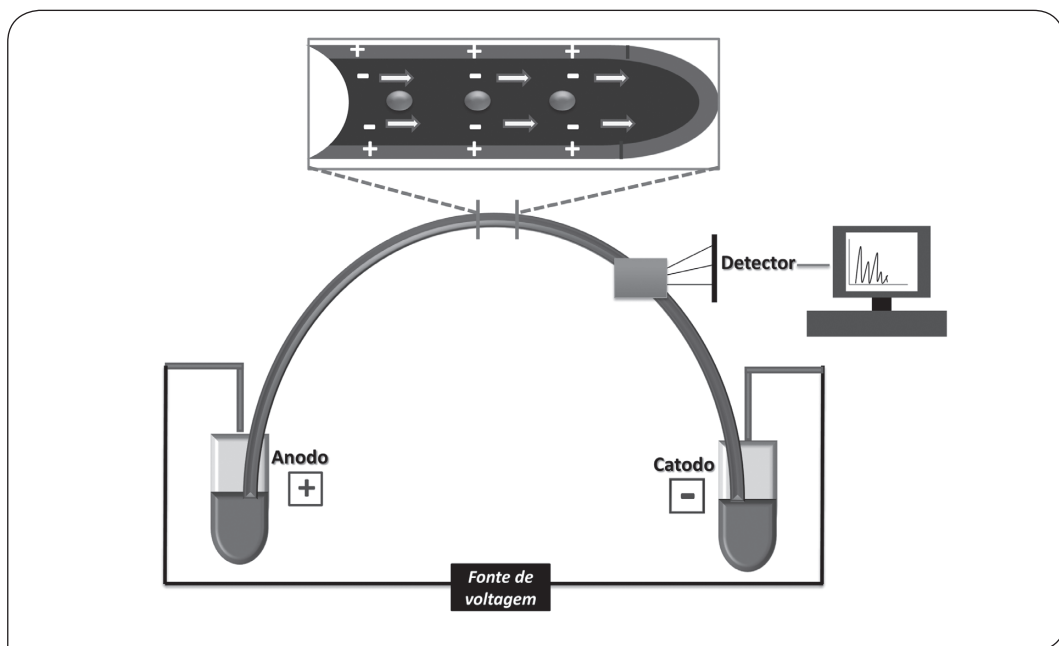


Figura 4.4. Esquema representativo de eletroforese capilar. Os recipientes contêm soluções eletrolíticas onde ficam os eletrodos, submetidos a uma alta voltagem. As moléculas carregadas migram em um campo elétrico e são detectadas por um detector acoplado a um computador, gerando assim o registro temporal dos sinais.

gerando uma corrente no interior do capilar através de eletrodos mergulhados na solução. Uma pequena quantidade da amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar e a aplicação do campo elétrico promove o movimento das moléculas em direção aos eletrodos. Um fenômeno eletroforético que gera o fluxo da solução dentro do capilar faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector. Esse tipo de eletroforese é atualmente utilizada em sequenciadores de DNA.

4.4. Zimografia

A zimografia consiste em um método sensível para medida da atividade enzimática após uma separação eletroforética. O princípio físico-químico da eletroforese permite a separação das proteínas, e a atividade enzimática é determinada pelo nível de degradação do substrato (normalmente co-polimerizado no mesmo gel de corrida). Usaremos como exemplo o substrato gelatina, para proteases. Após a corrida eletroforética e incubação, o gel com gelatina é corado com azul de Coomassie, permitindo a revelação das bandas. A diminuição, ou eventual desaparecimento de cor nas bandas do gel, está relacionado com a quantidade de gelatina (substrato) degradada na reação de proteólise. Este método é amplamente utilizado para busca de enzimas que degradam a matriz extracelular, em especial, metaloproteases de matriz extracelular (MMPs).

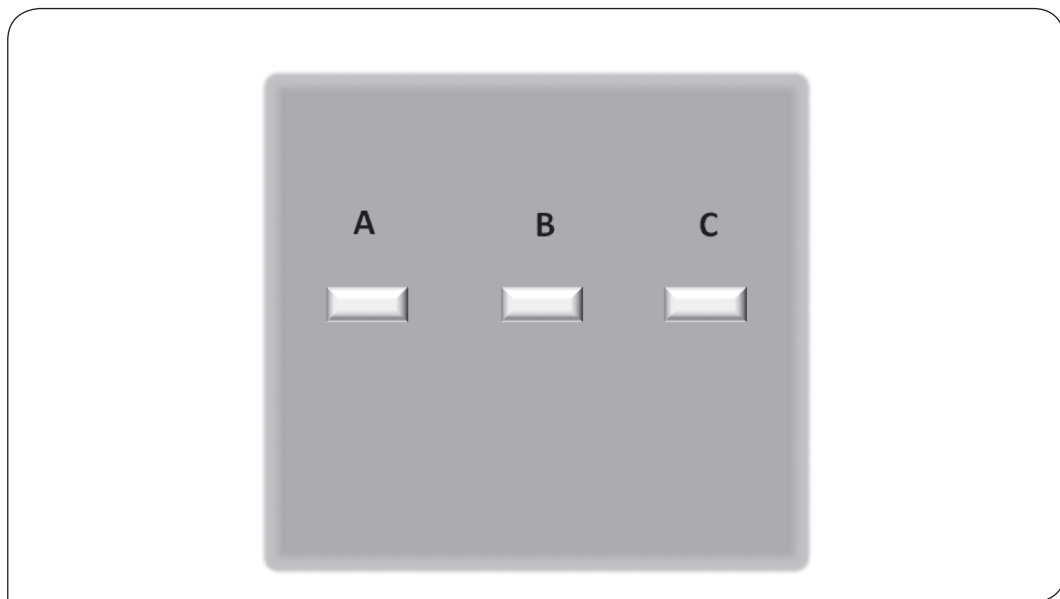


Figura 4.5. Representação esquemática do ensaio de zimografia. As amostras A, B e C apresentam atividade enzimática semelhante como representado no gel acima.

