
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Anally Ribeiro da Silva Menegasso

Desenvolvimento da Técnica de MALDI *Imaging* utilizando tecidos animais

The bottom half of the cover features a large, abstract geometric design. It consists of a series of overlapping triangles in various shades of blue and white, creating a complex, crystalline pattern that resembles a stylized globe or a molecular structure.

Rio Claro
São Paulo - Brasil
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE
MESQUITA FILHO

Instituto de Biociências

Campus Rio Claro

Anally Ribeiro da Silva Menegasso

**Desenvolvimento da Técnica de MALDI *Imaging*
utilizando tecidos animais**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de
Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma
Co-orientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Rio Claro
São Paulo – Brasil
2010

547.75 Menegasso, Anally Ribeiro da Silva
M541d Desenvolvimento da técnica de MALDI Imaging
 utilizando tecidos animais / Anally Ribeiro da Silva
 Menegasso. - Rio Claro : [s.n.], 2010
 96 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Mario Sergio Palma

Co-Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

1. Proteínas. 2. Análise proteômica. 3. Glioblastoma
multiforme. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

À minha mãe querida...

Por me mostrar que sonhar...faz a vida mais feliz.

Por me incentivar, por confiar e acreditar...e jamais me deixar desistir.

Minha fonte de luz...meu recanto de paz.

Força.

Sei que mesmo longe...está sempre ao meu lado.

Obrigada por me ensinar...que a vida é linda de viver!

Te amo incondicionalmente.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha mãe e ao meu padrasto, a meus avós, meus tios e primos por estarem sempre ao meu lado, por acreditarem no meu potencial. Graças a vocês, cheguei onde estou e terei forças para continuar caminhando. Graças a vocês sou apaixonada pela vida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Sergio Palma, pela oportunidade, pela orientação e pela paciência. Por fazer crescer em mim o amor pela ciência. Obrigada.

Agradeço também ao grupo do Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica: Nicoli, Daniel, Vanessa, Paulo, Nathália, Bibiana, Patrícia, Danilo, Lorenzo, Lucilene, Beto, Ana Maria, Marília e Franciele.

Agradeço à minha co-orientadora, Dra. Lucilene Delazari dos Santos, pelos sábios ensinamentos e preciosos conselhos. Obrigada por sempre me acalmar e nunca me deixar desistir, por me mostrar que talvez eu chegue a um lugar de forma mais rápida se for sozinha, mas juntos com certeza chegaremos muito mais longe.

Agradeço ao meu namorado (no passado e futuro) pelo apoio e por estar sempre ao meu lado. Pela paciência em me ensinar e pelas boas longas horas de trabalho. Obrigada por seu amor.

Agradeço à: Van, Nic, Dani, Dom e Pati pela amizade e apoio.

Agradeço a meus amigos: Thiago, Meiga, Severino, Felipe, Victor, Fernando, Mayara, Sidney, Flávia, Fabrício, Fawne, Ednilton, Cláudia, Gustavo e Tiago. Graças a vocês posso dizer que a vida é muito melhor quando temos verdadeiros amigos. Devo grande parte do que sou a vocês.

Agradeço à minha prima Rosely por me mostrar que sempre existe uma saída para tudo e que eu sou capaz de alcançar tudo o que eu quiser. Obrigada por sua luz e por toda sua sabedoria.

Agradeço à turma de Ciências Biológicas Integral de 2007, especialmente aos meus colegas: Leandro, Pedro, Bruno, Felipe, Liu, Evandro e Fernando.

Agradeço a minha *amisga* Cibele pelas horas divertidas e por uma amizade incrível.

Agradeço a Unesp, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais, aos docentes e funcionários. Sem vocês nada disto funcionaria bem.

Agradeço aos órgãos de fomento: FAPESP, CNPq, CAPES e ao Instituto de Investigação Imunológica pelo apoio à pesquisa.

Recomeçar

Não importa onde você parou,
em que momento da vida você cansou,
o que importa é que sempre é possível
e necessário "Recomeçar".
Recomeçar é dar uma nova
chance a si mesmo.
É renovar as esperanças na vida
e o mais importante:
acreditar em você de novo.
Sofreu muito nesse período?
Foi aprendizado.
Chorou muito?
Foi limpeza da alma.
Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia.
Sentiu-se só por diversas vezes?
É por que fechaste a porta até para os outros.
Acreditou que tudo estava perdido?
Era o início da tua melhora.

Recomeçar!

Hoje é um bom dia para começar
novos desafios.
Onde você quer chegar?
Ir alto.
Sonhe alto,
queira o melhor do melhor,
queira coisas boas para a vida.
pensamentos assim trazem para nós
aquilo que desejamos.
Se pensarmos pequeno,
coisas pequenas teremos.
Já se desejarmos fortemente o melhor
e principalmente lutarmos pelo melhor,
o melhor vai se instalar na nossa vida.
Jogue tudo fora.
Mas, principalmente,
esvazie seu coração.
Fique pronto para a vida,
para um novo amor.
Lembre-se somos apaixonáveis,
somos sempre capazes de amar
muitas e muitas vezes.
Afim de contas,
nós somos o "Amor".

Paulo Roberto Gaefke

“Muitos são os obstinados que se empenham no caminho que escolheram, poucos os
que se empenham no objetivo.”

Friedrich Nietzsche

Resumo

Atualmente, o estudo de importantes compostos moleculares, presentes em baixa abundância em alguns tecidos animais, tem sido um grande desafio para as estratégias clássicas das análises proteômica. Uma análise mais exploratória exige a investigação mais aprofundada e direcionada em pequenas regiões do tecido estudado ou de um pequeno grupo de células. A tecnologia MALDI *Imaging* (MSI) é uma aplicação da espectrometria de massas voltada para a análise química de tecidos intactos. Desta forma, os avanços na espectrometria de massas do tipo MALDI estão sendo obtidos pela integração da histologia, com os melhores métodos de automação e os principais instrumentos de análise de dados. Esta ferramenta tem se tornado essencial para analisar a distribuição espacial de peptídeos e proteínas ao longo de cortes de tecidos, proporcionando uma enorme quantidade de dados com um tempo mínimo de manipulação e preparação da amostra. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver a técnica de MALDI *Imaging* utilizando tecido de Glioblastoma multiforme (GBM), uma forma de tumor maligno muito comum no cérebro humano. Neste trabalho, a impressora química CHIP-1000 (Chemical Inkjet Printer, Shimadzu) e o espectrômetro de massas do tipo Maldi-ToF-ToF (Axima Performance, Shimadzu) foram utilizados, sendo que as proteínas identificadas foram obtidas utilizando o servidor público SwissProt. Aproximadamente, foram identificadas quarenta proteínas com diversas funções, dentre elas as proteínas F-actina e Thimosina, as quais estão relacionadas com a estrutura e organização celular, e proteínas como diversos Fatores de necroses tumorais, as quais estão relacionadas diretamente com a patologia analisada nesse estudo. O desenvolvimento dessa técnica proporcionou uma análise proteômica diretamente no tecido, favorecendo o desenvolvimento de testes diagnósticos para a detecção precoce de doenças, assim como também a identificação e caracterização de potenciais biomarcadores de doenças.

Palavras-chave: análise proteômica, MALDI *Imaging*, glioblastoma multiforme

Abstract

Currently the study of important molecular compounds present in low abundance in some tissues has been a challenge for proteomic analysis classic. An analysis requires more exploratory investigation of small regions of a tissue or a group of cells. MALDI *Imaging* Technology (MSI) is an application of mass spectrometry facing the chemical analysis of intact tissues. Thus, advances in mass spectrometry MALDI being obtained by the integration of histology, the best methods and automation are the main tools of data analysis. This tool has become essential to analyze the spatial distribution of peptides and proteins throughout the tissue sections, providing an enormous amount of data with minimum sample preparation. Thus, the aim of this study was to develop the technique of MALDI Imaging using tissue from glioblastoma multiforme (GBM), a form of most common malignant tumor in the brain. For this we used the printer chemical ChIP-1000 (Chemical Inkjet Printer, Shimadzu) and mass spectrometer type Maldi-ToF-ToF (Axima Performance, Shimadzu), a search of the identifications were performed in databases such as SwissProt. We identified more than forty proteins with diverse functions such as proteins F-actin-capping and Thymosin to the structure and organization cellular and proteins such several Tumor necrosis factor receptor development-related pathology. The development of this technique will permit to carry-out proteomic analysis directly into the tissue, enabling earlier diagnosis of diseases, as well as the identification and characterization of potential biomarkers of disease.

Key words: MALDI *Imaging*, proteomic analysis and glioblastoma multiforme

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Análise proteômica.....	11
2.2. Espectrometria de massas.....	12
2.3. MALDI (<i>Matrix Assisted Laser Desorption</i>).....	14
2.4. MALDI Imaging.....	18
2.4.1. Automação ou <i>microspotting</i>	22
2.5. Câncer.....	27
2.5.1. Glioblastoma Multiforme (GBM).....	28
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Obtenção dos tecidos.....	33
4.2. Histoquímica.....	33
4.3. Digestão das proteínas presentes no tecido.....	34
4.4. MALDI <i>Imaging</i>	34
4.5. Identificação das proteínas.....	34
4.6. Análise das imagens.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Impressora química ChIP-1000.....	36
5.1.1. <i>Software</i> ChIP-1000.....	39
5.1.2. LaunchPad ChIP Imaging <i>Experiment</i>	46
5.1.3. <i>Biomap</i>	50
5.2. Análise histoquímica de Glioblastoma Multiforme.....	56

5.3. Espotagem automática.....	57
5.4. Análise em MALDI ToF-ToF.....	59
5.5. Obtenção da imagem molecular da secção de Glioblastoma Multiforme.....	60
5.6. Identificação de proteínas.....	69
5.7. Considerações finais.....	87
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

1. Introdução

O Proteoma é a interação entre genes, proteínas e uma determinada condição fisiológica, farmacológica e/ou patológica de um determinado tecido em um momento específico de seu desenvolvimento. Por essa razão, a análise proteômica contribui diretamente para a identificação de alvos protéicos, contra os quais podem ser desenvolvidos medicamentos em potenciais para uso terapêutico. Nessa abordagem proteômica, uma combinação de métodos sofisticados como eletroforese bidimensional, técnicas de cromatografia, análises de imagens e espectrometria de massas são utilizados, os quais possibilitam uma eficiente identificação e caracterização das proteínas presentes nas amostras que são submetidas à essa avaliação molecular.

Por se tratar de misturas muito complexas, várias técnicas analíticas de separação de alta resolução são empregadas juntamente com métodos de detecção com elevada sensibilidade. A espectrometria de massa (MS) é uma dessas técnicas de alta resolução, que vem contribuindo de forma significativa com os avanços nos estudos de proteínas, sendo uma das técnicas mais utilizadas na identificação e caracterização de alvos moleculares. Portanto, ela se tornou indispensável à estratégia de análise proteômica.

Ultimamente, a espectrometria de massas do tipo MALDI vem sendo utilizada para a obtenção de perfis protéicos totais e para a obtenção de imagens moleculares de proteínas diretamente de cortes de tecidos, uma vez que os estudos de importantes compostos moleculares, presentes em baixa abundância em alguns tecidos, tem sido um desafio para as análises proteômicas clássicas. Esses estudos são desafiadores, uma vez, que o grau de complexidade de um proteoma e a baixa abundância de algumas proteínas, exigem elevada sensibilidade analítica dos equipamentos requeridos para suas análises. Diante disso, a tecnologia MALDI *Imaging* (MSI) surge como uma aplicação da espectrometria de massas voltada para a análise química de tecidos intactos. Desta forma, os avanços na espectrometria de

massas do tipo MALDI vêm sendo obtidos pela integração da histologia, com os melhores métodos de automação e os principais instrumentos de análise de dados.

Esta nova abordagem de espectrometria de massas vem se tornando essencial para analisar a distribuição espacial de peptídeos e proteínas ao longo de cortes de tecidos intactos, proporcionando um maior número de dados em um tempo mínimo de manipulação e preparação da amostra. Considerando suas inúmeras aplicações, a técnica de MSI apresenta um elevado potencial analítico, se tornando uma ferramenta indispensável em uma análise investigativa direta.

Dentre as diversas aplicações do MALDI *Imaging*, pode-se citar a caracterização de proteínas ou peptídeos como biomarcadores em potenciais de histopatologias e/ou investigações de produtos naturais; os diagnósticos clínicos, a constatação precoce de doenças; a seleção de terapias com base em características individuais do paciente e a avaliação em tempo real da eficácia terapêutica e da toxicidade de intervenções clínicas específicas. Além disso, esta tecnologia tem a vantagem de permitir que compostos de baixa massa molecular, tais como drogas e metabolitos em geral, possam ser visualizados, tornando evidentes, se possíveis alterações concomitantes de proteínas em tecidos específicos acontecem, após a administração de drogas sistêmicas.

Em combinação com rápidos avanços da informática e da velocidade no desenvolvimento de instrumentação específica, no processamento de dados, , tem se tornado possível adquirir perfis proteômicos com elevado grau de precisão e informação em uma secção de tumor dentro de um prazo extremamente curto de trabalho.

Dessa forma, a aplicação de uma estratégia proteômica utilizando abordagens sofisticadas como o MALDI *Imaging*, tem possibilitado um estudo protéico de diferentes regiões de tumores, proporcionando uma correlação dos diferentes perfis de expressão de proteínas e uma avaliação das diferenças entre graus histopatológicos da doença. No presente estudo, realizou-se a estratégia de MALDI *Imaging* para a obtenção do perfil protéico do tumor Glioblastoma Multiforme, a qual pode revelar a presença de muitas proteínas relacionadas com a estrutura e organização celular e também, relacionadas com o desenvolvimento da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Análise proteômica

O termo “proteoma” foi descrito como “todas as proteínas expressas em um genoma ou tecido” (WILKINS *et al.*, 1997). No entanto, sabe-se que essa definição não é totalmente correta, pois o proteoma é o perfil protéico de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento do sistema biológico, uma vez que o sistema está expressando um complemento protéico que reflete todas suas interações com o meio num momento específico (PENNINGTON *et al.*, 1997).

A proteômica é a ligação entre genes, proteínas e uma determinada condição fisiológica, farmacológica e/ou patológica. Qualquer proteína pode existir em múltiplas formas em uma célula ou em células diferentes. Modificações ocorridas podem ser oriundas de processos traducionais e/ou pós-traducionais, processos regulatórios e de degradações que afetam a estrutura da proteína, destinação celular (localização) e função (LIEBLER, 2002). Trata-se, portanto, de uma técnica complementar a genômica, pois ela se concentra nos produtos gênicos, os quais são agentes ativos nas células. Por essa razão, a proteômica contribui diretamente para a identificação de alvos protéicos, contra os quais podem ser desenvolvidas drogas de uso terapêutico (PANDEY *et al.*, 2000). Utiliza uma combinação de métodos sofisticados como eletroforese bidimensional, técnicas de cromatografia, análises de imagens e espectrometria de massas, que possibilitam uma oportunidade maior de exhibir e identificar proteínas (XIANG *et al.*, 2004; CANELLE *et al.*, 2005).

A proteômica diferencia-se da química de proteínas tradicional por ser o estudo de sistemas de múltiplas proteínas. As análises são direcionadas às misturas complexas e suas identificações não são realizadas pela análise completa da seqüência da proteína, mas por análises de seqüências parciais, com o auxílio de ferramentas de bioinformática. O contexto do proteoma é o estudo das proteínas de um sistema biológico, associado à caracterização das respostas moleculares desse

sistema num determinado momento (PLEBANI, 2005). Nos últimos anos, a engenharia proteômica tem desenvolvido microtécnicas que possibilitam a caracterização molecular de componentes bioativos, presentes em diferentes tipos de células, tecidos, extratos e/ou fluidos corporais (HEINE, 1997; RESING *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000).

Dentre as principais aplicações da análise proteômica estão: 1) Proteoma de expressão de proteínas, que estuda a expressão de proteínas quando o sistema biológico é exposto a drogas ou estímulos físicos, além de identificar novas proteínas como marcadores específicos de doenças; 2) Proteoma estrutural, no qual o principal objetivo é mapear a estrutura de complexos protéicos e interação entre proteínas; 3) Proteoma funcional, o qual estuda as interações entre proteínas e entre proteínas e/ou outras moléculas tendo como função determinar quais proteínas interagem em sistemas organizados e qual a função das mesmas; 4) Proteoma de mapeamento das modificações de proteínas, o qual envolve a identificação de como e onde as proteínas são modificadas, estabelecendo a natureza das modificações pós-traducionais e 5) Proteoma qualitativo, o qual identifica todas as proteínas do sistema biológico em estudo, a fim de compreender os mecanismos de ação dessas proteínas no organismo em estudo (PLEBANI, 2005).

A abordagem proteômica utiliza uma combinação de métodos sofisticados como eletroforese bidimensional, técnicas de cromatografia, análises de imagens e espectrometria de massas, que possibilitam uma oportunidade maior de exibir e identificar proteínas (CANELLE *et al.*, 2005). No entanto, o estudo de importantes compostos moleculares presentes em baixa abundância em alguns tecidos, é um desafio para as análises proteômicas clássicas. Uma análise mais exploratória exige a investigação de pequenas regiões de um tecido ou de um grupo de células. Sendo assim, o desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging* (MSI) torna-se imprescindível para esse tipo de análise, proporcionando uma análise diretamente no tecido de alvo de estudo.

2.2. Espectrometria de massas

A análise proteômica é uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente métodos e abordagens químicas, biológicas e de informática. O sinergismo oriundo dessa interdisciplinaridade faz-se necessário, uma vez que,

determina o conjunto de proteínas presentes em uma amostra muitas vezes não é o suficiente, mas também, caracterizar as inúmeras e comumente presentes isoformas das proteínas, produtos de modificações pós-traducionais sofridas pelas mesmas e a interação entre as proteínas presentes em um tecido (TYERS, 2003; AEBERSOLD, 2003). Devidamente dimensionada a complexidade do assunto, a espectrometria de massas (MS) emerge como uma tecnologia indispensável para a interpretação da informação codificada pelos genes, ou seja, o perfil proteômico presente numa amostra biológica. Uma das forças que vem impulsionando a proteômica é a habilidade de usar os dados de espectrometria de massas inerentes a peptídeos para identificar proteínas em bancos de dados e, para isso, dois tipos de resultados são usados. O primeiro usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF), enquanto que o segundo faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados (SADYGOV, 2004).

A base da espectrometria de massas é a produção de íons a partir de compostos neutros e, particularmente nos campos da química e bioquímica, a investigação da decomposição subsequente destes íons. Além disso, podemos considerar a espectrometria de massas como sendo o nome dado à manipulação de trajetórias iônicas, tanto para regiões com campos (elétrico e/ou magnético), quanto para regiões livres de campo, com intuito de se caracterizar uma determinada amostra (JOHNSTONE, *et al.*, 1996).

A espectrometria de massa é um poderoso método analítico que tem sido empregado amplamente no estudo de proteínas por ser um método de determinação precisa de massas molares de forma muito precisa em experimentos rápidos (CUNHA, 2006). Essas informações possibilitam a resolução de diversos problemas na química de proteínas, como correção de uma sequência de aminoácidos, identificação de proteínas, determinação da fidelidade e homogeneidade de proteínas recombinantes, identificação de complexos protéicos não-covalentes, detecção de doenças genéticas, identificação de modificações químicas em proteínas, determinação de glicosilações e fosforilações, seqüenciamento de proteínas e peptídios, entre outros. Também são realizadas aplicações envolvendo análises de carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (HOFFMAN, 1996).

A espectrometria de massas não é uma técnica recente, ela teve seu início em 1886 com a descoberta do íon positivo por Goldstein. O primeiro espectro de

massas foi obtido por Thomson, em 1912, e o primeiro espectrômetro foi desenvolvido por Dempster em 1918, a partir desta data vários tipos de espectrômetros foram desenvolvidos, mas o grande avanço da espectrometria de massas no campo biológico ocorreu a partir da década de 80 com o desenvolvimento das técnicas MALDI e ESI por Hillenkamp e Fenn respectivamente (GOLDSTEIN, 1886; JOHNSTONE, *et al.*, 1996).

Um espectrômetro de massas é composto de cinco componentes principais: sistema de injeção de amostra, fonte de íons, analisador de massas, detector e processador de sinais (Figura 1).

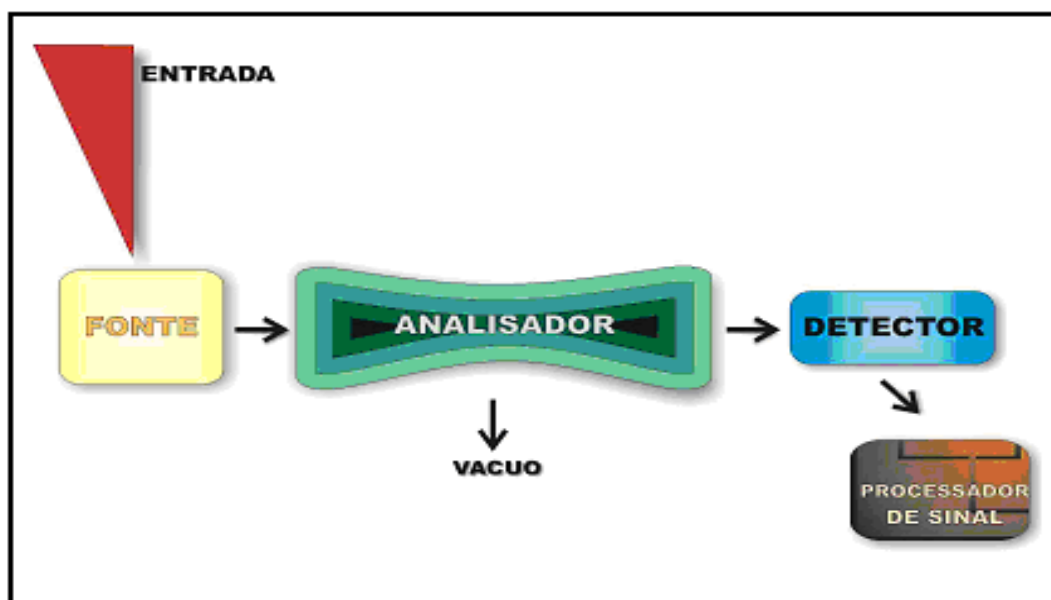


Figura 1: Principais partes que compõem um espectrômetro de massas.

2.3. MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption)

A técnica MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*) foi criada com a finalidade de se obter um método de ionização suave que permite a análise de biomoléculas como proteínas e peptídeos, preservando a estrutura polipeptídica. É um método que produz vaporização e ionização de macromoléculas biológicas não voláteis direto de uma fase sólida para uma fase gasosa. O analito é misturado com uma matriz ácida, a qual geralmente é constituída de compostos orgânicos aromáticos de baixa massa molecular, que co-cristalizam com o analito. A matriz absorve a energia do comprimento de onda do feixe de laser, essa energia absorvida pelas moléculas da matriz é transferida para o analito que inicialmente é

“desabsorvido”. A matriz ácida transfere prótons para as moléculas do analito fazendo com que fiquem ionizadas positivamente (CANTÚ *et al.*, 2008).

As moléculas de analito passam para fase gasosa e expandem a nuvem de material. Estar na forma ionizada e no estado gasoso é condição para que uma molécula possa ser analisada por espectrometria de massas. Mecanismos paralelos levam a um aumento do número de espécies ionizadas com uma única carga (Figura 2).

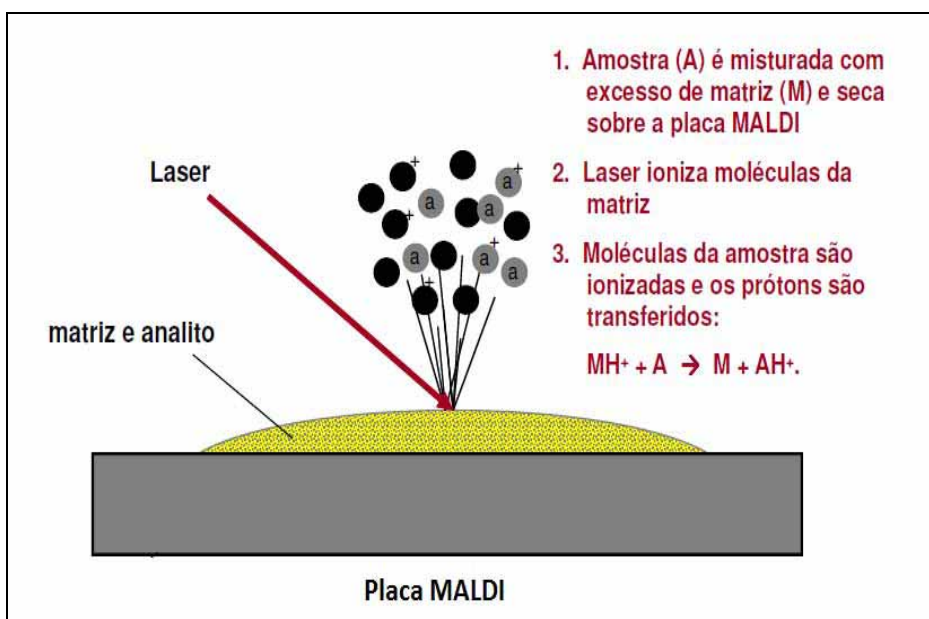


Figura 2: Ionização do tipo MALDI.

Durante a preparação das amostras para as análises, a matriz e o analito são misturados e o solvente desta solução é vaporizado da sonda onde as amostras são depositadas. Após a preparação, a amostra é introduzida no espectrômetro de massas e a irradiação laser é utilizada como fonte de dessorção e ionização na técnica MALDI. A matriz desempenha um papel importante ao proteger o analito de degradação transferindo parte da energia oriunda do laser às macromoléculas, resultando em uma leve ionização, permitindo assim, a detecção numa forma intacta. Quando as moléculas de matriz se desprendem, carregam parte dos analitos ao vácuo, contribuindo para o processo de ionização da amostra (SPENGLER, 2001). A tabela 1 mostra diferentes matrizes que são empregadas nessa abordagem.

Tabela 1: Tipos de matrizes utilizadas para as análises na técnica MALDI.

NOME	ESTRUTURA MOLECULAR	CARACTERÍSTICAS
★ Ácido sinapínico SA	$C_{11}H_{12}O_5$	Proteínas e peptídeos > 10 KDa
★ Ácido cinâmico CHCA	$C_{10}H_7NO_3$	Proteínas e peptídeos < 10 KDa
Ácido gentísico	$C_7H_6O_4$	Moléculas orgânicas
2,4,6 trihidroxiacetofenona	$C_8H_8O_4$	Oligonucleotídeos <3,5 KDa
Ácido hidroxipicolínico	$C_6H_5NO_4$	Oligonucleotídeos >3,5 KDa
Ditranol	$C_{14}H_{10}O_3$	Polímeros sintéticos apolares

* Concentração é tipicamente na faixa de mg/mL (5-10 mg/mL CHCA) ou solução saturada (ácido sinapínico); Razão molar amostra: matriz é tipicamente 1:100 - 1:100000 dependendo da amostra, matriz e solvente; Solventes devem ter pureza grau HPLC e a água deve ser deionizada; Modo positivo: matriz deve ser acidificada usando TFA ou FA; Solução deve ser mantida a baixa temperatura e evitar contato direto da luz; Matriz deve ser preparada diariamente ou semanalmente.

Após a ionização da amostra, a mesma é direcionada para um analisador de massa. Os analisadores de massa têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações massa/carga (m/z), porém, possuem características diferentes, tais como: intervalo de m/z , precisão e resolução de massas que podem ser alcançados. A compatibilidade dos diferentes tipos de analisadores aos diferentes métodos de ionização pode variar muito (CUNHA *et. al* 2006).

O analisador de massa associado à técnica MALDI é conhecido como Tempo de voo – ToF (*Time-of-Flight*), sistema em que as moléculas são ionizadas e aceleradas e em seguida projetadas em um tubo sob vácuo campo elétrico para quantificar/medir esse tempo de voo até um detector. Esse tempo de voo é proporcional à massa molar da molécula.

Os analisadores do tipo ToF separam os íons formados na fonte através do uso de diferentes velocidades assumidas por esses íons, após serem acelerados por um potencial de voltagem. A velocidade é dependente da massa do íon, sendo assim, quando uma nuvem de íons é submetida a um potencial, os íons adquirem velocidades diferentes de acordo com suas massas e viajam por uma região de

campo livre e alto vácuo, chegando a um detector em diferentes intervalos de tempo (CANTÚ, *et al.*, 2008).

Sendo assim, a espectrometria de massas é um método analítico que determina a relação m/z dos íons. As moléculas são ionizadas na fonte e aceleradas através de um campo elétrico próximo ao analisador. Na espectrometria de massas do tipo tempo de voo (ToF), o analisador é uma câmara sob vácuo, livre de campo elétrico. Os íons voam através do analisador com a energia cinética obtida da energia potencial do campo elétrico. Se todos os íons obtiverem a mesma energia cinética, aqueles que tiverem menor relação m/z terão maior velocidade que os íons de maior relação m/z . Portanto, na medida em que os íons vão caminhando pelo tubo de voo, vão se separando de forma que os íons de menor m/z chegam primeiro, seguido dos íons com maior m/z . Um detector está posicionado no final do analisador para medir o tempo de chegada de cada íon (Figura 3).

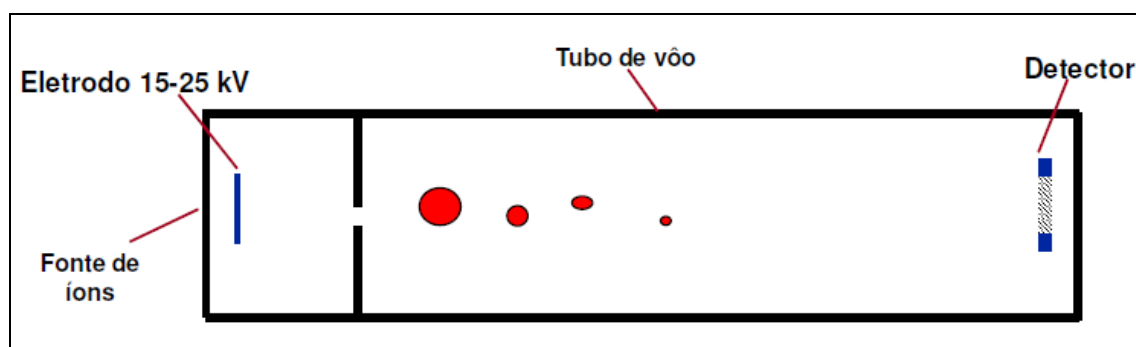


Figura 3: Esquema representativo da separação dos íons dentro do analisador de massa TOF (*Time-of-Flight*).