4.5. Western blot / Immuno blot

Na década de 70, o britânico Edwing Southern desenvolveu o método de identificação de uma seqüência de DNA a partir de sua transferência para uma membrana e sua detecção com sondas específicas, o qual acabou designado como Southern *blot*. Posteriormente, foi descrita outra técnica de transferência em membrana, porém para verificar a expressão de RNAm. Esta técnica foi denominada de *northern blot*, fazendo um trocadilho entre os pontos cardeais e o método de identificação de DNA. Em 1979, o *protein blot* ou *blot* foi introduzido por Towbin e colaboradores e chamado de *western blot*. Esta técnica é caracterizada pela transferência de um extrato protéico para uma membrana, comumente de nitrocelulose. Já o *immuno blot* é o *western blot* aonde, após a transferência para a membrana, as proteínas são identificadas com anticorpos específicos. Atualmente, utiliza-se o termo *western blot* como sinônimo de *immuno blot*.

A primeira etapa da técnica pode consistir, por exemplo, de uma eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), possibilitando a separação das proteínas da amostra de acordo com a sua massa molecular. Ao final da eletroforese, as proteínas são transferidas para uma membrana, possibilitando a imunodetecção. O processo de transferência mais comumente utilizado consiste no contato direto entre o gel proveniente da eletroforese e uma membrana, geralmente de nitrocelulose, sob aplicação de um campo elétrico, num ambiente imerso em tampão básico. A capilaridade do gel permite que o tampão entre nos poros e remova as proteínas para a membrana, mantendo-as separadas. As proteínas se ligam quase irreversivelmente com a membrana através de interações hidrofóbicas. Os dois principais tipos de membranas são: nitrocelulose (vantajosa no que diz respeito ao custo) e PVDF (maior sensibilidade, capacidade de ligação com as proteínas e tempo de retenção destas). Alguns fatores podem determinar a eficiência da transferência como a composição do gel, do tampão, volume molecular das proteínas, temperatura e tempo de transferência.

Após a transferência, a membrana é incubada com uma "solução bloqueadora", que tem a função de cobrir as regiões da membrana que não possuem as proteínas submetidas à eletroforese. O bloqueio inibe a ligação inespecífica entre os anticorpos a serem aplicados e a membrana. Esta solução é composta por albumina bovina ou leite, permitindo a associação entre as regiões livres da membrana e as proteínas da "solução bloqueadora". Após o bloqueio, a membrana é tratada com anticorpo reativo para a proteína que se deseja analisar (anticorpo primário) dissolvido em uma solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato). Na etapa seguinte, a membrana é submetida a lavagens consecutivas para remoção dos anticorpos que não se liga-

ram aos seus antígenos (proteínas) correspondentes. Posteriormente, a membrana é incubada com o anticorpo secundário, o qual é específico para a espécie animal na qual foi desenvolvido o anticorpo primário. O anticorpo secundário, comumente, está complexado a uma enzima reveladora, a qual, na medida em que for incubada com seu substrato específico, emitirá um sinal, por exemplo, fotossensível. A quantificação deste sinal é a medida indireta de quanto de proteína-alvo (antígeno) está presente na amostra (Figura 4.6). O *immunoblotting* se limita a uma análise semi-quantitativa (eventualmente quantitativa) da proteína pois não permite estimar a funcionalidade desta última.

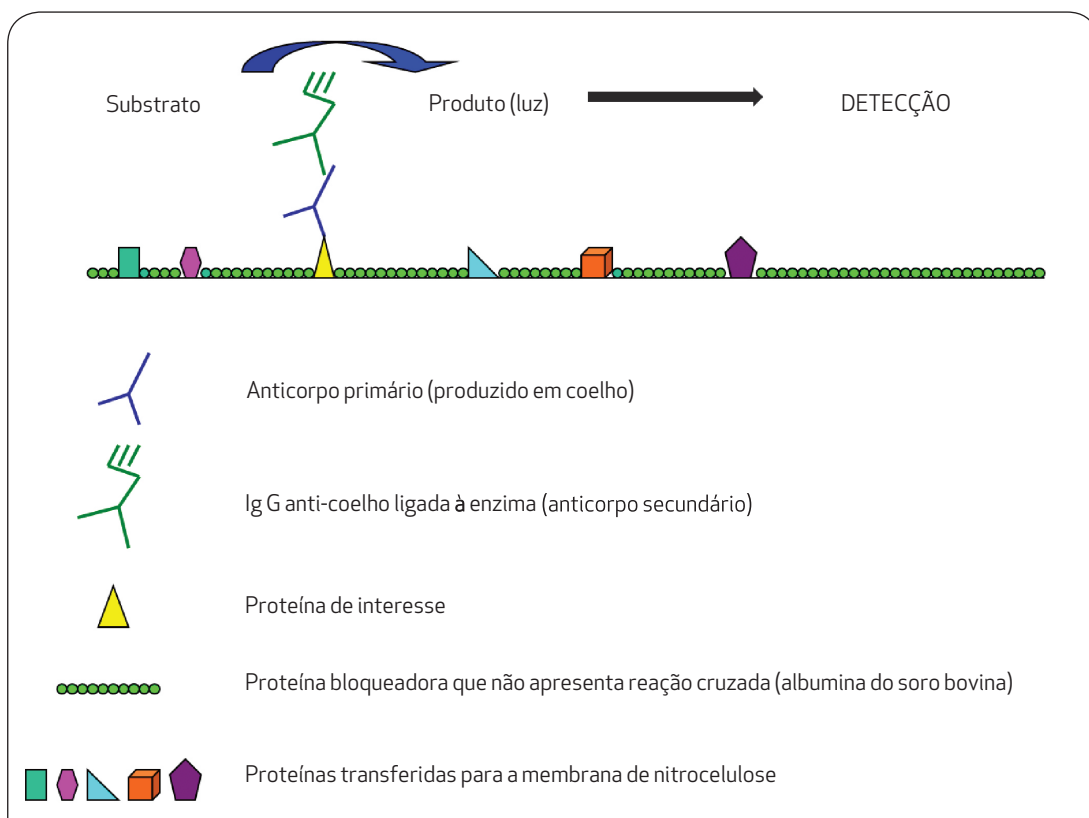


Figura 4.6. Esquema do processo de imunorevelação após *western blotting*.

Existem quatro tipos principais de detecção do sinal no *western blotting* após a adição do anticorpo primário:


- Colorimétrica – Neste método a detecção depende da incubação da membrana com um substrato que reaja com a enzima reveladora, como a peroxidase, que está conjugada ao anticorpo secundário. Esta reação converte o corante solúvel em insolúvel, colorindo a membrana e gerando as bandas. Após a lavagem para a remoção do co-

rante, o nível de abundância protéica é analisado por densitometria, que consiste na medida da intensidade da banda;

- b) Quimioluminescente – Os métodos de detecção quimioluminescentes são caracterizados pela incubação da membrana com substrato que emita luz após a reação com a enzima reveladora. A luz emitida é capturada por um filme fotográfico ou por câmeras digitais e a análise é feita por densitometria. A quimioluminescência é um dos métodos mais sensíveis de detecção no *western blot*;
- c) Radioativa – Diferentemente das técnicas de detecção anteriores, este método não necessita de substratos enzimáticos uma vez que o anticorpo secundário está acoplado a uma sonda radioativa, o que permite a associação de filmes médicos de Raios-X para revelação diretamente com o *western blot*. O emprego deste método está diminuindo devido ao seu alto custo e aos riscos à saúde com o uso de material radioativo;
- d) Fluorescente – Assim como a detecção radioativa, esta técnica não necessita de substratos enzimáticos, pois o anticorpo secundário está acoplado a uma sonda fluorescente. Quando excitada no comprimento de onda apropriado, esta sonda emite a fluorescência que é captada por um fotosensor, como uma câmera CCD, permitindo a análise das bandas por densitometria. A detecção fluorescente também é considerada um dos métodos mais sensíveis de detecção no *western blot*.

Referências

- Kurien, B.T., ScoWeld, R.H. (2006) *Western blotting*. *Methods*. 38: 283–293.
- Chen, H., Chang, G.D. (2001) *Electrophoresis*. 22: 1894–1899.
- Kurien, B.T., Matsumoto, H., ScoWeld, R.H. (2001) *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 38: 274–276.
- Reese, G., Schmechel, D., Ayuso, R., Lehrer, S.B. (2001) *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 756: 151–156.
- Leber, T.M., Balkwill, F.R. (1997) *Analytical biochemistry*. 15(249): 24–28.
- <http://www.icb.ufmg.br/mor/pad-morf/eletroforese.htm>
- Silva Júnior, J.G. (2001) *Eletroforese de proteínas: guia prático-teórico*, editora Interciência, Rio de Janeiro.
- Jager, A.V., Tavares, M.F.M. (2001) Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e Aplicações. *Quim. Nova*. 24: 363–373.
- Snoek-van Beurden, P.A., Von den Hoff, J.W. (2005) *BioTechniques*. 38(1):73–83.



INTRODUÇÃO À PROTEÔMICA

KARINA MASTROPASQUA REBELLO

5. INTRODUÇÃO À PROTEÔMICA

5.1. Introdução

A *Teoria Central* da biologia molecular explica como a informação genética contida nos genes é transferida para o citoplasma. Este processo inicia-se com a formação de uma molécula, o RNA mensageiro (RNAm), através do processo da transcrição, e no citoplasma esta molécula de RNAm é traduzida em uma proteína que exerce sua função biológica.

As proteínas são macromoléculas abundantes e relevantes pois desempenham diversas funções biológicas, tais como estrutural, hormonal, transportadora, imunológica e enzimática.

O intenso avanço da Biologia, em especial após o sequenciamento do genoma humano e de genes completos de vários organismos, gerou uma infinidade de informações sobre a organização genética destes. Entretanto, o sequenciamento de genes não gera informações sobre quais proteínas estão sendo expressas em um dado momento, sob determinada condição. Ao contrário do genoma, que permanece relativamente estável ao longo do ciclo de vida de um organismo, o proteoma, ou seja, o perfil de expressão protéica de uma célula é extremamente dinâmico, pois se modifica dependendo das condições e estímulos a que este organismo está exposto.

A necessidade de suprir essa grande demanda de conhecimento sobre a biologia da célula através do mapeamento de perfis protéicos, quantificação de proteínas e estudos de modificações pós-traducionais, levou ao surgimento da proteômica, que permite investigar, além do controle da expressão gênica, modificações pós-traducionais e o metabolismo celular. O termo proteômica, sugerido por Marc Wilkins em um simpósio na