O detector pode ser considerado como o conversor de íons em arquivos de dados compatíveis com uma estação de trabalho. Os detectores são posicionados no final dos analisadores e fazem a conexão com os processadores de dados ou estação de trabalho. Os tipos mais comuns de detectores são: Fotomultiplicador; Multiplicador de elétrons e Placa de microcanais” (MCP - *Microchannel plate*).

Toda a aquisição e processamento de dados, assim como o controle do espectrômetro, são realizados através de uma estação de trabalho. Após serem detectados, os íons são entendidos como sinais (elétrons) pelo detector, e transformados em sinais analógicos, os quais poderão ser lidos e interpretados pela estação de trabalho. Após serem adquiridos, os resultados obtidos de uma análise

são tratados através de um software que converte estes dados para um formato mais adequado a cada tipo de análise. Esses dados são organizados e transformados em gráficos de intensidade x m/z chamados de espectros de massas.

2.4. MALDI *Imaging*

Existem várias tecnologias disponíveis para analisar proteínas em uma amostra de tecido. A tecnologia mais comumente utilizada é a separação e visualização de proteínas por gel de eletroforese bidimensional (2D) e posterior, identificação por espectrometria de massa e busca de dados via bioinformática proteômica (LAHM & LANGEN, 2000; GODOVAC-ZIMMERMANN & BROWN, 2001). Uma das desvantagens da tecnologia do gel 2D é que a preparação da amostra remove a relação direta entre as regiões morfológicas dos tecidos e a localização de proteínas específicas. Uma solução para este problema é purificar as células a partir de cortes de tecido fino por microdissecção de captura a laser antes da extração de proteínas. Embora esta abordagem tenha sido bem sucedida (CURRAN *et al.*, 2000), a extração de uma quantidade suficiente de material é muito trabalhosa e requer uma grande quantidade de células microdissecadas.

Uma das aplicações recentes da espectrometria de massas do tipo MALDI é a sua utilização para a obtenção de perfis proteômicos e de imagens moleculares de proteínas diretamente de cortes de tecidos (TODD *et al.*, 2001; CHAURAND & CAPRIOLI, 2002; CHAURAND *et al.*, 2004).

O estudo de importantes compostos moleculares, presentes em baixa abundância em alguns tecidos, tem sido um desafio para as análises proteômicas clássicas. Uma análise mais exploratória exige a investigação de pequenas regiões de um tecido ou de um grupo de células. Esses estudos são desafiadores, uma vez que o grau de complexidade do proteoma e a baixa abundância de muitas proteínas exigem elevada sensibilidade analítica. Sendo assim, a tecnologia MALDI *Imaging* (MSI) surge como uma aplicação da espectrometria de massas voltada para a análise química de tecidos intactos. Desta forma, os avanços na espectrometria de massas do tipo MALDI estão sendo obtidos pela integração da área de histologia, com os melhores métodos de automação e os principais instrumentos de análise de dados. Esta ferramenta está se tornando essencial para analisar a distribuição espacial de peptídeos e proteínas ao longo de cortes de tecidos, proporcionando

uma enorme quantidade de dados com um tempo mínimo de preparação da amostra. Considerando suas inúmeras aplicações, a técnica de MSI apresenta um elevado potencial por ser uma ferramenta indispensável em uma análise investigativa direta (CHAURAND & CAPRIOLI, 2002).

A abordagem MALDI *Imaging* pode ser realizada em qualquer substrato, desde que as moléculas sejam suficientemente ionizadas e estejam presentes em quantidades suficientes para serem detectadas. Além disso, a espectrometria de massas de imagens não apenas permite que relatórios sobre a localização de macromoléculas sejam obtidos, mas também fornece informações de massas moleculares e o sequenciamento peptídico das moléculas visualizadas, permitindo dessa forma, a visualização do estado metabólico de um agente terapêutico, por exemplo (FRANCK *et al.*, 2010). Esta ferramenta tem se tornando essencial para analisar a distribuição espacial de peptídeos e proteínas ao longo de cortes de tecidos, proporcionando uma enorme quantidade de dados com um tempo mínimo de preparação da amostra (GROSECLOSE *et al.*, 2007).

Segundo Esquenazi *et al.* (2009), existem duas abordagens principais em que os dados do MSI são adquiridos. As abordagens são de varredura no local ou de varredura contínua. Nos estudos em que se utiliza a varredura local, a seleção dos pontos de amostragem é determinante para a obtenção de bons resultados. Neste caso, a imagem pode ser comparada com a imagem projetada em uma televisão ou monitor, em que cada ponto contém pixels diferentes com informações particulares e quando visto de forma integrada, formam uma imagem. Desta forma, quanto maior o número de pontos, maior é a quantidade de pixels e maior é a resolução da imagem. No caso da técnica, cada ponto rastreado contém uma relação m/z de dados em vez da cor da informação. A varredura contínua, no entanto, é uma alternativa para a abordagem de varredura local e muitas abordagens MSI baseiam-se neste princípio (YOON *et al.*, 2008; JURCHEN *et al.*, 2005).

Embora a espectrometria de massas de imagem tenha investigado as massas moleculares de íons secundários de superfícies sólidas desde 1960 por Raimond Castaing, ela vem sendo aplicada à biologia somente na última década devido ao avanço das técnicas de ionizações brandas. A disponibilidade comercial e o refinamento dos métodos mais comuns utilizados para geração de imagens biológicas (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) e DESI (Desorption Electrospray Ionization), bem como

outras formas de ionização, permitiram a MSI ganhar impulso nos últimos anos (HEEREN *et al.*, 2009; ZIMMERMAN *et al.*, 2008; WISEMAN *et al.*, 2008; BOXER *et al.*, 2009).

Enquanto a maioria das metodologias de espectrometria de massas de imagem desenvolvidas na década passada foi centrada na descoberta de biomarcadores para doenças, as ferramentas desenvolvidas para essa proposta estão se tornando imprescindíveis para a compreensão do metabolismo de agentes terapêuticos, os quais estão se tornando rapidamente uma das principais aplicações da MSI (ESQUENAZI *et al.*, 2009).

As primeiras aplicações da técnica de MALDI *Imaging* foram em estudos neurobiológicos com moluscos da espécie *Lymnaea* (LI *et al.*, 1994; DREISEWERD *et al.*, 1997) e crustáceos. Estes estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos com muito esforço para aperfeiçoar a sensibilidade, a reprodutibilidade, o processamento de dados, a preservação do tecido e, principalmente, no desenvolvimento de softwares para o tratamento das imagens moleculares obtidas (CALDWELL *et al.*, 2005; MADDALO *et al.*, 2005; AERNI *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, a MSI ganhou uma utilização mais ampla, ou seja, além da caracterização de metabólitos, outra preocupação foi a compreensão de propriedades farmacocinéticas (ESQUENAZI *et al.*, 2009). A abordagem MALDI *Imaging* vem sendo aplicada a estudos clínicos, sendo utilizada em diagnósticos baseados em assinaturas de perfis protéicos que complementam a histopatologia, na detecção precoce de doenças, na seleção de combinações terapêuticas com base em características individuais do paciente, incluindo a complexa rede de proteínas específicas, na avaliação em tempo real da eficácia terapêutica e de sua toxicidade, no redirecionamento da terapia baseada em mudanças no paciente doente que podem ser ocasionadas pela rede de proteínas que estão associadas com resistência a medicamentos, e finalmente, na terapia combinatória (FRANCK *et al.*, 2010).

A tecnologia MALDI *Imaging* apresenta algumas vantagens científicas, pois possibilita adquirir as massas moleculares de macromoléculas específicas, não requer reagentes específicos, permite a realização de análises de grandes proteínas acima de 100 kDa, é favorável a protocolos de alto rendimento, adquirindo mais de 1.000 espectros por segundo, com centenas de proteínas monitoradas em um único experimento, e apresenta facilidade na preparação da amostra por ser

relativamente simples (HARDESTY *et al.*, 2008). Além disso, MALDI MSI é complementar com outras estratégias proteômicas como eletroforese bidimensional e análise LCMS/MS, uma vez que estas não nos fornecem informações a cerca da distribuição espacial das macromoléculas presentes em regiões de células no tecido.

O processo consiste em cinco etapas analíticas: (1) a deposição de matriz em pontos específicos do tecido para estabelecer a distribuição de uma ou mais proteínas, segundo suas respectivas massas moleculares na imagem de MALDI-MS; (2) hidrólise ou digestão enzimática de pontos distintos do tecido, onde as proteínas de interesse estão localizadas; (3) aquisição de espectros de massas destes digestos utilizando-se MALDI-MS; (4) análise da seqüência MS/MS e pesquisa em banco de dados, para conseqüente identificação da proteína, e (5) correlação das imagens dos peptídeos gerados (GROSECLOSE *et al.*, 2007).

Para a realização de um procedimento eficiente utilizando a técnica de MALDI *Imaging*, a deposição da matriz é uma etapa extremamente importante, sendo que ela pode ser realizada manualmente ou de forma automática (Figura 4). A maneira mais fácil de depositar a matriz é realizada manualmente com o auxílio de uma micropipeta. Isso permite a preparação rápida do tecido com uma boa extração e co-cristalização dos compostos de interesse. No entanto, pode gerar uma má reprodutibilidade e perda da distribuição espacial das moléculas presentes nos tecidos nesta preparação. Outro método de aplicação da matriz é por aerografia, a qual fornece uma deposição homogênea da matriz sobre a secção de tecido. Isto pode ser obtido manualmente com um spray pneumático (FRANK *et al.*, 2009). Porém, têm-se investido em técnicas automatizadas, as quais permitam uma deposição de matriz e/ou enzima que possa ocorrer de forma homogênea e reprodutível.

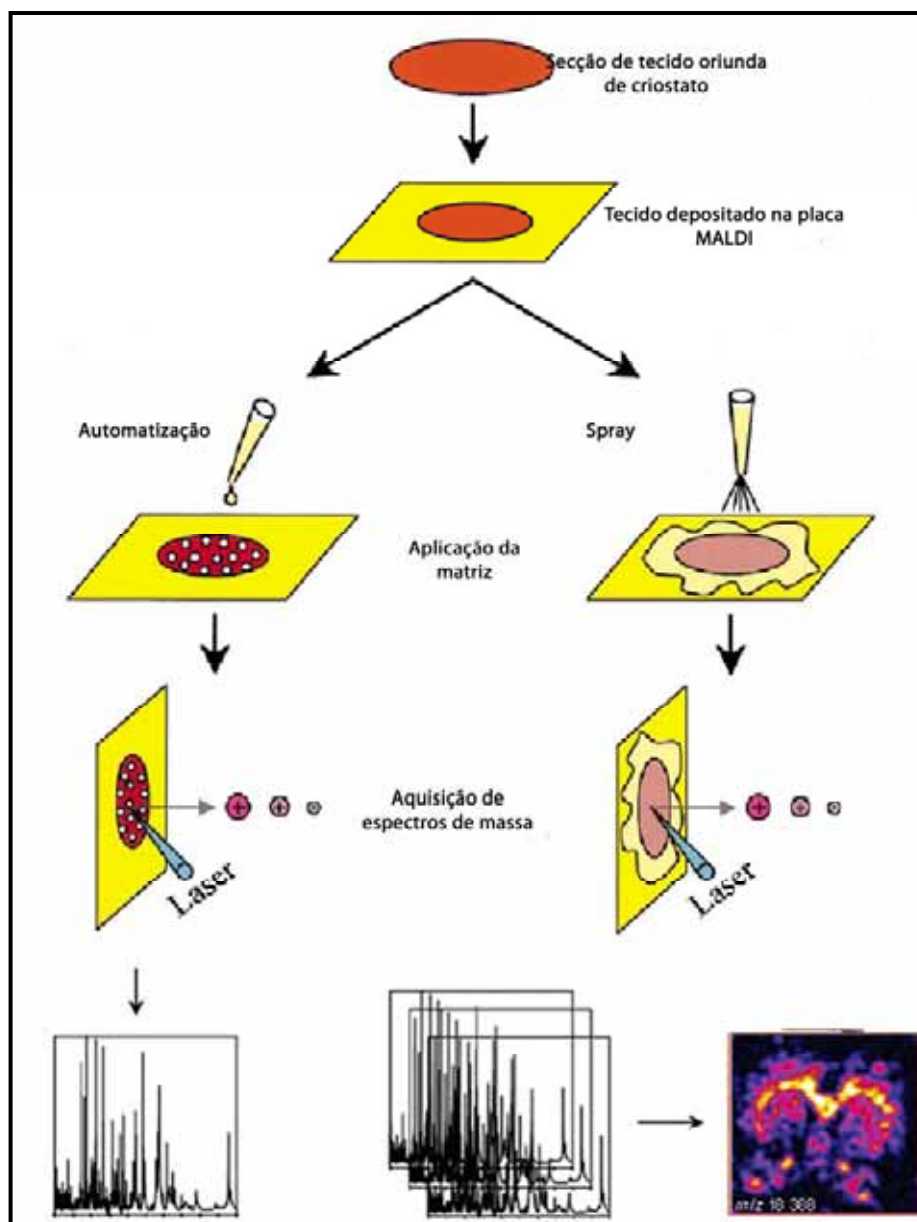


Figura 4 – Deposição de matriz automática ou manual (spray). Modificado de CHAURAND *et al.* 2006.

2.4.1. Automatização ou *microspotting*

A deposição automática (*microspotting*) da matriz é uma das novidades recentes da técnica de MALDI *Imaging*. A automação se tornou uma excelente ferramenta, pois é possível controlar o volume e a localização das soluções de matrizes e enzimas que entrarão em contato com a amostra. Dentre as principais vantagens deste método em relação à deposição manual estão a alta reprodutibilidade de deposição da matriz e a alta qualidade dos espectros que podem ser gerados, graças ao volume de solvente que permite a extração do analito e a incorporação dos cristais da matriz de forma homogênea (FRANK *et al.*, 2009).

O método de deposição, chamado de espotagem ou *microspotting*, permite a criação de um conjunto ordenado de pontos e a deposição de matrizes em locais específicos (Figura 5). Para isto, várias estratégias têm sido desenvolvidas para fornecer uma espotagem eficaz e homogênea (FRANK *et al.*, 2009). Um dos desafios dessa automatização é a utilização de uma impressora química. Como exemplo, pode-se citar a CHIP-1000 (Chemical Inkjet Printer) da empresa SHIMADZU.

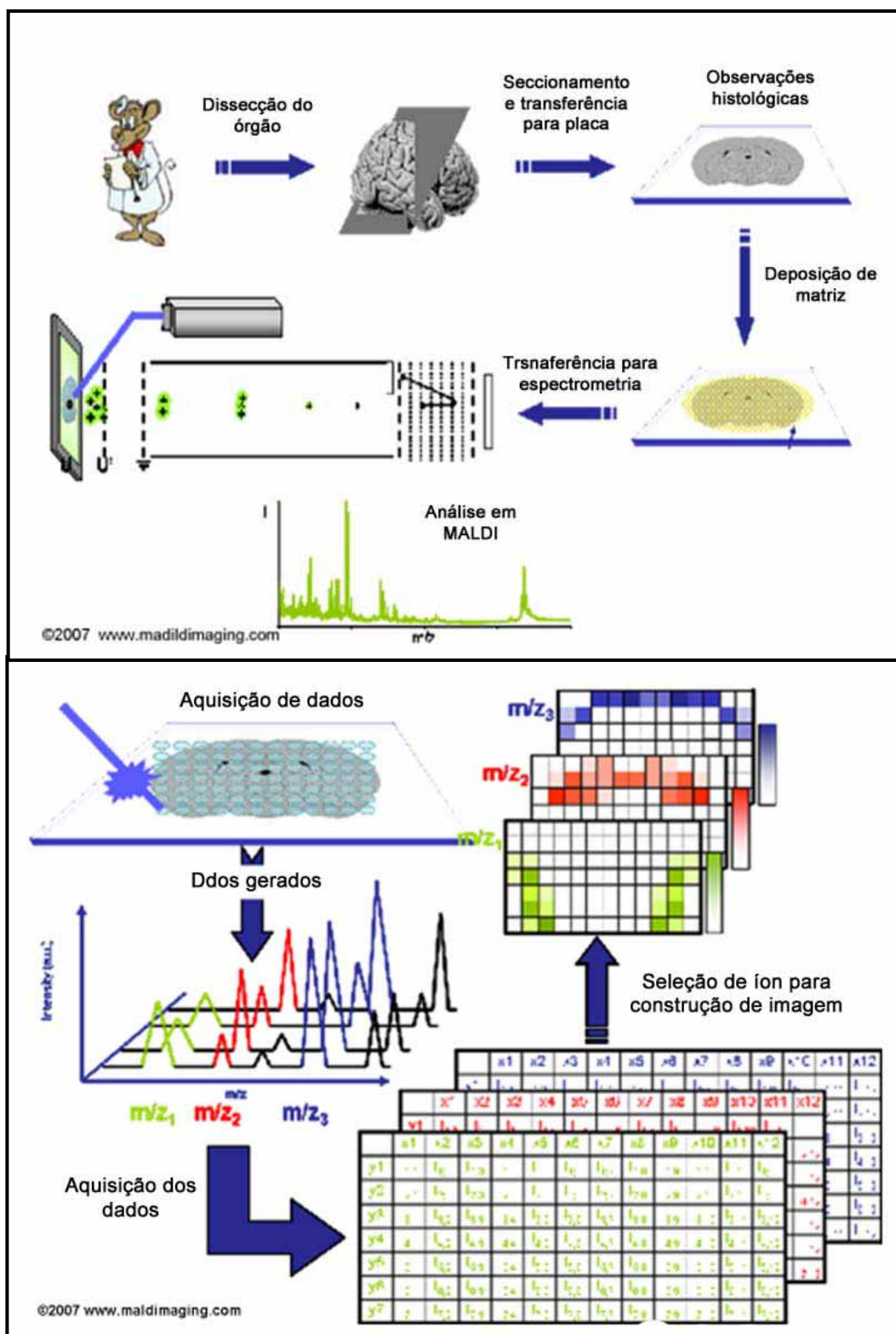


Figura 5 – Estratégia utilizada na técnica de MALDI *Imaging*. Modificado de http://www.univ-lille1.fr/master-proteomique/msi/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=30 (acessado em 29/09/2010)

Este equipamento de impressão tem a função de depositar soluções de matrizes e/ou soluções enzimáticas nos tecidos, que por sua vez são imobilizados numa placa. Esta placa contendo o tecido tratado é levada para o espectrômetro de massas e cada micro região do tecido é analisada. Dos dados moleculares resultantes obtém-se uma imagem molecular bem semelhante à imagem óptica (STAUBER *et al.*, 2010). A composição molecular das diversas microregiões do tecido é analisada, auxiliando o mapeamento e a identificação das proteínas e/ou peptídeos do tecido alvo. Além disso, a técnica oferece a flexibilidade de detecção de moléculas, bem como alta sensibilidade e resolução.

Esta tecnologia tem ainda a vantagem de permitir que compostos de baixa massa molecular, tais como drogas e metabólitos, possam ser visualizados, tornando possível que alterações concomitantes de proteínas em tecidos específicos após a administração de drogas sistêmicas se tornem evidentes (CHAURAND *et al.*, 2006). Sendo assim, a técnica de MALDI *Imaging* tem sido amplamente utilizada por pesquisadores reconhecidos internacionalmente como Richard M. Caprioli, Jonathan V. Sweedler e Michel Salzet em busca de biomarcadores moleculares.

Caprioli *et al.* (2007) identificaram diversas proteínas a partir de secções coronais de cérebro de rato utilizando a técnica de MALDI *Imaging*. Neste estudo, a identificação das proteínas foi obtida com a deposição de matriz ácido sinapínico e também, após a digestão trípica das proteínas e a utilização da matriz DHB. Para a comprovação dos dados gerados, as imagens moleculares foram comparadas com imagens histoquímicas de cortes corados com HE (Hematoxilina-eosina). Os resultados obtidos ratificaram a precisão dessa técnica, onde cada um dos digestos trípticos oriundos da digestão da isoforma da proteína mielina básica resultou em uma imagem molecular (Figura 6). A sobreposição destas imagens confirma a presença da proteína nas diferentes regiões do cérebro do rato, fornecendo informações espaciais e de intensidade relativa destes íons.

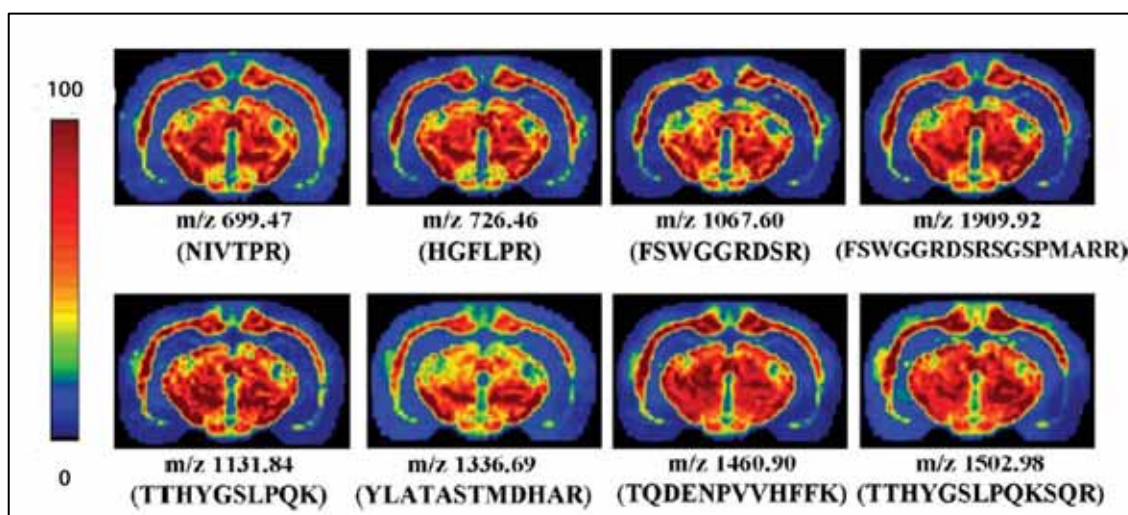


Figura 6 - Imagens dos digestos tripticos gerados através da digestão da isoforma da proteína mielina básica (14.2 kDa). Modificado de Caprioli *et al.* (2007).

Em combinação com rápidos avanços na informática, a MSI oferece alta capacidade analítica por ser um meio de investigação totalmente novo e altamente preciso para analisar um tecido doente. Num contexto mais amplo, os contínuos avanços no desenvolvimento da instrumentação, no processamento de dados, além de uma maior compreensão da patogênese molecular, será possível adquirir perfis proteômicos para uma secção de tumor dentro de um prazo extremamente curto (CHAURAND *et al.*, 2006).

Sabe-se que análises de tecidos incluindo abordagens histomorfológicas e imunohistoquímicas são tradicionalmente utilizadas para elaborar diagnósticos de cânceres ou prever resultados de câncer em pacientes individualmente. Geralmente, os tecidos utilizados nessas abordagens são fixados com formalina e inclusos em parafina (*Formalin fixation and paraffin embedding* - FFPE), pois essa técnica preserva os detalhes celulares, a arquitetura e os dados morfológicos do tecido, os quais são observados durante uma avaliação investigativa pelas técnicas de microscopia. Este processo também estabiliza os tecidos, permitindo estocá-los por longos períodos e em temperatura ambiente. Por essas razões que os arquivos de tecidos têm sido elaborados pela técnica FFPE por diversas décadas, e atualmente, é uma metodologia padrão praticada nos laboratórios de histopatologia mundialmente (MANGÉ *et al.*, 2009). Diante desse aspecto, os tecidos em FFPE são os suplementos arquivados mais abundantes, havendo bibliotecas gigantescas de tecidos provenientes de diversos órgãos com as mais diversas doenças.

No entanto, as análises de espectrometria de massas desses tecidos fixados não eram possíveis devido ao uso de alguns reagentes incompatíveis com a

abordagem proteômica, inclusive o uso da formalina. A formalina facilita a formação de agregados de proteínas, impedindo a execução de procedimentos convencionais de extração de proteínas e as análises subseqüentes (GILLESPIE *et al.*, 2002). Porém, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos, a fim de superar os inconvenientes encontrados nessa interface entre a histologia e a biologia molecular. Algumas estratégias proteômicas baseadas na espectrometria de massas do tipo NanoRPLC-MS/MS (PATEL *et al.*, 2008; BALGLEY *et al.*, 2009) e **MALDI MSI** (LEMAIRE *et al.*, 2007; RONCI *et al.*, 2008; STAUBER *et al.*, 2008; CHAURAND *et al.*, 2008), estão iniciando uma nova era científica por se mostrarem eficientes em suas investigações proteômicas em tecidos fixados em FFPE.

Considerando suas inúmeras aplicações, a técnica de MALDI *Imaging* apresenta um elevado potencial por ser uma ferramenta indispensável em uma análise investigativa direta. Parte dos investimentos realizados nessa técnica visa o aprimoramento da preparação de amostra, da instrumentação, da resolução e, também do desenvolvimento de novos softwares de análises das imagens geradas.

2.5 Câncer

Um câncer pode ser definido como um crescimento desordenado de células (maligno) que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se por outras regiões do corpo. Esse crescimento desordenado é devido à anormalidades em genes que controlam a proliferação celular levando dessa forma, ao crescimento desenfreado que caracteriza as células malignas. Assim, para ganhar a iniciativa na detecção e tratamento do câncer, os oncologistas devem começar a compreender as raízes moleculares da doença.

A biologia molecular já desempenha um importante papel na oncologia clínica, a partir da análise dos tumores de informações de prognóstico ou patogênicos para a produção de agentes farmacológicos, tais como fatores estimuladores de colônias (QCA), interleucinas (ILs), e eritropoietina (POLYAK & RIGGINS, 2001).

Nessa perspectiva, a proteômica possui um grande potencial para integrar um fenótipo molecular em protocolos de diagnóstico de uma patologia. Desde que a soma das alterações temporais em termos de proteínas reflita o estado da doença, nomeadamente, as proteínas representam um conjunto de potenciais marcadores tumorais e alvos específicos de drogas (CATALONA *et al.*, 1994).

Como em todos os outros aspectos da medicina e da pesquisa clínica, o rápido aparecimento da genômica e da proteômica e a tecnologia da informação estão transformando as abordagens experimentais e as aplicações de marcadores tumorais. Começando com a biologia molecular utilizada para a análise do genoma humano, os últimos anos viram a explosão da genética e da proteômica e a aplicação destes perfis, da transcrição do genoma, para a descoberta rápida e para a avaliação de novos marcadores de tumores (LANDER *et al.*, 2001).

A análise do câncer de mama por meio de 2D-SDS-PAGE acoplada a espectrometria de massas e a bioinformática para identificação de proteínas, levaram à identificação de novos marcadores moleculares em câncer de mama, onde proteínas sinalizadoras e complexos mecanismos de sinalização envolvidos no crescimento do tumor (HONDERMARCK *et al.*, 2001) foram encontradas. Essas tecnologias, utilizadas em conjunto com ensaios de imunodetecção utilizando soro de pacientes sensibilizados, também têm revelado a existência de marcadores tumorais, definidos pela resposta imune do hospedeiro (BRICHORY *et al.*, 2001; LE NAOUR *et al.*, 2001).

Portanto, pode-se constatar que a combinação de tecnologias que permite uma reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, vem proporcionar um método novo e eficiente na geração de perfis de expressão de proteínas do utilitário de diagnóstico clínico para a descoberta de novos marcadores da doença. Sendo assim, o desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging* deverá contribuir significativamente com os avanços das pesquisas já realizadas, ao permitir que seja elaborada uma análise proteômica de diversos tipos de tumores diretamente nos tecidos alvos de estudos.

2.5.1. Glioblastoma Multiforme

O Glioblastoma Multiforme ou GBM é a forma de tumor maligno mais comum no cérebro humano. Geralmente, ele ocorre entre a quarta e a sexta década de vida do paciente (idade média de 55 anos), tendo um melhor prognóstico nos pacientes mais jovens quando comparamos estes com pacientes idosos. Menos de 10% dos casos ocorrem em crianças; a sobrevivência média global de pacientes com GBM é de aproximadamente 10 a 12 meses, sendo duas vezes mais comuns em brancos do que em negros, e surgem mais frequentemente nos lobos temporais (32%) e frontais (31%), sendo letal na maioria dos casos.

Possui uma incidência anual de 25.000 casos nos Estados Unidos com uma estimativa de 2.5% de causa de morte por câncer, sendo assim, requer uma alta prioridade de estudos entre pesquisadores e clínicos (DAVIS *et al.*, 2001). Os sintomas de apresentação da doença incluem dores de cabeça, convulsões ou déficits neurológicos focais.

O comportamento invasivo é a marca patológica dos gliomas malignos. As células neurais estaminais são móveis, sendo atraídas para as regiões de lesão cerebral, e podem migrar consideráveis distâncias para chegar a uma região de glioma. No entanto, a base molecular da progressão do gliotropismo para gliomas malignos ainda é pouco compreendida (BLACK, 1998).

O tumor geralmente é visto como uma lesão focal, embora freqüentemente se estenda por todo o trato da matéria branca do corpo caloso para o hemisfério contralateral, dando assim, a aparência da chamada "borboleta GBM", ou pode até mesmo aparecer como multifocal devido à infiltração difusa do cérebro por células gliais neoplásicas (DAVIS *et al.*, 1999).

Como o nome sugere, GBM possui uma aparência variada microscopicamente. É um tumor de caráter altamente pleomórfico, núcleo basofílico e fronteiras indistintas. Quantidades variáveis de mitoses, necrose e proliferação capilar endotelial são comuns (DAVIS *et al.*, 2001).