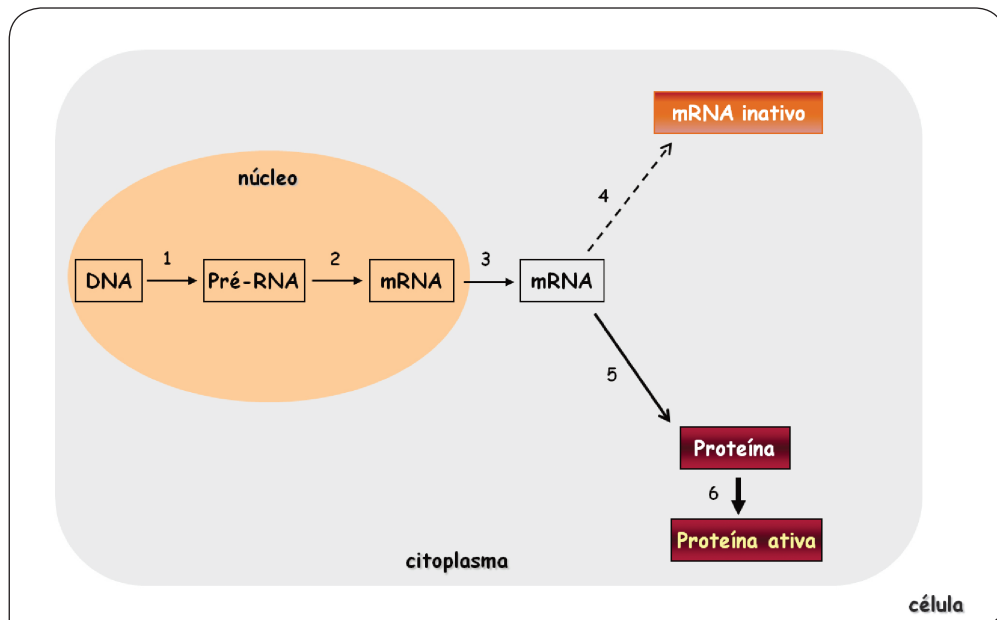


Figura 5.1. Teoria Central da biologia molecular com indicação dos diversos pontos de controle existentes, os quais podem ocorrer na transcrição (1), no processamento do RNA (2), no transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma (3), na eventual degradação desse mRNA (4), na tradução (5) e, finalmente, na eventual adição de grupamento químico e/ou processamento da proteína recém-sintetizada para gerar sua forma ativa (modificações pós-traducionais) (6).

Itália, em 1994, e subsequentemente publicado em 1995, é definido como a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas contidas em uma célula. Este conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido, a partir do genoma, é que denominamos proteoma.

A análise proteômica é uma técnica relativamente recente, que permite caracterizar um proteoma de uma amostra qualitativa e quantitativamente. As duas principais técnicas para a análise do proteoma são: eletroforese bidimensional (2D-PAGE – **2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis**) e espectrometria de massas.

A técnica de 2D-PAGE, descrita por O'Farrell em 1975, consiste na separação de proteínas com base em duas importantes propriedades físico-químicas independentes: ponto isoelétrico e massa molecular. Inicialmente, a técnica consistia na preparação de géis cilíndricos de poliácridamida, em que o gradiente de pH era estabelecido através de uma pré-corrída com partículas carregadas (também chamados de anfólitos) específicas com elevada capacidade de tamponamento em pHs próximos aos seus pontos iso-

elétricos (pI). Na primeira etapa da técnica (primeira dimensão), a amostra é submetida a uma migração eletroforética em fita de gel contendo um gradiente de pH. Assim, as proteínas migram horizontalmente no gel até chegarem ao pH em que sua carga líquida (soma das cargas positivas e negativas) seja zero (pI – ponto Isoelétrico) (Berg et al., 2002). Esta técnica é conhecida como focalização isoelétrica (IEF - **I**so**E**lectric **F**ocusing). Na etapa seguinte, a fita resultante da primeira dimensão é submetida à eletroforese tradicional SDS-PAGE para uma segunda separação das proteínas, agora pela diferença em suas massas moleculares.

A espectrometria de massas determina a relação massa/carga (m/z) de íons em fase gasosa. Inicialmente, esta técnica era aplicada principalmente na determinação de estruturas químicas de moléculas pequenas e voláteis. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de ionização suaves (que ionizam macromoléculas sem degradá-las) no início da década de 80, tornou-se possível sua aplicação na análise de moléculas maiores e polares, como peptídeos e proteínas. A partir desse momento, novos equipamentos passaram a ser desenvolvidos com a finalidade de solucionar questões relacionadas à química de proteínas.

As técnicas de proteômica podem ser aplicadas nas áreas biomédicas, em diversos estudos, tais como: identificação de biomarcadores de doenças, efeito de fármacos sobre células e, ainda, na comparação de expressão de cepas patogênicas e não patogênicas, para auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos e de agentes terapêuticos.

5.2. Preparação da amostra

É a etapa fundamental do estudo. O protocolo ideal varia de acordo com a amostra. A preparação da amostra consiste basicamente em duas etapas: inicialmente ocorre a lise celular (rompimento das células) seguida das etapas de extração e solubilização das proteínas. A lise celular é feita em temperatura baixa (gelo) utilizando uma solução fortemente desnaturante, com auxílio de ciclos de congelamento/descongelamento em N_2 líquido, sonicação e/ou maceração. Ainda na primeira etapa, é possível utilizar inibidores de proteases, para impedir a degradação das proteínas. Na segunda etapa, é utilizada uma solução de extração contendo agentes caotrópicos (Uréia e Tiouréia, que desfazem interações não-covalentes, como as ligações de hidrogênio nas proteínas), detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (CHAPS, TRITON X-100 e Nonidet P-40 que auxiliam na solubilização das proteínas e desfazem os agregados protéicos), agentes redutores (ditiotreitól ou beta-mercaptoetanol que rompem as ligações dissulfeto intra e inter-cadeias) e tampão com anfólitos carreadores os quais auxiliam na solubilização das proteínas, além de manter a condutividade mais uniforme ao longo do gradiente de pH (Figura 5.2).

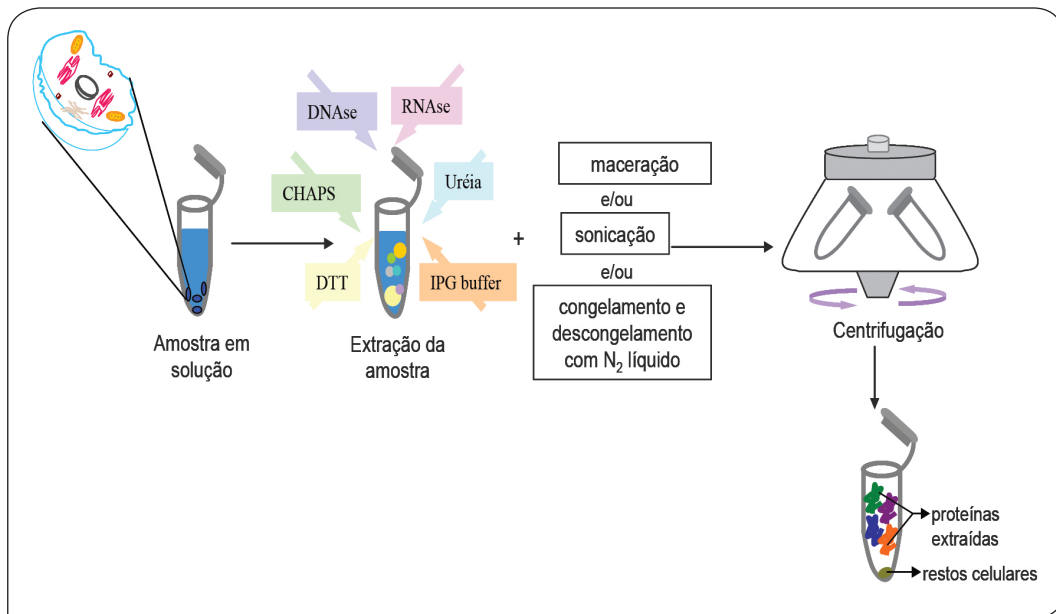


Figura 5.2. Representação esquemática de diferentes protocolos de extração de proteínas. DTT (ditiotreitito); CHAPS (3-[(colamidopropil) dimetilamônio]-1-propano-sulfonato); IPG buffer (tampão de anfólitos).

5.3. 2D-PAGE - Eletroforese Bidimensional

Esta etapa consiste basicamente em três passos. O primeiro é a focalização isoelétrica (IEF – *Isoelectric Focusing*), seguido pelo equilíbrio das tiras de IPG para a terceira e última fase, que é o SDS-PAGE.

Como qualquer outra técnica, a técnica de eletroforese bidimensional tem suas limitações: dificuldade de solubilizar proteínas de membrana, dificuldade da resolução/separação de proteínas com *pI* extremos (abaixo de 3 e acima de 10) e de proteínas pouco abundantes, dificuldade de automação e de reprodutibilidade, além de ser um método bastante trabalhoso.

5.3.1. Focalização isoelétrica (IEF) – Primeira Dimensão

Em 1975, O'Farrell descreveu a técnica de separação de misturas complexas de proteínas em primeira dimensão, de acordo com seu ponto isoelétrico (*pI*). Desde então, esta técnica sofreu aperfeiçoamentos em vários aspectos e tornou-se mais simples e confiável devido à introdução de gradientes de *pH* imobilizados em suporte, comercialmente disponíveis, tornando os géis mais reprodutíveis. Esta técnica é conhecida como focalização isoelétrica, onde a

separação das cadeias polipeptídicas ocorre através de um gradiente de pH, gerado por carreadores anfólitos (substâncias poliméricas que contêm em suas estruturas vários grupos ionizáveis do tipo carboxila e amina) em géis de poliacrilamida, na presença de um campo elétrico. A técnica inicialmente apresentava limitações na reprodutibilidade, pois os gradientes gerados por anfólitos eram instáveis e sofriam variação durante a sua produção. No entanto, ela foi aperfeiçoada tornando-se operacionalmente simples devido a gradientes de pH comercialmente disponíveis, imobilizados em tiras ou "strips" de poliacrilamida, também conhecidas como tiras de IPG (IPG - *Immobilized pH gradient*) (Görg et al., 1985) (Figura.5.3).

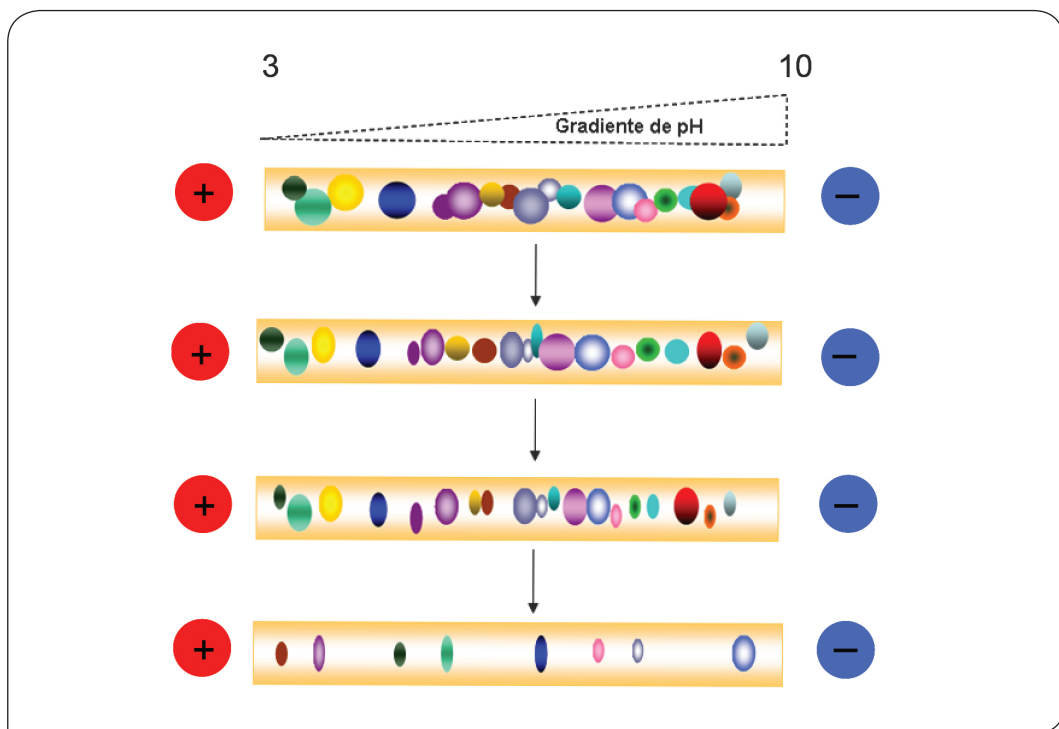


Figura 5.3. Representação esquemática de uma isoeletrofocalização entre pH 3 e 10 ao longo do tempo de corrida.