Esse tipo de tumor responde mal às terapias convencionais. Células de glioblastoma proliferam-se, apesar de um suprimento de sangue irregular e um microambiente hipóxico. Os mecanismos de compensação, incluindo a captação de glicose e a atividade glicolítica aumentam nestes tumores (ALBINI & BENELLI, 2007). Estudos anteriores têm demonstrado que, as células de glioblastoma possuem capacidade glicolítica suficiente para apoiar a migração das células tumorais sem a participação mitocondrial (CAUWE *et al.*, 2007). A glicólise é suprimida por ácidos metabólicos, incluindo o ácido cítrico, que é excluído das mitocôndrias durante a hipóxia (GROVAS *et al.*, 1997).

A dissecação cirúrgica completa do GBM é muito difícil, sendo que, os tumores geralmente se repetem no intervalo de um ano de radiação e quimioterapia, independentemente da resposta inicial a essas modalidades de tratamento. Uma abordagem tradicional para o estudo dos GBMs foi criada em 1933 por Russell e Bland (BROWN & GIAVAZZI, 1995), que criaram as culturas de explantes de tumores removidos cirurgicamente para padrões de estudo "*in vitro*" do crescimento

do tumor. Com as técnicas disponíveis, culturas de células de espécimes cirúrgicos foram difíceis de criar e manter. Em 1968, quando Ponten *et al.* estabeleceram um conjunto de linhas de células de glioma, a comunidade científica obteve um método padrão e unificado para estudar gliomas *in vitro* (CAUWE *et al.*, 2007). Um número de linhagens celulares derivadas de gliomas malignos está agora comercialmente disponível e tornou-se essencial para a investigação sobre a patogênese dos GBMs (CHELLI *et al.*, 2004). Muito do conhecimento das características moleculares de GBMs foi gerado por meio da análise dessas linhagens celulares.

No que se refere à tratamentos, os agentes alquilantes são os agentes quimioterápicos mais utilizados. Entre os compostos quimioterápicos, a temozolomida (TMZ), um agente alquilante citotóxico, tem mostrado atividade eficaz (BRADA *et al.*, 1999; CONRAD *et al.*, 1995; HIROSE *et al.*, 2001; LEVIN *et al.*, 2001), sendo capaz de atrasar a progressão do tumor e prolongar a sobrevivência do paciente. No entanto, muitos pacientes desenvolvem resistência a essas drogas, o tumor retorna e, normalmente, só sobrevivem 12-15 meses após o diagnóstico. Nos últimos anos, a combinação de terapias provou ser mais eficaz no tratamento de uma ampla variedade de cânceres humanos agressivos, incluindo os gliomas. Em particular, os estudos pré-clínicos têm avaliado a combinação de TMZ com outros agentes quimioterápicos, radiação ou ambos no tratamento padrão de recém-diagnosticados e gliomas malignos recorrentes (DEHDASHTI *et al.*, 2006; VIRREY *et al.*, 2009).

A metástase, um fenômeno bem conhecido da disseminação de células tumorais, é basicamente um processo mecânico, que é dirigido passivamente como resultado de restrições de tamanho, ou ocorre como consequência de um ambiente fértil propiciado pelo órgão no qual as células tumorais podem se proliferar (ALBINI & BENELLI, 2007). Além disso, metástases cerebrais são conhecidas por serem dependentes de múltiplas células e interações célula-matriz, que permitem que células tumorais se destaquem do tumor primário, e transmigrem para todo o revestimento endotelial no tecido parenquimático e, finalmente, em tumores, assumindo uma forma secundária (CONRAD *et al.*, 1995).

A compreensão das diferentes características biológicas destas subpopulações de células heterogêneas dentro do tumor apresenta um valor inestimável na medida em que se pode fornecer não só metas e pistas sobre a patogênese do tumor, mas também potenciais formas para o tratamento.

Esforços têm sido realizados para explorar a ultra-estrutura e a base molecular da heterogeneidade utilizando-se diferentes métodos experimentais (GIESE *et al.*, 2003). Os estudos já realizados sobre o tema foram baseados em análises citogenéticas (GIESE *et al.*, 2003; DEHDASHTI *et al.*, 2006). Porém, a análise proteômica apresenta vantagens sobre as análises genéticas, porque normalmente, genes mutados podem não ser transcritos por um grande número de razões epigenéticas e as modificações pós-traducionais de proteínas que alteram a estrutura e a função são reveladas com a proteômica, mas não com a genômica (PAWELETZ *et al.*, 2000). No entanto, a relação entre os marcadores moleculares e as regiões específicas do tumor dentro dos glioblastomas ainda é pouco compreendida (CAUWE *et al.*, 2007).

Dessa forma, a aplicação de uma estratégia proteômica utilizando técnicas sofisticadas como MALDI *Imaging* possibilita um estudo das diferentes regiões do tecido tumoral. Krafft *et al.* (2006) realizaram estudo correlacionando diferentes perfis de expressão de proteínas com as regiões de diferentes graus histológicos do glioblastoma (grau I a IV). No presente estudo, foi realizada uma investigação de uma secção de glioblastoma multiforme a fim de, identificar e compreender a distribuição espacial de proteínas relacionadas com a organização celular e a patologia. A compreensão dos mecanismos de proliferação e desenvolvimento do tumor é fundamental para o aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos e para o tratamento dos pacientes em potencial.

3. OBJETIVOS

Considerando as inúmeras aplicações da estratégia de MALDI *Imaging*, MALDI MSI apresenta tem se tornado uma ferramenta indispensável em uma análise investigativa. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram:

- a) Identificar e analisar a distribuição espacial de proteínas presentes em tecido de Glioblastoma Multiforme (*Homo sapiens sapiens*);
- b) O desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging* visando uma melhor compreensão dos processos biológicos relacionados com a patologia;
- c) A formação de recursos humanos na área de Análise Proteômica com ênfase em uma tecnologia inovadora como o MALDI MSI.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos tecidos e suas preparações

Para o desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging* foram utilizados tecidos de glioblastoma multiforme (GBM) cedidos pelo Prof. Dr José César Rosa do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

Os tecidos foram seccionados utilizando-se um micrótomo por congelamento para a aquisição de cortes de 10-15 µm de espessura. Cortes subsequentes foram analisados pela técnica histoquímica e por MALDI *Imaging*, os quais foram posicionados sobre uma placa metálica (TO-487, Kratos). Os cortes foram fixados em álcool 70% (v/v) e 90%(v/v), respectivamente, durante um minuto em cada solução. Este procedimento possibilitou a eliminação de sais e lipídeos presentes nas amostras (SEELEY *et al.*, 2008).

4.2 . Histoquímica

A coloração com hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para comparação do método histoquímico com a técnica de MALDI *Imaging* e para a interpretação dos dados gerados.

As lâminas foram submersas em etanol 95%(v/v) por vinte minutos, lavadas com água corrente sem deixar que o material se soltasse da lâmina e, em seguida, foram submetidas em Hematoxilina por 20 segundos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas com água corrente deixando descansar em água destilada por aproximadamente 5 minutos. As mesmas foram então submetidas em Eosina por mais 20 segundos e lavadas com água destilada corrente. Ao final do processo, as lâminas foram submetidas a uma bateria de etanol 95% (v/v) I, II, III, VI e V para a remoção do o excesso de corante e em Xilol I, II e III para montagem das lâminas.

4.3. Digestão das proteínas presentes no tecido

A enzima proteolítica tripsina foi depositada automaticamente sobre os tecidos por meio da impressora química ChIP-1000 (Shimadzu). Um volume de 20 nL de solução contendo 20 mg/mL de tripsina em 20 mM de tampão NH_4HCO_3 (pH 8,0) foi aplicado em cada ponto da spotagem, os quais apresentaram espaçamento de 250 μm de centro a centro, sendo que 100 pL da solução de enzima foram depositados em cada ponto por ciclo. A secção de tecido foi então incubada por 2 horas em uma atmosfera úmida a 37 °C.

4.4. MALDI *Imaging* dos digestos tripticos

Para as análises dos digestos tripticos, foi utilizada uma solução de matriz contendo 10 mg/mL de ácido cinâmico (CHCA) em solução acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v). O volume total de 20 nL de matriz foi aplicado nos mesmos pontos projetados anteriormente, quando um arquivo de coordenadas foram gerados durante o experimento de digestão das proteínas.

Os espectros de MALDI MS foram obtidos no modo *reflectron* positivo por um MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu) equipado com um laser SmartBeam controlado pelo software Launchpad v2.8 (Shimadzu).

4.5. Identificação das proteínas

Os bancos de dados são ferramentas valiosas e de fundamental importância na bioinformática proteômica, tanto no auxílio durante a identificação de moléculas quanto no armazenamento das informações biológicas provindas de experimentações de bancada. É possível citar dois dos principais recursos de dados on-line, o *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000), Swissprot (www.uniprot.org) e o *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A ferramenta de bioinformática utilizada no presente estudo foi o MASCOT (www.matrixscience.com), com os seguintes parâmetros: bancos de dados de sequência primária SwissProt + TrEMBL, clivagens perdidas = 1; tolerância de massa do peptídeo = 0.4 Da; modificação variável: foi considerado a oxidação da metionina, porque se utilizou um ambiente oxidativo durante a preparação da amostra.

4.6. Análise das imagens

As imagens moleculares obtidas foram reconstruídas utilizando-se o software Biomap versão 3.7.5.2 (Novartis Institutes, Biomedical Research) disponível em <http://www.maldi-msi.org>. As relações massa/carga que viabilizaram a identificação das proteínas no Mascot foram utilizadas para a reconstrução das imagens, gerando um mapa de densidade de distribuição para cada relação massa/carga. A sobreposição das imagens (uma para cada relação massa/carga) ratifica a localização das proteínas presentes nos tecidos em estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Impressora química ChIP-1000 (Shimadzu)

A compreensão da funcionalidade e composição do equipamento e de como operar o software que gerencia o mesmo é extremamente importante para que as aplicações sejam otimizadas. A Figura 7 descreve a ChIP-1000, a impressora química que foi utilizada no presente trabalho.

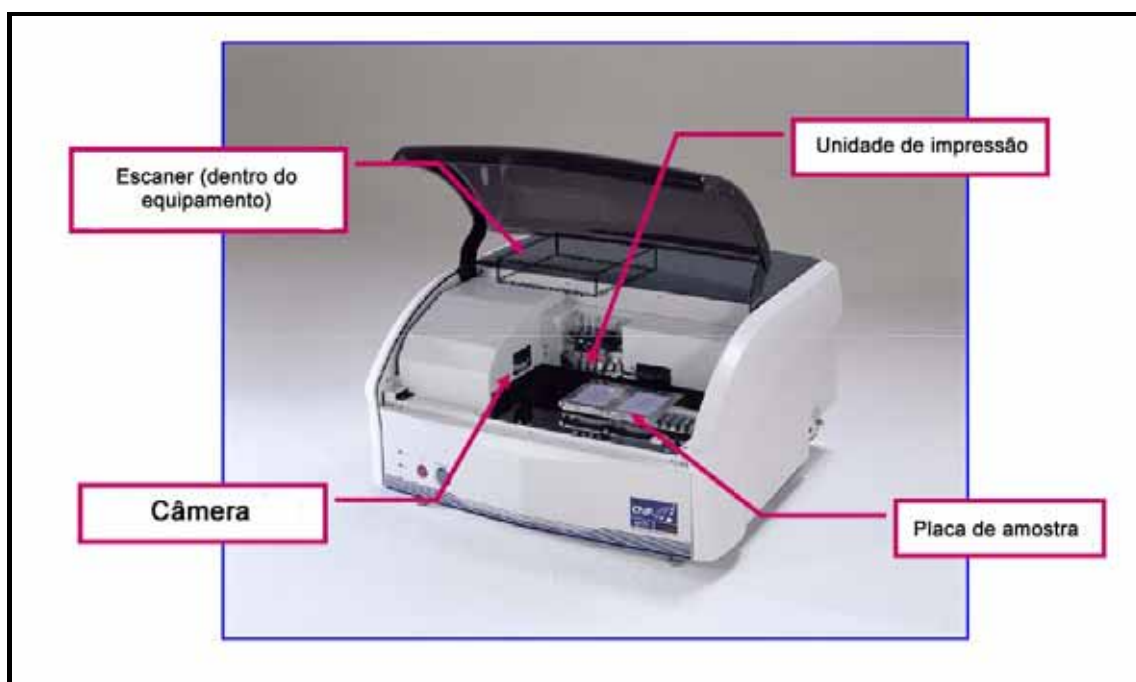


Figura 7 – ChIP-1000 (Shimadzu) utilizada no presente trabalho, a qual é composta por um escaner, uma unidade de impressão, uma câmera e um suporte onde a placa contendo as amostras é introduza.

Esta impressora é uma unidade essencial para o pré-tratamento proteômico, pois imprime/dispensa volumes em nível de picolitros em pequenas regiões, exatamente como as impressoras tradicionais tipo jato de tinta realizam. Impressões exatas de uma matriz possibilitam análises diretas e rápidas em MALDI-ToF-ToF, possibilitando tratamentos químicos, utilizando enzimas ou anticorpos bioquímicos

em membranas para a identificação ou análise de proteínas, além de possibilitar a análise de tecidos *in situ*. Dentro deste contexto, pode-se listar as seguintes vantagens oferecidas por este equipamento:

- a dispensa de reagentes em volumes na escala de picolitros em microregiões do tecido, os quais podem apresentar diâmetros de 100 μm ;
- os pré-tratamentos de uma única área da amostra estudada na presença de diferentes reagentes, a qual pode se apresentar imobilizada em membranas de PVDF ou diretamente em tecidos;
- as análises de *Finger Print* (PMF) mais eficientes do que as tradicionais após digestões enzimáticas, extrações e dessalinizações *in-gel*;
- Membranas e tecidos tratados podem ser analisadas diretamente com os espectrômetros MALDI – ToF-ToF (AXIMA, Shimadzu).

Na Figura 8, o sistema dispensador de soluções da impressora química ChiP-1000 (Shimadzu) pode ser observado com detalhes.

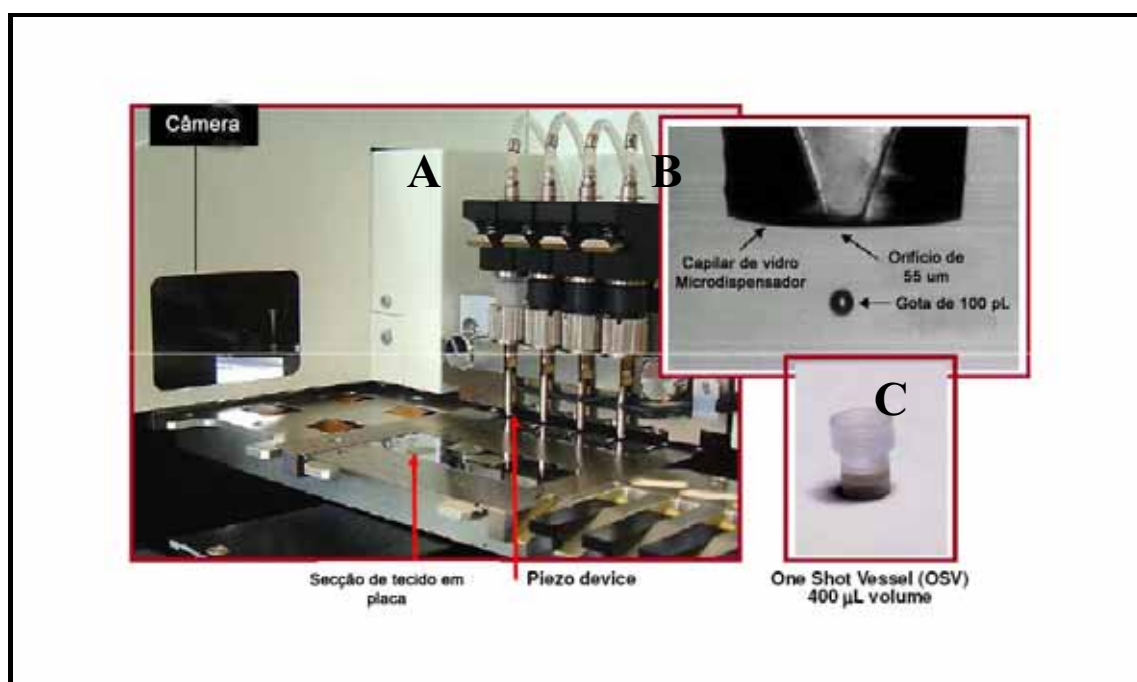


Figura 8 – Sistema dispensador de gotas. A: Piezo device é o acessório onde as soluções são dispensadas. B: Capilar de vidro embutido no interior do Piezo device, individualizando uma gota com o volume de 100 μL . C: Vessel é um acessório onde as soluções são armazenadas antes da espotagem acima do piezo device.

Como ilustrado na figura 8, a impressora química ChiP-1000 utiliza a tecnologia de *piezos*. É possível o uso de até quatro soluções, já que o equipamento é composto por 4 canais (*piezos*). Isso torna as análises práticas e rápidas, pois

diferentes análises podem ser realizadas ao mesmo tempo. Basta selecionar no software gerenciador, o método desejado e informar em que canal está cada solução para que os ajustes de espotagem são feitos automaticamente.

O reduzido diâmetro dos *piezos* e o ajuste elétrico refinado (controle de pressão por sistema de vácuo) garantem que volumes na escala de pL (picolitros) sejam depositados de forma controlada e altamente precisa. Essa tecnologia garante uma espotagem precisa para microregiões, gerando ao final do processo imagens moleculares de alta resolução (Figura 9).

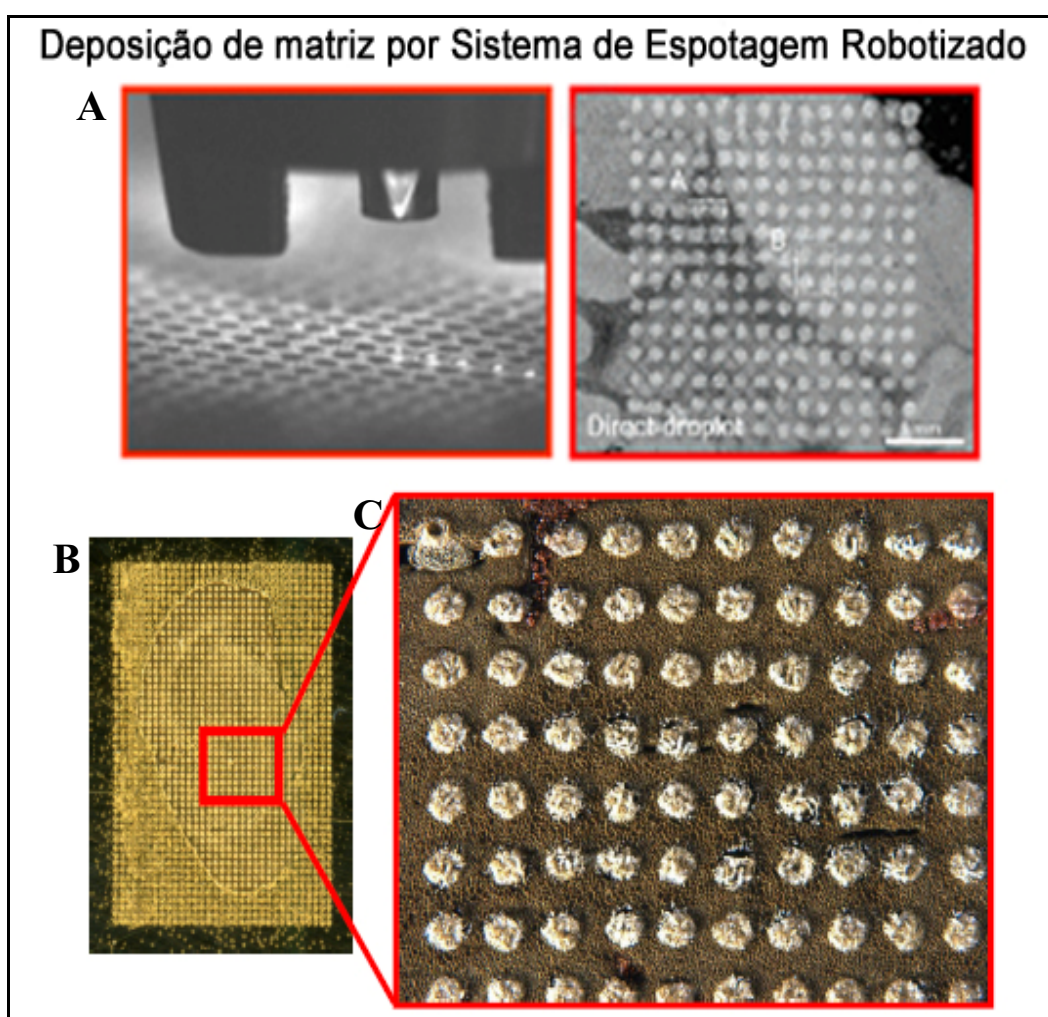


Figura 9 – Sistema automatizado de deposição de matriz.

A figura 9 revela o acessório que possibilita a liberação das soluções de matrizes, favorecendo assim deposição das mesmas em pontos específicos sobre o tecido analisado (Figura 9B). Para cada *spot* (coordenada) obteremos por meio de

análise em MALDI-ToF-ToF um espectro, que será então transformado em uma imagem química. Quanto maior o número de *spots*, maior será a resolução desta imagem química. Um grande volume de dados é gerado em curto espaço de tempo e com preparação de amostra reduzida. Este sistema dispensador de soluções é uma ferramenta analítica precisa, pois permite que o sistema gerenciador da espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF-ToF incida o laser nos mesmos pontos formados anteriormente (Figura 9C) pela impressora química. Dessa maneira, os compostos presentes em cada ponto serão analisados e a somatória desses dados permitirá a elaboração de uma imagem molecular.

5.1.1 Software ChIP-1000

O software gerenciador do ChIP-1000 permite que os ajustes nos parâmetros de impressão sejam realizados durante a experimentação. O primeiro passo é selecionar o modo de operação do equipamento, ou seja, a primeira etapa é escolher a forma em que a secção de tecido será analisada. O equipamento pode operar espotando as soluções de diferentes maneiras através de áreas retangulares, em que o número de pontos de espotagem é definido pelo operador (Figura 10), por áreas circulares (Figura 11) ou em faixas (Figura 12).

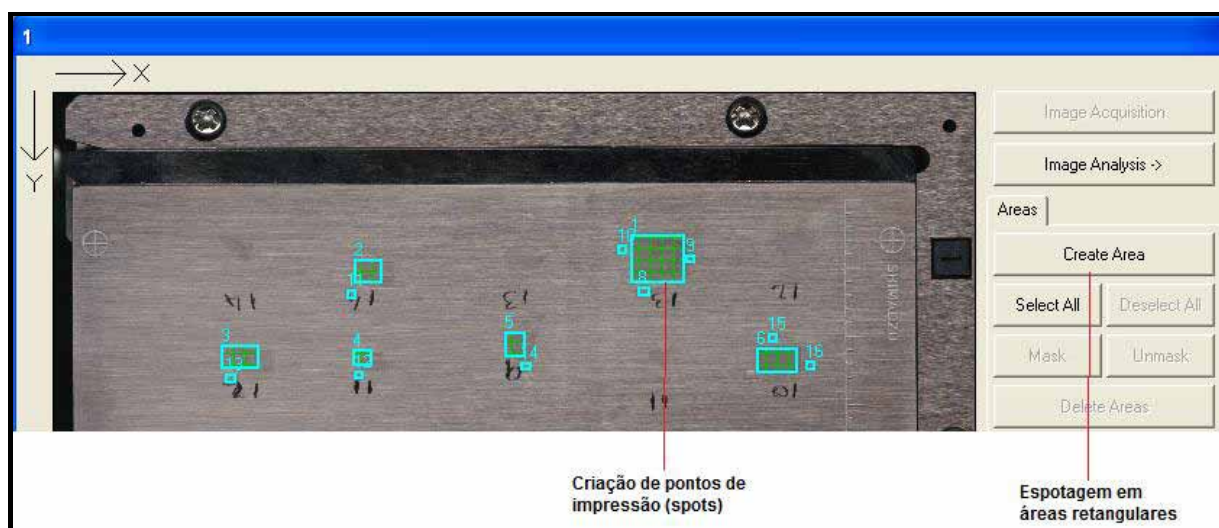


Figura 10 – Espotagem em áreas retangulares sobre o tecido alvo do estudo.

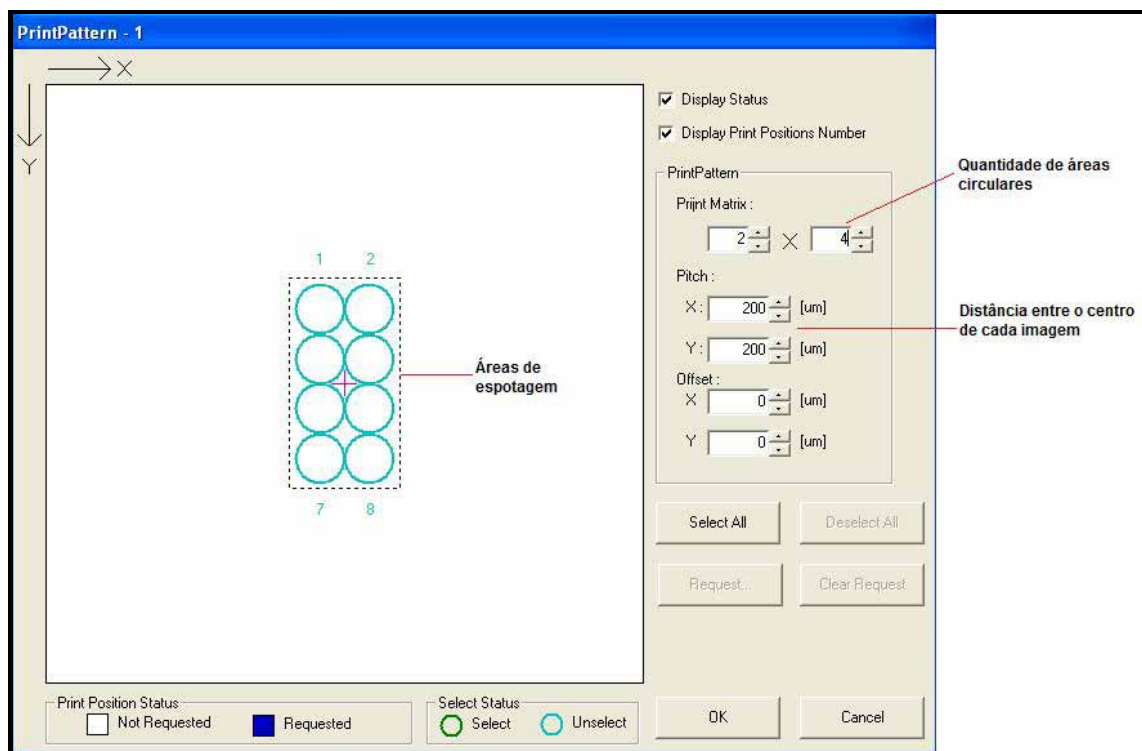


Figura 11 – Espotagem em áreas circulares.

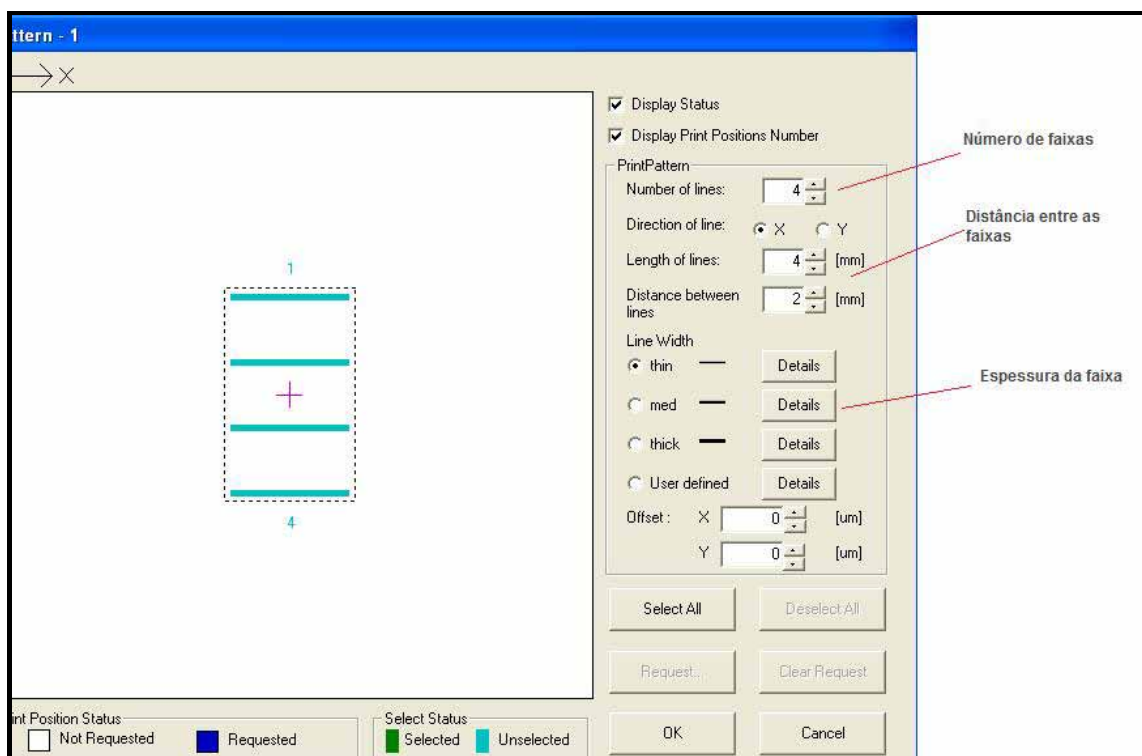


Figura 12 – Espotagem em faixas.

A espotagem através do modo retangular possibilita estabelecer o número de pontos em que a imagem molecular apresentará através da criação de coordenadas X e Y no tecido estudado. Levando em conta que cada ponto criado será posteriormente analisado pelo espectrômetro de massas, resolução da imagem é dependente deste número de pontos. Como em uma câmera fotográfica, determinar o número de pontos e o ter a permissão de aumentar esse número de pontos, funcionaria como o ajuste no número de pixels da imagem a ser desenhada. Este tipo de espotagem é adequado para análises que visam um escaneamento refinado do tecido. Faz-se necessário cuidado cauteloso para que um número de pontos não sejam selecionados pois comprometeria a reconstrução da imagem. Além disso, os possíveis pontos que forem selecionados para área de impressão, não devem-se juntar para que a resolução da imagem não seja comprometida.

Já as espotagens circulares e/ou em faixas são mais adequadas para a análise de membranas ou de regiões específicas de uma secção de tecido. Neste trabalho, será realizado uma varredura total do tecido, a fim de compreender o mecanismo de ação e proliferação de glioblastoma multiforme.

Após a seleção do modo de operação/spotagem do equipamento, o escaneamento da placa onde é depositado o tecido foi acionado e a área de impressão foi delimitada, bem como o número de pontos a serem criados. O número de pontos é determinado pela distância que foi estabelecida entre o centro de um *spot* (ponto) e o adjacente a este. A partir disso, o software estabelece uma relação entre a área selecionada e o espaçamento entre os pontos.

O próxima etapa consistiu na escolha do método de impressão. O software permite a criação de métodos, os quais podem ser armazenados e utilizados como referência. Desta forma, pôde-se criar um método de impressão da enzima proteolítica (*Tissue digest protocol*) e um método para análise de digestos trípticos (*Print Matrix*) (Figura 13).

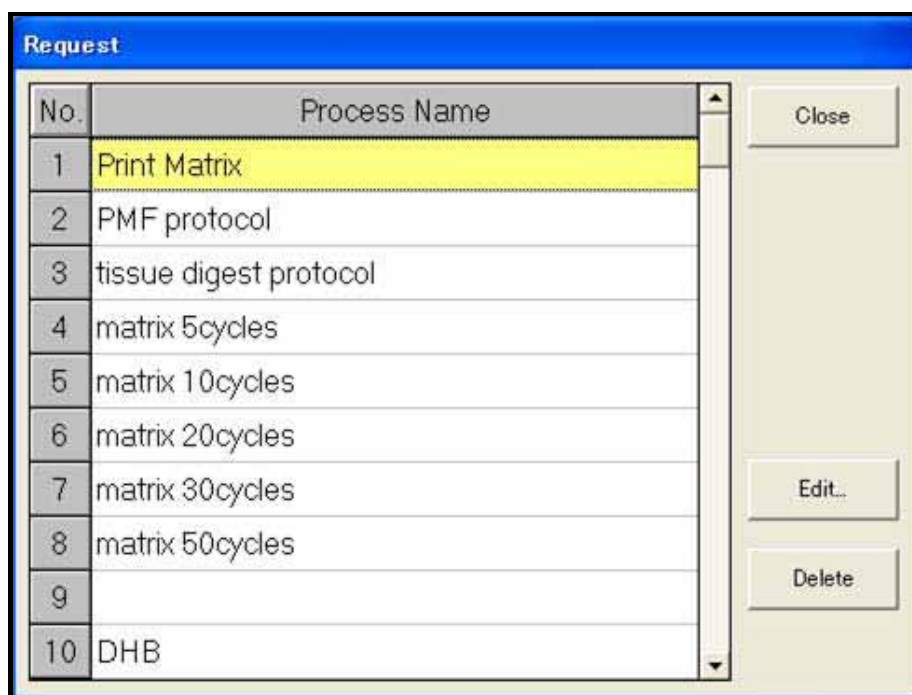


Figura 13 – Escolha do método de impressão.

Na criação de um método de impressão, faz-se necessário informar ao equipamento cada passo que será realizado durante a espotagem, quais soluções serão depositadas e o volume da solução que deve ser depositada na área selecionada (Figura 14). Deve-se informar ao software se um período de incubação será adotado, no caso de digestão das proteínas na presença de enzimas proteolíticas.

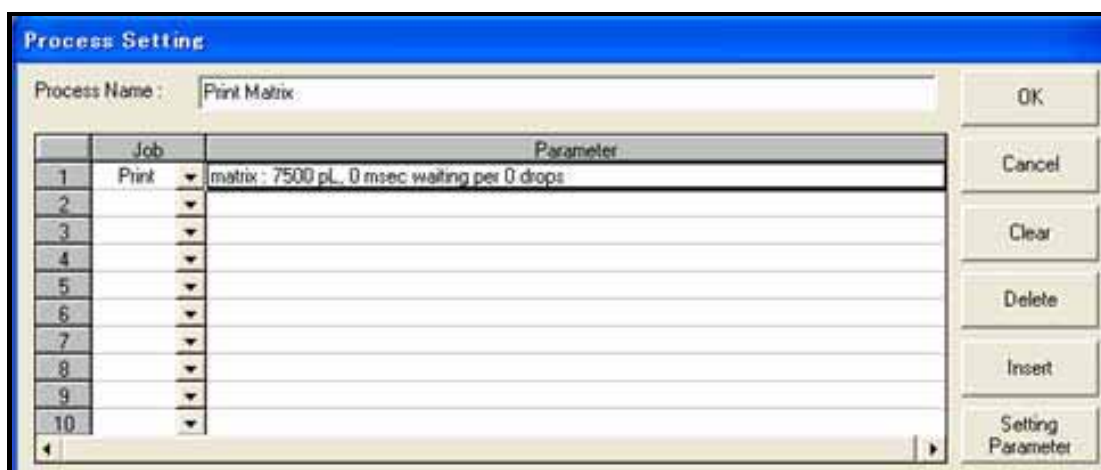


Figura 14 – Seleção dos parâmetros de impressão do método escolhido.

Após a adoção de um método de impressão, é preciso salvar o experimento que foi projetado. Em seguida, é necessário informar ao software qual a solução

presente em cada um dos canais para que, no momento da aplicação do método de impressão, a solução correta seja dispensada corretamente. A partir deste ponto, os testes de espotagem podem ser iniciados.

Em seguida, os piezos devem ser lavados com solução de metanol 100% (v/v) antes de receberem as soluções que serão utilizadas durante a espotagem no tecido alvo de estudo. Esta lavagem é realizada sobre um papel filtro e para garantir que os piezos estejam estéreis e prontos para a impressão. A pressão nos canais deve ser ajustada com auxílio de uma bomba à vácuo. Este ajuste de pressão permite controlar a queda das gotas das soluções pelos *piezos*, sendo que os valores ótimos de pressão devem ficar na faixa de -0,2 a -0,6 kPa (Figura 15). A adoção de pressões negativas garante que a gota só será dispensada com a aplicação de uma voltagem, a qual também será ajustada nos passos seguintes.

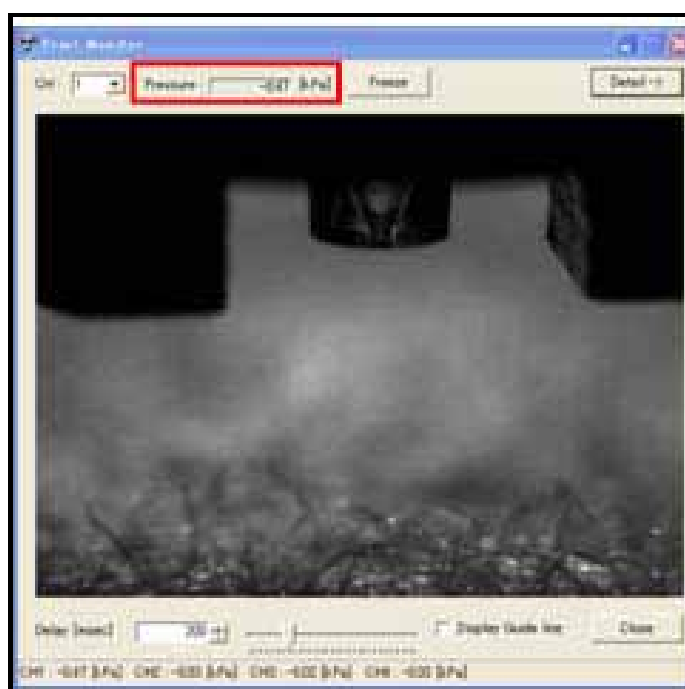


Figura 15 – Imagem da câmera da ChIP-1000 durante o ajuste de pressão do *piezo*.

O próximo passo é determinante no sucesso da técnica de MALDI *Imaging*. Neste ponto, a impressão será ajustada ao se determinar a voltagem com que a gota será dispensada e o tempo entre uma gota e outra. Pode-se também determinar o volume em picolitros que será dispensado em cada uma das gotas e quantos ciclos de espotagem será realizado e sua frequência, pois é muito importante observar se a solução que está sendo dispensada está sendo absorvida

pelo tecido antes que um novo ciclo de espotagem se inicie. Esses parâmetros conferem à técnica alta precisão, resolução e reprodutibilidade. Portanto, faz-se necessário um ajuste fino e preciso nesta etapa, para que bons resultados sejam alcançados. Na Figura 16 pode-se observar como estes parâmetros são selecionados.

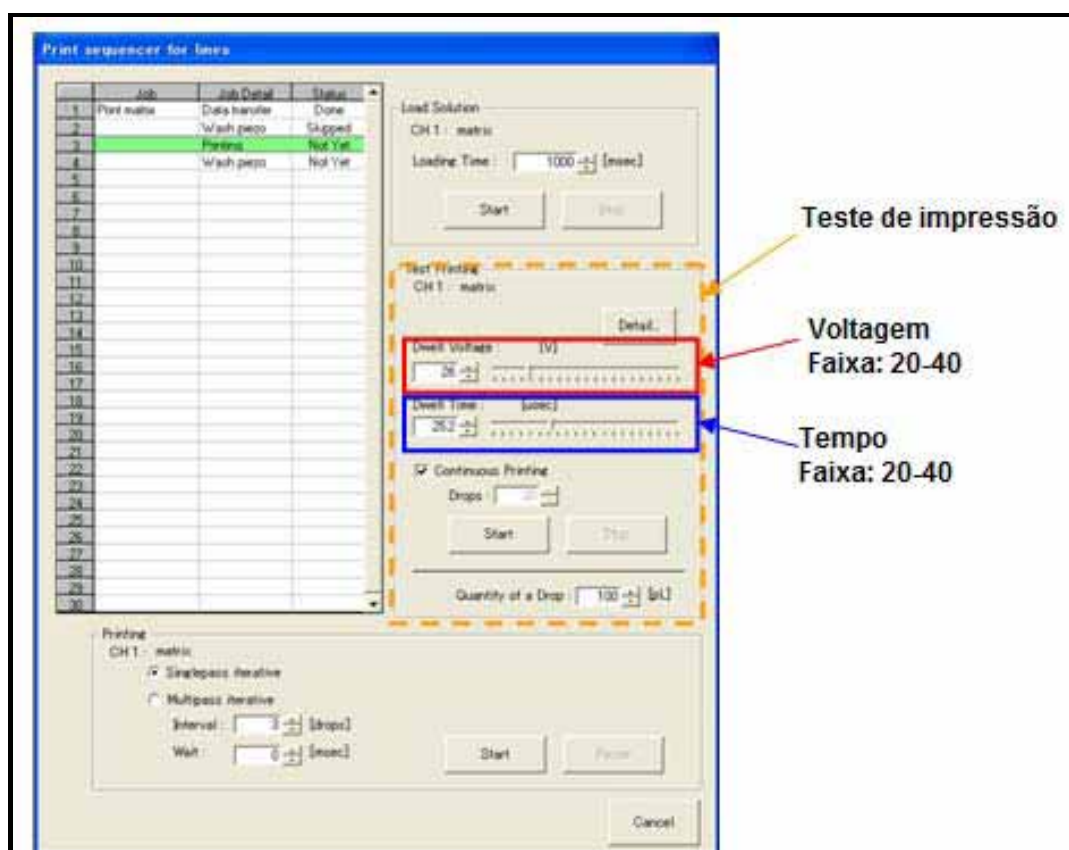


Figura 16 – Ajuste dos parâmetros de espotagem através do sistema de controle dispensador de soluções, onde voltagem e tempo podem ser selecionados para melhor atender o processo de impressão.

Para cada tecido analisado, todos os valores apresentados anteriormente devem ser determinados. Por exemplo, um tecido A pode não adsorver tão bem uma determinada solução de matriz e neste caso, o volume de cada gota deverá ser menor, resultando em um grande número de ciclos de espotagem. Num tecido B, se as gotas são rapidamente adsorvidas pelo tecido, a gota pode ter um volume superior ao utilizado no tecido A, tendo um número de ciclos reduzido, já que o volume total depositado geralmente é o mesmo.

O ajuste destes parâmetros mostra que a técnica é delicada e exige certa percepção do pesquisador. Diversos testes são feitos antes do início da análise propriamente dita para que valores próximos dos ideais sejam estabelecidos.

Com o ajuste correto do dispensador, a espotagem pode ser iniciada (Figura 17). Embora o equipamento faça a espotagem automática, é recomendável que haja um monitoramento constante da espotagem, pois alterações na direção da gota podem ocorrer durante a impressão; a solução no dispensador pode se esgotar; o volume da gota pode estar excessivo e elas podem se unir, gerando perda de resolução ou ainda o tecido pode se tornar saturado e não mais absorvendo a solução. Os parâmetros devem então ser reajustados caso alguns desses problemas aconteçam. É preciso também ter cuidado com os canais que dispensam matriz, já que esta pode cristalizar dentro do canal. Por diversas vezes é adequado que se lave o canal com metanol 100% (v/v) para evitar a obstrução do *piezo*.

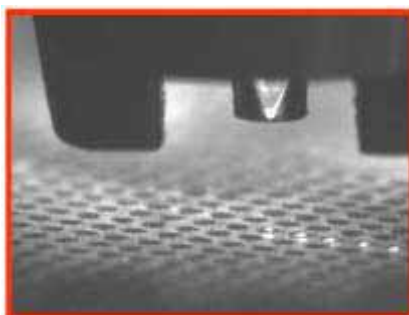


Figura 17 – Espotagem por impressora química ChIP-1000.

Com o término da espotagem, algumas medidas de limpeza devem ser adotadas para garantir a integridade do equipamento. Assim, os *piezos* devem ser exaustivamente lavados com solução de metanol 100% (v/v). A bomba de vácuo que auxilia a manter a pressão negativa do sistema deve ser avaliada periodicamente. Além disso, a manutenção por pessoal especializado necessariamente deve ocorrer, já que os acessórios como os *piezos* são extremamente sensíveis.

O experimento na impressora química é finalizado com o armazenamento das coordenadas criadas nesta experimentação forem salvas em formato txt para importação dos mesmos para o software gerenciador do MALDI ToF-ToF.

5.1.2 Software LaunchPad – ChIP *Imaging Experiment*

Ao término da espotagem e com o arquivo de coordenadas salvo, o próximo passo é a transferência destes dados para o espectrômetro de massas MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance - Shimadzu). No software LaunchPad é necessário escolher a opção *ChIP Imaging Experiment* em *Automation* (Figura 18).

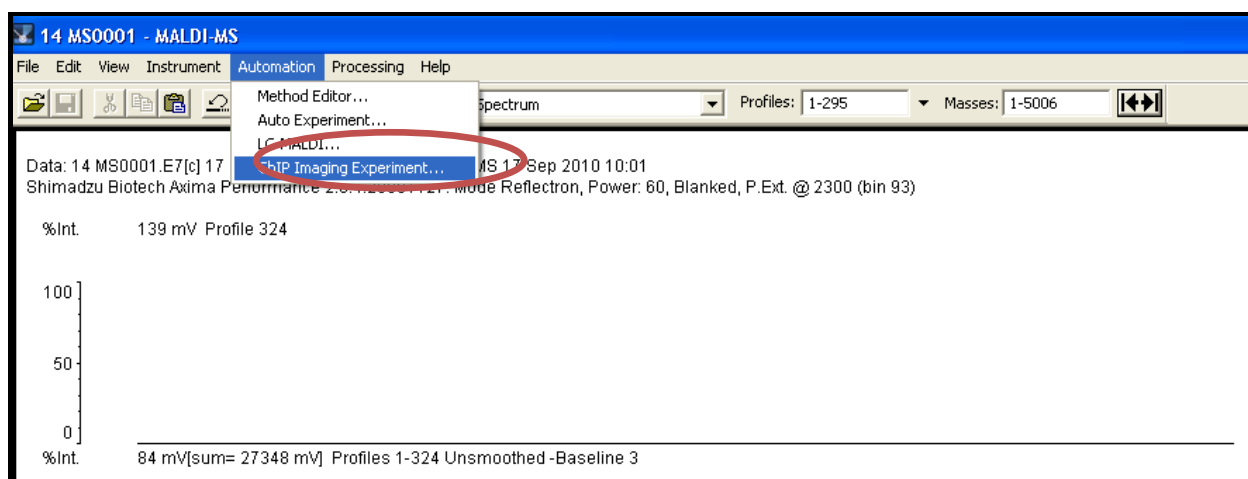


Figura 18 – Para início da análise no espectrômetro é necessário selecionar a opção *ChIP Imaging Experiment* no software LaunchPad.

Após carregar o arquivo de coordenadas criadas e oriundas do gerenciador da Chip-1000, uma ilustração da placa que contém as amostras/tecidos é exibida em uma nova janela (Figura 19). Neste momento, o software deve ser comunicado qual região trata-se do tecido (em laranja na figura 19) e qual se refere ao calibrante (em azul na figura 19).

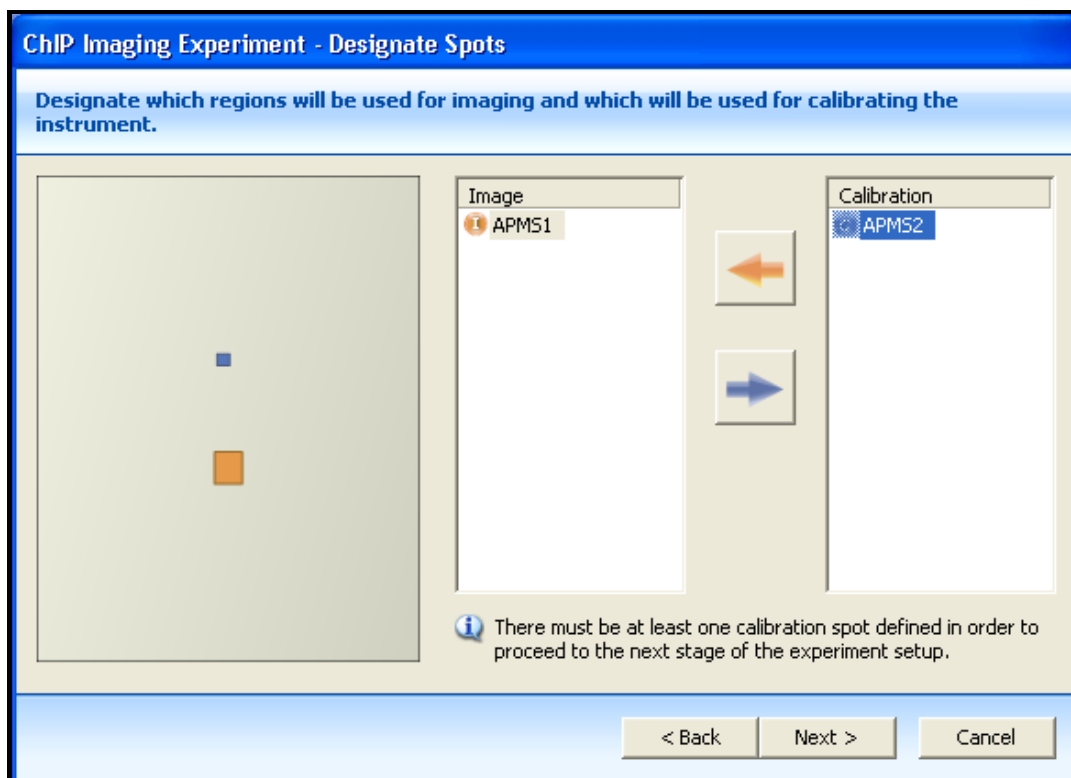


Figura 19 – Indicação de calibrante e tecido no software que gerencia as análises de espectrometria de massas.

Com as regiões delimitadas e devidamente identificadas é necessário realizar o alinhamento da placa dentro do espectrômetro de massas (Figura 20). Este alinhamento deve ser feito de acordo com o modelo da placa utilizada (*Slide Alignment*) ou de acordo com a posição do tecido em estudo na palca utilizada (APMS1). Esta opção garante que um alinhamento preciso seja feito e que as coordenadas oriundas da Chlp-1000 sejam interpretadas de forma correta no espectrômetro de massas.

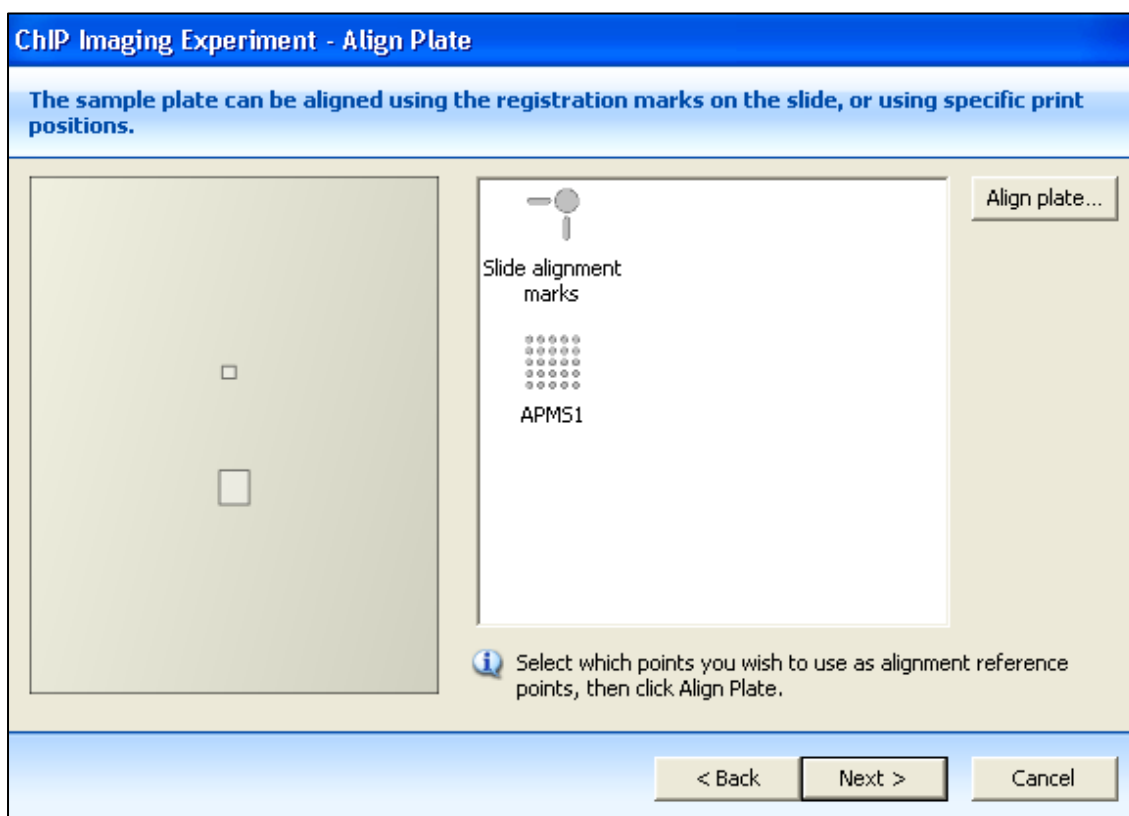


Figura 20 – Opções de alinhamento do tecido a ser analisado.

Após o procedimento de alinhamento, os parâmetros em que os dados de massa serão adquiridos devem ser ajustados. Em *Acquisition parameters*, os dados como potência do laser, faixa de massa, número de *shots* por coordenada e o modo de operação serão importados do software LaunchPad. A opção *Peak processing* é utilizada para determinar os parâmetros de processamento dos dados que serão gerados. Já a opção *Calibration* é utilizada para que o equipamento tenha uma lista de massas conhecidas (calibrantes) como referência. Dentre as diversas listas armazenadas, deve-se escolher a que corresponde com o calibrante depositado na placa. Estas opções podem ser visualizadas na Figura 21.

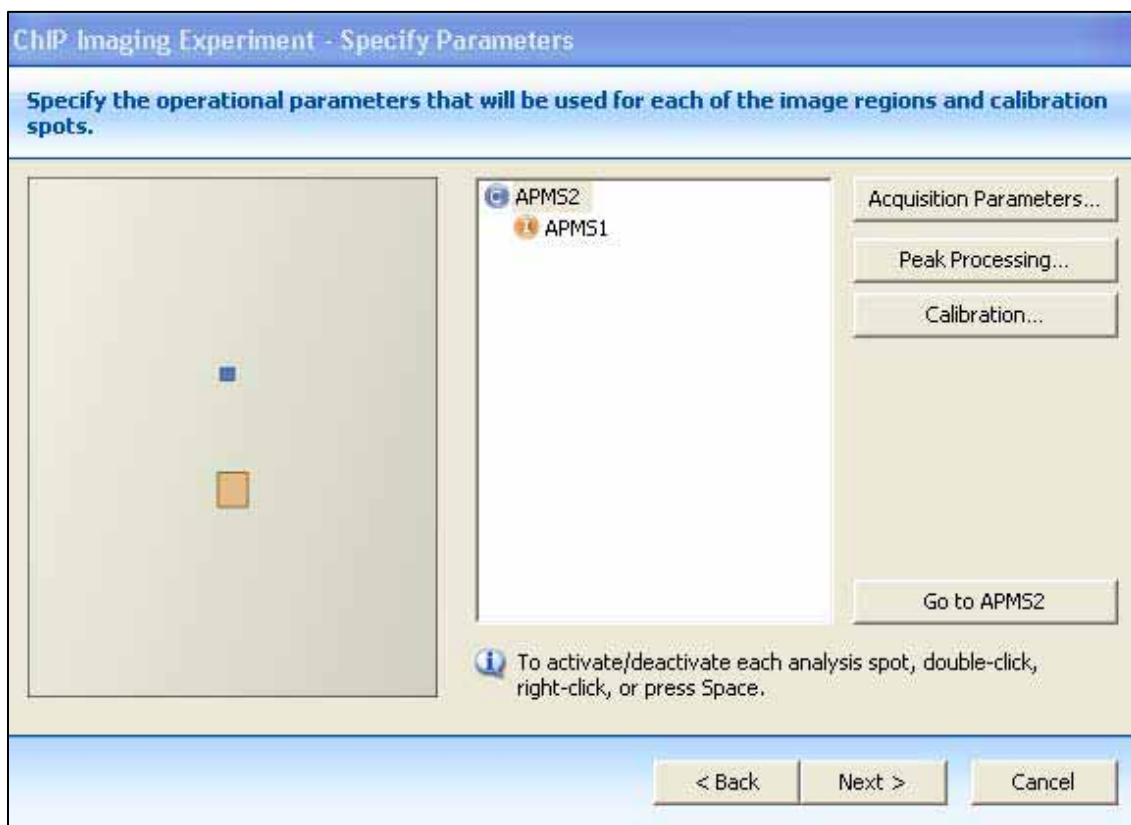


Figura 21 – Seleção de parâmetros de aquisição de dados, processamento dos dados e calibração.

O último passo desta etapa é autorizar o início da análise. Neste momento, o espectrômetro de massas percorrerá toda a amostra/tecido (Figura 22), de acordo com as coordenadas oriundas da ChIP-1000, a fim de obter uma infinidade de espectros de massas que serão posteriormente transformados em imagens moleculares.

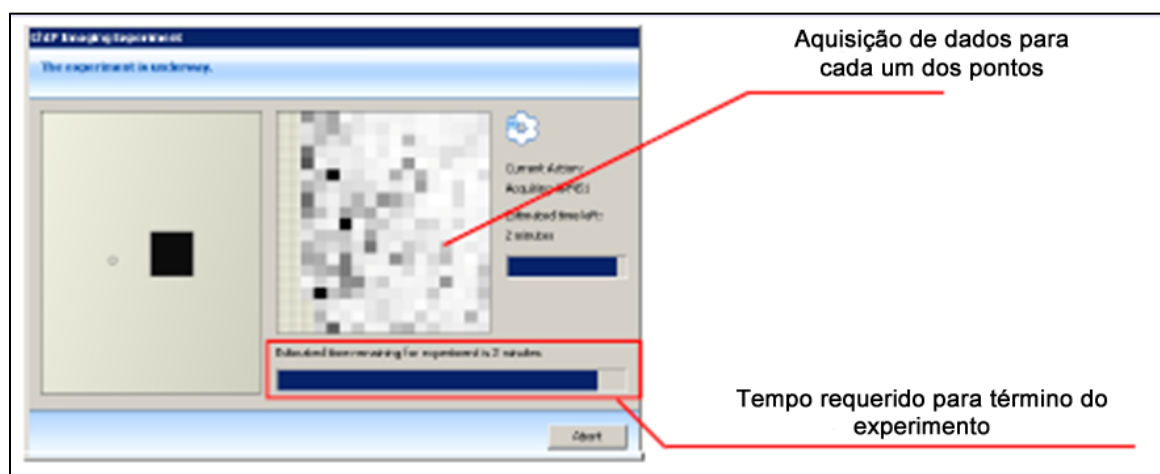


Figura 22 – Aquisição dos dados de espectrometria de massas para cada um dos pontos.

5.1.3 Biomap

Após a aquisição dos espectros de massas de cada ponto impresso no tecido, uma imagem molecular será elaborada a partir desses dados analíticos. A visualização dessa imagem é baseada na reconstrução multiplanar que permite a extração de cortes arbitrários a partir de um volume 3D. Outras características ligadas à visualização são sobrepostas de dois conjuntos de dados individuais. O software Biomap versão 3.7.5.2 (Novartis Institutes, Biomedical Research) disponível em <http://www.maldi-msi.org>. utiliza uma representação em quatro dimensões de dados de imagem. As primeiras três dimensões são usadas para descrever a posição de um *voxel* no espaço, a quarta dimensão está reservada para os parâmetros independentes, tais como tempo, massa ou comprimento de onda.

Este software permite trabalhar com os dados oriundos do software do espectrômetro de massas (LaunchPad). O primeiro passo é importar estes dados no formato MSI (Figura 23). Os outros formatos de importação são compatíveis com outros experimentos e/ou com outros equipamentos de espectrometria de massas.