Entre as etapas de IEF e a segunda-dimensão (SDS-PAGE) as tiras de IPG ou "strips" são equilibradas, para que as proteínas previamente separadas pelo seu pI interajam com o SDS e possam então ser separadas segundo seu volume molecular (Figura 5.4). O SDS é um detergente apresentando uma cadeia longa apolar ligada a grupo terminal carregado. Possui uma ação desnaturante porque sua cauda hidrofóbica se insere no interior da proteína e se associa com radicais apolares, rompendo interações hidrofóbicas que mantêm

a estrutura proteica nativa. Além disso, confere uma carga negativa a todas as proteínas, fazendo com que estas se distingam somente pelas suas massas moleculares.

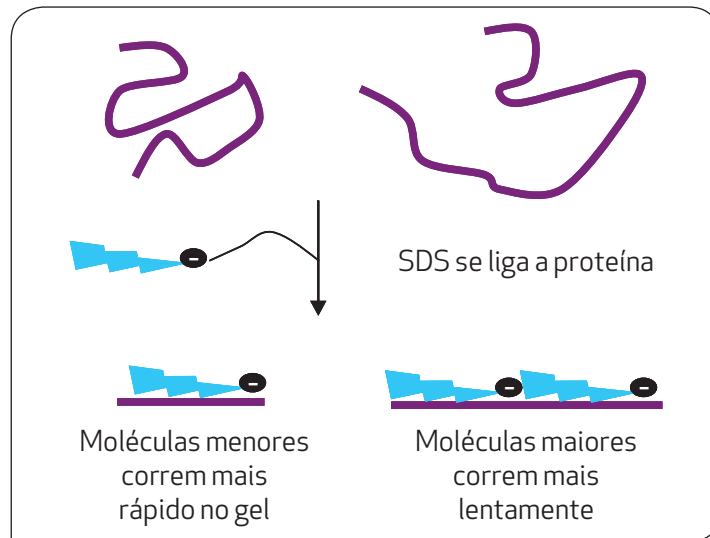


Figura 5.4. Ilustração da ação do SDS em proteínas.

5.3.2. SDS-PAGE

Na segunda etapa, a fita resultante da primeira dimensão é submetida à tradicional eletroforese SDS-PAGE para uma segunda separação das proteínas, agora pela diferença na massa molecular (Figura 5.5).

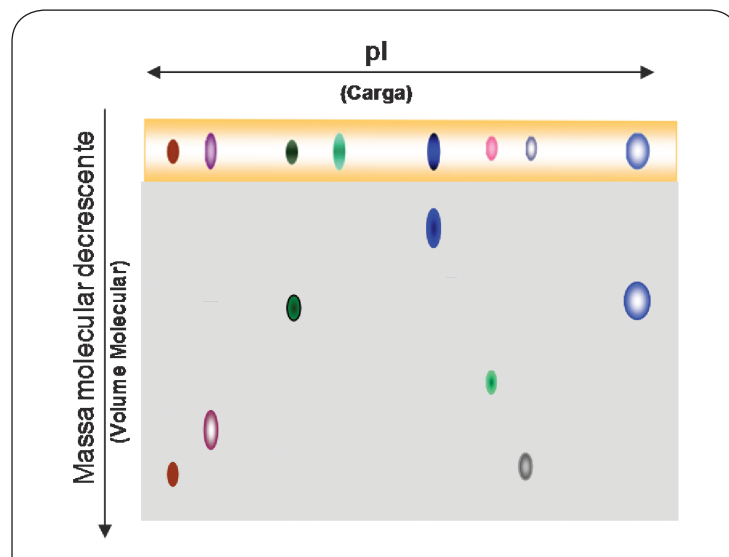


Figura 5.5. Resultado final de uma 2D-PAGE. As moléculas sofreram separação em duas dimensões: pI (carga) X massa molecular relativa (volume molecular).

5.4. Introdução à espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta analítica capaz de identificar as composições, qualitativa e quantitativamente, de misturas complexas (incluindo a distribuição isotópica de seus elementos), assim como permite analisar modificações pós-traducionais como metilação, glicosilação, acetilação e fosforilação. A espectrometria de massas permite também determinar a seqüência de aminoácidos dos peptídeos, visando à identificação das proteínas que constituem a amostra.

O espectrômetro de massas é um instrumento que determina a razão entre massa e carga (m/z) de íons em fase gasosa, sendo constituído pelos seguintes componentes: fonte de ionização (responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra), analisador (es) de massas (determina a relação m/z do analito) e detector de íons (detecta a presença do analito) (Figura 5.6).

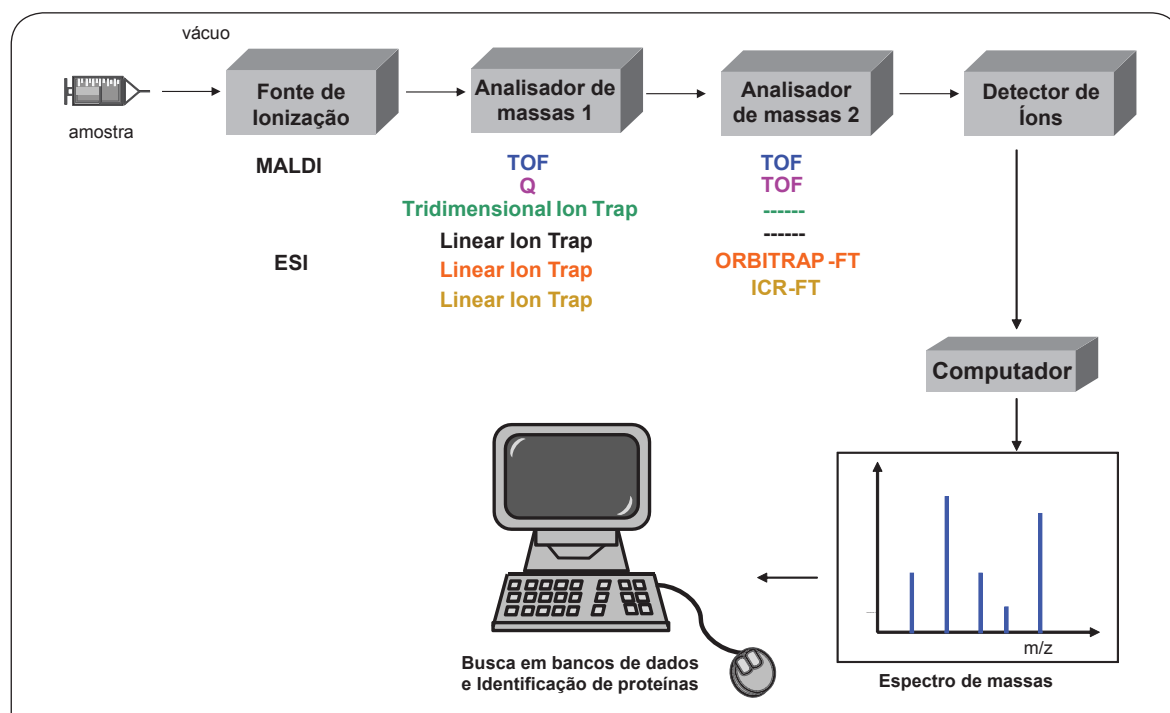


Figura 5.6. Esquema dos componentes possíveis de um espectrômetro de massas utilizado em estudos proteômicos. ESI (*Electrospray Ionization*), MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), ICR-FT (*Ion cyclotron resonance - Fourier transform*), Q (*Quadrupole*) e TOF (*Time of Flight*).

Basicamente, existem dois tipos principais de fonte de ionização que são utilizadas na análise de proteínas e peptídeos: ionização por eletrospray (*ESI - Electro***s***pray Ioni-*

zation) (Figura 5.7) e ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (**MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization**) (Figura 5.8). Geralmente, estas fontes podem ser combinadas de diferentes formas com os analisadores permitindo a construção de equipamentos híbridos de alto desempenho. Uma combinação que tem se mostrado eficiente é da fonte de ionização MALDI com dois analisadores TOF (**Time of Flight**) em *tandem* (um atrás do outro; alinhados).

No espectrômetro MALDI TOF-TOF a amostra é misturada a uma matriz orgânica e aplicada a uma placa de aço inoxidável contendo microfissuras. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam, ocorre uma co-cristalização destes. A placa então é submetida a tiros de laser, o que provoca a fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra, e posterior desorção, fazendo com que os íons do analito entrem em fase gasosa. Após entrarem em fase gasosa, os analitos são encaminhados ao analisador do tipo TOF, onde os íons são acelerados pela aplicação de uma diferença de potencial e percorrem um espaço livre (tubo de vôo) sob vácuo, até serem detectados. Os íons de m/z diferentes atingem o detector em tempos diferentes; os íons de maior massa levam mais tempo para atingir o detector, o que pode ser visualizado pela fórmula a seguir:

$$\frac{m}{z} = 2eU \left(\frac{t}{L} \right)$$

Assumindo os valores de e , U e L constantes;
Lembrando que na maioria das vezes $z = 1$.

$e \rightarrow$ carga elementar

$t \rightarrow$ tempo

$m \rightarrow$ massa

$U \rightarrow$ diferença de potencial

$L \rightarrow$ espaço percorrido

$z \rightarrow$ carga do íon

Desta forma, os componentes individuais em uma mistura de íons são separados de acordo com as suas relações entre massa e carga (m/z), tornando possível a determinação da massa de cada proteína ou peptídeo intacto. Para este resultado dá-se o nome de espectro MS.

Os peptídeos previamente detectados durante o espectro MS (chamados de íons precursores) são então isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. O espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS.

A identificação das proteínas é feita a partir dos resultados obtidos tanto do espectro MS, bem como dos espectros de fragmentação (MS/MS), através da comparação destes dados experimentais com dados de fragmentação teóricos, gerados *in silico*, de

todas as proteínas presentes em determinado banco de dados, utilizando ferramentas (softwares) específicas tais como *Mascot* ou *Sequest*. Estes programas reportam os resultados encontrados na forma de estimadores da confiabilidade de identificação. Assim, quanto maior o valor do estimador, menor é a probabilidade de que este resultado seja fruto de uma “coincidência”, ou seja, uma identificação falso-positiva.

A identificação de proteínas de um determinado organismo através da busca em banco de dados é possível somente se este organismo possui o seu genoma seqüenciado e disponível. Em situação na qual o genoma de uma determinada espécie ainda não esteja completamente seqüenciado ou disponível, é necessário derivar a seqüência primária de aminoácidos de determinados peptídeos baseado única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas, isto é, sem recorrer aos algoritmos e a banco de dados. Esta técnica é denominada de seqüenciamento *de novo* (Steen & Mann, 2004).