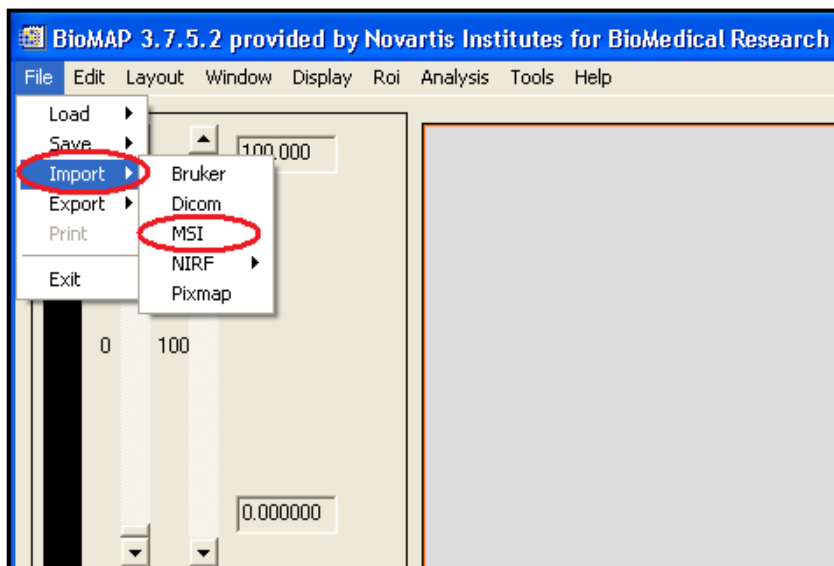


Figura 23 – Para importar dados oriundos de Axima Performance (Shimadzu) é necessário selecionar a opção MSI.

Em seguida, uma janela com nome *MSI Import* se abrirá (Figura 24). Um intervalo de relação massa/carga (m/z) pode ser definido. Nesta janela é necessário fornecer um número adequado no campo *Bin Size*. Esta função relaciona-se diretamente com a resolução da imagem, a qual é dependente da qualidade dos

espectros gerados. Quanto maior este número, menor a resolução da imagem gerada. Com o valor adequado, é possível realizar o *update* da imagem.

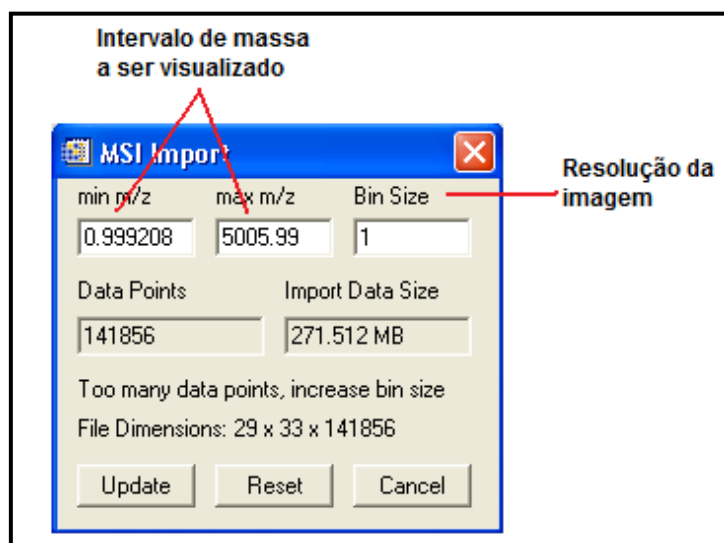


Figura 24 – Update de imagem segundo resolução e faixa de m/z .

A partir disso uma imagem é gerada e está representada na Figura 25.

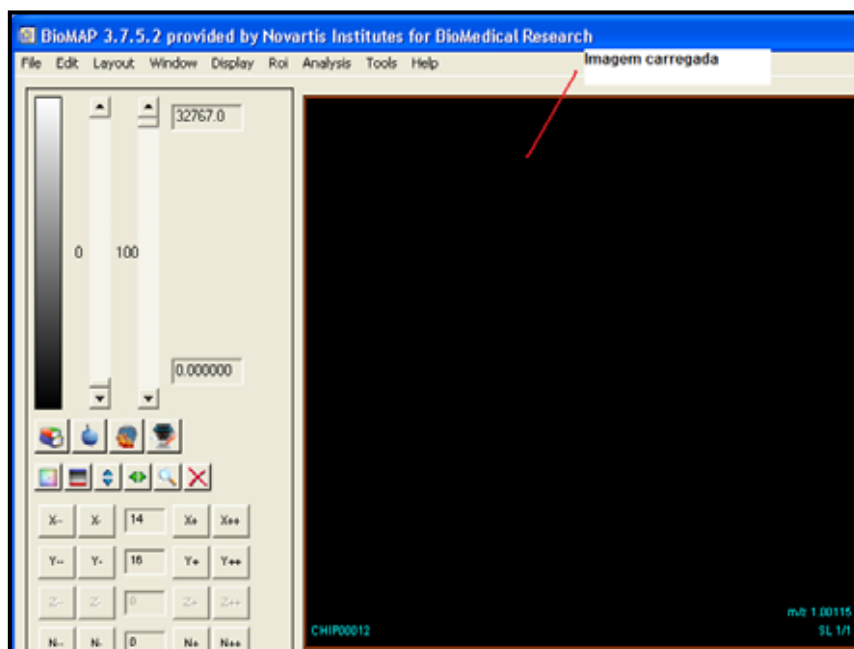


Figura 25 – Imagem molecular gerada pelo software Biomap.

Como pôde ser visto na figura anterior, a imagem gerada adquiri uma coloração negra. O próximo passo é ajustar as opções para o tratamento da imagem. Escolhendo a opção *Analysis* e selecionado a opção *Point* dentro de opção

Plot (Figura 26), pode-se ter acesso à função. É necessário habilitar a função *Baseline correction* em *Config* → *Options* (Figura 27) para que o ruído dos espectros seja minimizado.

Ainda na janela *Plot Tool*, pode-se visualizar o espectro da imagem gerada. Um faixa de relação massa/carga pode ser selecionada para que uma determinada área do espectro seja ampliada (Figura 28) e uma relação massa/carga que seja interessante observar, possa ser selecionada na imagem gerada (Figura 29).

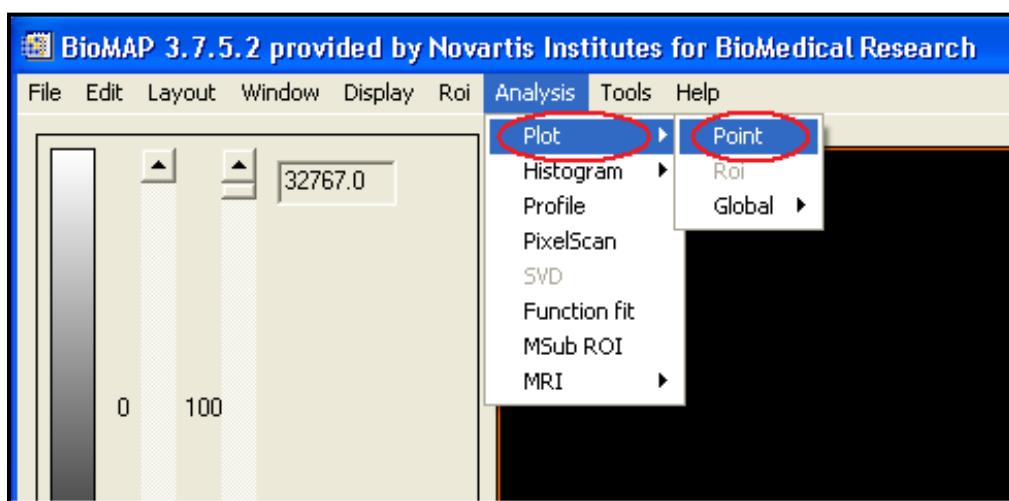


Figura 26 – Acesso a opção *Plot Tool*.

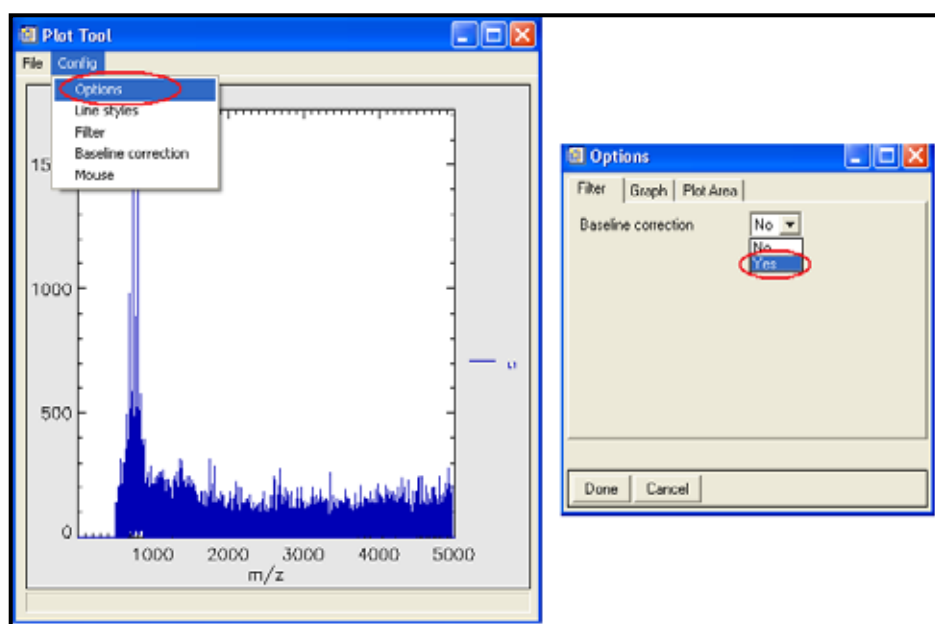


Figura 27 – Na janela *Plot Tool* é possível selecionar a opção *Base line correction* e promover o aperfeiçoamento da qualidade do espectro correspondente à imagem molecular.

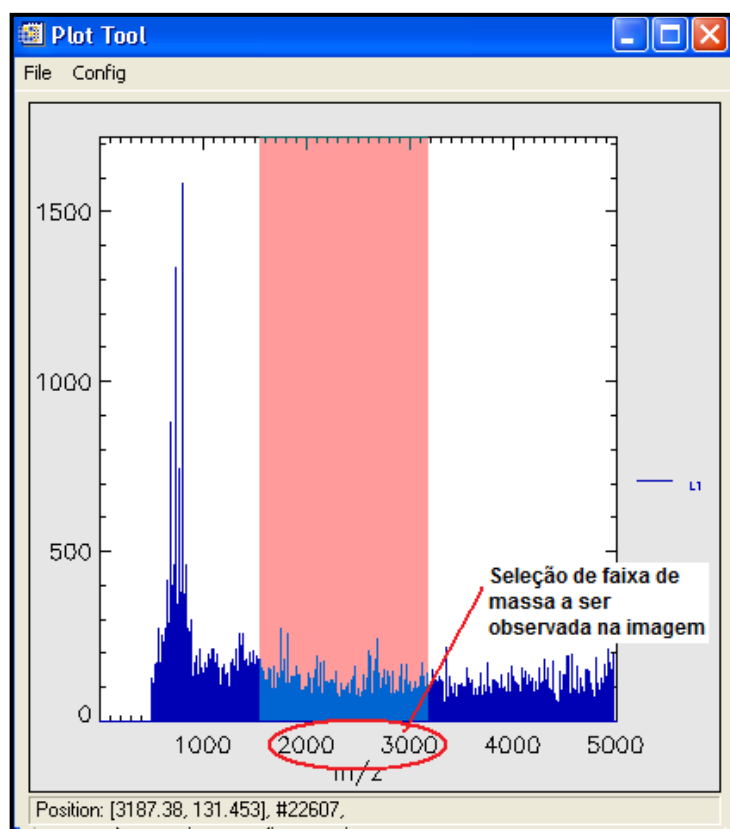


Figura 28 – Na janela *Plot Tool*, pode-se selecionar faixas de relação massa/carga específicas.

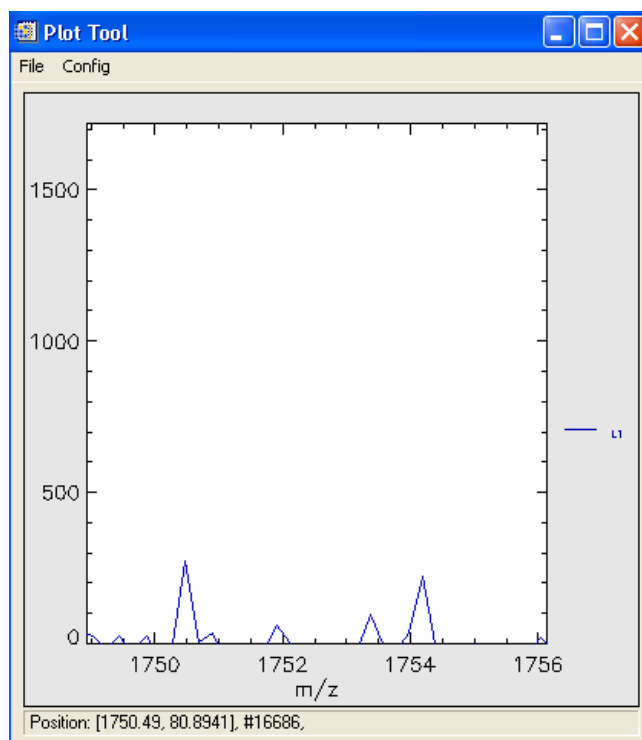


Figura 29 – Selecionando faixas de relação massa/carga, pode-se obter uma melhor visualização do espectro.

O próximo passo é escolher uma das escalas de cores disponíveis no software Biomap (Figura 30). A diversidade de escalas favorece os diferentes tipos de imagem que serão construídas.

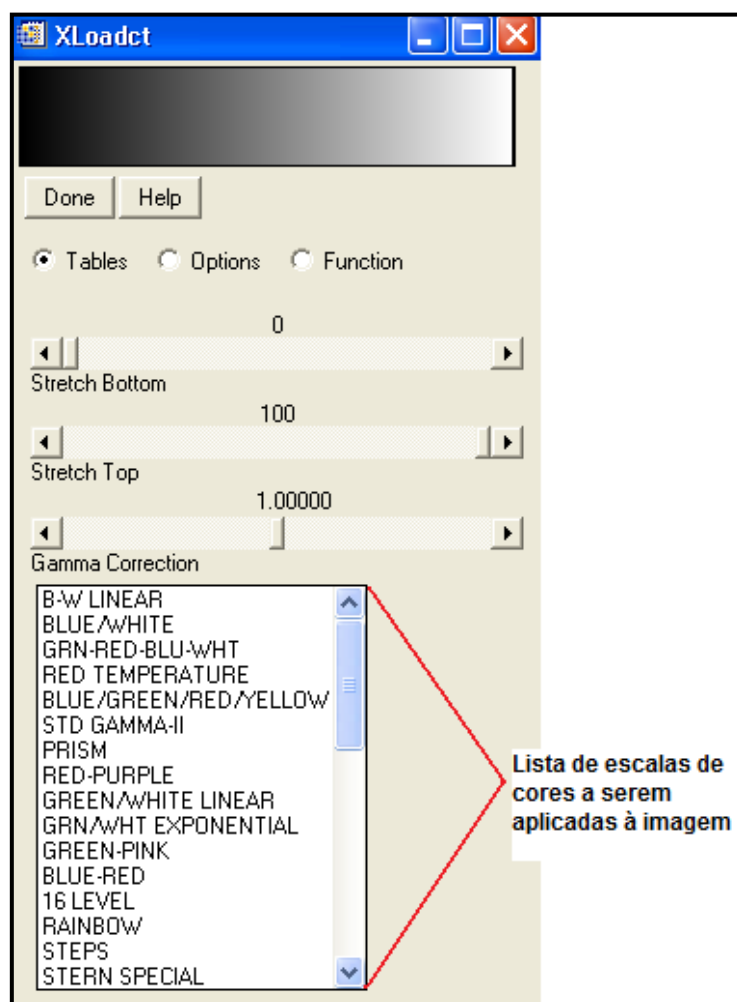


Figura 30 – Lista de escala de cores disponíveis a serem aplicadas à imagem.

A escala de cor selecionada é mostrada na janela principal do software e ajustes de brilho e contraste podem ser feitos alterando-se os números ao lado da barra de ajustes de cores (Figura 31). Esse ajuste facilita a visualização da distribuição das relações massa/carga anteriormente selecionada e permite que os íons que estejam presentes em determinadas regiões do tecido sejam visualizados mesmo que se apresentem em baixa intensidade. As imagens construídas apresentam uma notória riqueza de informação em decorrência aos ajustes da escala e aos ajustes no brilho e no contraste. (Figura 32).

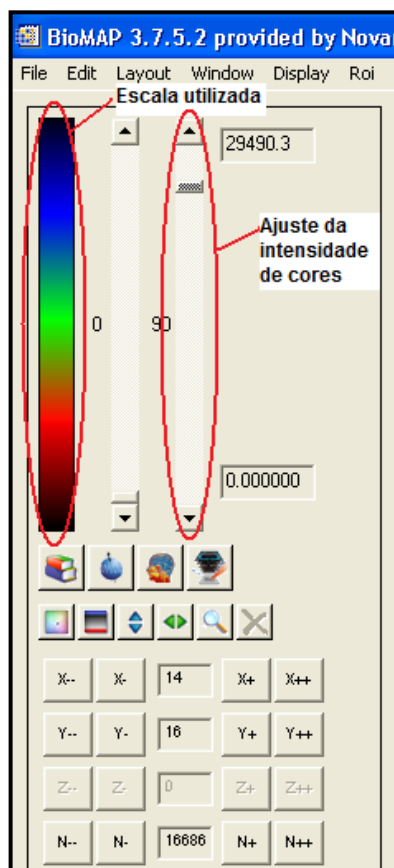


Figura 31 – Visualização da escala de cor selecionada (à esquerda na imagem) e o ajuste da intensidade de cores (brilho e contraste – à direita na imagem).

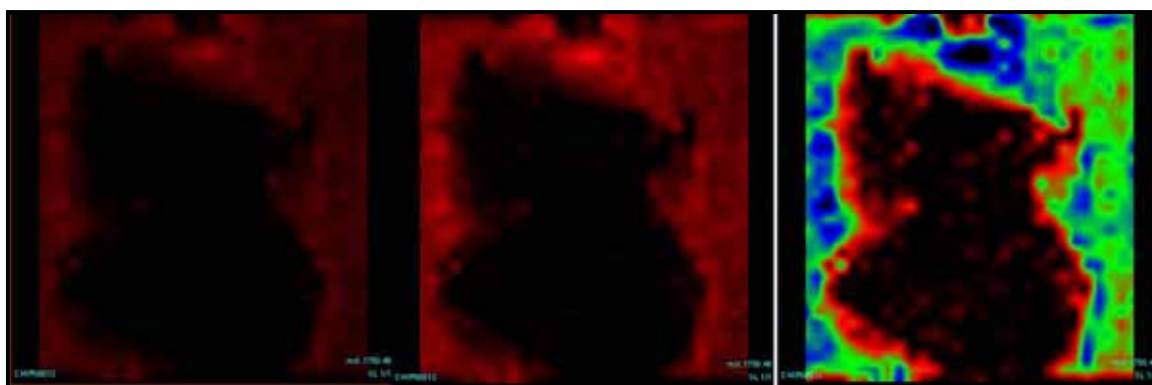


Figura 32 – Representação de uma mesma imagem com diferentes ajustes de brilho e contraste. Esse ajuste auxilia na visualização dos íons de interesse.

5.2. Análise Histoquímica d2 Glioblastoma Multiforme

As imagens histoquímicas contidas na Figura 33 ilustram as características de um glioblastoma multiforme analisado no presente trabalho sob coloração com hematoxilina e eosina.

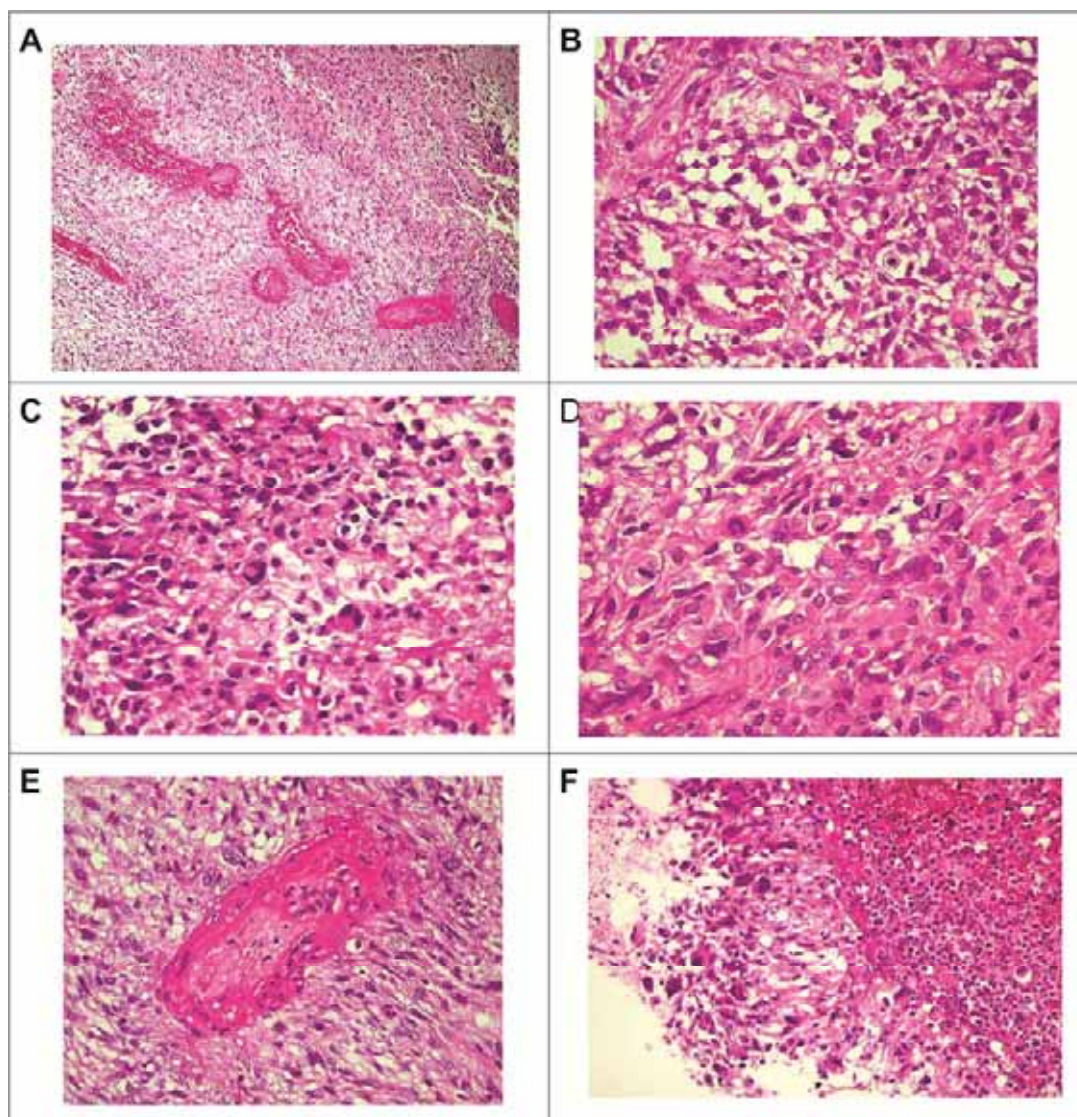


Figura 33 – Características morfológicas típicas de glioblastoma multiforme. Coloração: Hematoxilina-eosina. (A) Aspecto geral de um glioblastoma multiforme (40x). (B) as células apresentam prolongamentos curtos que se entrecruzam, criando um fundo fibrilar que é próprio dos gliomas em geral e dos astrocitomas em particular (400x). (C) Em certas áreas as células têm citoplasma mais abundante (400x). (D) atipias nucleares. (E) Proliferação vascular - vasos espessos, frequentemente com trombose (400x). A trombose é importante na gênese das áreas de necrose próprias dos glioblastomas. (F) Necrose - geralmente do tipo coagulativo, que pode corresponder à quase totalidade da massa do tumor (100x). Imagens retiradas de: <http://anatpat.unicamp.br/nptglioblastoma1.html> (acessado em 28/09/2010).

Geralmente, para o desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging*, duas secções de tecido são normalmente utilizadas, onde uma é corada histologicamente

(tipicamente com hematoxilina e eosina) para avaliação óptica e a segunda, é submetida à investigação por MSI. A região do tecido selecionada para análise por MALDI *Imaging* pode ser visualizada na Figura 34 por meio da coloração com Hematoxilina-eosina.

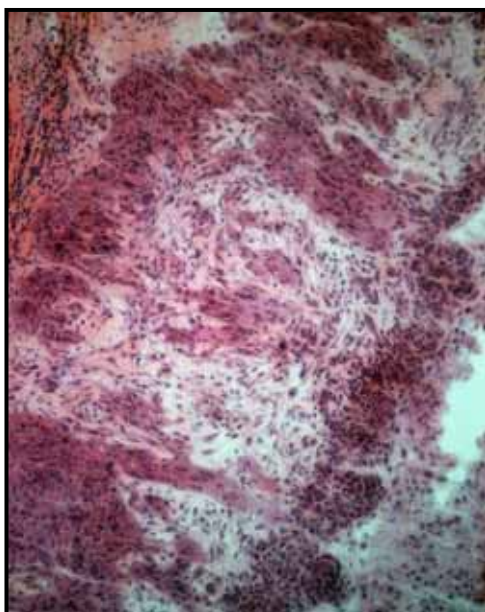


Figura 34 – Região do tecido utilizada para desenvolvimento da técnica de MALDI *Imaging*.
Coloração: Hematoxilina-eosina (aumento 400x).

Nessa imagem, a presença do tumor gera uma desestruturação do citoesqueleto celular, a qual é caracterizada pelo aspecto difuso das células revelado por meio da técnica de coloração com hematoxilina-eosina. No centro dessa imagem, é possível observar uma área de necrose, sendo que nas bordas, há um adensamento celular ocasionado pela hipóxia do tecido.

5.3. Espotagem automática

Em relação a seção que foi submetida a investigação por MALDI *Imaging*, trata-se de uma secção de tecido subsequente ao apresentado na Figura 34 e foi utilizada para espotagem das soluções de tripsina e de matriz com o auxílio da impressora química ChIP-1000 (Shimadzu). Faz-se necessário ressaltar que esta etapa é determinante na qualidade dos resultados, uma vez que, a seleção dos parâmetros de ajustes da impressão é o que permite a obtenção de excelentes aquisições de dados pelo espectrômetro de massas, e consequentemente, a obtenção de imagens moleculares de alta resolução.

Foram realizados testes com diferentes concentrações da matriz ácido cinâmico: 5 mg/mL, 10 mg/mL e 15 mg/mL. A espotagem que apresentou uma maior resolução (spots individualizados e bem delimitados) foi obtida com o valor de 10 mg/mL, sendo que esta concentração foi adotada para a análise deste tecido durante todo o processo de desenvolvimento da técnica.

Sendo assim, uma área contendo uma are de 12 mm² (3x4 mm) foi selecionada como a área de espotagem e as coordenadas (X e Y) foram determinadas, adotando-se a distância de duzentos e cinquenta µm de centro a centro de cada *spot*. O método de espotagem consistiu de três passos:

1. Espotagem da solução de tripsina contendo 20 mg/mL da enzima tripsina em 20 mM de tampão NH₄HCO₃ (pH 8,0) com volume de 120 pL por ciclo;
2. Incubação da placa contendo o tecido em estudo por duas horas em estufa a 37°C;
3. Espotagem de solução de matriz contendo 10 mg/mL de ácido cinâmico (CHCA) em solução acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v), com volume total de 20 nL de matriz aplicada em cada um dos mesmos pontos do passo 1.

Durante o processo, foi observado uma saturação de solução de tripsina pelo tecido nos ciclos finais do processo de espotagem, sendo assim, foi necessário estabelecer um intervalo de pausa por 5 segundos entre um ciclo e outro para que a solução de tripsina pudesse ser absorvida pelo tecido antes de um novo ciclo se iniciasse. O mesmo procedimento foi aplicado à espotagem da matriz ácido cinâmico. Este procedimento garantiu que os spots mantivessem sua localização e não houvesse união de *spots* adjacentes, garantindo assim, uma espotagem de alta qualidade.

Além disso, foi observado a dificuldade de se controlara direção e o volume da gota da solução de tripsina que é dispensada pelo *piezo*. Já para a solução de matriz, este procedimento foi relativamente mais rápido quando comparado à tripsina devido as diferentes densidades dessas soluções. Como a solução de matriz é mais densa, o controle de ajustes da gota melhor padronizados. Entretanto, foi necessário realizar lavagens periódicas no *piezo* com solução de metanol 100% (v/v), uma vez que, a matriz se cristalizou no interior do *piezo* após um período de espotagem.

O controle da gota que é dispensada pelo equipamento é importante para que as soluções sejam dispensadas exatamente sobre a área do tecido selecionada,

pois a resolução da imagem molecular a ser obtida é determinada por estes fatores de ajustes.

Acredita-se que, o teste desses parâmetros de ajustes da gota e a persistência em se obter uma boa espotagem, tenha permitido a obtenção dos ótimos resultados que serão apresentados a seguir. O resultado da espotagem pode ser visualizado na Figura 35.

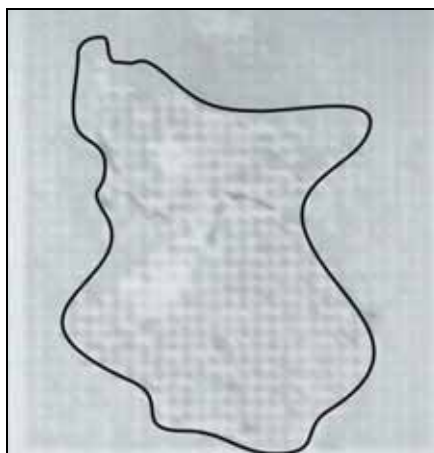


Figura 35 – Espotagem da solução de tripsina e da matriz ácido cinâmico pelo tecido de glioblastoma multiforme. A linha de cor preta delimita a área do tecido. Na parte superior do tecido, calibrantes peptídicos (SIGMA) foram espotados manualmente.

5.4. Análise em MALDI ToF-ToF

Após a espotagem das soluções de tripsina e de matriz no tecido em estudo, o próximo passo foi submeter a placa com o tecido no espectrômetro de massas do tipo MALDI ToF-ToF (AXIMA Performance, Shimadzu).

O primeiro procedimento foi informar ao software LaunchPad mencionado anteriormente, qual é a área do tecido a ser analisado e a área em que calibrante está espotado.

Em seguida, os parâmetros de operação do espectrômetro de massas foram selecionados, entre os quais estão: no modo *reflectron* positivo, 700 a 3.500 Da como faixa de relação massa carga, potência do laser de 65 e 50 *shots* por *spot*. A análise de espectrometria de massas foi iniciada pelo calibrante, sendo que o equipamento toma os valores de massa/carga do calibrante como referência para a análise do tecido. Após a análise do calibrante, o espectrômetro de massas segue automaticamente para a análise do tecido, incidindo 50 *shots* de laser em cada uma das coordenadas importadas da impressora química ChIP-1000.

Para cada coordenada, somam-se os 50 espectros gerados (oriundos dos 50 *shots*). Ao final do experimento, um arquivo com a somatória de todos esses espectros de massas pode ser visualizado (Figura 36).

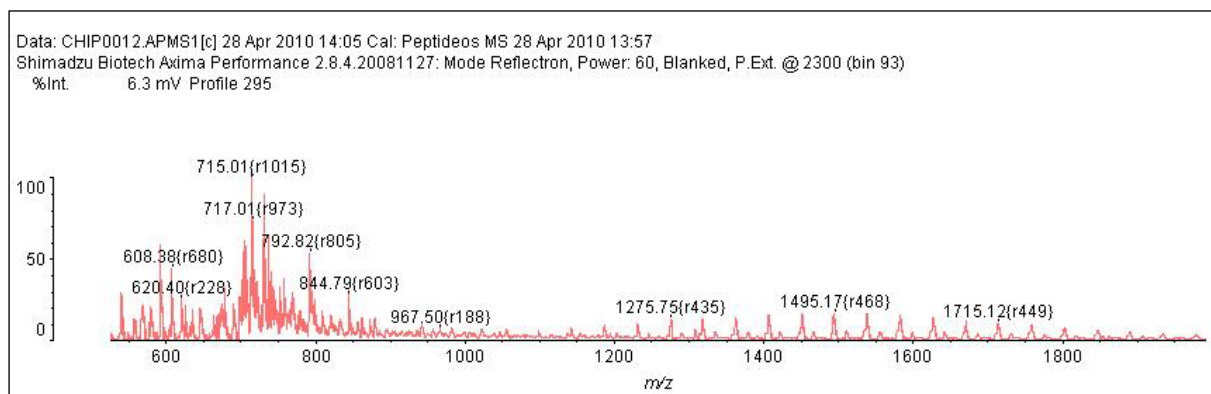


Figura 36 – Espectro gerado por meio da análise por MALDI ToF-ToF da região do tecido de glioblastoma multiforme analisado no presente estudo.

5.5. Obtenção da Imagem molecular da secção de Glioblastoma Multiforme em estudo.

A técnica de MALDI *Imaging* tem como finalidade a reconstrução molecular de uma secção de tecido a partir dos dados de espectrometria de massas. Uma impressora química possibilita a espotagem de soluções de enzimas e de diferentes matrizes de forma precisa e reprodutível, sendo que o espectrômetro de massas tem a capacidade de unir os dados de cada coordenada projetada na impressão, exatamente como uma câmera fotográfica ou como um televisor faz. Uma imagem óptica é transformada em uma imagem química através da leitura (presença) de proteínas, peptídeos, lipídeos ou qualquer outra macromolécula presente em cada ponto da impressão química realizada.

Primeiramente, foi possível visualizar a imagem molecular do calibrante, depositado próximo ao tecido analisado. A Figura 37 mostra o calibrante através das colorações mais intensas da escala apresentada a seguir.

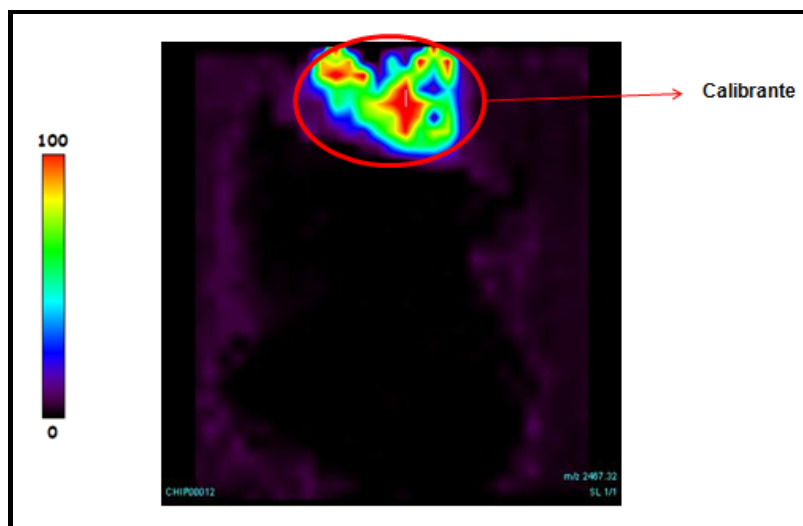


Figura 37 – Reconstrução da imagem do íon 2465 m/z, o qual é um dos peptídeos calibrantes -que foram depositados próximos ao tecido em estudo.

Após este procedimento, uma primeira imagem pôde ser obtida pelo software LaunchPad, como parte integrante na obtenção de uma imagem molecular para o tecido glioblastoma multiforme. A figura 38 mostra essa análise inicial.

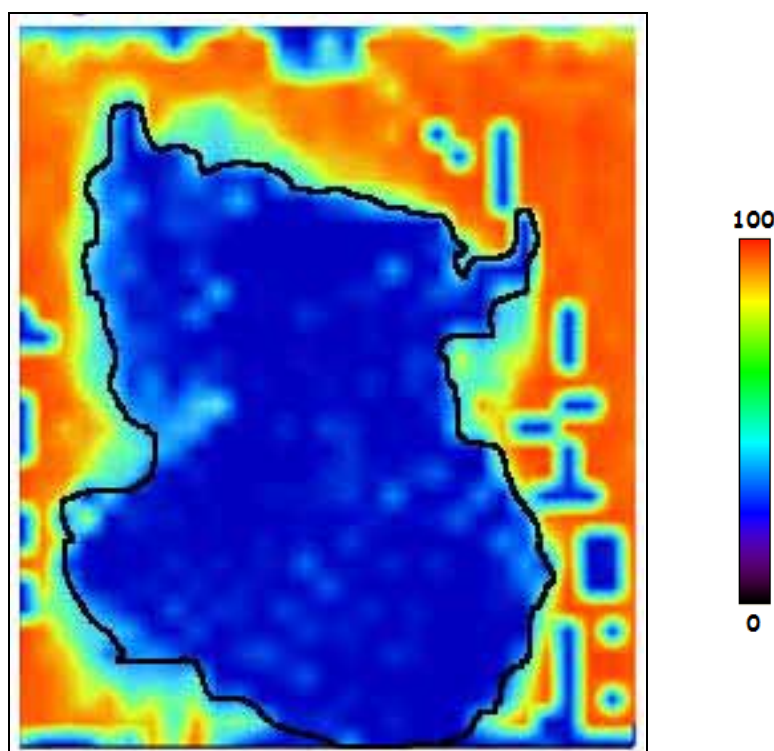


Figura 38 – Imagem molecular obtida pelo software LaunchPad.

Essa imagem molecular pôde ser adquirida e redesenhada pelo software Biomap, o qual foi adotado neste trabalho. Em ambos os softwares, a identificação

das proteínas pode ser realizada ao selecionar um único ponto da imagem, pois um espectro de massas correspondente a este ponto pode ser visualizado e submetido a identificação de proteínas pelas ferramentas de bioinformática associados a eles. Já na Figura 39, a evidencia a imagem molecular dos digestos trípticos do tecido de glioblastoma multiforme.

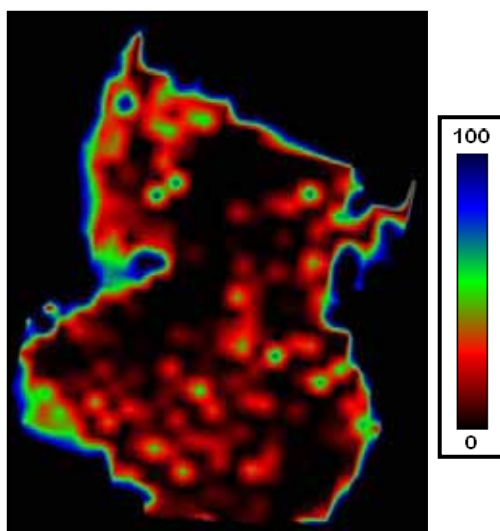


Figura 39 – Imagem molecular dos digestos trípticos de região de tecido de glioblastoma multiforme reconstruída pelo software Biomap.

A reconstrução da imagem molecular permite realizar inferências a cerca da intensidade dos íons em cada ponto da impressão. Na escala apresentada neste figura, a cor vermelho representa baixa intensidade de um determinado íon molecular ao longo do tecido; a coloração verde indica média intensidade, e a coloração azul indica alta intensidade do íon molecular. A partir dessas observações, nota-se que é possível observar a distribuição de diferentes íons moleculares, suas localizações e suas intensidades pelo tecido analisado. Para que a técnica de MALDI *Imaging* seja reprodutível e auxilie na localização dos compostos por todo o tecido, uma imagem histoquímica, geralmente corada com hematoxilina-eosina, foi preparada paralelamente a imagem molecular. A figura 40 compara as três imagens obtidas nessa técnica de MALDI *Imaging*.

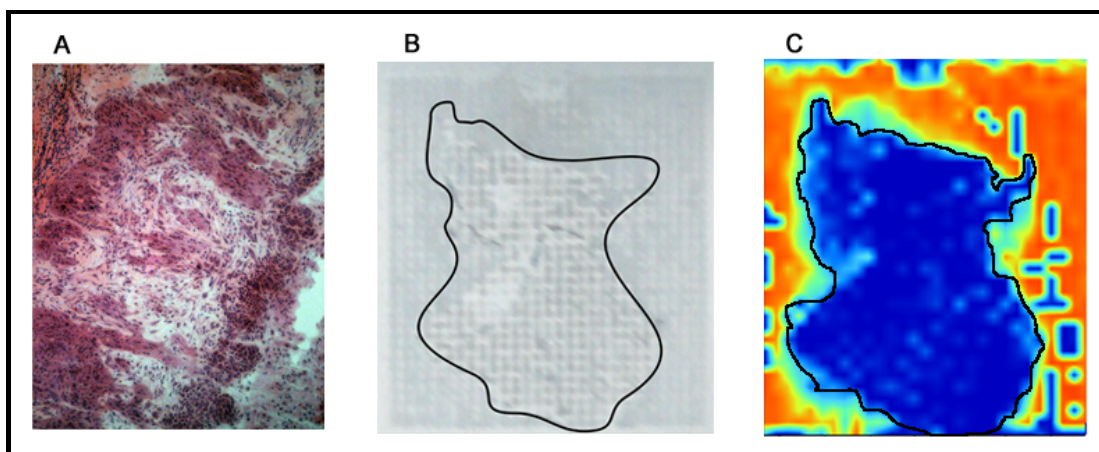


Figura 40 – Comparação de: (A) imagem histoquímica corada com hematoxilina-eosina; (B) Espotagem da região do tecido com a impressora química (C) imagem molecular de digestos tripticos criada pelo software LaunchPad.

A área selecionada para impressão foi uma área retangular ao redor do tecido, sendo que o tecido possui outra morfologia. Sendo assim, na figura 40 (B) e (C) a linha contínua de cor preta delimita o tecido com a região externa à ele. Porém, a área externa na imagem molecular é constituída somente da matriz ácido cinâmico, sendo as informações dessa região descartadas.

Embora essa abordagem seja robusta, alguns problemas de alinhamento entre as secções de tecido utilizadas, uma na coloração com HE e a outra utilizada na reconstrução de imagem molecular, podem ocorrer. Para que este problema de alinhamento seja diminuído, Chaurand e colaboradores (2004) desenvolveram um protocolo que utiliza lâminas de vidro opticamente transparentes como placas-alvo, as quais possuem uma fina camada condutora na superfície, juntamente com o tecido destinado a MALDI MS. Isso torna possível a avaliação microscópica de um corte de tecido por um patologista seguido pela imagem molecular da mesma secção de MSI. Entretanto, sabe-se que a sobreposição perfeitamente igual das imagens é pouco provável, já que um tecido pode não ser igual em toda sua extensão. O importante é que os protocolos sejam bem executados para que as diferenças sejam reduzidas ao máximo.

Em relação às proteínas identificadas no presente estudo e suas localizações no tecido alvo, as mesmas serão destacadas sob o ponto de vista da identificação proteômica pelas ferramentas de bioinformática. No entanto, dados de imagens moleculares as evidenciarão para melhor atender como imagens moleculares foram obtidas e o quanto a técnica de MALDI *Imaging* responde as expectativas na identificação de proteínas importantes e sua distribuição pelos tecidos. Para cada

proteína identificada neste estudo, duas relações massa/carga foram adotadas para auxiliar a reconstrução de uma imagem molecular para cada proteína. Nessa perspectiva, a reconstrução de uma imagem molecular para diferentes íons moleculares de uma mesma proteína e a sobreposição delas, vem ratificar a distribuição pontual de uma determinada proteína pelo tecido analisado. Neste estudo, será possível observar que, a distribuição dos íons moleculares é muito semelhante, mas não é idêntica em virtude de que os íons estarem presentes em diferentes intensidades na amostra analisada. Baseado nessas observações, para cada imagem molecular, uma imagem histoquímica foi adicionada para fins de comparação e para promover um mapa ilustrativo da localização das proteínas identificadas nesse estudo. As figuras 41 a 55 mostram o estudo de MALDI *Imaging* para as proteínas identificadas no presente estudo que obtiveram *scores* superiores a 30, como uma forma de privilegiar as identificações mais confiáveis.

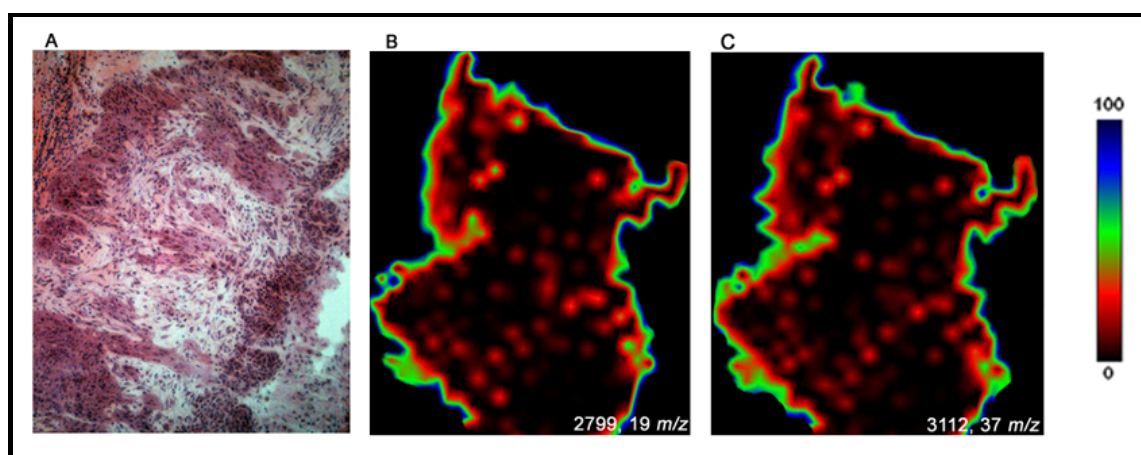


Figura 41 – Proteína Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon molecular 2799,19 m/z ; (C) imagem do íon molecular 3112,37 m/z .

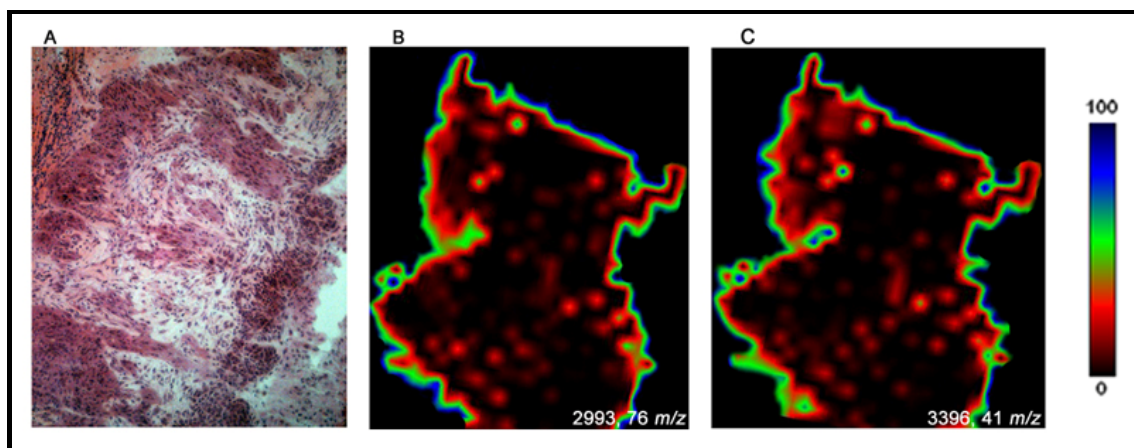


Figura 42 – Proteína Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 2993,76 m/z ; (C) imagem do íon 3396,41 m/z .

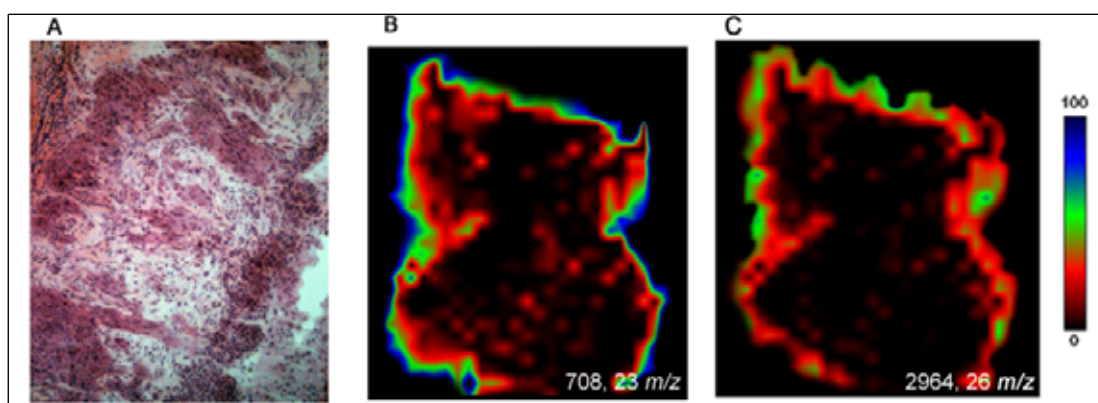


Figura 43 – Proteína Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D4. imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 708,23 m/z ; (C) imagem do íon 2964,26 m/z .

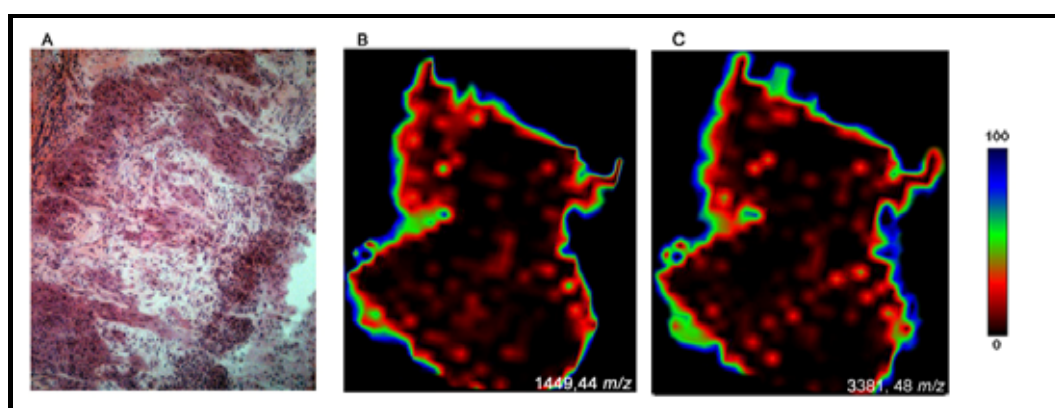


Figura 44 – Proteína Calponin-2. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 1449,44 m/z ; (C) imagem do íon 3381,48 m/z .

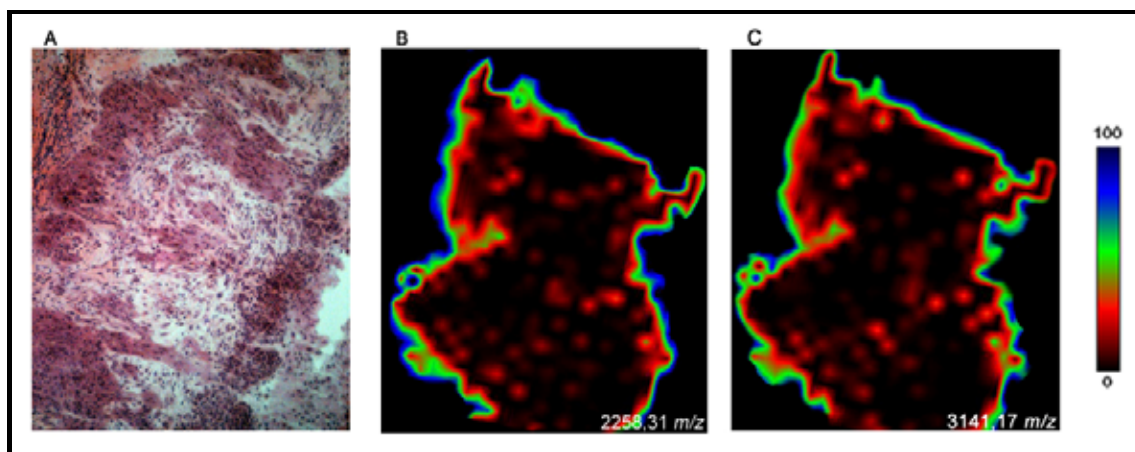


Figura 45 – Proteína Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 2258,31 m/z ; (C) imagem do íon 3141,17 m/z .

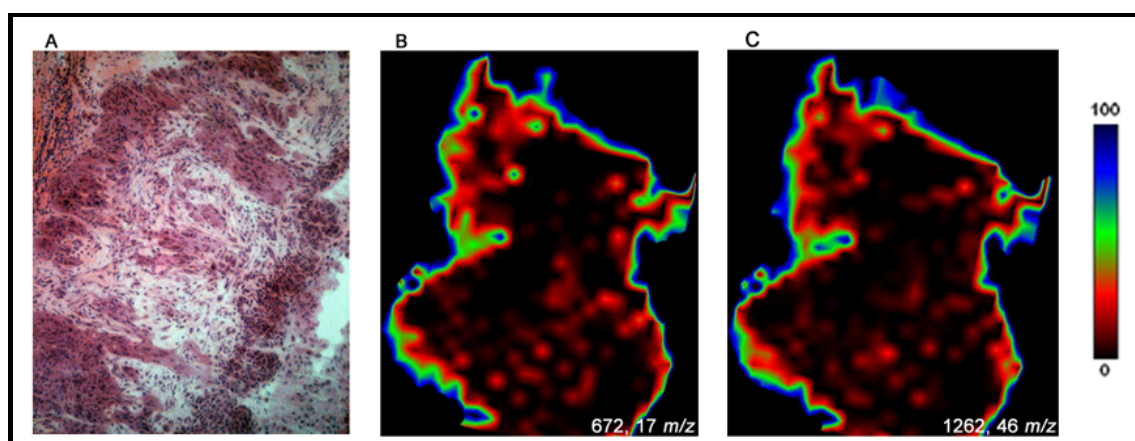


Figura 46 – Proteína Cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 4. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 672,17 m/z ; (C) imagem do íon 1262,46 m/z .

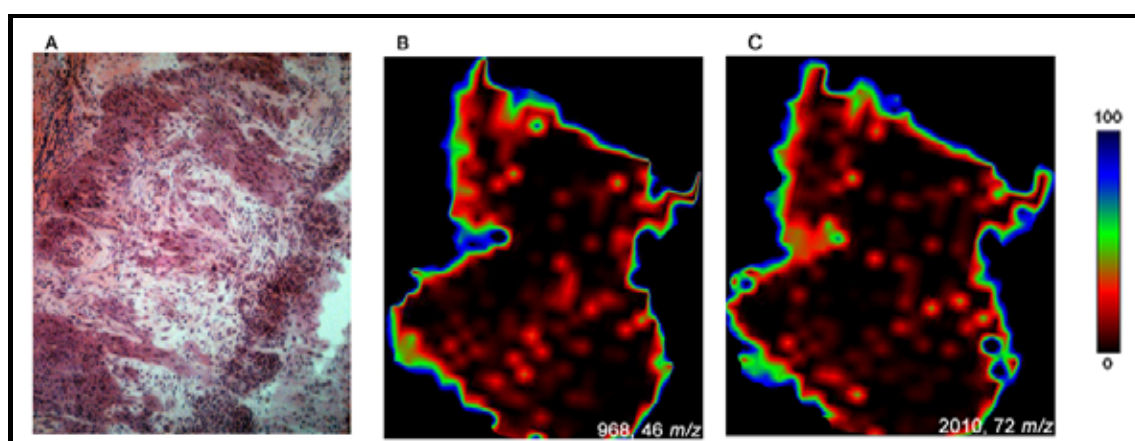


Figura 47 – Proteína Cysteine-rich PDZ-binding protein. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 968,46 m/z ; (C) imagem do íon 2010,72 m/z .

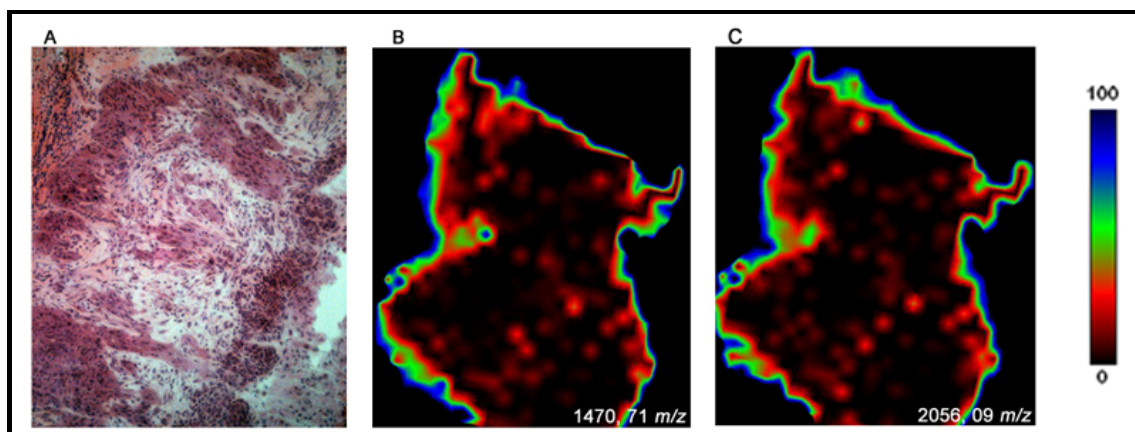


Figura 48 – Proteína Guanine nucleotide-binding protein G. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 1470,71 m/z ; (C) imagem do íon 2056,09 m/z .

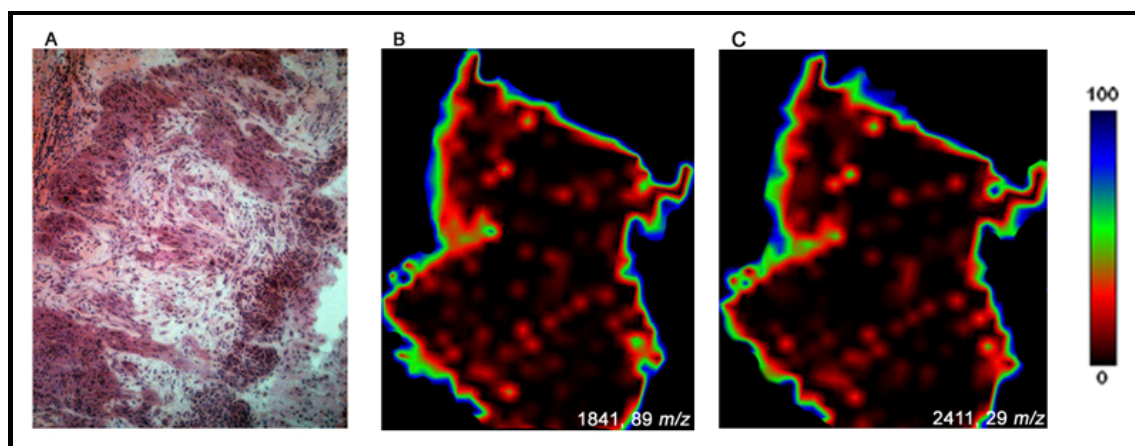


Figura 49 – Proteína Host cell factor 2. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 1841,89 m/z ; (C) imagem do íon 2411,29 m/z .

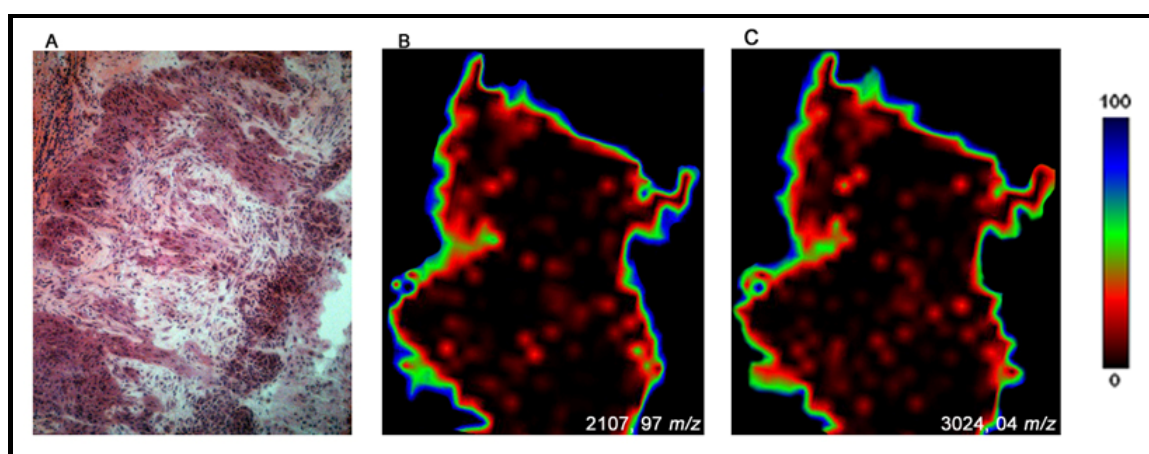


Figura 50 – Proteína Integrator complex subunit 6. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 2107,97 m/z ; (C) imagem do íon 3024,04 m/z .

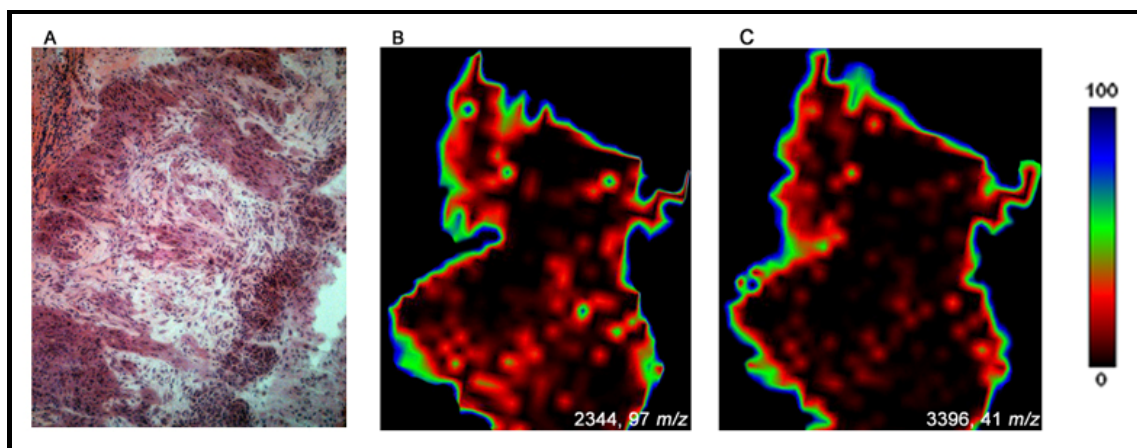


Figura 51 – Proteína Microcephalin. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 2344,97 m/z; (C) imagem do íon 3396,41 m/z.

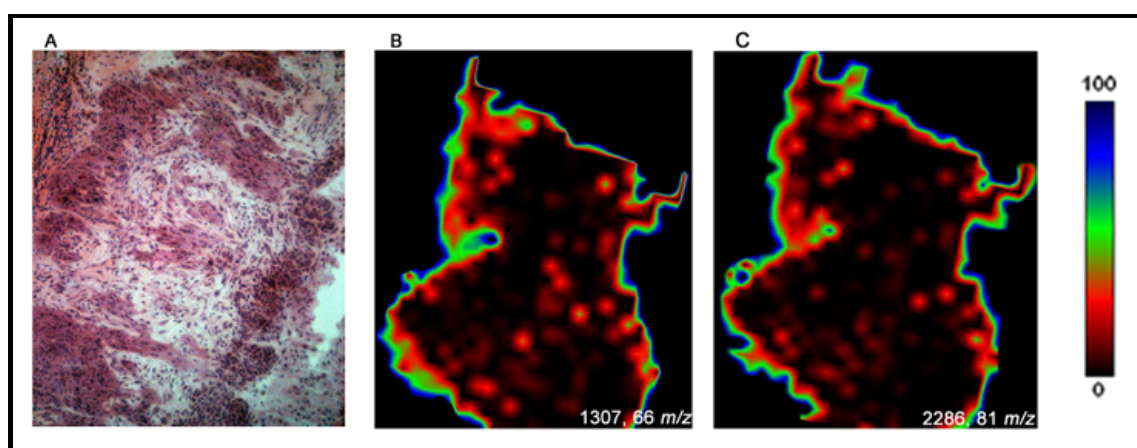


Figura 52 – Proteína Parafibromin. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 1307,66 m/z; (C) imagem do íon 2286,81 m/z.

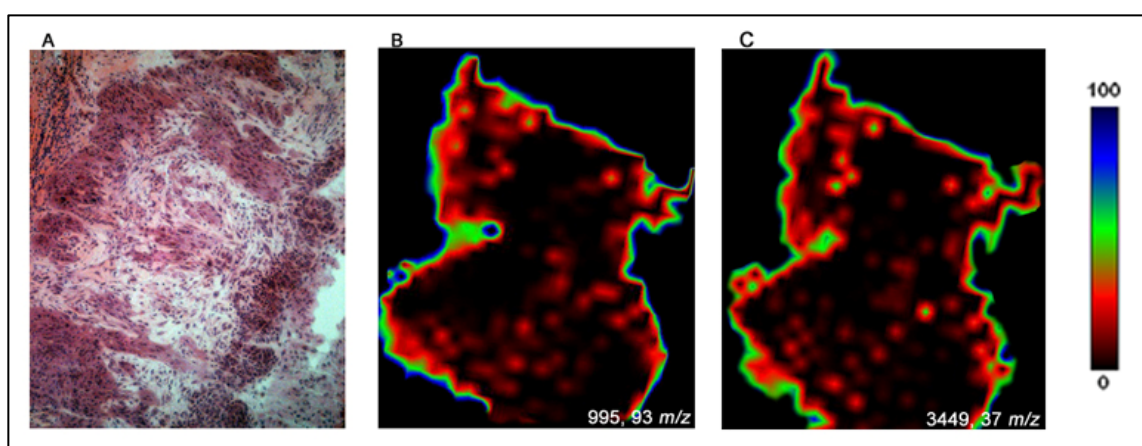


Figura 53 – Proteína Parathyroid hormone-related protein. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 995,93 m/z; (C) imagem do íon 3449,37 m/z.

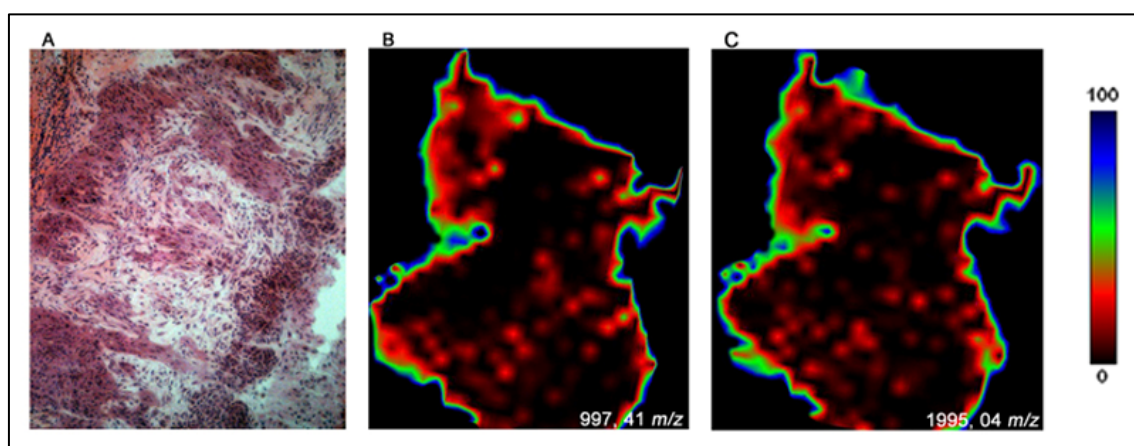


Figura 54 – Proteína RAB3A interacting protein. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 997,41 m/z ; (C) imagem do íon 1995,04 m/z .

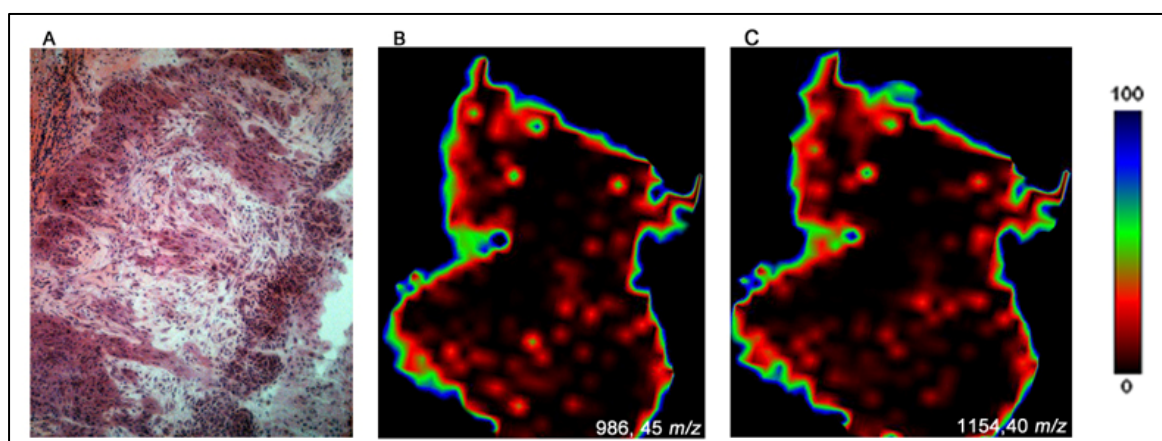


Figura 55 – Proteína Raftlin. (A) imagem histoquímica – coloração com HE; (B) imagem do íon 986,45 m/z ; (C) imagem do íon 1154,40 m/z .

Pode-se notar que a técnica de MALDI *Imaging* é altamente eficaz para um estudo da distribuição de moléculas de interesse pois a espotagem/impressão e a subsequente análise por espectrometria de massas, fornecem uma enorme quantidade de dados de elevada qualidade, que permitem adicionalmente conhecer a intensidade dos compostos presentes em um tecido.

5.6. Identificação das proteínas

Após a obtenção dos espectros de massas de cada ponto impresso no tecido, aproximadamente, 40 proteínas foram reveladas no processo de identificação das mesmas pelas ferramentas de bioinformática.

A Tabela 2 contém as informações relacionadas com a abordagem proteômica clássica de identificação de proteínas, onde os seguintes parâmetros devem ser observados para cada proteína: código de acesso, identificação, função no GeneOntology, localização celular, função, *score*, porcentagem de cobertura ou *matched*, delta e relação massa/carga.

Tabela 2 – Identificações de proteínas obtidas através da técnica de MALDI *Imaging*.

Código de Acesso	Identificação (Cérebro)	Go Terms	Localização Subcelular	Função	Score	% Cobertura de Sequência	Sequência Correspondida	Delta (Da)	m/z
A8MTL9	Serpín-like protein HMSD	tipo de serino inibidor da atividade de endopeptidase	Secreção	Inibidor serino protease. Expressa em células dendríticas e células de leucemia primária, especialmente os de linhagens mielóides	36	38	TDTEYVLR	0.4404	996.64
							TANGLFGEKS	0.0115	936.49
							VNSWVADKT	0.2320	918.70
							TKGENILLFYFDNILNSFIVSSLQNCQI	-0,0451	3233.61
P63313	Thymosin beta-10	Organização do citoesqueleto actina	Citoplasma	Desempenha um papel importante na organização do citoesqueleto	21	38	MADKPDMGEIASFDK	-0,43	1670.31
							ADKPDMGEIASFDKAK	-0,3667	1722.65
P47756	F-actin-capping protein subunit beta	Organização do citoesqueleto actina	Citoplasma	F-actin-capping ligam proteínas em uma forma de Ca2 +- independente para o rápido crescimento das extremidades dos filamentos de actina bloqueando assim a troca de subunidades a esses fins.	28	25	MSDQQDLCALDLMR	-0,4082	1669.30
							VVGKDYLLCDYNR	0,527	1557.29
							LTSTVMLWLQTNKSGSGTMNLGGSLTR	0,4654	2868.91
							DETVSDCSPHIANIGR	0,5039	1713.28

Q5TAT5	Collagen alpha-1 chain	adesão célula-matriz, diferenciação celular, adesão celular.	Membrana celular	Envolvido na interação célula-matriz e adesão celular.	33	15	GFPGFPGPIGLDGKPGHGP	0,3546	2028.41
							GDMGLTGPPGQPGPQQKGEK	0,0985	2051.07
							GQCGEYPHRECLSSMPAALR	-0,2398	2203.75
							GEIGLPGPPGHDGEGKGP	0,1371	1769.02
							K.GDKGDQGAPGLDAPCPLGEDGLPVQGC WVK	0,3979	2993.76
Q9Y2X8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D4	modificação pós-traducional de proteínas, regulação do processo metabólico de proteínas.	Citoplasma	Catalisa a ligação covalente da ubiquitina a outras proteínas.	28	25	MALKR	0,3495	633.71
							VLLSICSLCDPNPDDPLVPEIAHTYK	-0,2349	2964.26
							R.EKYNRL	-0,1227	708.23
Q02223	Tumornecrosis factor receptor superfamily member 17	Imunidade; receptor e proto-oncogene (doença)	Membrana celular; Proteína de membrana unipasso tipo III	Receptor para TNFSF13B/BLYS/BAFF e TNFSF13/APRIL. Promove a sobrevivência de células-B e desempenha papel	32	58	GTNAILWTCLGLSLISLAVFVLMFLLR	-0,2111	3114.25
							ISSEPLK	0,147	3396.41
							SKPKVDSDDHCFPLPAMEEGATILVTTK	0,3348	932.51

									NTSGLLGMANIDLEKSR	0,1932	2051.07
									MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLR	-0,1326	2993.76
									LRSPSVLEVR	-0,2744	1154.40
									TLVLSSTPTSPTQEPLPGGK	-0,0097	1995.04
									STSSAMSGSHQDLSVIQPIVKDCK	0,2324	2517.45
									EADLSLYNEFR	0,137	1355.77
									KCALTGQSK	0,0821	934.57
									LGYFKEEL	-0,0993	997.41
									VRLPLLGAALLMLPLLGR	-0,1148	2258.31
									LLPLLGAALLMLPLLGR	0,3147	2003.57
									LLPLLGAALLMLPLLGTRAQEDAELQPR	0,3733	3141.17
									GPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSND R	-0,1958	3112.37
									AVAAAILGLVLGLLGPLAILLALYLLR	0,3799	2799.19
									CFTCQVCGCGLAQSGFFFK	0,2759	2045.14
									GPSHCAGCK	0,3851	858.73

				ABRA-dependente SRF atividade transcricional.						SSTPTSYQAPKHFHIPAGDSNIYR	-0,1908	2673.10
										LQSGIGRLILK	0,1923	1196.95
POC5K6	Putative tumor antigen NA88-A	x	x	Expressada nos testículos e linhagens de células de melanoma.	x	28	66			MSPSSMCSVPVLLAAASGQNR	0,259	2232.29
										SPPSSMCSVPVLLAAASGQNR	0,2894	2069.29
Q96KP6	TNFAIP-3- interacting protein 3	x	x	Inibe a ativação do NF-kappa-B induzidas pelo fator de necrose tumoral.	x	30	19			EENKLLK	-0,014	872.48
										VEFCHEEMRTEMEVLK	-0,1829	2008.72
										TEMEVLKQVQIYEEDFK	-0,1456	2255.95
										EHPPDYQWYALDQLPPDVQHKANGLSSVK	-0,1435	3331.48
Q6P1J9	Parafibromin	Supressor do Tumor ; ciclo celular	Nucleo	Provável supressor de tumor envolvido no controle das rotas de transcrição e pós- transcrição. Regulação dos ciclos de expressão.		29	35			NVKTNVYVWGTGK	-0,2198	1464.55
										KDLLGYLNGEASTASIDR	-0,2838	2008.72
										EETEGFKIDTMGTYHGMLTK	-0,2373	2286.81
										IDTMGTYHGMLTKSVTEGASAR	0,3485	2341.45
										RHLDRPVFLR	-0,0947	1307.66
Q99439	Calponin-2	organização do citoesqueleto;	Citoplasma	Capacidade de ligação com a		32	30%			NFDDATMKAGQCIVIGLQMGTNK	0,3663	2341.45
										HLYPDKNHILPPMDHSTISLQMGTNK	-0,2464	3018.22

		resposta celular ao estímulo mecânico		actina, calmodulina, troponina C e tropomiosina.			CASQVGMTAPGTRR	-0,2389	1449.44
							LGTDKCDNSSMSLQMGYTQGANQSGQVF GLGR	-0,0197	3381.48
P0C7U8	Putative protein FAM41C	x	x	x	38	44	MCPGVEALDGER	0,284	1275.84
							RTLCMNNLFPYYR	-0,0692	1689.74
							TLCMNNLFPYYR	-0,2981	1533.41
							MAAGETQLYAKVSNK	-0,003	1689.74
							SRSSPSLLEPLLAMGFPVHTALK	0,2623	2466.59
							LSNLTRASFVSHYLQK	0,0421	2056.09
							MYTFSLATDLNSR	-0,3006	1533.41
P57075	Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein A	regulação negativa de receptores de células-T; rota de sinalização.	Citoplasma; nucleio	Interfere com a CBL-mediada regulação e degradação do receptor do tipo tirosina quinase . Promove o acúmulo de alvos ativados por receptores, como os receptores, EGFR e PDGFRB, sobre a superfície de células-T.	32	14	DFENDPPLSSCGIFQSRIAGDALLDSGIR	0,1854	3092.67
Q9P2W3	Guanine nucleotide-binding protein G	Vias de sinalização mediados por hormônios.	Membrana celular; Citoplasma	Envolvidos como moduladores ou transdutores em vários sistemas de	34	52	EVESLKYQLAFQR	-0,07	1689.74
							YQLAFQREMASK	-0,0162	1470.71

					transmembranas.						DPFLNPDLMKNNPWVEK	0,0839	2056.09
P12272	Parathyroid hormone-related protein	regulação negativa da proliferação celular; processo metabólico AMPc	Citoplasma; Nucleo; Secreção	Peptídeo Neuroendócrino regulador do crescimento, desenvolvimento, migração, diferenciação e sobrevivência de células e órgãos.	27	32					FFLHLLAEIHTAEIR	0.3001	1946.35
											TRSAWLDSGYTSGLEGDHLSDTTSTLSLEDSR	-0.2456	995.93
											YLTQETNK	0.4404	3449.37
											MDQSSEGCMIKK	0.2686	1274.76
											NNILDIOLEKSNCLLK	0.0398	1857.04
											GENEQLKISADLIK	0.4518	1557.29
Q4G0S7	Coiled-coil domain-containing protein 152	x	x	x	40	29					EEGYKK	0.5123	752.88
											EMEISELNAK	-0.3761	1178.17
											LRSQEK	-0.3412	759.08
											SQEKEK	-0.3635	747.01
											KLQHFQEEK	0.4085	1186.02
											IIIKDDSEHFSEILLR	-0.4587	1926.58
											MLITK	0.1960	620.55
											AETSKMK	-0.4026	808.99
A2A368	Melanoma-associated antigen B16	x	x	Antígeno de Tumor	20	10					EEEEER	0.2725	917.69

Q8WZ60	Kelch-like protein 6	Rota de sinalização de receptores de células-B.	x	envolvidos na sinalização de receptores de antígenos de linfócitos B e na formação de centros germinativos.	33	14	MLMAGQRGAWTMGDVVEK	-0.3098	2010.62
							TGDLVEILNGEKVK	0.2676	1514.10
							HKPSEK	0.4898	752.88
							FVAEVTCLDPLR	0.3914	1362.09
							LPLTHELESENK	-0.0696	1537.69
							TQCYDPSTNKWSLK	-0.4743	1669.30
							AAMPVEAKCINAVSFR	-0.3965	1721.46
							MAVPPGHGPFSGPGQEHTQVLPDVR	-0.4843	2868.91
							LSVDLIKTYK	-0.5183	1178.17
							LLELMNQHDTEMKYIVHLK	-0.0131	2549.25
							HFMFR	0.5399	752.88
							NTHFRGVSLNLTR	0.2914	1514.10
							MTGGRPLPPDDPATLGLGLRGVPQSTAASS	-0.1665	3346.54
							WVDIALECEK	-0.3432	1232.24
							NMVTTCNNVGVR	0.0271	1361.69
							WNGEK	0.3809	632.67
							NWGEGWGFMPSDR	-0.1881	1537.45
							MAVGFMLAHPYGFTR.	0.0309	1696.85
							MAVGFMLAHPYGFTRVMSSVR	-0.0612	2468.08
QO3519	Antigen peptide transporter 2	transporte intracelular de proteínas virais na célula hospedeira;	Membrana do retículo endoplasmático	Envolvido no transporte de antígenos do	20	14	VVGLYGFMLSIPR	-0.3799	1537.45

		transporte antígeno de peptídeo; processamento do antígeno e apresentação do antígeno peptídeo endógeno via MHC classe I.	o; Proteína multipasso de membrana	citoplasma para o retículo endoplasmático em associação com MHC Classe I			VFSYMDRQPNLPSPGTLAPTTLQGVVK	0.0163	2931.53
							VMMAAAQAAHADDFIQEMEHIYTDVGEK	-0.3222	3062.05
							VMMAAAQAAHADDFIQEMEHIYTDVGEK	0.3068	858.76
Q96CA5	Baculoviral IAP repeat-containing protein 7	anti-apoptótico, fragmentação de DNA envolvidos na mudança nuclear apoptose; ligação da enzima	Citoplasma; Núcleo	Proteção contra apoptose induzida por TNF ou por agentes químicos como adriamycin, etoposid ou staurosporine.	20	12	VCLDRAVSIVFPCGHLVCAECAPGLQLPICR	-0.2417	3483.47
							AVSIVFPCGHLVCAECAPGLQLPICRAPVR	0.1487	3320.83
Q9NW81	ATP-synthase subunit s-like protein	x	x	x	35	26	GIHRLGAAVAPEGNQK	-0.1519	1616.72
							LGAAVAPEGNQKK	-0.1313	1281.57
							TILQFLTNYFYDVEALRDYLLQR	-0.3287	2893.17
							CCHVDDWCLSLRYPLADSLQLSLAGCPR	0.2596	3262.76
Q96H15	T-cell immunoglobuli	Proteína integral de membrana.	Membrana	Receptor de Phosphatidylserine	22	16	VTLPCLYSSWSHNSNSMCWGKDQCPSGCK	-0.0003	3396.41

	n and mucin domain				que aumenta o engolfamento de células apoptóticas. Regulação da proliferação de células-T.				YRLQGTIPR	-0.2520	1102.37
									TSDSVSSPQPGASDTAVPEQNKTTK	-0.0760	2531.12
Q8NEM0	Microcephalin	centro organizador de microtúbulos.	Citoplasma	33	Atua na condensação dos cromossomos	11			QVTHVIFKDGYSQTWDK	0.0615	2051.07
									ENLSPSSQMIQQSHDNPSNLCEAPLNISR	-0.1547	3396.41
									LSPTLSSTK	-0.0051	932.51
									DLIKPHEELKK	-0.1087	1348.66
									TLVMTSMPESEKQNVVIQVVDK	-0.2607	2344.97
Q14699	Raftlin	Membrana plasmática.	Membrana Celular	37	Desempenha papel na formação e/ou manutenção da camada de lipídeos. Atuação como receptor na sinalização de antígenos de células-B.	17			VCAPENYLLSQ	0.2071	1235.79
									FLEFTLSAAELPGSSAVR	0.0114	1995.04
									LIPEFIKK	-0.1637	986.45
									FVGVIPQYHSSVNSAGSSAPVSTANSTEDARDAK	0.2832	3448.93
									NQSPSPSSGPR	-0.1289	1154.40
P51452	Dual specificity protein phosphatase 3	regulação negativa da ativação das células T; inativação da atividade de MAPK; sinapse imunológica.	Citoplasma	28	Atividade tanto na relação proteína tirosina fosfato quanto na relação proteína serino fosfato	24			NLEDQSSKAGDMGNCVSGQQEGGVSEEMK	-0.1558	3141.17
									TSAIANVAK	0.0308	2903.79
									FPATVHMAHQKPTPALEK	0.3120	2018.35

									FPATVHMAHQKPTPALEKVVPLK	0.2533	1665.97
									AALGLGTLALCGAALLYLARCAAEPGDPR	0.0943	2826.58
									VLAMLAWLDEHVAFEVLKADDDSFAR	-0.2248	3123.31
								20	GRVKPGGR	0.1794	825.67
									AWHSEDVSLGAWLAPVDVQR	0.2355	2235.34
									FSLIQKEYEGYEVESSEDASFEK	0.2704	2826.58
									SLEATCEKLNK	-0.1661	1262.46
									SQIAEAKIICK	0.2635	1202.93
								11	LNVSILK	-0.2443	672.17
								28	FELLEKDPNALDVSNATFGR	0.2256	2235.34
									LSGPAEPR	0.2383	825.67
									MDRSMPSMESSR	-0.2843	1573.33
									MVCEK	-0.1135	608.15
									MVCEKCEK	0.0498	968.46
								42	VCEKCEK	0.3603	837.73
								38	LNENKALTSK	0.1189	1116.73

							ARFDPYGK	-0.3903	1032.05
							SSVHQPGSHYCQGCAVK	0.0072	2010.72
Q9UL03	Integrator complex subunit 6	ligação às proteínas, a atividade do receptor transmembrana; actina citoesqueleto.	Nucleo	Supressão do tumor; suprimindo crescimento de células tumorais	30	14	GDRYMLVTFEPPYAIK	0.0038	2107.97
							ENHATEMNELKNLQAEGLTTLGQSLR	0.2971	2930.75
							TSHPVVKFSDTCEPMVIDK	0.3053	2235.34
							AVRMMGAPNLIADSMGYGLSVISYLIK.	0.2689	3206.74
							MMGAPNLIADSMGYGLSVISYLIK	-0.1622	3024.04
							SHGLSMAYR	0.2904	1116.73
							ELDPDQPR	0.0064	968.46
							KGMMIDEAEFVAGPQNK	-0.1799	2010.72
							LTVYLGKR	-0.3392	1028.20
							RDFVDHIDLVDPPDGVVLVDPEYLIK	0.0411	2946.48
P49407	BETA-arrestin - 1	regulação negativa de ubiquitinação de proteínas; regulação negativa da NF-kappaB atividade do fator de transcrição.	Citoplasma; Nucleo; membrana Celular	Atua como suporte para sinalização MAPK como MAPK1 / 3 (ERK1 / 2), envolvida no receptor Toll-like e receptor da IL-1 de sinalização através da interação com TRAF6 que impede TRAF6 autoubiquitinação e oligomerização necessária para ativação do NF-kappa-B	29	15	DFVDHIDLVDPPDGVVLVDPEYLER	0.3448	2995.86
							RVVVTLTCAFR	-0.3044	1327.40

Faz-se necessário explicar alguns parâmetros que ratificam a identificação das proteínas desse estudo.

O código de acesso indicado na tabela, evidencia o número através do qual a proteína é identificada no banco de dados no qual ela está depositada. A função descrita para cada proteína foi evidenciada pela ferramenta GeneOntology (em <http://www.geneontology.org/>), o qual é oriunda de um consórcio que reúne a descrição de produtos gênicos presente nos diferentes bancos dados, fornecendo para o usuário, informações a cerca de componentes celulares, funções moleculares e de processos biológicos.

Quando uma busca por identificação é realizada com auxílio de um banco de dados, os dados submetidos são confrontados com a sequência de proteínas depositadas neste banco. Este procedimento revela qual a porcentagem de aminoácidos é idêntica ou similar àquelas depositadas nos bancos de dados. Esta variável é representada pelo nome de cobertura ou *matched*, ou seja, a parte da sequência que está presente na amostra analisada e que foi localizada na sequência da proteína depositada no banco de dados, seja ela por identidade ou por similaridade.

Outro dado importante estão contidos no item “Delta” da tabela 2, os quais foram obtidos por meio da subtração dos valores da relação massa/carga esperada (os dados da proteína depositada) e da relação massa/carga observada, obtidos na análise por espectrometria de massas. Este valor indica o quanto os valores de relação massa/carga submetidos estão próximos aos valores depositados no banco de dados, representando a qualidade e a precisão da técnica de MALDI *Imaging*.

Dentre as proteínas identificadas, foram reveladas proteínas relacionadas com a estrutura celular, como por exemplo, a organização celular do citoesqueleto, ciclo celular, interações célula-célula e célula-matriz e, com a patologia característica do tecido analisado, como por exemplo, proteínas que estão envolvidas com o sistema imune, apoptose, necrose e etc. A figura 56 demonstra as principais funções das proteínas identificadas neste estudo, entre elas proteínas envolvidas com o processo de Modificação pós-traducional, Controle metabólico, Transdução de sinal, Imunidade, Apoptose, Ciclo celular, Organização do citoesqueleto, Adesão celular e comunicação, Ligação de proteína, Integral à membrana e proteínas que ainda não foram caracterizadas, portanto, proteínas não determinadas.

A categoria identificada como não determinada contém as seguintes proteínas: Putative protein FAM41, Coiled-coil domain-containing protein 152, ATP-synthase subunit s-like protein, LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein, Serpin-like protein HMSD e RAB3A interacting protein. Essas proteínas foram agrupadas na categoria “não determinada”, pois não possuem função relacionada com nenhum dos dois grupos agrupados neste trabalho.

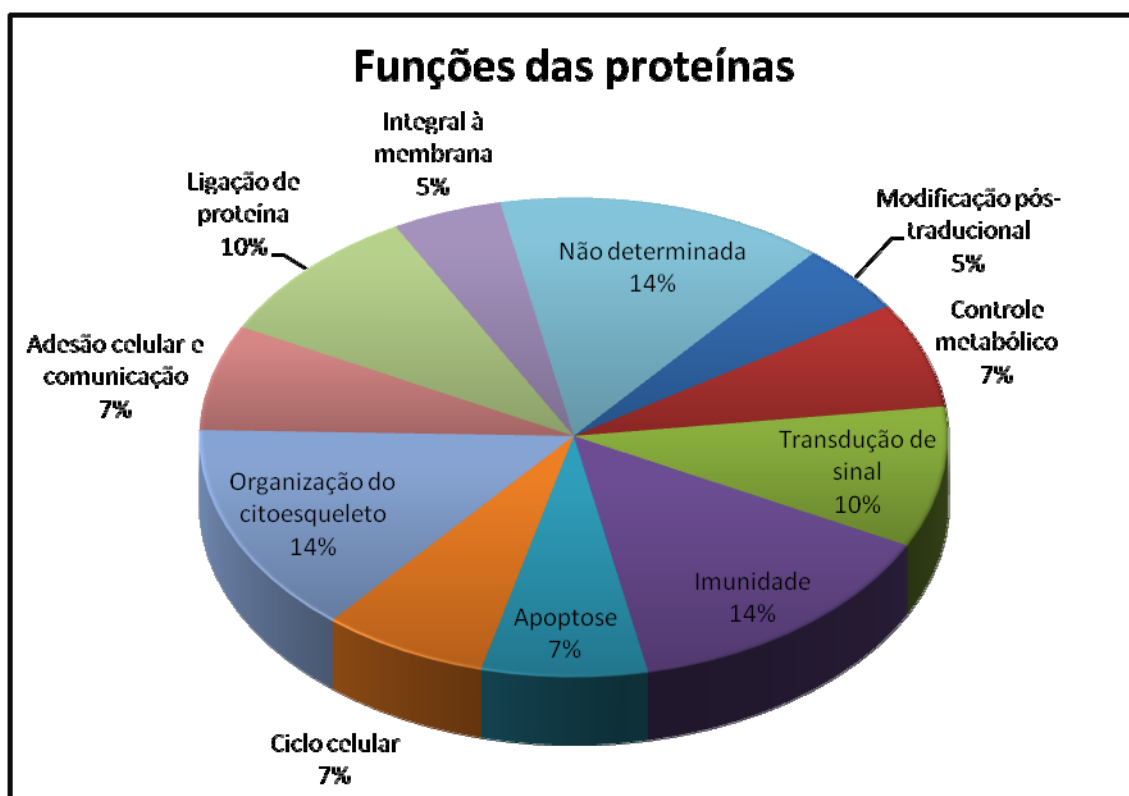


Figura 56 – O gráfico 1 representa as Funções das proteínas identificadas segundo categorias elaboradas.

Um desafio da técnica de MALDI *Imaging* ainda é o aperfeiçoamento dos valores de *scores* das proteínas identificadas neste estudo. Esta variável representa numericamente o quão significativo a identificação proposta é válida. Como visualizado na tabela 2, os *scores* variaram de 20 a 38. Na abordagem de análise proteômica clássica, estes valores seriam insuficientes para que as identificações obtidas fossem validadas.

Entretanto, como essa técnica é inovadora e muitos dos parâmetros analíticos ainda estão em desenvolvimento, como por exemplo, os de preparação do tecido/amostra, os de espotagem/impressão e/ou os de análise por espectrometria de massas, muitas coisas ainda podem ser aprimoradas e consequentemente, os

valores de *scores* serão significativamente maiores. Faz-se necessário lembrar que, esta é uma análise *in situ*, existindo uma grande probabilidade de apresentar muitas proteínas em um só ponto, o que pode comprometer consideravelmente, a identificação das proteínas. Desta forma, para cada coordenada criada neste estudo, uma ou várias proteínas podem ter sido digeridas ao mesmo tempo. Uma vez que os dados oriundos da espectrometria de massas submetidos às ferramentas de bioinformática em busca da identificação das proteínas, os valores de massa/carga dessas diversas proteínas podem estar reunidas em um único espectro. Essa união de dados oriundos de diferentes proteínas pode ser um dos problemas que acarretaram em *scores* com valores abaixo dos permitidos para validação dos resultados da bioinformática proteômica.

Para algumas das proteínas identificadas no presente estudo, existem citações na literatura que as relacionam com tumores, e em muitos casos, elas estão diretamente relacionadas com glioblastoma multiforme. A seguir, serão descritas as principais funções exercidas e algumas características das proteínas Tumor necrosis factor receptor e Ubiquitina, as quais foram citadas anteriormente na tabela 2. As demais proteínas não serão caracterizadas com detalhes, uma vez que, este estudo não foi finalizado.

Tumor necrosis factor receptor

Segundo BRADLEY e colaboradores (2001), receptores associados à fatores de necrose tumoral (TRAFs) foram inicialmente descobertos como proteínas adaptadoras que se acoplam a receptores da família de necrose tumoral, especificamente envolvidas com sinalização celular. Recentemente, esses fatores de necrose tumoral também têm se mostrado como transdutores de sinais de membros da família Toll/interleukin-1. Seis membros da família TRAF já foram identificados. Todas as proteínas TRAF compartilham uma região homóloga denominada C-terminal do domínio TRAF, a qual é capaz de se ligar ao domínio citoplasmático de receptores, e a outras proteínas TRAF. Além disso, TRAFs 2 - 6 têm anel e *motifes* de zincfinger que são importantes para a sinalização de eventos *downstream*. As proteínas TRAF são importantes reguladores de alguns mecanismos importantes com morte celular e resposta celular ao estresse, enquanto que TRAF2, TRAF5 e TRAF6 foram demonstradas como mediadores da ativação de NF- κ B e JNK. Proteínas TRAF são expressas em tecidos normais e doentes de uma forma regulada, sugerindo que elas desempenham um papel importante em processos fisiológicos e patológicos.

Fator de necrose tumoral (TNF) é uma proteína chave na sinalização do sistema imunitário. Como uma citocina reguladora, TNF orchestra a comunicação entre células do sistema imunológico e controla muitas de suas funções (1). TNF é mais conhecida por

apresentar o papel de conduzir as defesas imunitárias para proteger uma área localizada de invasão ou lesão; além disso, também, ela está envolvida no controle da sobrevivência ou morte das células-alvo. (FAUSTMAN 2010). São estruturalmente relacionados com moléculas que modulam um amplo espectro de respostas, incluindo a ativação de vários genes envolvidos em respostas em inflamatórias e imuno-regulação, proliferação celular, respostas anti-virais, a inibição do crescimento e morte celular (BRADLEY *et al.* 2001).

A proteína TRAF4 foi identificada por triagem de uma biblioteca de cDNA de câncer de mama derivadas de linfonodos metastáticos. Originalmente, ela foi denominada CART1 (BRADLEY *et al.* 2001). TRAF4 localiza-se predominantemente no núcleo celular, e não foi mostrada como uma proteína regulamentadora de sinalização através de receptores da superfície celular. Ensaios *in vitro* demonstraram que TRAF4 pode interagir com LTbR, e com o receptor de fator de crescimento do nervo p75, mas não apresenta interação com TNFR1, TNFR2, Fas ou CD40 (Krajewska *et al.*, 1998). TRAF4 é altamente expressa durante a embriogênese de rato, mais notadamente no sistema nervoso central e periférico (Masson *et al.*, 1998). Em ratos adultos, ela é expressa no hipocampo e no bulbo olfatório, mas não em outros tecidos normais (BRADLEY 2001).

Segundo KATO e colaboradores (1995), o fator de necrose tumoral (TNF) tem efeito citotóxico direto e/ou citostático em certas células cancerosas humanas. No entanto, a ação varia de acordo com as células cancerosas e a toxicidade sistêmica quando administrado intravenosamente (Waage 1992). O potencial de TNF para o tratamento de gliomas malignos humanos ainda não foi totalmente avaliado pelos estudos *in vitro*. Baixas doses de TNF tem um efeito antiproliferativo em um painel de linhagem de células de glioblastoma humano (HELSETH *et al.* 1989).

Sendo assim, uma maior compreensão das funções complexas do TNF, que envolvem a atividade desses receptores e as vias de sinalizações envolvidas é fundamental para a identificação de novos alvos moleculares e no desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e seguros.

Ubiquitina

A ubiquitina é uma proteína encontrada nas células eucariotas constituída por 76 aminoácidos que desempenha uma função importante na regulação de proteínas. Ela identifica proteínas indesejadas, como por exemplo proteínas que não foram enoveladas corretamente e sinalizam as mesmas para que estas sejam degradadas por organelas chamadas proteassomas. A modificação pós-traducional de proteínas dependente de ubiquitina e de outras proteínas similares é um mecanismo regulatório essencial em processos biológicos tais como, o controle do ciclo celular,

a ativação do processo de transcrição, a transdução de sinal e na proteólise intracelular dependente do proteassoma 26S. Esta via de modificação é um processo dinâmico, reversível e controlado pela ação de múltiplas enzimas distintas. A conjugação da ubiquitina e de moléculas relacionadas a elas é catalisada pela ação sucessiva de três tipos de enzimas: a ativadora de ubiquitina (E1), a conjugadora (E2) e a ligase (E3). Por outro lado, o processo de remoção é catalizada por proteases, genericamente denominadas de enzimas desubiquitinadoras (DUBs). As DUBs podem atuar em vários níveis da via de ubiquitinação, as quais estão envolvidas tanto na formação da ubiquitina livre como na remoção da ubiquitina dos conjugados proteicos mono ou poliubiquitinados.

A relevância da ubiquitinação nos tecidos tumorais surge a partir de mutações em oncogenes que perturbam a ubiquitinação das proteínas que controlam o crescimento celular e consequentemente, a morte celular. Além disso, o recente desenvolvimento e aprovação do medicamento bortezomib, uma droga inibitória do mecanismo de degradação 26S proteassomal, sublinhou a importância desta via para estratégias no tratamento de diversos tipos de cânceres (MANI *et al.* 2005).

Muitas evidências têm demonstrado que a inibição do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) promove a morte celular por apoptose (DEMARCHI *et al.* 2005). Isto indica que o estudo deste processo pode ser uma possível rota para o tratamento do Glioblastoma multiforme, já que o elevado grau de necrose é uma das marcas registradas deste tumor maligno.

Apesar das abordagens agressivas, o tratamento de pacientes com GBM representa um desafio permanente (FURNARI *et al.* 2007 e ZUH *et al.* 2002). A caracterização de novas vias de necrose seria então uma etapa importante para superar a resistência à apoptose típica de GBMs. Além disso, considerando a propensão de necrose de GBMs, compreender os mecanismos moleculares que governam esse tipo de necrose é fundamental para a concepção de novos tratamentos terapêuticos (FOT *et al.* 2009).

5.7 Considerações Finais

As imagens moleculares geradas por espectrometria de massas pela técnica de MALDI Imaging são altamente específicas, possibilitando a identificação dos compostos diretamente no tecido alvo de estudo e além disso, avaliar sua intensidade por todo o tecido analisado. Paralelamente, com a possibilidade de

localizar substâncias por um tecido, as variações de proteoma induzidos, por exemplo, a ação de drogas específicas, podem ser investigadas em função da dose ou tempo para a determinação de sua eficácia. Esta estratégia pode ser extremamente útil na avaliação da ação de determinadas drogas em períodos de tempo muito curtos perante as possíveis reações provocadas por um tratamento, por exemplo.

É extremamente importante enfatizar que a MSI é uma tecnologia nova que, atualmente, está em fase de desenvolvimento, a qual se tornará mais acessível e funcional para seus usuários em potencial. O tempo de aquisição de uma imagem molecular é dependente de vários parâmetros instrumentais, ou seja, a taxa de repetição do laser ponto-a-ponto, o posicionamento da amostra e o processamento dos dados podem ser variáveis importantes para a obtenção de imagens moleculares com reprodutibilidade.

Outra observação está no fato de aperfeiçoar os métodos de preparação da amostra e os procedimentos de revestimento por matriz para que permitam a obtenção de dados com alta resolução. A espectrometria de massas por imagem traz um benefício extraordinário por ser uma ferramenta de investigação, pois não é preciso saber com antecedência quais proteínas foram alteradas em um estudo comparativo. Além disso, as origens celulares e concentrações relativas dos marcadores através da secção de tecido podem ser avaliadas. Uma vez que, um marcador de interesse é identificado, a sua localização, a concentração, a regulação e a função podem ser investigadas, auxiliando a compreensão da progressão de doenças a nível molecular. Embora a atual tecnologia de MSI não permita a análise de células individuais, sabe-se que novas tecnologias permitirão que esta aplicação seja alcançada em um futuro próximo devido ao aperfeiçoamento da instrumentação analítica na análise de compostos por espectrometria de massas.

Em relação a área clínica, a MSI pode fornecer uma avaliação molecular da progressão do tumor, por exemplo, e do tratamento a partir de biópsias, com potencial para identificar subpopulações tumorais e prever a sobrevivência do paciente, a qual não é evidente, com base no fenótipo celular determinada histologicamente. As informações obtidas pela MSI aumentam significativamente, mas não substituem as ferramentas de diagnóstico molecular existentes na área clínica. Trabalhando em conjunto, essas ferramentas permitirão novas descobertas na biologia e na medicina.

6. CONCLUSÕES

O glioblastoma multiforme é um tumor maligno e oferece baixa taxa de sobrevida aos pacientes com esta patologia. Os tratamentos existentes não são eficazes e a remoção cirúrgica é difícil em decorrência da heterogeneidade do tumor ao longo do tecido cerebral. A análise proteômica clássica vem investigando esta enfermidade e, embora alguns progressos tenham sido alcançados, ainda há muito para se estudar nesta área, a fim de que, se encontre um marcador ou alvo molecular e possibilite o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes.

Embora o objetivo principal do presente trabalho não seja encontrar alvos moleculares, foi demonstrada a habilidade de estudar proteínas importantes da presente patologia por meio da técnica de MALDI Imaging. Os resultados aqui apresentados permitem concluir que, essa técnica vem agregar um imenso valor à análise proteômica clássica, pois conseguiu identificar um grande número de proteínas estruturais e características da patologia proposta em um curto espaço de tempo e com uma breve preparação de amostra. Através desta abordagem, foi possível obter informações a cerca da distribuição das proteínas pelo tecido e também, sobre a intensidade das mesmas pelo tumor analisado.

Dessa forma, pode-se concluir que a técnica de MSI oferece significativas vantagens sobre técnicas de imagem tradicionais, como autoradiografia e espectroscopia de fluorescência. As macromoléculas intactas podem ser desorvidas diretamente em superfícies de tecido, sendo que sínteses adicionais não são necessárias, e permitem que este tipo de análise de localização de compostos, possa ser elaborada com um investimento reduzido.

Além disso, as informações de proteínas específicas e suas localizações no tecido são complementares às aquelas informações geradas a partir da análise proteômica clássica (shotgun, eletroforese bidimensional) e dos ensaios de

ressonância magnética, PET, e de imagens baseadas em anticorpos, que, em conjunto, garantem uma maior compreensão dos processos biológicos.

7. Referências Bibliográficas

AEBERSOLD, R. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature Publishing Group**. Vol. 422, p. 198 a 207, 2003.

AERNI, H. R.; CORNETT, D. S.; E CAPRIOLI, R. M. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. **Analytical Chemistry**. Vol. 78, p. 827–834, 2006.

ALBINI, A.; BENELLI, R. The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. **Nat Protoc**, Vol. 2, p. 504-511. 2007.

BALGLEY, B. M.; GUO, T.; ZHAO, K.; FANG, X.; TAVASSOLI, F. A.; LEE, C. S. Evaluation of archival time on shotgun proteomics of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **J. Proteome Res.**, 8 (2), 917–925, 2009.

BOXER, S.G.; KRAFT, M.L.; WEBER, P.K. Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples. **Annu. Rev. Biophys.**, 38, 53, 2009.

BRADA, M.; JUDSON, I.; BEALE, P.; MOORE, S.; REIDENBERG, P.; STATKEVICH, P.; DUGAN, M.; BATRA, V.; CUTLER, D. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. **Br J Cancer**, Vol. 81, p. 1022–1030. 1999.

BRADLEY, J. R.; POBER, J. S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). **Oncogene**, 20, 6482-6491, 2001.

BRICHORY F, BEER D, LE NAOUR F. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. **Cancer Res.** 61: 7908–12, 2001.

BROWN, D.; GIAVAZZI, R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. **Ann Oncol**, Vol. 6, p. 967–974. 1995.

CALDWELL, R. L., AND CAPRIOLI, R. M. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. **Molecular & Cellular Proteomics**. Vol. 4, p. 394–400, 2005

CANELLE, L.; BOUSQUET, J.; PIONNEAU, C.; DENEUX, L.; IMAMSGHIOUAR, N.; CARON, M.; JOUBERT-CARON, R. Na efficient proteomics-based approach for the screening of autoantibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 299, p. 77-89, 2005.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de Peptídeos usando Espectrometria de Massas: Um guia prático. **Quím. Nova**, vol. 31, nº 3, 669-675, 2008.

CATALONA WJ, RICHIE JP, AHMANN FR. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer. Results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. **J. Urol.** 151: 1283–90, 1994.

CAUWE, B.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, Vol. 42, p. 113–185. 2007.

CHAURAND, P.; SCHWARTZ, S. A.; e CAPRIOLI, R. M. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. **Current Opinion in Chemical Biology**. Vol. 6, p. 676–681, 2002.

CHAURAND P, SCHWARTZ SA, BILLHEIMER D, XU BJ, CRECELIUS A, CAPRIOLI RM. Integrating histology and imaging mass spectrometry. **Anal Chem**. Feb 15;76(4):1145-55, 2004.

CHAURAND, P.; NORRI, J. L. S.; CORNETT, D. S.; MOBLEY, J. A.; CAPRIOLI, R. M. New Developments in Profiling and Imaging of Proteins from Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 05, no 11, 2006.

CHAURAND, P.; LATHAM, J.C.; LANE, K.B.; MOBLEY, J.A.; POLOSUKHIN, V.V.; WIRTH, P.S.; NANNEY, L.B.; CAPRIOLI, R.M. Imaging Mass Spectrometry of Intact Proteins from Alcohol-Preserved Tissue Specimens: Bypassing Formalin Fixation. **Journal of Proteome Research**, 7, 3543–3555, 2008.

CHELLI, B.; LENA, A.; VANACORE, R.; DA POZZO, E.; COSTA, B.; ROSSI, L.; SALVETTI, A.; SCATENA, F.; CERUTI, S.; ABBRACCHIO, M. P.; GREMIGNI, V.; MARTINI, C. Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells. **Biochem Pharmacol**, Vol. 68, p. 125–134. 2004.

CONRAD, C. A.; MILOSAVLJEVIC, V. P.; YUNG, W. K. Advances in chemotherapy for brain tumors. **Neurol Clin**, Vol. 13, p. 795–812. 1995.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de Massa de Proteínas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - volume 36; 2006.

Curran, S.; McKay, J.A.; McLeod, H.L.; Murray, G.I. Laser capture microscopy. **Mol Pathol**, 53(2):64–68, 2000.

DAVIS FG, KUPELIAN V, FREELS S. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. **Neurooncol.** 3: 152–8, 2001.

DAVIS FG, MCCARTHY BJ, FREELS S. ET AL. The conditional probability of survival of patients with primary malignant brain tumors: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) data. **Cancer**, 85: 485–91, 1999.

DEHDASHTI, A. R.; HEGI, M. E.; REGLI, L.; PICA, A.; STUPP, R. New trends in the medical management of glioblastoma multiforme: the role of temozolomide chemotherapy. **Neurosurg Focus**, Vol. 20, p. E6. 2006.

DEMARCHI F,B RANCOLINI C. Altering protein turnover in tumor cells: new opportunities for anti-cancer therapies. **Drug Resist Updat**, 8:359–68, 2005.

DEMPSTER, A. J. **Physical Review**. Vol. 11, p. 316, 1918.

DREISEWERD, K.; KINGSTON, R.; GERAERTS, W. P.; e LI, K. W. Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in *Lymnaea stagnalis*. **International Journal Mass Spectrometry**. Vol. 169, p. 291–299, 1997.

ESQUENAZI, E.; YANG, Y. Y.; WATROUS, J.; GERWICK, W. H. E. DORRESTEIN. Imaging mass spectrometry of natural products. **Natural Product Report**. Vol. 26, p. 1521–1534, 2009.

FRANCK, J.; ARAFAH, K.; ELAYED, M.; BONNEL, D.; VERGARA, D.; JACQUET, A.; VINATIER, D.; WISZTORSKI, M.; DAY, R.; FOURNIER, I. E SALZET, M. MALDI Imaging Mass Spectrometry - STATE OF THE ART TECHNOLOGY IN CLINICAL PROTEOMICS. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. 2023 a 2033, 2010.

FRANCK, F.; ARAFAH, K.; BARNES, A.; WISZTORSKI, M.; SALZET, M.; FOURNIER, I. Improving Tissue Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging. Part 1: Using Microspotting. **Anal. Chem.**, 2009.

FOTI C, FLOREAN C, PEZZUTTO A, RONCAGLIA P, TOMASELLA A, GUSTINCICH S, BRANCOLINI C. Characterization of caspase-dependent and caspase-independent deaths in glioblastoma cells treated with inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. **Mol Cancer Ther.**, Nov; 8(11):3140-50, 2009.

FURNARI, F.B.; FENT, O.N.T.; BACHOO, R.M. Malignant astrocytic glioma: genetics,biology, and paths to treatment. **Genes Dev**. 21:2683–710, 2007.

GIESE, A.; BJERKVIG, R.; BERENS, M. E.; WESTPHAL, M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. **J Clin Oncol**, Vol. 21, p. 1624–1636. 2003.

GILLESPIE, J. W.; BEST, C. J.; BICHSEL, V. E.; COLE, K. A.; GREENHUT, S. F.; et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **Am. J. Pathol.**, 160 (2), 449–457, 2002.

GODOVAC-ZIMMERMANN J, BROWN LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. **Mass Spectrom Rev.**, Jan-Feb; 20(1):1-57, 2001.

GOLDSTEIN, E. **Berl Ber**. Vol. 39, p.691, 1886.

GROSECLOSE, M. R.; ANDERSSON, M.; HARDESTY, W. M.; CAPRIOLI, R. M. Identification of proteins directly from tissue: *in situ* tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. **Journal Of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 254-262, 2007.

GROVAS A, FREMGEN A, RAUCK A. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. **Cancer**, 80: 2321–32, 1997.

HARDESTY, W. M. E CAPRIOLI, R. M. In situ molecular imaging of proteins in tissues using mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. Vol.391, p.899–903, 2003.

HEINE, G.; RAID, M.; FORSSMANN, W.G.G. Mapping of peptides and protein fragments in human urine using liquid chromatography – Mass Spectrometry. **J. of Chromatography**, Amsterdam, v.776, p.117-124, 1997.

HEEREN, R.M.A; SMITH, D.F.; STAUBER, J.; KUKRER-KALETAS, B.; MACALEESE, L. J. Am. Imaging mass spectrometry: hype or hope? **Soc. Mass Spectrom.**, 20, 1006, 2009.

HELSETH E, TORP S, DALEN A, UNSGAARD G. Effect of in terferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on clonogenic growth of cell lines and primary cultures from human gliomas and brain metastasis. **APMIS** 97: 569-574, 1989.

HIROSE, Y.; BERGER, M. S.; PIEPER, R. O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. **Cancer Res**, Vol. 61, p. 1957–1963. 2001.

HONDERMARCK H, VERCOUTTER-EDOUART A-S, RÉVILLION F. Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling. **Proteomics**, 1: 1216–32, 2001.

JOHNSTONE, R. A. W., ROSE, M. E. (Eds.) **Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists**. New York: Cambridge University Press. 2.Ed. 501p., 1996.

JURCHEN, J. C.; RUBAKHIN, S. S. E SWEEDLER, J. V. **Journal American Society Mass Spectrom.** Vol.16, p.1654, 2005.

KATO, T.; SAWAMURA, Y.; TADA, M.; SAKUMA, S.; SUDO, M.; ABE, H. p55 and p 75 Tumor Necrosis Factor Receptor Expression on Human Glioblastoma Cells. **Neurol Med Chir.**, 35, 567 -574, 1995.

KRAFFT C, THÜMLER K, SOBOTTKA SB, SCHACKERT G, SALZER R. Classification of malignant gliomas by infrared spectroscopy and linear discriminant analysis. **Biopolymers**. Jul; 82(4): 301-5, 2006.

KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, ZAPATA JM, VAN ARSDALE T, GASCOYNE RD, BERERN K, MCFADDEN D, SHABAIK A, HUGH J, REYNOLDS A, CLEVINGER CV, REED JC. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. **Am J Pathol.** Jun;152(6):1549-61, 1998.

LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, NUSBAUM C, ZODY MC, BALDWIN J. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**. 409: 860–921, 2001.

LEMAIRE, R.; DESMONS, A.; TABET, J. C.; DAY, R.; SALZET, M.; FOURNIER, I. Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffinembedded tissue sections. **J. Proteome Res.**, 6 (4), 1295–1305, 2007

LE NAOUR F, MISEK DE, KRAUSE MC. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. **Clin Cancer Res.** 7: 3328–35, 2001.

LEVIN, V. A.; LEIBEL, S. A.; GUTIN, P. H. Neoplasms of the central nervous system. In: DE VITA JR, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. (editores). **Cancer: principles of oncology**, Lippincott-Raven, Filadélfia, p. 2100–2161, 2001.

LI, K. W.; VAN GOLEN, F. A.; VAN MINNEN, J.; VAN VEELLEN, P. A.; VAN DER GREEF, J.; e GERAERTS, W. P. Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of Lymnaea: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. **Mol. Brain Res.** Vol. 25, p. 355–358, 1994.

LIEBLER, D. C. The Proteome. In: Liebler, D. C., editor. Introduction to proteomics: tools for the new biology. **Human Press**, Totowa, p. 1-13, 2002.

MADDALO, G.; PETRUCCI, F.; LEZZI, M.; PANNELLINI, T.; DEL BOCCIO, P.; CIAVARDELLI, D.; BIROCCIO, A.; FORLÌ, F.; DI ILIO, C.; BALLONE, E.; URBANI, A.; E FEDERICI, G. Analytical assessment of MALDI-TOF imaging mass spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation. **Clinical Chemistry Acta**. Vol. 357, p. 210–218, 2005.

MANGÉ, A.; CHAURAND, P.; PERROCHIA, H.; ROGER, P.; CAPRIOLI, R.M.; SOLASSOL, J. Liquid Chromatography-Tandem and MALDI Imaging Mass Spectrometry Analyses of RCL2/CS100-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Proteomics Evaluation of an Alternate Fixative for Biomarker Discovery. **Journal of Proteome Research**, 8, 5619–5628, 2009.

MANI, A.; GELMANN, E. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 23, 2005.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, New York, v.405, p.837-846, 2000.

PATEL, V.; HOOD, B. L.; MOLINOLO, A. A.; LEE, N. H.; CONRAD, T. P.; BRAISTED, J. C.; KRIZMAN, D. B.; VEENSTRA, T. D.; GUTKIND, J. S. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. **Clin. Cancer Res.**, 14 (4), 1002–1014, 2008.

PAWELETZ CP, GILLESPIE JW, ORNSTEIN DK. Rapid protein profiling of cancer progression directly from human tissue using a protein biochip. **Drug Dev Res.** 49: 34–42, 2000.

PENNINGTON, S. R.; WILKINS, M. R.; HOCHSTRASSER, D. F.; DUNN, M. J. Proteome analysis: from protein characterization to biological function. **Trends Cell. Biol.**, Cambridge, v.7, p. 168-173, 1997.

PLEBANI, M. Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? **Clinical Chimica Acta**, Amsterdam, v.357, p.113-122, 2005.

POLYAK K, RIGGINS GJ. Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research. **J Clin Oncol.** 19: 2948–58, 2001.

RESING, K.A.; AHN, N.G. Applications of mass spectrometry to signal transduction. **Progr. Biophys. Mol. Biology**, Elmsford, v.71, p.501-523, 1999.

RONCI, M.; BONANNO, E.; COLANTONI, A.; PIERONI, L.; DI ILIO, C.; SPAGNOLI, L. G.; FEDERICI, G.; URBANI, A. Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to MALDI-TOF imaging MS investigations. **Proteomics**, 8 (18), 3702–3714, 2008.

SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R.; Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods** 2004.

SEELEY, E. H.; OPPENHEIMER, S. R.; MI, D.; CHAURAND, P.; CAPRIOLI, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, v.19, p.1069–1077, 2008.

SPENGLER, B. **The Basics Of Matrix-Assisted Laser Desorption, Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry And Post-Source Decay Analysis**. In: James, P. (Ed.) *Proteome Research: Mass Spectrometry*. 1.Ed.Germany:Springer,Chap.3, p.33-53, 2001.

STAUBER, J.; LEMAIRE, R.; FRANCK, J.; BONNEL, D.; CROIX, D.; DAY, R.; WISZTORSKI, M.; FOURNIER, I.; SALZET, M. MALDI imaging of formalinfixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. **J. Proteome Res.**, 7 (3), 969–978, 2008.

STAUBER J, AYED ME, WISZTORSKI M, SALZET M, FOURNIER I. Specific MALDI-MSI: Tag-Mass. **Methods Mol Biol.** 656:339-61, 2010.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, 422, 193, 2003.

VIRREY, J. J.; GOLDEN, E. B.; SIVAKUMAR, W.; WANG, W.; PEN, L.; SCHÖNTHAL, A. H.; HOFMAN, F. M.; CHEN, T. C. Glioma-associated endothelial cells are chemoresistant to temozolomide. **J Neuro Oncol**, Vol. 95, p. 13–22, 2009.

WAAGE, A. The molecules and their emerging role. In **medicine in Beutler B** (ed): Tumor Necrosis Factors. New York, Raven, pp 237-254, 1992.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L. APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. editors. **Proteome research: new frontiers in functional genomics**. Springer, Berlin, p.243, 1997.

WISEMAN, J.M.; IFA, D.R.; VENTER, A.; COOKS, R.G. Ambient molecular imaging by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Nat. Protoc.**, 3, 517, 2008.

XIANG, Y.; SEKINE, T.; NAKAMURA, H.; IMAJOH-OHMI, S.; FUKUDA, H.; NISHIOKA, K.; KATO, T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as na autoantigen in patients with osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 50, p. 1511-1521, 2004.

YOON, O. K.; ROBBINS, M. D. ; ZULETA, I. A.; BARBULA, G. K. E ZARE, R. N. **Analytical Chemical**, vol.80, p. 8299, 2008.

ZIMMERMAN, T.A.; MONROE, E.B.; TUCKER, K.R.; RUBAKHIN, S.S. SWEEDLER, J.V. Imaging of cells and tissues with mass spectrometry: adding chemical information to imaging. **Methods Cell Biol.**, 89, 361, 2008.

ZHU, Y.; PARADA, L.F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nat Rev Cancer**,2:616–26, 2002.



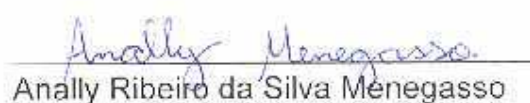
Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Orientador



Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Co-orientadora



Anally Ribeiro da Silva Menegasso

Graduanda