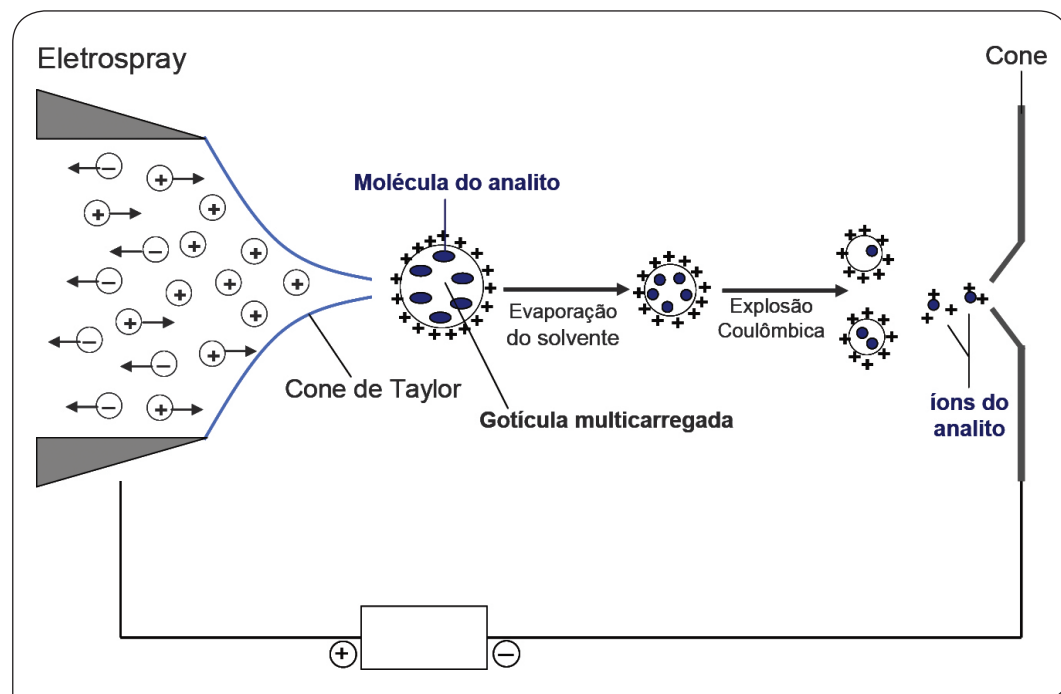


Figura 5.7. Ionização e dessolvatação por ESI (*Electrospray Ionization*).

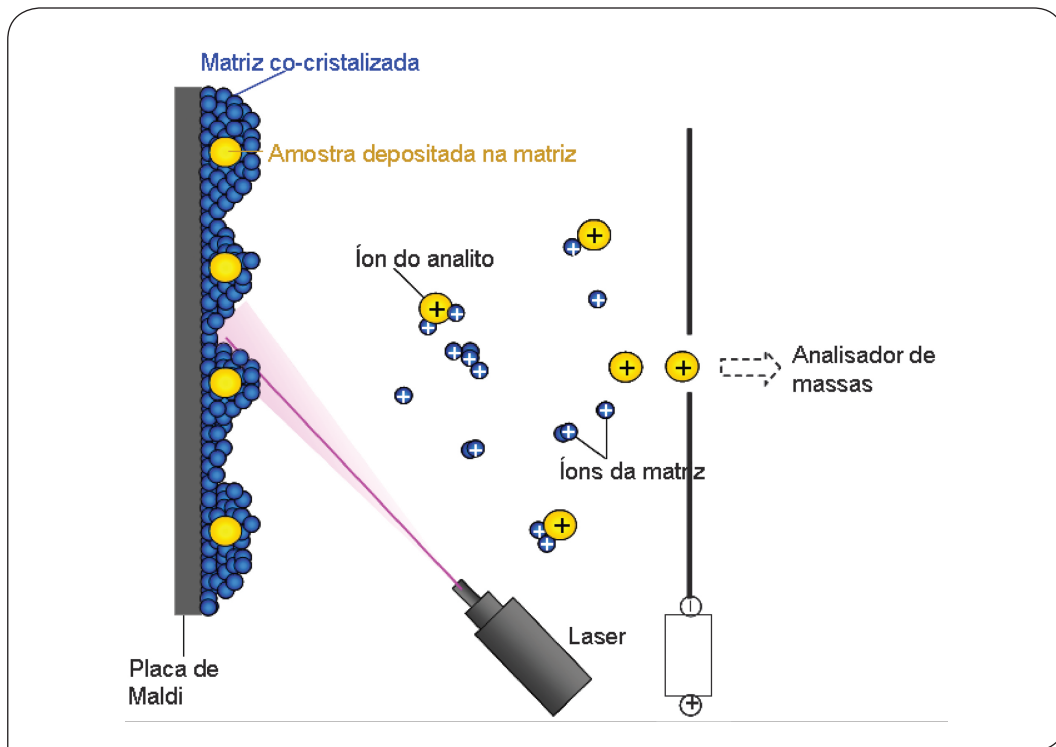


Figura 5.8. Ionização e dessorção por MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

Referências Bibliográficas

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Strayer, L. Biochemistry: W. H. (2002) Freeman and Co.; 5ª ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Carrilo, E., Cantú, M.D. (2008) Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*. 31(3): 669-675.

Görg, A., Postel, W., Günther, S., Weser, J. (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis*. 6(12): 599-604.

Keith, W., Walker, J. (1994) Principles and techniques of practical biochemistry; 4ª ed, Australia. Cambridge University Press.

Marzzoco, A., Torres, B.B. (2007) Bioquímica Básica; 3ª ed, Rio de Janeiro editora Guanabara Koogan.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional eletrophoresis of proteins *Journal of Biological Chemistry*. 250(10): 4007-4021.

Steen, H., Mann, M. (2004) The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. A good introduction to the concepts and methods that are involved in peptide sequencing by MS/MS. *Nature Reviews in Molecula Cell Biology*. 5(9): 699-711.

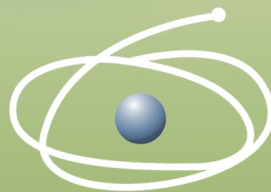
Silva Júnior, J.G. (2001) Eletroforese de proteínas: guia prático-teórico. Rio de Janeiro. Editora Interciência.

Simpson, R.J. (2003) Proteins and Proteomics: a laboratory manual. New York. Cold Spring Harvbor Laboratory Press.

Wasinger, V.C., Cordewell, S.J., Cerpa-Pojlak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.W., Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16(1): 1090-1094.



Financiamento:



C A P E S

Realização:

IOC

Instituto Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

FIUCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ministério da
Saúde

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA