UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Leticia Gomes de Pontes

ANÁLISE PROTEÔMICA DO PLASMA SANGUÍNEO E CRIOPRECIPITADO DE BÚFALOS *Bubalus Bubalis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do titulo de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu
2015

Leticia Gomes de Pontes

Análise proteômica do plasma sanguíneo e crioprecipitado de búfalos *Bubalus Bubalis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do titulo de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos, CEVAP/FMB/UNESP

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, CEVAP/FMB/UNESP

Botucatu

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pontes, Leticia Gomes de.
Análise proteômica do plasma sanguíneo e crioprecipitado de búfalos Bubalus bubalis. / Leticia Gomes de Pontes. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Rui Seabra Ferreira Junior
Capes: 20801017

1. Biologia molecular. 2. Proteômica. 3. Marcadores biológicos. 4. Biodiversidade. 5. Búfalo.

Palavras-chave: bioprospecção; búbalinos; marcadores moleculares; pesquisa básica; proteômica.

Leticia Gomes de Pontes

Análise proteômica do plasma sanguíneo e crioprecipitado de búfalos *Bubalus Bubalis*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do titulo de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Comissão examinadora

_____

Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu

_____

Prof. Dr. Mario Sérgio Palma
Universidade Estadual Paulista Rio Claro - UNESP
Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) - Departamento de Biologia

_____

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
Departamento de Ciências Biológicas

DADOS CURRICULARES

Leticia Gomes de Pontes

NASCIMENTO : 28/10/1986

FILIAÇÃO: Nelson Mariano de Pontes Filho e Nilma Gomes de Pontes

2011 – Graduação em Biologia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP)

2012 – Bolsista de aperfeiçoamento em Apoio Técnico Laboratorial.

2013 – Realizou o projeto de extensão: “Elaboração de material didático para o ensino sobre animais peçonhentos e seus acidentes no serpentário do CEVAP”

2014 – Estágio docência do curso de Biologia da Universidade Estadual Paulista na disciplina de Bioquímica da Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri

Dedicatória

Dedico esta dissertação

Aos meus pais, ***Nelson Mariano de Pontes Filho*** *e* ***Nilma Gomes de Pontes*** *que não mediram esforços para qve ev chegasse até esta etapa de minha vida.*

Ao meu noivo ***Fabio Chaves Sgavioli****, pessoa com quem amo partilhar a vida. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz mesmo na correria.*

A minha orientadora Prof. Dra. ***Lucilene Delazari dos Santos****, pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria que muito me auxiliou para conclusão deste trabalho.*

Agradecimentos

*A **Deus**, cuja sabedoria guia nossos caminhos.*

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP pela infraestrutura e condições para o desenvolvimento deste trabalho

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) pela oportunidade de fazer parte dessa equipe e aos funcionários que sempre me auxiliaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxilio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

*Aos pesquisadores qve me acompanharam, em especial a Profa. Dra. **Lucilene Delazari dos Santos** porque sem ela nada disso seria possível, Prof. Dr. **Benedito Barraviera** e ao Prof. Dr. **Rui Seabra Ferreira Junior**, também responsáveis pela realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. **Pedro de Magalhães Padilha** pelos ensinamentos científicos.*

*Ao Prof. Dr. **Mario Sérgio Palma** por ser sempre solicito a ajudar.*

*À Profa. Dra. **Eliane Candiani Arantes** pelo carinho.*

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas, SP pelo suporte nas análises de espectrometria de massas e por me ajudaram na realização do presente trabalho.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Em especial a ***Rafaela Nunes da Silva***, ***Lidiane Nunes Barbosa*** *e ao* ***Franco Valentin Pereira***.

Aos meus amigos do CEVAP pela paciência. Em especial a ***Patrícia Rocha Mendes***, ***Aline Ropelli Silva*** *e* ***Fausto Capuano Neto***.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, meu sincero obrigado.

Epígrafe

"Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida
e muda todas as perguntas..."

Luís Fernando Veríssimo

Resumo

Desde o advento da nova era da abordagem proteômica, a identificação de assinaturas moleculares individuais em vários sistemas biológicos pela pesquisa básica tem impulsionado a descoberta de biomarcadores diretamente relacionados a aplicações terapêuticas, promovendo desenvolvimento de testes diagnósticos clínicos mais específicos. Neste contexto, a necessidade da aplicação clínica estimula a pesquisa de bancada, sendo que novas tecnologias permitem novas descobertas e podem se transformar em prognósticos efetivos, medicamentos inéditos ou mais eficazes e/ou testes diagnósticos mais específicos. Os bubalinos tem sido alvo de muitas iniciativas econômicas e de pesquisas translacionais. Uma vez que, seu plasma sanguíneo é rico em fibrinogênio, búfalos da espécie *Bubalus bubalis* raça Murrah, se tornaram doadores primordiais de matéria-prima para o desenvolvimento de insumos biológicos, como por exemplo, o selante de fibrina derivado do veneno de serpentes e do sangue de bubalinos produzido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP). Para tal, se fez necessário melhor compreender a composição do plasma sanguíneo e do crioprecipitado destes bubalinos, a fim de dar suporte à pesquisas futuras que envolverão a identificação de marcadores moleculares de doenças infecciosas que podem acometer estes animais doadores. Este trabalho foi dividido em duas partes: a primeira destaca-se os achados prévios e significância da bubalinocultura, a utilização do sangue de animais para o desenvolvimento de bioinsumos na saúde animal e humana, a produção e aplicação de diversos selantes de fibrina, o uso da abordagem proteômica como estratégia investigativa para a prospecção de biomarcadores moleculares de doenças infecciosas e uma breve descrição das principais técnicas analíticas empregadas pela abordagem proteômica. A segunda parte deste trabalho, destaca-se a caracterização proteica do plasma sanguíneo e do crioprecipitado de búfalos *B. bubalis* clinicamente sadios, evidenciando 17 grupos de proteínas majoritárias envolvidas com a via de sinalização do sistema complemento e a cascasta de coagulação.

Palavras-chave: Análise proteômica, bubalinos, selante de fibrina, marcadores moleculares.

Abstract

Since the advent of the new era of proteomics approach, the identification of individual molecular signatures in various biological systems for basic research has driven the discovery of biomarkers directly related to therapeutic applications, promoting the development of more specific clinical diagnostic tests. In this context, the need for clinical application stimulates the bench study, which new technologies and new discoveries can become effective prognostic, or novel drugs more effective and/or more specific diagnostic tests. The bubaline have been targets of several economic initiatives and translational research. Since its plasma is rich in fibrinogen, *Bubalus bubalis* water buffalos (Murrah) have became main donors of raw material for the development of biological insumes, as example, the fibrin sealant from snake venoms and water buffalos blood produced by The Center for the Studies of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) at UNESP. Then, it was necessary to better understand the composition of the blood plasma and cryoprecipitate these buffalo, in order to support future research will involve the identification of molecular markers of infectious diseases that can affect these donor animals. This study was divided into two parts: the first stands up the previous findings and significance of buffalo, the use of animal blood for developing bioinsumes in animal and human health, the production and application of several fibrin sealants, the use proteomics approach as a research strategy for the discovery of molecular biomarkers of infect diseases and a brief description of the analytical methods used by proteomics approach. The second part of this work brings the protein characterization of blood plasma and cryoprecipitate of *B. bubalis* healthy buffalo, where have evidenced 17 groups of major proteins involved in the signaling pathway of the complement system and the cascade coagulation.

Keywords: Proteomic Analysis, water buffalo, fibrin sealant, molecular markers.

Lista de Abreviaturas

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

IgG - Imunoglobulina G

CEVAP - Centro de estudos de venenos e animais peçonhentos

Decit - Ministério da ciência e tecnologia

CNPq - Conselho nacional de desenvolvimento cientifico e tecnológico

SUS - Sistema único de saúde

PFA - Proteínas de fase aguda

Hp - Haptoglobina

HPLC - Cromatografia liquida de alta performance

2D - Eletroforese bidimensional

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

ESI - *Electrospray*

SILAC - *Stable* isotope labelling by amino acids in cell culture

iTRAQ - *Isobaric tag for relative and absolute quantification*

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica..... 22

1. Achados prévios e significância..... 23

1.1. O papel dos bubalinos na produção de bioinsumos..... 23

1.2. Pesquisas biotecnológicas aplicadas à animais soroprodutores..... 24

1.3. Selantes de fibrina como adesivos cirúrgicos: descobertas e suas diversas aplicações..... 27

1.4. Desenvolvimento de um novo selante de fibrina para o tratamento de ulceras crônicas venosas..... 32

1.5. Marcadores moleculares na avaliação da sanidade animal..... 36

1.6. Abordagem proteômica como estratégia de investigação..... 38

1.7. As ferramentas analíticas da proteômica em estudos translacionais..... 41

2. Referências..... 45

CAPÍTULO 2

1. Análise proteômica do plasma sanguíneo e criopreciptado de búfalos *Bubalus Bubalis*..... 57

Resumo..... 58

Abstract..... 59

1. Introdução..... 60

2. Objetivo geral..... 64

3. Material e métodos 65

3.1 Aspectos Éticos e origem do material biológico em estudo..... 65

3.2 Coleta do sangue 66

3.3 Obtenção do crioprecipitado..... 66

3.4 Eletroforese bidimensional..... 66

3.5 Aquisição e análises das imagens de géis..... 67

3.6 Digestão de proteínas in gel..... 68

3.7 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas (LC-MS/MS)..... 68

3.8 Bioinformática proteômica..... 69

4. Resultados..... 70

5. Discussão..... 79

6. Conclusão..... 90

7. Referências..... 91

ANEXO 101

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

1. ACHADOS PRÉVIOS E SIGNIFICÂNCIA

1.1. O PAPEL DOS BUBALINOS NA PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS

Nos últimos anos, grandes avanços científicos ocorreram envolvendo pesquisas básicas de bancada e tiveram seus desdobramentos no setor biotecnológico, no que se refere ao desenvolvimento de novos compostos bioativos a partir de matérias-primas de origem animal [1]. Neste contexto, os búfalos da espécie *Bubalus bubalis* ganharam espaço considerável na economia mundial por atuarem como doadores de matéria-prima.

Os animais da espécie *Bubalus bubalis* é de origem asiática e podem ser encontrados em maior abundância nas regiões tropicais e temperadas da Ásia. A população de búfalos no mundo totaliza 168 milhões de animais, que estão distribuídos geograficamente nas seguintes proporções: 161 milhões [95,83%] na Ásia, 3,717 milhões [2,24%] na África, 3,3 milhões [1,96%] na América do Sul, 500 mil [0,3%] na Europa e 40 mil [0,02%] na Austrália [2]. Portanto, essa espécie tem ocupado um relevante papel na produção de alimentos por garantirem estabilidade econômica para áreas menos favorecidas [2]. Além disso, estes animais têm sido mundialmente utilizados em atividades econômicas, dentre estas, o emprego de força para a tração de instrumentos agrícolas e a produção de leite e de carne [3].

A criação de bubalinos vem crescendo em todo o mundo [4], haja vista, os dados brasileiros publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2010. Estes dados indicaram 1.207.461 cabeças de búfalos distribuídas pelas cinco regiões brasileiras, destacando-se as raças Murrah e Jafarabadi [5]. Segundo o MAPA, o Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo. Atualmente, a bubalinocultura cresce com maior intensidade nos países localizados em áreas tropicais, dada a maior capacidade adaptativa e produtividade dos búfalos frente aos bovinos.

Dentre os fatores de maior relevância que sustentam o crescimento da população bubalina mundial, destacam-se, principalmente, as características químicas singulares do leite e da carne desses animais, sendo estes potenciais precursores de matéria-prima para as indústrias alimentícias [6]. De acordo com pesquisas realizadas por Ricci, o leite de búfala apresenta um elevado valor nutricional em vista dos maiores níveis de gorduras, proteínas, calorias, vitamina A e cálcio quando comparado com o leite de vacas [7;8]. Este elevado teor de cálcio no leite de búfalas é importante sob o ponto de vista nutricional e tecnológico, especialmente para elaboração de produtos lácteos [9,10,11], sendo recomendado para pessoas que apresentam osteoporose [12,13]. De acordo com Silva, o leite de búfala é cerca de 40-50% mais produtivo na elaboração de derivados, em relação ao leite bovino [7,14].

Associado ao maior rendimento do leite para produção de derivados, o búfalo produz carne de excelente qualidade. Estudos apontam que a carne bubalina apresenta maior proporção de ferro [15], uma maior porcentagem de carne magra, maior concentração de proteínas, melhor cor e menos umidade que a bovina [16]. Pelas similaridades, e em alguns casos, superioridade em relação à composição nutricional das carnes convencionais (vermelha [bovina] e branca [frango]), a carne de bubalinos constitui uma fonte importante para a produção de derivados [17]. Somado todos esses atributos entre o leite de búfala e a carne bubalina, este animal torna-se um recurso natural em potencial para o fornecimento de matéria-prima com qualidades excepcionais para a indústria alimentícia [18].

1.2. PESQUISAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS À ANIMAIS SOROPRODUTORES

A matéria-prima de origem animal possui um mercado promissor por ser o início da linha de produção das indústrias alimentícias [19]. Porém, uma nova frente de pesquisas biotecnológicas vêm se desenvolvendo no que se refere às fazendas

produtoras de animais de grande porte [14]. Sabe-se que, o sangue é um líquido viscoso que tem por finalidade estabelecer a comunicação entre as diversas estruturas anatômicas que compõem o organismo dos vertebrados [20]. É composto de glóbulos brancos ou leucócitos, glóbulos vermelhos ou hemácias, plaquetas ou trombócitos. Ao centrifugar o sangue total na presença de agentes coagulantes, se obtém o plasma como sobrenadante dessa preparação, o qual é composto por 90% de água, e os outros 10% são moléculas que desenvolvem um papel crucial na manutenção das funções de imunidade, conteúdo de oxigênio e outras funções do organismo [21].

Apesar do plasma ser constituído por até 6% de proteínas totais, a utilização de animais de grande porte como doadores/soroprodutores desse material biológico tem se tornado importante na pesquisa científica e/ou na produção de medicamentos e imunobiológicos [22,23]. O principal exemplo de imunobiológico é o soro antiofídico. Em sua etapa de produção, o veneno das serpentes é inoculado subcutaneamente em doses crescentes de concentração em equinos. Neste caso, o animal fornece um grande volume de sangue, rico em anticorpos, produzidos contra ao veneno inoculado. Doze litros de sangue, aproximadamente podem ser coletados de um cavalo que pese 400 quilos, sendo um procedimento amplamente padronizado e seguro para a saúde do animal [24]. Então, o plasma é concentrado, purificado e fracionado, as proteínas inativadas são eliminadas e as gamaglobulinas específicas, são mantidas para a produção do soro-antiofídico [25].

Outro estudo biotecnológico promissor e inovador que envolve sangue de animal de grande porte, está a transfusão de plasma sanguíneo a potros que não receberam colostro até 24 horas pós-parto [26], neste caso, a transferência de 2 a 4 litros de plasma contendo anticorpos específicos, auxiliam os produtores de animais de grande porte à adequarem os níveis séricos de IgG dos animais quando deficiências como essa são destacadas durante o manejo [27]. A indicação dos baixos

níveis de IgG e a reposição dos mesmos nos animais, reduzem em 60% a probabilidade de morte desses animais, índices estes evidenciados nas pesquisas de Silva e colaboradores (2013) no manejo de equinos, recentemente [14].

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP) vem desenvolvendo um novo selante de fibrina há mais de 20 anos, para atuar como cola biológica em procedimentos cirúrgicos e no auxílio durante o tratamento de úlceras venosas crônicas. A equipe de pesquisadores do CEVAP propôs a prospecção de um novo selante a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos. Esta iniciativa de desenvolvimento um novo selante de fibrina a partir do sangue de búfalos ganhou mais expressão quando Thomazini-Santos e colaboradores (1998) avaliaram o tempo de coagulação da fração trombina de serpentes *Crotalus durissus terrificus,* empregando-se crioprecipitado (plasma concentrado) de diferentes espécies animais. Este estudo evidenciou que o plasma de búfalos da espécie *Bubalus bubalis* apresenta uma concentração de fibrinogênio superior aos demais animais analisados (homem, bovinos, equinos e ovinos) e tempo de coagulação próximos aos obtidos nas amostras de seres humanos [28].

Uma vez que, para se produzir um dos componentes do novo selante de fibrina do CEVAP, o fibrinogênio presente no plasma desses bubalinos é o principal substrato da cascata de coagulação proposta, estes animais passaram a ser os animais doadores de matéria-prima (plasma) para o desenvolvimento do novo selante de fibrina.

1.3. SELANTES DE FIBRINA COMO ADESIVOS CIRÚRGICOS: DESCOBERTAS E SUAS DIVERSAS APLICAÇÕES

Mas qual a origem dos selantes de fibrina? Por que estudar e pesquisar selantes de fibrina?

Bennett e colaboradores (1988) descrevem que a tentativa de utilização de agentes selantes e hemostáticos tópicos em procedimentos cirúrgicos é data de muitos anos desde os anos 1800 A.C. por meio dos papiros egípcios, onde se encontram os primeiros relatos médicos que agentes com poder selante foram empregados [30]. Entretanto a descrição da utilização da fibrina como principal composto biológico de ação adesiva para procedimentos cirúrgicos simples foi realizada apenas em 1909 pelo pesquisador Bergel, ao publicar o manuscrito intitulado *On the functions of fibrins*, onde foi relatado o efeito hemostático da fibrina em feridas cirúrgicas [31]. Posteriormente, outros pesquisadores descreveram seus relatos de experiências com uma maior riqueza de detalhes, como por exemplo, Grey e pesquisadores (1915), após nove anos da primeira publicação, estes pesquisadores se impressionaram com o poder do selante da fibrina no combate de hemorragias hepáticas e cerebrais [32]. Já em 1942, Seddon & Medswar relataram a utilização de fibrina na anastomose de nervos, obtendo resultados satisfatórios perante os tratamentos disponíveis na época [33]. No mesmo ano, os pesquisadores Tidrick & Warner realizaram uma nova formulação deste selante, tornando-o mais eficaz a estratégia como adesivo de fibrina na fixação de enxertos cutâneos [34].

No entanto, Staindl em 1979 conduziu novas pesquisas na tentativa de aprimorar a ação adesiva do selante de fibrina descrito por Tidrick & Warner [35]. O pesquisador Staindl relatou a necessidade de se obter maiores concentrações de fibrinogênio, e, posteriormente, combiná-las à trombina não humana para a realização de testes de eficiência adesiva. Para tanto, ele produziu o adesivo de fibrina a partir de

um *pool* de plasma humano [35]. Este selante tinha como composição fibrinogênio extraído de vários plasmas humanos, o qual foi posteriormente adicionado à trombina extraída do sangue bovino. Este novo selante de 1979 foi utilizado em quase todas as especialidades cirúrgicas a partir desta data, não havendo qualquer relato de transmissão de doenças na época. Entretanto, infelizmente, a organização *Food and Drug Administration* (órgão regulatório que afere sobre o desenvolvimento de medicamentos no mundo) não aprovou sua extensa produção e aplicação devido à possibilidade de transmissão de doenças virais como as diversas e severas hepatites, uma vez que, este selante não apresentava segurança no que se refere à transmissão de doenças infecciosas.

Muitos estudos utilizando selantes de fibrina com origem humana e animal foram retomados a partir dos anos 90, como por exemplo, os achados de Scardino e colaboradores (1999) quando avaliaram histologicamente a cicatrização epitelial após procedimentos cirúrgicos em cadelas utilizando selantes derivados de plasma humano e de plasma bovino. Neste estudo, os autores mostraram que ambos os selantes atuaram positivamente e diminuíram o tempo de fechamento da sutura em relação aos procedimentos convencionais, porém, o grupo tratado com o produto derivado de plasma humano, observou-se a presença de um infiltrado inflamatório crônico [36], enfatizando ainda a problemática em se usar um produto de origem humano devido à possibilidade de transmissão de doenças infecciosas.

Do ponto de vista experimental e clínico, a década de 90 foi marcada pela presença de vastas pesquisas nas áreas de medicina veterinária, odontologia e dermatologia no que se refere ao aprimoramento do composto adesivo cirúrgico realizado a partir da combinação das proteínas fibrinogênio e trombina heterólogos. Conforme citado anteriormente, Thomazini-Santos e colaboradores em 1998 revelaram a viabilidade de um novo selante de fibrina a partir de matérias-primas de

serpentes e plasma animal [28]. Este estudo que destacaram a existência e aplicabilidade clínica deste novo selante de fibrina produzido então pelos pesquisadores do CEVAP, o qual atuaria como um adesivo cirúrgico, foi evidenciado em 1999 por Stolf e colaboradores, os quais observaram que, este adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente e do sangue de búfalos, mimetiza as reações finais do processo da coagulação sanguínea e que, o fibrinogênio de búfalos ao interagir com a fração "trombina-like" extraída do veneno de serpente, liberaria uma fibrina monomérica, a qual na presença do fator XIII e de cálcio, esta malha se tornaria polimérica, agindo como uma cola biológica [29;37]. Neste estudo, Stolf e colaboradores (1999) observaram vinte e um pacientes portadores de tumor cutâneo na região nasal, com idade média de 64 anos de ambos os sexos, foram tratados com esta cola biológica desenvolvida pelo CEVAP. Os resultados revelaram que, este adesivo de fibrina teve a capacidade adesiva total (alta aderência) em 66,7% e parcial (media aderência) em 33,3% dos pacientes que foram submetidos a processos de cirurgia cutânea, constituindo-se, desta forma, um método alternativo valioso nestes tipos de cirurgia. Nesse sentido, este estudo revelou pela primeira vez, a importância do papel da fibrina exógena, a qual mimetiza e amplifica os últimos passos fisiológicos da fase da coagulação [37].

A partir de então, outros estudos envolvendo o selante heterólogo do CEVAP foram desenvolvidos. Sartori-Filho e colaboradores (1998) observaram o poder adesivo do novo selante de fibrina do CEVAP em nervos ciáticos, no cólon de ratos e na pele de coelhos. Após a análise dos ferimentos ocorridos cirúrgicamente nestes animais saudáveis, os autores observaram que o uso deste selante, desencadeou um processo de cura mais rápido e uniforme destes ferimentos em relação aos procedimentos de suturas convencionais [38]. Em contrapartida Chalhoub e colaboradores (2000), submeteram ovelhas prenhas à dois diferentes processos cirúrgicos cesarianos: à cesariana com adesão tecidual realizada através da aplicação

do novo selante de fibrina do CEVAP e, à cesariana convencional com adesão tecidual realizada através de suturas convencionais [39], e neste caso, a adesão tecidual por meio das suturas convencionais apresentou um melhor processo de cicatrização. No mesmo ano, Leite e colaboradores (2000), demonstraram que o novo selante de fibrina do CEVAP pode tornar-se uma ferramenta valiosa em anastomoses de cólon de roedores, pois agiu como um agente impermeável, principalmente, quando associado à fatores de risco que causam deiscências, como infecção, hipóxia, hematoma, diabetes e desnutrição [40].

Entre 2005 e 2007, outros dois estudos apontaram o novo selante de fibrina do CEVAP como uma ferramenta próspera em procedimentos cirúrgicos na área da medicina veterinária e na área da odontologia humana. Ferraro e colaboradores (2005) apontaram a recuperação de uma taxa de 62,5% de tendões rompidos de cães, onde uma ligeira retração do dentão de cerca de 2 mm, permitiu um aumento progressivo na resistência para a força máxima de tração e a reparação permanente desses tendões tratados com o selante [41]. Paralelamente, Chiquito (2007) avaliou pacientes com defeitos gengivais conhecidos como recessão do tecido marginal sob a ação do novo selante de fibrina do CEVAP. Neste estudo, o enxerto foi fixado utilizando selante de fibrina derivado de veneno de serpente, sendo comparado à pacientes submetidos aos procedimentos de suturas convencionais. O selante derivado de veneno de serpente demonstrou características favoráveis como estancamento e regeneração rápida quando aplicado em cirurgia periodontal, no que se refere ao recobrimento radicular em recessões teciduais marginais em relação à aplicação de sutura convencional [42].

O uso do novo selante de fibrina derivada do veneno de serpente e do sangue de grandes animais mostrou-se de fácil aplicação, viável com modelos animais e de baixo custo, evitando o progresso da lesão, permitindo assim, a cicatrização [37;42]. Neste contexto, Sampaio e colaboradores (2007) utilizaram o novo selante de fibrina

para reparar ferimentos da ceratectomia em cães. Os resultados indicaram que a cola de fibrina foi eficiente no reparo dos ferimentos oculares e apesar do pequeno tempo de permanência, o novo selante mostrou-se eficiente, pois contribuiu para os mecanismos reparadores, acelerando o processo de cicatrização, evitando a formação de edema na ferida, o que contribui para a manutenção da limpidez da córnea [43].

Estudos realizados por Barbosa e colaboradores (2008) na área odontológica, evidenciou novamente que o uso do selante de fibrina do CEVAP é tão eficaz na imobilização de enxertos gengivais em relação aos enxertos suturados. Neste estudo, os enxertos foram realizados nos dentes pré-molares mandibulares contralaterais de 15 pacientes. Os grupos que tiveram o enxerto suturado apresentaram uma maior densidade de células inflamatórias em sete dias e uma tendência para uma menor densidade de colágeno, enquanto que o grupo suturado com o bioproduto apresentou uma aparência de cura mais avançada [44]. Portanto, os autores indicaram que este bioproduto pode promover a maturação do enxerto gengival já na primeira semana após a cirurgia, em comparação com a utilização de suturas convencionais, podendo assim, o selante de fibrina vir a ser o material substituto candidato nos procedimentos de cirúrgicos de suturas convencionais.

No entanto, este novo selante de fibrina do CEVAP tem despertado grande interesse também na área da biotecnologia. Além de cola biológica, Gasparoto e colaboradores (2014), avaliaram a viabilidade *in vitro* do selante de fibrina do CEVAP como ótimo modelo de arcabouço para células-tronco mesenquimais. Os autores observaram que, este selante heterólogo pode ser eficiente como arcabouço biológico, pois ao interagir com as células tronco mesenquimais, manteve-as viáveis, ou seja, o selante não afetou a adesão, proliferação e diferenciação celular e permitiu a aderência e o crescimento das células-tronco em sua superfície [45], demonstrando assim, que este selante também pode ser uma ferramenta útil em vários processos

clínico-cirúrgicos regenerativos, onde a implantação de células-tronco em órgãos condenados ou debilitados se faz necessário.

1.4. DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SELANTE DE FIBRINA PARA O TRATAMENTO DE ULCERAS CRÔNICAS VENOSAS

Os termos “ferida ou úlcera” podem ser definidos como sendo qualquer lesão presente no tecido epitelial, nas mucosas ou em determinados órgãos acarretando prejuízo de suas funções básicas. Caracterizam-se por apresentar perda de tecido atingindo a epiderme, às vezes a derme chegando muitas vezes ao tecido celular subcutâneo e mais raramente aos músculos [43].

A úlcera cutânea é de ocorrência comum, mas quando complicada por uma infecção ou dependendo da sua cronicidade, representa um grave problema de saúde pública [46]. A prevalência de úlcera venosa ativa (não cicatrizada) entre os adultos é de aproximadamente 0,3% na população mundial, ou seja, um em cada 350 adultos são acometidos por essa enfermidade [47]. Nos Estados Unidos, estima-se que o custo anual para o tratamento da úlcera venosa esteja entre 1,9 e 2,5 bilhões de dólares, sendo que 1,3% da verba destinada à saúde são investidos no tratamento de úlceras venosas (UVs) [48,49]. No Brasil, particularmente no município de Botucatu, Estado de São Paulo, a prevalência das UVs é de 1,5% [47]. De acordo com estes autores, houve um aumento de 4% na prevalência desta enfermidade em indivíduos com idade acima de 65 anos [47]. Esse dado tem preocupado as autoridades de saúde, haja vista que, atualmente, a população idosa brasileira, ou seja, com idade superior a 60 anos, representa cerca de 19 milhões de indivíduos. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [50], 10% da população do nosso país se encontram neste grupo de risco. Além disso, estimativas deste Instituto indicam que esse contingente atingirá 32 milhões de pessoas em 2025, tornando o Brasil o sexto colocado no mundo em número de idosos [50].

As principais complicações que ocorrem nos pacientes com úlceras venosas crônicas são: infecções de partes moles, colonização crítica, dermatite de contato, osteomielites e, mais raramente, transformação neoplásica [51]. Os portadores das úlceras venosas crônicas necessitam de cuidados especiais, como um atendimento multidisciplinar composto por cirurgiões vasculares, dermatologistas, fisioterapeutas, nutricionistas, entre outros. Além disso, a principal e maior consequência dessa enfermidade é o comprometimento da qualidade de vida e da autoestima desses pacientes, que além de dores e da dificuldade de locomoção, a lesão pode apresentar exsudato com forte odor [52], o que consequentemente, pode restringir suas atividades da vida diária e o lazer, levando-os à quadros de frustração e depressão [53].

Mas não se pode descartar que, várias doenças sistêmicas comuns exacerbam ainda mais o processo de cicatrização das úlceras venosas, como por exemplo, a presença de diabetes mellitus e/ou fragilidade da pele [54]. Neste contexto, Broadbent e colaboradores (2010), se esforçam para investigar vários fatores no ambiente da ferida que auxiliam na compreensão do complexo processo de cicatrização das úlceras [55]. O processo de cicatrização ocorre fundamentalmente em três fases: inflamação, formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular e remodelação pela presença de mediadores derivados da circulação (as frações livres do complemento, fatores de coagulação, moléculas do sistema fibrinolítico e hormônios como os esteroidais, tireoideanos e a insulina), cininas (histamina,bradicinina e serotonina), mediadores peptídicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e estruturas da matriz extracelular) e mediadores lipídicos (eicosanóides) [56].

Os principais métodos destinados à cicatrização da úlcera são o tratamento local e a terapia compressiva. Algumas medidas devem ser tomadas para diminuir a hipertensão venosa crônica e sua repercussão na macro e microcirculação. A terapia compressiva age na macrocirculação, aumentando o retorno venoso profundo,

diminuindo o refluxo patológico durante a deambulação e, aumentando o volume de ejeção durante a ativação dos músculos da panturrilha [57]. A compressão do membro aumenta a pressão tissular favorecendo a reabsorção do edema e melhorando a drenagem linfática [58]. Além disso, age na microcirculação diminuindo a saída de líquidos e macromoléculas dos capilares e vênulas para o interstício, podendo estimular também a atividade fibrinolítica [59]. A pressão externa que a compressão deve realizar no tornozelo dos pacientes com úlcera venosa é em torno de 35 a 40mmHg e gradualmente menor na região abaixo do joelho. Para atingir os benefícios da compressão o paciente deve ser estimulado a deambular. Todos os métodos compressivos são contra-indicados se o paciente apresentar doença arterial periférica grave, ou seja, pulsos distais não palpáveis [57]. No tratamento local da ferida é importante o preparo do seu leito. Este é um conceito clínico que se refere ao manejo para acelerar a cicatrização endógena e auxiliar na eficácia das medidas terapêuticas. É um conceito relativamente recente, que proporciona uma abordagem estruturada no tratamento das feridas crônicas. Foi desenvolvido devido ao aumento da compreensão das diferenças entre exsudato de feridas agudas e crônicas e pelo potencial de prejuízo que o fluído de tal ferida causa no leito da lesão [60]. No entanto, até o momento, não existe nenhuma terapia comprovadamente eficaz [61] para a cura de úlceras venosas crônicas.

Contudo, infelizmente não existe um tratamento 100% eficaz para as úlceras crônicas venosas atualmente. Neste contexto, os pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP) vêm desenvolvendo um novo selante de fibrina há mais de 20 anos, para auxiliar no tratamento de úlceras venosas crônicas. A equipe de pesquisadores do CEVAP propôs a prospecção de um novo selante a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos. Muitos estudos pré-clínicos foram realizados até que Gatti e colaboradores

entre 2007 e 2010, desenvolveram um ensaio clínico pioneiro fase I, utilizando o novo selante de fibrina do CEVAP em 24 pacientes adultos com úlceras de membros inferiores de origem venosa; neste estudo, evidenciou-se que este selante auxiliou na cicatrização total e/ou parcial das úlceras, proporcionando alta dos pacientes na oitava semana de tratamento. Neste mesmo contexto, o CEVAP, juntamente com a Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, deram continuidade em 2011 ao ensaio clínico multicêntrico de fase II, no qual 260 pacientes com úlceras venosas de membros inferiores serão estudados, tendo o apoio do Ministério da Ciência e Tecnologia (Decit) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do processo no. 563582/2010-3 – (Projeto de Pesquisa Clínica intitulado *"Tratamento de úlceras venosas com o selante de fibrina derivado de veneno de serpente*" - Edital MCT/CNPq/CT - Saúde/MS/SCTIE/DECIT Nº 67/2010 - Pesquisa Clínica - Produtos Estratégicos para o Sistema Único de Saúde (SUS). Como aplicação biotecnológica, este novo selante está sendo aplicado em pacientes que apresentam ulceras venosas crônicas, a fim de auxiliar na cicatrização das mesmas como tratamento adjuvante. O diferencial deste novo selante é o fato de não apresentar risco de transmissão de doenças infecciosas humanas por ser constituído de fluidos animais (sangue de bubalinos e veneno de serpentes), e por ser um produto genuinamente brasileiro, seu custo é reduzido e, atualmente, se encontra padronizado para utilização clínica em pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores. A principal meta deste projeto de pesquisa clínica é disponibilizar este novo selante para distribuição junto ao SUS. Porém, até o presente momento, não se tem a compreensão se, este bioinsumo atua como um agente cicatrizante no tratamento das úlceras venosas ou somente atua no preparo do leito, conforme os questionamentos deixados por Gatti e colaboradores (2011) [62].

1.5. MARCADORES MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA SANIDADE ANIMAL

Atualmente, a utilização de biomarcadores é considerada de extrema importância nas pesquisas experimentais por aumentar a confiabilidade dos estudos clínicos. Além disso, a identificação de biomarcadores chaves em determinados indivíduos podem contribuir para a prevenção de alterações, o que poderia ser feito mediante a elaboração de programas de intervenção [63]. Outro importante papel dos biomarcadores é a sua utilização para o aprimoramento de tratamentos pré-existentes.

Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo. A utilização dos biomarcadores pode ter como finalidade elucidar a relação causa-efeito e para fins de monitoramento biológico, realizado de maneira sistemática e/ou periódica [64,65]. Contudo, existe a necessidade de identificar e validar, para cada sistema biológico, os biomarcadores que poderão ser utilizados como indicadores durante uma atividade de monitoramento. Os biomarcadores podem ser utilizados ainda no diagnóstico clínico com o objetivo de confirmar o diagnóstico de uma intoxicação aguda ou crônica, de avaliar a efetividade de um tratamento ou mesmo de avaliar o prognóstico de casos individuais [66].

Sabe-se que a uma das primeiras resposta do organismo para estresse imunológico é a síntese e a secreção de proteínas a partir das células hepáticas [67;68;69;70;73;74]. A resposta imunológica ocorre logo após uma lesão, declinando dentro de um ou dois dias [75]. Proteínas cuja concentração se eleva rapidamente nesses casos são denominadas de proteínas de fase aguda (PFA). O fígado é estimulado a produzir um número de proteínas que podem ser detectadas em níveis mais elevados em animais com processos inflamatórios instalados [71;72;76]. As proteínas de fase aguda podem ser divididas em dois grupos: negativas e positivas. As negativas são as que diminuem a concentração quando ocorre a resposta de fase aguda, que incluem albumina e transferrina; enquanto as positivas têm seu nível elevado quando há

resposta de fase aguda, tais como proteína C-reativa, glicoproteína ácida-1, antitripsina-1, antiquimotripsina-1, amiloide A sérica, ceruloplasmina, haptoglobina (Hp), macroglobina-2, fibrinogênio e componente do complemento [77,73]. Relata-se que estas proteínas podem ser consideradas indicadoras potenciais de doença inflamatória ou do bem-estar em animais, individualmente ou em rebanho [73].

Kaneko e colaboradores (1997) evidenciaram que a haptoglobina (Hp) é a proteína de fase aguda mais importante em ruminantes [78]. De acordo com Jain (1993), Hp é uma glicoproteína sintetizada no fígado, com quatro cadeias de polipeptídios e com meia vida no plasma de dois a quatro dias [79]. Estruturalmente, a Hp é formada por duas subunidades alfa combinadas com duas subunidades betas que se estabiliza ao se juntar com a hemoglobina [73].

Com base na necessidade de se controlar a qualidade a matéria-prima doada por esses animais considerados produtores de insumos biológicos para a indústria biotecnológica, várias técnicas qualitativas são empregadas no intuito de se obter o perfil de proteínas expressas em condições normais de saúde, para que bioprodutos possam ser produzidos com fidelidade em larga escala pela indústria farmacêutica, facilitando seus acessos à comunidade [80].

Pomorska-Mól *et al* (2014) investigaram a cinética das proteínas de fase aguda em quadros subclínicos e clínicos de gripe em suínos. A gripe suína é uma doença respiratória contagiosa importante na saúde pública humana. O diagnóstico da gripe suína foi baseado em sinais clínicos e confirmado pela detecção do vírus ou anticorpos específicos no sangue. No entanto, a infecção é muito mais frequente do que a doença propriamente dita e neste caso, as proteína C-reativa, haptoglobina e amilóide sérica, denomiadas de fase aguda, foram evidenciadas como marcadores superexpressos após a infecção provocada em 28 leitões. Neste estudo, foi evidente a relação entre a magnitude da resposta sérica das proteínas de fase aguda com a

gravidade da doença, proporcionando assim, uma ferramenta bioquímica viável em uma rotina diagnóstica em relação ao grau da infecção por gripe suína [81].

A importância de proteínas de fase aguda (PFA) como biomarcadores de enfermidades em ruminantes. Para tal, se determinou o proteinograma sérico e leucograma para bovinos, ovinos e caprinos sadios e doentes. Em bovinos, a proteína haptoglobina teve destaque como um biomarcador molecular precoce e confiável de foco inflamatório/infeccioso. Em ovinos, as proteínas ceruloplasmina, haptoglobina, glicoproteína-1 ácida mostraram moderada expressão frente às enfermidades avaliadas. Já a proteína transferrina, embora tenha se mostrado biologicamente como uma PFA negativa em todos os grupos estudados, apenas apresentou comportamento estatisticamente diferenciado em bovinos acometidos por mastite [82].

Ao mesmo tempo em que as proteínas de fase aguda podem responder por quadros clínicos de inflamação em animais, estas podem não necessariamente ser os marcadores moleculares para doenças infecciosas como tuberculose, brucelose, papilomatose, febre aftosa e anaplasmose. A crescente preocupação com a rapidez na identificação e resolução de problemas sanitários em rebanhos incentivou e propiciou os avanços tecnológicos na área de identificação de biomarcadores moleculares. Desta forma, a utilização de técnicas analíticas da abordagem proteômica pode atuar como uma ferramenta molecular inovadora para identificar marcadores específicos para sanidade animal.

1.6. ABORDAGEM PROTEÔMICA COMO ESTRATÉGIA DE INVESTIGAÇÃO

Atualmente, a busca por novas moléculas a partir de extratos de vegetais, de venenos e de insumos animais, como o plasma/soro/sangue, têm contribuído para a descoberta de novos medicamentos [83]. Estima-se que cerca de 60% dos fármacos antitumorais e anti-infecciosas que se encontram disponíveis no mercado são de

origem natural [84,85], e foram descobertas por técnicas analíticas que compõe a estratégica de análise proteômica.

A abordagem proteômica é o estudo em larga escala de peptídeos/proteínas, usualmente, por métodos bioquímicos [86,87,88,89]. A proteômica está relacionada com o conjunto de tecnologias analíticas que têm por objetivo separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas [90]. Essas moléculas controlam a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares [91,92]. Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de novas tecnologias para o estudo deste conjunto de proteínas diferencialmente expressas. Desta forma, as ferramentas analíticas passaram, então, a serem instrumentos essenciais na abordagem proteômica [93].

Neste contexto, avanços tecnológicos vêm beneficiando diferentes áreas da biomedicina nos últimos anos. Estes avanços deram ênfase nos estudos que promoveram o aumento de escala de análises e a agilidade na obtenção de métodos mais eficientes para a descoberta de proteínas candidatas à biomarcadores [94]. Estudos proteômicos têm auxiliado na obtenção de diagnósticos clínicos mais específicos na área de medicina. Em humanos há o desenvolvimento de uma plataforma proteômica para detecção de marcadores prognósticos e diagnósticos através da análise do fluído de feridas crônicas [95]. Auxiliou no isolamento das proteínas presentes em baixas concentrações no fluido de feridas crônicas. Tal estudo resulta na identificação de biomarcadores moleculares para auxiliar a segregar os pacientes quando submetidos às diferentes terapias na área de dermatologia[95].

De forma semelhante, Zhang e colaboradores (2012) evidenciaram em seus estudos, biomarcadores em potenciais para a doença de Parkinson [96]. Ele observou marcações com isótopos estáveis nos ensaios de espectrometria de massas quantificaram as proteínas diferencialmente expressas nas amostras oriundas de

pacientes com doença de Parkison, a fim de se classificar os diferentes estágios dessa doença. Desta forma, os pesquisadores determinaram que a proteína apolipoproteína AI, na fase inicial dos pacientes acometidos pela doença de Parkinson, se mostrou reduzida, ou seja, sua expressão foi suprimida nesta fase da doença. Apolipoproteína AI é uma proteína que atua, não só no metabolismo de lipídios do sistema nervoso central, mas também, participa do processo de deposição de proteínas que estão envolvidas nas doenças degenerativas neurais [96].

Recentemente, Phillips e colaboradores (2014) avaliaram o perfil de proteínas no soro de pacientes acometidos por úlceras de Buruli. A úlcera de Buruli é uma doença causada por *Mycobacterium ulcerans* e, tem se espalhado pelos países tropicais rapidamente, com implicações expressivas na saúde pública e econômica na África Ocidental, principalmente. Neste estudo, os pacientes acometidos por esse tipo de úlcera tiveram os níveis de proteínas totais e uréia reduzidos no sangue, mesmo na ausência de sinais de desnutrição ou insuficiência funcional do fígado. Este estudo evidenciou uma assinatura proteômica exclusiva para esta doença, uma vez que, as proteínas albumina e globulina que estão envolvidas com o metabolismo lipídico, com a coagulação e a remodelação de tecido, se encontraram diferencialmente expressas [97].

Na medicina veterinária, muitos estudos prospectivos e biotecnológicos utilizaram da abordagem proteômica para evidenciar marcadores moleculares do plasma seminal, visando o conhecimento das vias celulares e processos biológicos [98,99,100]. Além da identificação de agentes infecciosos e seus processos fisiológicos no hospedeiro [101], identificação de fraudes em produtos de origem animal [102,103,104], estudo da fertilidade/infertilidade e processos envolvidos [105] e a busca por marcadores moleculares para produção de medicamentos [106,107].

No que se refere aos estudos envolvendo o plasma sanguíneo de animais, destaca-se os efeitos do estresse promovido pelos exercícios físicos em cavalos de competição por meio do uso de estratégias proteômicas. Geralmente, os quadros de estresse associados com doenças mal compreendidas, tais como, a síndrome do fraco desempenho, a síndrome do excesso de treinamento, rabdomiólise por esforço induzida por exercício e hemorragia pulmonar [108,109], comprometem o rendimento desses animais e seus retornos aos eventos de competição. Scoppetta e colaboradores (2012) estudaram o plasma sanguíneo de equinos envolvidos em corridas de resistência na tentativa de se estabelecer a ocorrência de assinaturas moleculares após o exercício físico prolongado. A análise da expressão de proteínas demonstrou que, as proteinas α-1-antitripsina, ceruloplasmina, α-2-macroglobulina e fator de complemento-C4 se encontravam superexpressas após a competição, enquanto as proteínas β-haptoglobina, apolipoproteína, fibrinogênio, fator de complemento B e albumina se encontraram subexpressas neste mesmo perfil proteômico sanguíneo [110]. Estes resultados indicaram que o exercício físico prolongado afetam as vias de sinalizações relacionadas com os processos de inflamação, coagulação, danos celulares e vasculares, permitindo assim que, estas proteínas respondam um diagnóstico precoce na medicina veterinária, no que se refere ao retorno desses animais nas competições esportivas ou na rotina de trabalho que os mesmos exercem.

1.7. AS FERRAMENTAS ANALITICAS DA PROTEOMICA EM ESTUDOS TRANSLACIONAIS

Uma vez que a abordagem proteômica tem sido admitida como uma estratégica investigativa e eficaz na medicina translacional, a prioridade está no fato de reduzir a complexidade das amostras antes da caracterização de suas proteínas

[111]. Muitos estudos translacionais evidenciaram biomarcadores moleculares importantes na detecção de várias enfermidades no plasma sanguíneo de pacientes pela abordagem proteômica [112]. A obtenção do plasma sanguíneo de pacientes é um processo menos agressivo que outras técnicas de coleta de amostras biológicas, como por exemplo, uma punção lombar. Além disso, o plasma é um fluído amplamente aceitável para uso em testes clínicos, que reflete a complexidade de proteínas corpóreas em quadros clínicos saudáveis e doentes, contendo biomarcadores relevantes para predição, diagnóstico ou uma investigação mais aprofundada sobre as causas e os efeitos das doenças [113].

Associado com a elevada abundância de proteínas como soroalbumina e imunoglobulinas[114], as quais juntas constituem mais de 85% das proteínas totais constituintes, estas podem mascar as proteínas menos abundantes neste tipo de amostra biológica, as quais podem ser biomarcadores em potenciais. Para resolver este problema, as proteínas mais abundantes podem ser removidas com o uso de colunas de depleção por afinidade ou protocolos de precipitação de proteínas [113,115,116].

Zangarini e colaboradores (2014) evidenciaram que em adição aos procedimentos de depleção das proteínas mais abundantes, outra maneira de reduzir a complexidade das amostras é utilizando métodos de separação, como a eletroforese uni e bidimensional e, a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) [117]. A eletroforese bidimensional (2D) é uma das ferramentas mais utilizadas na proteômica responsável por isolar proteínas por meio das suas massas moleculares e pontos isoelétricos num gel de poliacrilamida [118]. Além disso, é um método analítico que apresenta características singulares, tais como o elevado poder de resolução e ótima reprodutibilidade quando se quer separar componentes presentes em uma amostra proteica complexa [114,119]. Além disso, outra vantagem em relação a outras tecnologias de separação de macromoléculas é a capacidade de separar um grande número de

proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de se realizar análises da expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos [120,121].

Paralelamente, o método analítico mais utilizado para se caracterizar/identificar proteínas é a espectrometria de massas devido a sua alta sensibilidade e capacidade de produzir informações com base na estrutura de proteínas e peptídeos. Os avanços na instrumentação de espectrometria de massas, combinados com a recente disponibilidade de genomas sequenciados e a descoberta de técnicas de ionização suaves, tais como *Matrix-assisted laser desorption/ionization* [MALDI] [122,123] e *Electrospray* [ESI] [124], culminaram em uma nova geração das pesquisas proteômicas. Utilizando a espectrometria de massas, é possível identificar e quantificar milhares de proteínas ao mesmo tempo dentro de um único experimento, fazendo com que a eletroforese bidimensional, muitas vezes seja substituída, uma vez que, identificar *spots* em géis de poliacrilamida e quantificá-los é uma atividade laboriosa, dependendo do número amostral em uma pesquisa translacional.

Neste campo de análises de espectrometria de massas, duas abordagens metodológicas tem sido extensivamente utilizadas a estratégia *shotgun* e a de quantificação de proteínas. A estratégia *shotgun* compreende uma análise de uma mistura proteica complexa [125]. As proteínas totais presentes em uma amostra complexa são submetidas à hidrólise na presença de uma enzima proteolítica, formando uma mistura complexa de peptídeos [126]. Assim as proteínas são identificadas por correlação entre os fragmentos peptídicos adquiridos experimentalmente com as sequências depositadas em banco de dados de proteínas [127]. Paralelamente, a estratégia de espectrometria de massas quantitativa tem seu caráter inovador pelo fato que as proteínas presentes em uma amostra complexa são identificadas e quantificadas relativamente, ou seja, estudos de expressão diferencial de proteínas podem ser realizados quando essas amostras digeridas são submetidas

à espectrometria de massas diretamente, e neste caso, a diferença entre a intensidade dos mesmos íons presentes nas diferentes amostras, podem ser observados e quantificados [126].

A espectrometria de massas oferece uma grande variedade de técnicas de quantificação de proteínas, sendo quase todas aplicáveis com base na quantificação de peptídeos provenientes de digestão das proteínas com a enzima tripsina [128]. Dentre elas, estão a estratégia de quantificação *Stable isotope labelling by amino acids in cell culture* (SILAC) e *Isobaric tag for relative and absolute quantification* (iTRAQ). Esta técnica se apoia na marcação dos peptídeos com diferentes isótopos estáveis. Nestas estratégias, duas ou mais amostras podem ser submetidas ao mesmo tempo em um equipamento de espectrometria de massas. Neste caso, fragmentos peptídicos homólogos são comparados dentro de um mesmo espectro de massas e a diferença entre a intensidade normalizada dos íons, indica quantidade relativa ou absoluta das proteínas alvos do estudo [126;128].

Outra abordagem de espectrometria de massas quantitativa é a estratégia *label-free*, a qual vem ocupando um papel importante nos estudos de quantificação de proteínas devido a relação custo-benefício e a flexibilidade do experimento. Ele é um método utilizado para se determinar a concentração de proteínas sem a utilização de marcadores com isótopos estáveis, por meio da combinação de digestão proteica e cromatografia liquida acoplada ao um equipamento de espectrometria de massas (LC/MS). A quantificação da proteína pode ser realizada pela medida da intensidade de sinal dos íons dos peptídeos correspondentes à proteína alvo do estudo em um espectro de massas, ou pela contagem e comparação do número de espectros de massas de fragmentação dos peptídeos que identificam esta proteína [114].

Apesar de toda especificidade e inovação que as ferramentas analíticas podem contribuir para uma rotina ambulatorial, muitas dificuldades são enfrentadas para

inserir essas ferramentas e metodologias analíticas, sendo os principais motivos são: 1) carência de mão de obra especializada requerida na área da proteômica analítica, uma vez que, os cursos da área da saúde não apresentam disciplinas ou treinamentos, que envolvam a capacitação em recursos humanos na área de química analítica [129], 2) elevado custo em relação aos ensaios prognósticos e diagnósticos vigentes e, 3) recursos financeiros para aquisição de equipamentos de elevada resolução e infraestrutura física de alojamento destes equipamentos, e seus respectivos custos com manutenções preventivas.

2. REFERENCIAS

[1] Bonduelle Y, Pisani J. The future of pharma: back to basics. Bus Develop Licens J. 2003;2:32-5.

[2] Borghese A, Mazzi M. Buffalo population and strategies in the world. In: Buffalo Production and Research, 12, 2014, Roma, Italy. Roma: BPR, 2014;5:12-35.

[3] Ranjhan SK. Buffalo as a social animal for humanity. In: Proceedings of the 8th World Buffalo Congress; 19-22 oct, 2007; Caserta, Italy. Caserta: WBC; 2007. p. 30-38.

[4] Food and Agriculture Organization (FAO). FAOSTAT: Agriculture database [Internet]. Rome: FAO; 2007. [Acesso: 23 out 2013]. Disponível em: http://faostat. fao.org/default.aspx.

[5] Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-2-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, DF: MARA, 1997.

[6] Kamal T, Shebaita M, Ibrahim I. Physiological responses of lactating buffaloes to shed type. In: Proceedings of the 9th Prospects of buffalo production in the

Mediterranean and the Middle East; 9-12 nov 1993; Cairo, Egito. Cairo: PBMM, 1993. p. 123-25.

[7] Ricci GD, Domingues PF. O leite de búfala. Rev Educ Cont Vet Med Zootec. 2012;10:14-9.

[8] Verruma MR, Salgado JM. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. Agric Ciênc. 1994;51:56-8.

[9] Ling ER, Ron SK, Porter JWG. The composition of the milk and nutritive value of its components. In: The Mamary Gland and Its Secretion. New York: Academic Press;1961. v. 2, p. 195-263.

[10] Furtado MM. Leite de búfala: estudo da fabricação do queijo azul. Rev do Inst Latic Cândido Tostes. 1980;35(207):23-8.

[11] Neves NLB. Contribuição da bubalinocultura para a produção leiteira. In: Caracterização e implementação de uma política para o leite. Piracicaba: CIUPPL; 1985. p.37-45.

[12] Dubey PC. Factors affecting composition of milk of buffaloes. Indian J Anim Sci. 1997;67:802-4.

[13] Macedo MP. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. Rev Bras Zootec. 2001;30:1084-8.

[14] Silva MST. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PROnAF [internet]. Pará; 2003 [acesso 20 fev 2014]. Disponível em: <www.cpatu.br/bufalo>.

[15] Rey JF, Martínez CL, Urrea A. Evaluation of sensory characteristics and texture of an economic Buffalo meat (*Bubalus bubalis*) sausage and an economic beef (*Bos indicus*) sausage with addition of bovine hemoglobin powder. Procedia Food Sci. 2011;1:545-8.

[16] Cedres J. Chemical composition and physical characteristics of buffalo meat extensively bred in the province of Formosa [tese]. Corrientes: Faculty of veterinary science;2002.

[17] Corte OO, Felicio PE, Cia G. Sistematização da avaliação final de bovinos e bubalinos. Bol Téc CTC. 1979;3:67-88.

[18] Wang B, Zhan S, Gong T, Lee L. Iron therapy for improving psychomotor development andcognitive function in children under the age of three with irondeficiency anaemia (Review). Cochrane Database Syst Rev. 2013;6:6.

[19] Rural Industries. RIRDC - Research and Development Corporation: Maximising marketing opportunities for buffalo products [intenet]. Barton: Rural Industries RED corporation;2013 [acesso 20 out 2013]. Disponível em: http://www.ruralindustriesresearch.org/report_development_corporation.php/.

[20] Bailey FR. Histologia. 2ª ed. São Paulo: E. Blucher; 1973.

[21] Brouet JC, Clauvel JP, Danon F. Biologic and clinical significance of cryoglobulins: A report of 86 cases. Am J Med. 1984;57:775-8.

[22] Loose HW, Haslam PJ. The management of peripheral arterial aneurysms using percutaneous injection of fibrin adhesive. Br J Radiol. 1998;71(852):1255-9.

[23] Pizzol MMD, Roggia MF, Kwitko S, Marinho DR, Rymer S. Utilização de adesivo de fibrina em cirurgias oftalmológicas. Arq Bras Oftalmol. 2009;72:308-12.

[24] Stone, JH. Mixed Cryoglobulinemia. In: Imboden,J Hellmann, DB Stone. Current heumatology. diagnosis & treatment. New York: Mcgraw-Hill; 2004 chap 35, p. 273-7.

[25] Mendoza JC, Lazo F, Yarlequé L, Ruiz NC, Yarlequé A, Pessah S, et al. Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades de fosfolipasa a2, l-aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2008;25:174-8.

[26] Anderson KP. Feeding and care of orphaned foals. Equinews. 2008;2:3.

[27] Mcauliffe SB, Slovis NM. Color atlas of diseases and disorders of the foal. Oxford: Elsevier; 2008,1:127-9.

[28] Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase®, and thrombin-like fraction of Crotalus durissus terrificus venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitades. J Venom Anim Toxins. 1998;4:120-36.

[29] Puente PDL, Ludeña D. Cell cultureinautologous fibrin scaffoldsfor applications intissueengineering. Exp Cell Res. 2014;322:1-11.

[30] Bennett ME, Michaels C, O'Brien K, Weyant R, Phillips C, Dryland V. Measuring beliefs about orthodontic treatment: a questionnaire approach. J Public Health Dent. 1997;57:215-23.

[31] Bergel S. On the functions of fibrins. Dtsch Med Wochenschr. 1909;35:633-65.

[32] Grey EG. Fibrin as a hemostatic in cerebral surgery. Surg Gynecol Obsteit. 1915;21:452.

[33] Seddon HJ, Medawar PB. Fibrin suture of human nerves. Lancet. 1942;2:87-92.

[34] Tidrick RT, Warner ED. Fibrin fixation of skin transplants. Surgery. 1944;15:90-5.

[35] Staindl O. The healing of wounds and scar formation under the influence of a tissue adhesion system with fibrinogen, thrombin and coagulation factor XIII. Arch OtorhinolaryngoL. 1979;222:241-5.

[36] Scardino MS, Swaim SF, Morse BS, Sartin EA, Wright JC, Hoffman CE. Evaluation of fibrin sealants in cutaneous wound closure. J Biomed Mater Res. 1999;48:315-21.

[37] Stolf HO. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from the patient's naso labial fold. J Venom Anim Toxins. 1999;5:227.

[38] Sartori-Filho R, Prestes NC, Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Canavessi AMO, et al. Use of fibrin glue derived from snake venom in testicular biopsy of rams. J Venom Anim Toxins. 1998;4:23-35.

[39] Chalhoub M, Prestes NC, Lopes MD, Rocha NS, Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM. The use of snake venom derived fibrin glue in hysterorrhaphy of ovine caesarean surgery. J Venom Anim Toxins. 2000;6:220-37.

[40] Leite CV, Naresse LE, Arantes HL, Lopes AF, Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, et al. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. J Venom Anim Toxins. 2000;6:180-93.

[41] Ferraro GC, Moraes JRE, Shimano AC, Pereira GT, Moraes FR, Bueno De Camargo MH. Effect of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2005;11:261-74.

[42] Chiquito GCM. Comparison between suture and fibrin adhesive derived from snake venom for fixation of connective tissue graft in correction of marginal tissue recession. J. Venom Anim. Toxins Trop Dis. 2007;13:559.

[43] Sampaio RL, Thomazini-Santos IA, Ranzani JJT, Brandão CVS, Barraviera B, Barraviera SRC S, et al. Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers: experimental study in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). J Venom Anim Toxinas Incl Trop Dis. 2007;13:857-73.

[44] Barbosa MDS, Stipp AC, Passanezi E, Greghi SL. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. histological analysis. J Appl Oral Sci. 2008;16:310-5.

[45] Gasparotto VP, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2014;10:5:78.

[46] Jaul E. Non-healing wounds: the geriatric approach. Arch Gerontol Geriatr. 2009;49:224-6.

[47] Maffei FH, Magaldi C, Pinho SZ, Lastoria S, Pinho W, Yoshida WB, et al. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. Int J Epidemiol. 1986;15:210-7.

[48] Callam MJ. Epidemiology of varicose veins. Br J Surg. 1994;81:167-73.

[49] Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, Eaglstein WH. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. J Am Acad Dermatol. 2001;44:401-21.

[50] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Resultados do Censo 2010 [internet].
Brasilia: IBGE; 2010 [acesso 10 jun 2013]. Disponível em: http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados_do_censo2010.php/.

[51] Phillips TJ, Dover JS. Leg ulcers. J Am Acad Dermatol. 1991;25:965-87.

[52] Bongiovanni CM, Hughes MD, Bomengen RW. Accelerated wound healing: multidisciplinary advances in the care of venous leg ulcers. Angiology. 2006;57:139-44.

[53] Salomé GM, Pellegrino DMS, Blanes L, Ferreira LM. Self-esteem in patients with diabetes mellitus and foot ulcers. J Tissue Viability. 2011;20:100-6.

[54] Chen WY, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. Wound Repair Regen. 2007;15:434-49.

[55] Broadbent J, Walsh T, Upton Z. Proteomics in chronic wound research: potentials in healing and health Proteomics. Clin Appl. 2010;4:1-11.

[56] Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Rev Bras Cienc Farm. 2005;41:43-8.

[57] Zimmet SE. Venous leg ulcers: modern evaluation and management. Dermatol Surg. 1999;25:236-41.

[58] Partsch H. Compression therapy of the legs: A review. J Dermatol Surg Oncol. 1991;17(10):799-805.

[59] Smith PC, Sarin S, Hasty J, Scurr JH. Sequential gradient pneumatic compression enhances venous ulcer healing: a randomized trial. Surgery.1990;108:871-5.

[60] Dealey C. Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

[61] Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad Dermatol. 2008;58:185-206.

[62] Gatti M, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. J Venom Anim Toxins Incl Trop. 2011;17:226-9.

[63] Beauchaine TP, Neuhaus E, Brenner SL, Gatzke-Kopp L. Ten good reasons to consider biological processes in prevention and intervention research.Dev Psychopathol. 2008;20:745-74.

[64] World Health Organization. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental health criteria 210: principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. Geneva: WHO;1999.

[65] Amorim LCA. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. Rev Bras Epidemiol.2003;6:15.

[66] Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. Rev Med Vet. 2000;151:577-84.

[67] Gonzalez MA, Alvarez ML, Pisani GB, Bernal CA, Roma MG, Carrillo MC. Involvement of oxidative stress in the impairment in biliary secretory function induced by intraperitoneal administration of aluminum to rats. Biol Trace Elem. 2007;116:329-48.

[68] Gonzalez MA, Bernal CA, Mahieu S, Carrillo MC. The interactions between the chronic exposure to Aluminum and liver regeneration on bile flow and organic anion transport in rats. Biol Trace Elem. 2009;127:164-76.

[69] Hirvonen J, Eklund K, Teppo AM, Huszenica G, Kulcsar M, Saloniemi H, et al. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. Acta Vet Scand. 1999;40:35-46.

[70] Skinner JG, Brown RAL, Roberts L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. Vet Rec. 2001;128:147–9.

[71] Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteinsin veterinary diagnosis: an overview. Vet J. 2004;168:28-40.

[72] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. Vet Res. 2004;35:163-87.

[73] Subiela SM, Tecles F, Parra MD, Cerón JJ. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas em medicina. An Vet. 2001;17:97-114.

[74] Tizard IR. Imunologia veterinária: uma introdução. 5ª ed. São Paulo: Guanabara; 1998.

[75] Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. J Zhejiang Univ Sci. 2005;6:1045-56.

[76] Ringler DJ. Inflammation and repair. Vet Pathol. 1997;6:113-57.

[77] Schaffer CJ, Nanney LB. Cell biology of wound healing. Int Rev Cytol. 1996;169:151-77.

[78] Kaneko JJ. Serum proteins and the dysproteinemias. In Kaneko J, Harvey JW, Bras ML editor.Clin biochem domestic animals. 5 ed. San Diego: Academic Press;1997. p.117-37.

[79] Jain NC. Essentials of Veterinary hematology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993. p.12-5.

[80] Schneider C, Malisius R, Küchler R. A prospective study on ultrasound-guided percutaneous thrombin injection for treatment of iatrogenic post-catheterisation femoral pseudoaneurysms. Int J Cardiol. 2009;131:356-61.

[81] Pomorska-Mol M, Kwit K, Pejsak Z, Markowska D. The analysis of the acute phase protein response in pigs with subclinical infection with swine H3N2 flu virus. Influenza Other Respir Viruses. 2014; 8(2):228-34.

[82] Simplício KMMG, Sousa FC, Fagliari JJ, Silva PC. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013;65(5):1339-47.

[83] Galdos ACR. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo; 2009.

[84] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 2004;74:2157-84.

[85] Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoides and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Nat Rev Cancer. 2007;7:357-69.

[86] Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. Electrophoresis. 1996;17:443-53.

[87] Celis JE, Gromov P, Ostergaard M, Madsen P, Honoré B, Dejgaard K, et al. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease. Nat Biotechnol. 1996;398:129-34.

[88] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Nat Biotechnol. 1996;14:61-5.

[89] Wilkins MR, Willians KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Proteome research: new frontiers in functional genomics. J Clin Oncol Res. 1997;243:22-4.

[90] O'Farrel PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. J Biol Chem. 1975;250:4007-21.

[91] Isfor RJ. Proteomics analysis of striated muscle. J Chrom B. 2002;771:155-65.

[92] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003;402:198-207.

[93] De Souza MV, Fontes W, Ricart CA. Análise de proteomas: o despertar da era pós-genômica. Biotecnol Ciênc Desenvol. 2003:12-4.

[94] Santos LD, Menegasso ARS, Pinto JRAS, Santos KS, Castro FM, Kalil JE, et al. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp Polybia paulista. Proteomics. 2011;11:1403-12.

[95] Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, Malda J, Upton Z. Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. Br J Dermatol. 2008;158:281-90.

[96] Zhang X, Yin X, Yu H, Liu X, Yang F, Yao J, et al. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. Analyst. 2012;137:490.

[97] Phillips RO, Sarfo FS, Landier J, Oldenburg R, Frimpong M, Wansbrough-Jones M, et al. Combined inflammatory and metabolic defects reflected by reduced serum protein levels in patients with buruli ulcer disease. PLoS Negl Trop Dis. 2014,8:e2786.

[98] Sales D, Brito I, Lima LF, Lobo CH, Duarte AB, Souza CEA, et al. Expression and localization of Aquaporin 3 (AQP3) in folliculogenesis of ewes. Acta Histochem.

2014;1:1-7.

[99] Rego JPA, Crisp JM, Nouwens A, Li Y, Moura AA, Venus B, et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus bulls*. Anim Reprod Sci. 2014;1:1-15.

[100] Cadavid VG, Martins JAM, Moreno FB, Andrade TS, Santos AC, Monteiro-Moreira ACO, et al. Proteins of the boar seminal plasma are associated with sperm parameters. Theriogenology. 2014;1:1-10.

[101] Maxwell KL, Frappier L. Viral proteomics. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71:398-411.

[102] Gaso-Sokac D, Kovac S, Josic D. Use of proteomic methodology in optimization of processing and quality control of food of animal origin. Food Technol Biotech. 2011;49:397-412.

[103] Paredi G, Sentandreu M, Mozzarelli A, Fadda S, Hollung K, Almeida AM. Muscle and meat: New horizons and applications for proteomics on a farm to fork perspective. J Proteomics. 2013;88:58-82.

[104] Jayasri K, Padmaja K, Prasad PE. Proteomics in Animal Health and Production. IOSR J Agricult Vet Sci. 2014;7:50-6.

[105] Park Y, Kim J, You Y, Pang M. Proteomic revolution to improve tools for evaluating male fertility in animals. J Proteome Res. 2013;12:4738-47.

[106] Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC, Memili E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. BMC Syst Biol. 2008;2(19):1-13.

[107] Rahman MS, Lee J, Kwon W, Pang M. Sperm Proteomics: road to male fertility and contraception. Int J Endocrinol. 2013;20:1-11.

[108] Fraipont C, Alexeeva S, Wolf B, Schloesser M, Den Blaauwen T, Nguyen-distèche M. The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a sub-complex in Escherichia coli. J Clin Microbiol. 2011;157:251-9.

[109] Amorim LCA. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. Rev Bras Epidemiol. 2003;6:15.

[110] Scoppetta F, Tartaglia M, Renzone G, Avellini L, Gaiti A, Scaloni A, et al. Plasma protein changes in horse after prolonged physical exercise: a proteomic study. J Proteomics. 2012; 75:4494-504.

[111] Chiou SH, Wu CY. Clinical proteomics: current status, challenges, and future perspectives. Kaohsiung J Med Sci. 2011;27:1-14.

[112] Ekegren T, Hanrieder J, Bergquist J. Clinical perspectives of high-resolution mass spectrometry-based proteomics in neuroscience: exemplified in amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery research. J Mass Spectrom. 2008;43:559-71.

[113] Pendyala G, Trauger SA, Siuzdak G, Fox HS. Quantitative plasma proteomic profiling identifies the vitamin E binding protein afamin as a potential pathogenic factor in SIV induced CNS disease. J Proteome Res. 2010;9:352-8.

[114] Santos HM, Lodeiro C, Capelo JL. Analytical proteomics: an emerging field?. J Proteomics. 2010;73:1411-4.

[115] Kolla V, Jeno P, Moes S, Tercanli S, Lapaire O, Choolani M, et al. Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). J Biomed Biotechnol. 2010;10:952047.

[116] Song F, Poljak A, Kochan NA, Raftery M, Brodaty H, Smythe GA, et al. Plasma protein profiling of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease using iTRAQ quantitative proteomics. Proteome Sci. 2014;12:5.

[117] Zangarini M, Ceriani L, Sala F, Marangon E, Bagnati R, D'Incalci M, et al. Quantification of trabectedin in human plasma: Validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method and its application in a clinical pharmacokinetic study. J Pharm Biomed Anal. 2014;2:107-12.

[118] Weiland F1, Zammit CM, Reith F, Hoffmann P. High resolution two-dimensional electrophoresis of native proteins. Electrophoresis J. 2014;35:1893-902.

[119] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature. 2000;405(6788):837-46.

[120] Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. Rev Méd Chile. 1975;26:231-43.

[121] Qualtieri A, Pera ML, Urso E, Bono F, Valentino P, Scornaienchi MC, Quattrone A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. J Neurosci Met. 2007;159:125-33.

[122] Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988;60:2299-301.

[123] Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by lazer ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass. 1998;2:151-3.

[124] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 1989;246(4926):64-71.

[125] Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. Cell. 2006;127:635-48.

[126] Fournier ML, Gilmore JM. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. Chem Rev. 2007;107:3654-86.

[127] Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to poteomics. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66:39-63.

[128] Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the presente. Anal Bioanal Chem. 2012;404:939-65.

[129] Pernemalm M, Lehtiö J. Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook. Expert Rev Proteomics. J Proteome Res. 2008;7:2712-22.

Capítulo 2

Análise proteômica do plasma sanguíneo e criopreciptado de búfalos Bubalus Bubalis

RESUMO

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP) propuseram há cerca de 20 anos, a bioprospecção de um novo selante de fibrina a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos. Atualmente, pouco se sabe sobre a constituição sérica de búfalos da espécie *Bubalus bubalis*, raça Murrah. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo caracterizar as proteínas majoritárias presentes no plasma sanguíneo e do crioprecipitado de *B. bubalis* por meio das técnicas analíticas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Como resultados, evidenciou-se a presença de 129 e 100 proteínas no plasma sanguíneo e no crioprecipitado de bubalinos, respectivamente, sendo estas com massas moleculares entre 110 e 20 kDa e ponto isoelétrico 4-7. Destas 129 proteínas do plasma sanguíneo, 112 foram identificadas, dentre elas albumina, fibrinogênio-α, fibrinogênio-β, fibrinogênio-γ, imunoglobulinas em geral, α-1-antiproteinase, α-1B-glicoproteína, α-2-HS-glicoproteína, α-2-macroglobulina, apoliproteina A-1, antitrombina-III, endopina 2B, fetuína-B, proteína ligante de retinol, serotransferina, transtiretinae proteína ligante de vitamina-D. A maioria destas proteínas estão relacionados com a via de sinalização do sistema complemento e cascata de coagulação. A finalidade deste estudo foi melhor compreender a composição proteica das proteínas majoritárias presentes no plasma e no crioprecipitado de bubalinos, a fim de dar suporte cientifico em estudos futuros para o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica mais específica de sanidade de bubalinos doadores de matéria-prima do selante de fibrina do CEVAP.

Palavras-chave: Análise proteômica, plasma sanguíneo, crioprecipitado, *Bubalus bubalis*, selante de fibrina, eletroforese bidimensional, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The Center for the Studies of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) at UNESP proposed to twenty years ago, the prospection of one fibrin sealant from a serineprotease from *Crotalus durissis terrificus* snake venom associated to cryoprecipitate rich in fibrinogen extract from bubaline blood. Nowadays, few is know about the composition of *Bubalus bubalis* buffalo serum (Murrah). So, the objective this word was characterizing the majority proteins presents in the plasma and cryoprecipitate of *B. bubalis* by using two main analytical techniques bidimensional electrophoresis and mass spectrometry. As results, it was evidenced the presence of 129 e 100 proteins in the plasma and cryoprecipitate, respectively, with molecular mass between 100 and 20 kDa and isoelectric point 4-7. Of theses 129 proteins from plasma, 112 ones were identified, among them albumin, fibrinogen-α, fibrinogen-β, fibrinogen-γ, immunoglobulins em general, α-1-antiproteinase, α-1B-glycoprotein, α-2-HS-glycoprotein, α-2-macroglobulin, apoliprotein A-1, antitrombin-III, endopin 2B, fetuin-B, retinol binding protein, transferrin, transthtiretin e vitamin D binding protein. Most of these proteins are related with the signaling via of complement system and coagulation cascade. The finality this study was better understanding the composition of the most abundance proteins from plasma and cryoprecipitate of healthy buballos to give cientific support in future studies for the development of a specific diagnostic plataform of sanity for buballos donors of raw material of the fibrina sealant at CEVAP.

Keywords: Proteomic analysis, plasma, cryoprecipitate, *Bubalus bubalis*, fibrin sealant, bidimensional electrophoresis, mass spectrometry.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto à própria civilização humana. Atualmente, a busca de novas moléculas a partir de extratos de vegetais, de venenos e de insumos animais, como plasma sanguíneo ou soro, tem contribuindo para a descoberta de novos medicamentos[1]. Estima-se que 60% dos fármacos antitumorais e anti-infecciosos que se encontram disponíveis comercialmente são de origem natural [2,3].

Os búfalos da espécie *Bubalus bubalis* ganharam um espaço considerável na economia mundial por atuarem como bons doadores de matéria-prima. Estes, por sua vez, são de origem asiática e podem ser encontrados em maior abundância nas regiões tropicais e temperados da Ásia. Segundo Borghese e Mazzi, a população de búfalos no mundo totaliza cerca de 168 milhões de animais, os quais estão distribuídos geograficamente pelo mundo nas seguintes proporções: 161 milhões [95,83%] na Ásia, 3,717 milhões [2,24%] na África, 3,3 milhões [1,96%] na América do Sul, 500 mil [0,3%] na Europa e 40 mil [0,02%] na Austrália. Essa espécie tem ocupado um papel relevante na produção de alimentos por garantir estabilidade econômica para áreas menos favorecidas[4]. Por sua vez, estes animais têm sido mundialmente utilizados em atividades econômicas, dentre estas, o emprego de força para a tração de instrumentos agrícolas e a produção de leite e de carne[5].

Uma nova frente de pesquisas biotecnológicas vem se desenvolvendo no que se refere às fazendas produtoras de animais de grande porte[6]. A utilização de animais de grande porte como doadores/soroprodutores desse material biológico tem se mostrado de grande importância na pesquisa científica e/ou na produção de medicamentos e imunobiológicos[7,8].

Neste contexto, o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP) vem desenvolvendo um novo selante de fibrina há mais de 20 anos,

para atuar como cola biológica em procedimentos cirúrgicos e no auxílio durante o tratamento de úlceras venosas crônicas. A equipe de pesquisadores do CEVAP propôs a prospecção de um novo selante a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado (plasma sanguíneo concentrado) rico em fibrinogênio extraído de bubalinos.

Esta iniciativa de desenvolvimento de um novo selante de fibrina a partir do sangue de búfalos ganhou mais expressão quando Thomazini-Santos e colaboradores (1998) avaliaram o tempo de coagulação da fração trombina de serpentes *Crotalus durissus terrificus,* empregando-se crioprecipitado (plasma sanguíneo concentrado) de diferentes espécies animais. Este estudo evidenciou que o plasma sanguíneo de búfalos da espécie *Bubalus bubalis* apresenta uma concentração de fibrinogênio superior dos demais animais analisados (homem, bovinos, equinos e ovinos) e tempo de coagulação próximos aos obtidos nas amostras de seres humanos[9].

Por sua vez, o crioprecipitado consiste na porção acelular do sangue obtida por precipitação/centrifugação do sangue total, sendo constituído basicamente de água, proteínas, tais como soro albumina e globulinas, fatores de coagulação, fibrinogênio, carboidratos e lipídios[10]. Originalmente, o crioprecipitado foi desenvolvido como um agente terapêutico para o tratamento e/ou prevenção de sangramento em pacientes com deficiências de múltiplos fatores de coagulação, como por exemplo, doenças hepáticas severas, tratamento da hemofilia clássica (hemofilia A) doença de von Willebrand, deficiência de fator XIII e, como fonte de fibrinogênio para hipofibrinogenemia[11]. No entanto, o crioprecipitado tem sido administrado para outras finalidades, como por exemplo, reposição do nível de fibrinogênio em pacientes com coagulopatias adquiridas, estancamento de hemorragias, incluindo cirurgia cardíaca, trauma, transplante hepático ou obstétrica hemorragia[11].

O crioprecipitado humano é um produto oriundo do plasma sanguíneo em forma de *pool*, o qual não sofre inativação de patógenos e sua administração tem sido

associado à uma série de eventos adversos, em particular a transmissão de patógenos sanguíneos e lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão[11]. Diante dessa problemática, o desenvolvimento de um novo selante de fibrina do CEVAP, a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, foi um marco na história dos crioprecipitados, sendo este uma ótima alternativa para evitar a transmissão de doenças infecciosas humanas. O diferencial deste novo selante é o fato de não apresentar risco de transmissão de doenças infecciosas humanas por ser constituído de fluidos animais (sangue de bubalinos e veneno de serpentes) e, por ser um produto genuinamente brasileiro e custo reduzido na preparação do mesmo.

Muitos estudos pré-clínicos foram realizados com o selante de fibrina do CEVAP como a finalidade de cola biológica conforme indicado no Capítulo I desta dissertação[12,13]. Porém, Gatti e colaboradores entre 2007 e 2010, desenvolveram um ensaio clínico pioneiro fase I, utilizando o selante de fibrina do CEVAP em 24 pacientes adultos acometidos com úlceras de membros inferiores de origem venosa. Neste estudo, evidenciou-se que, este selante auxiliou na cicatrização total e/ou parcial das úlceras, proporcionando alta dos pacientes na oitava semana de tratamento[14]. Neste mesmo contexto, o CEVAP, juntamente com a Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, deram continuidade em 2011 ao ensaio clínico multicêntrico de fase II, no qual 50 pacientes com úlceras venosas de membros inferiores serão estudados, tendo o apoio do Ministério da Ciência e Tecnologia (Decit) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do processo no. 563582/2010-3 – (Projeto de Pesquisa Clínica intitulado *"Tratamento de úlceras venosas com o selante de fibrina derivado de veneno de serpente*" - Edital MCT/CNPq/CT - Saúde/MS/SCTIE/DECIT Nº 67/2010 - Pesquisa Clínica - Produtos Estratégicos para o SUS. Como aplicação biotecnológica, este novo selante está

sendo aplicado em pacientes que apresentam ulceras venosas crônicas, a fim de auxiliar na cicatrização das mesmas como tratamento adjuvante.

Com base na necessidade de se obter formas alternativas de avaliar/controlar a qualidade do material doado por animais considerados produtores de insumos biológicos para a indústria, várias técnicas analíticas qualitativas e quantitativas vêm sendo empregadas no intuito de se obter um perfil das proteínas que se expressam nesses animais produtores. Os avanços tecnológicos na área de proteômica vêm beneficiando diferentes áreas da medicina humana e animal nos últimos anos. Estes avanços deram ênfase aos estudos que promoveram o aumento de escala de análises e a agilidade na obtenção de métodos mais eficientes para a descoberta de proteínas candidatas à biomarcadores moleculares[15] favorecendo assim, a detecção de marcadores prognósticos e diagnósticos de diversas doenças. Neste contexto, a utilização de técnicas analíticas da abordagem proteômica podem atuar como as ferramentas moleculares inovadoras para identificar marcadores moleculares específicos de sanidade animal, principalmente, aos pesquisadores do CEVAP no que se refere a aprimorar a seleção atual dos búfalos soroprodutores que fornecem matéria-prima para a produção do novo selante de fibrina do CEVAP.

2. OBJETIVO GERAL

Pouco se sabe sobre a composição proteica do plasma sanguíneo e do crioprecipitado de búfalos da espécie *Bubalus bubalis*. Desta forma, este projeto de pesquisa tem como objetivo geral caracterizar as proteínas totais presentes no plasma sanguíneo de búfalos sadios da espécie *Bubalus bubalis* e de seu crioprecipitado.

Portanto, os objetivos específicos deste trabalho são:

- Isolar as proteínas do plasma sanguíneo e do crioprecipitado por meio da técnica analítica eletroforese bidimensional;
- Identificar as proteínas presentes no plasma sanguíneo de búfalos e do seu crioprecipitado por meio da espectrometria de massas e de ferramentas de bioinformática proteômica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e origem do material biológico em estudo

Para a condução do experimento, foram utilizadas como doadoras dos subprodutos sanguíneos, vinte búfalas adultas da espécie *Bubalus bubalis*, raça *Murrah*, com idades entre três a cinco anos, não lactantes, criadas em regime de pasto, suplementadas com Silagem de Milho (*Zea maiz L.*) e Feno de Capim-Tifton 85 (*Cynodon* spp.), com água de bebida e sal mineral "*ad libitum*", apresentando escore de condição corporal entre 3 e 4, numa escala de um a cinco [16]. Estes animais são pertencentes à Fazenda Experimental Lageado da UNESP *Campus* de Botucatu.

Todas as condições de manejo e sanidade das búfalas que incluem esquemas de vacinação e controle de endo e exoparasitas, estão de acordo com o prescrito pelos Programas Nacionais de Sanidade Animal – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [17]. Estes animais foram acompanhados clinicamente por dois médicos veterinários que certificaram que durante todo período de coleta e experimentação do presente estudo, os animais não apresentaram nenhuma manifestação clínica de doença.

Esta pesquisa foi submetida para o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP), e foi aceita sob número de processo FMB-PE-46/2012, estando de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) [18].

As coletas de sangue dos 20 animais ocorreram mensalmente no período de abril de 2013 à fevereiro de 2014. As amostras alvos deste estudo (plasma e soro) foram compostas por partes iguais de plasma sanguíneo e de soro de cada animal, caracterizando assim, um estudo proteômico de uma única amostra biológica concentrada e denominada *pool*. Em relação às amostras de crioprecipitado, a união

de vários processos de produção do crioprecipitado favoreceu a elaboração de um único pool proteico, totalizando assim, três amostras experimentais.

3.2. Coleta do sangue

A coleta de sangue foi realizada após imobilização do animal no tronco de contenção. A punção da veia jugular foi realizada após tricotomia e assepsia local com álcool etílico 70% (v/v). Após a punção venosa, o sangue foi depositado em tubos contendo anticoagulante (citrato de sódio 3,2% [v/v]) para obtenção do plasma sanguíneo e, em tubos secos para a obtenção do soro. Em seguida, as amostras de sangue foram submetidas a centrifugação à 1000g por 25 minutos à 24ºC. Após a centrifugação, o plasma sanguíneo e o soro sobrenadante foram coletados, alíquotados e congelados à -80°C até o momento do uso.

3.3. Obtenção do crioprecipitado

O pool de crioprecipitado utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), como parte integrante do bioproduto Selante de fibrina, cujos componentes e fórmula de aplicação para úlceras venosas, constam das suas patentes [Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360] [19-22].

3.4. Eletroforese bidimensional

A quantificação de proteínas totais presentes no plasma sanguíneo, crioprecipitado e do soro, foi determinada pelo método de Bradford (BioRad-São Paulo) [23]. Todos os experimentos de quantificação de proteínas foram realizados em triplicata. Para a realização da focalização, as proteínas foram aplicadas às fitas *ImmobilizedpH Gradients* [IPG](GE Healthcare Life Sciences - Pittsburgh) de pH 4 a 7, com 7 cm de comprimento para o processo de focalização isoelétrica, uma vez que muitos trabalhos proteômicos na literatura que se utilizam de amostras de sangue

animais, evidenciou que a maior parte das proteínas constituintes, apresentam ponto isoelétricos entre 4 a 7. Estas fitas foram rehidratadas por 18 horas em temperatura ambiente, onde 100ug de plasma sanguíneo bovino ou crioprecipitado ou soro, foram adicionados à 125 µL da solução de reidratação, contendo 8M ureia (m/v), 2% CHAPS (m/v), 1% solução tampão IPG, 19 mM Ditiotreitol (DTT) e azul de bromofenol. As proteínas foram separadas conforme seus diferentes pontos isoelétricos utilizando três passos 500 V por 30 minutos, 1000 V por 30 minutos e 5000 V por 2 hs. Em seguida, as fitas foram equilibradas por 20 minutos em uma solução 19 mM DTT, 50 mM Tris, 6M ureia, 30% glicerol, 2% SDS e, posteriormente na mesma solução, exceto pela substituição do DTT por 0,2M iodoacetamida. Para a realização da segunda dimensão, a fita foi inserida no topo de um gel de poliacrilamida à 10% (m/v) (10x10cm,1.5 mm) e o padrão molecular na faixa entre 97 à 14.4 kDa (LMW-SDS marker kit GE Healthcare Life Sciences – Pittsburgh, USA) foram utilizados. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente, utilizando 10 mA por gel por 15 minutos e 20 mA por gel por 1 hora. Após a separação na segunda dimensão, as proteínas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad – Guarulhos, São Paulo). Todos os experimentos de eletroforese bidimensional foram preparados em triplicata.

3.5. Aquisição e análises das imagens de géis

Para obtenção das imagens, os géis 2D foram digitalizados utilizando scanner ImageScanner III (GE Healthcare Life Sciences–Pittsburgh, USA) no modo de transmissão calibrado. As imagens dos géis bidimensionais foram analisadas pelo software Image Master 2DPlatinun v 7.05 (Ge HealthcareLife Sciences–Pittsburgh, USA), sendo que a autenticidade de cada *spot* foi validada por inspeção visual, com o auxílio da ferramenta *3D View*.

3.6. Digestão de proteínas *in gel*

A digestão proteica *in gel* foi realizada segundo metodologia descrita por Shevchenko e colaboradores[24]. Os *spots* proteicos de interesse foram excisados dos géis de eletroforese, descorados com solução de 25 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 em 50% acetonitrila (v/v). Em seguida, os *spots* foram submetidos às etapas de redução e alquilação das pontes de dissulfeto na presença de 10 mM DDT e 55 mM Iodoacetamida (IAA) em solução tamponate, respectivamente. Após esta etapa, os géis foram desidratados com acetonitrila 100% (v/v), sendo então, submetidos à centrifugação à vácuo. Os géis desidratados foram incubados com uma solução 12,5 mol/uL da enzima tripsina (Promega – Rio de Janeiro, Brasil) em tampão 25 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 durante 18 horas à 37^{o}C. A hidrólise foi interrompida com a adição de 1% (v/v) ácido fórmico em relação ao volume da amostra e os sobrenadantes foram coletados. As amostras foram liofilizadas à vácuo e posteriormente mantidas a –20ºC até o momento do uso.

3.7. Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas (NanoLC-MS/MS)

Uma alíquota de 4,5 µl dos digestos trípticos de cada amostra foram injetados individualmente em uma coluna analítica C18, 1,7µm BEH 130 (100 µm x 100 mm) em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa (RP-UPLC - NanoAcquity UPLC, Waters - Milford, Estados Unidos) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Tof PREMIER (MicroMass/Waters-Milford, Estados Unidos). O equipamento foi gentilmente cedido pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), Campinas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Adriana Paes Leme. O gradiente linear utilizado foi de 2 a 90% (v/v) de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido fórmico durante 60 minutos e fluxo de 600 nl/min. O instrumento foi operado em modo de ionização positiva e a aquisição continua dos dados foram obtidas no intervalo de massas moleculares entre 100 a 2.000 Da.

3.8. Bioinformática proteômica

As pesquisas nos bancos de dados públicos para identificação das proteínas a partir dos dados de espectrometria de massas (LC MS-MS) foram realizadas por meio da ferramenta de bioinformática Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science, Boston - USA) utilizando carbamidometilação como modificação fixa (massa monoisotópica 57,0215Da), oxidação da metionina como modificação variável (massa monoisotópica 15,9949) e 0,1 Da de erro de tolerância para os dados de MS e MS/MS. As proteínas foram identificadas utilizando o banco de dados NCBI, taxonomia *Bos taurus* (123.725 sequências)http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=9913.

Cabe ressaltar que, os dados de MS/MS quando submetidos às buscas aos bancos de dados de sequência públicas foram considerados válidos, segundo o algoritmo estatístico da ferramenta MASCOT, quando as identificações proteicas continham valores de *Mascot Scores* superiores à 42 e pelo menos, uma das sequências peptídicas identificadas com valores de *Ion Score* maiores que 30. Os resultados de MS/MS foram considerados válidos neste estudo, apresentaram uma taxa de falsa descoberta (False Discovery Rate - FDR) de $p < 0,05$. A identificação dos componentes celulares, função molecular e processos biológicos foram determinados pelo bando de dados Gene Ontology (http://geneontology.org/) e a rede de interações entre as proteínas deste estudo foram obtidas pelo software STRING (http://string-db.org/).

4. RESULTADOS

De forma pioneira, o presente trabalho revelou a constituição proteica do plasma sanguíneo de uma espécie de búfalos importante economicamente, *Bubalus bubalis*, raça Murrah. Utilizando as técnicas analíticas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas do tipo Nano-LC MS/MS, 129 *spots* proteicos foram evidenciados no plasma sanguíneo, enquanto que 100 *spots* aproximadamente foram encontrados no perfil proteico do crioprecipitado e no soro destes bubalinos. As análises de imagem dos mapas proteômicos mostraram que os três perfis contém proteínas com massas moleculares entre 110 e 20 kDa e pontos isoelétricos entre 4,5 e 7. A Figura 1 representa os perfis proteicos bidimensionais do plasma sanguíneo (A), crioprecipitado (B) e soro (C) de búfalos clinicamente sadios da espécie *Bubalus bubalis*, e a Figura 2 representa o perfil proteico do plasma sanguíneo contendo os 129 *spots* evidenciados neste estudo.

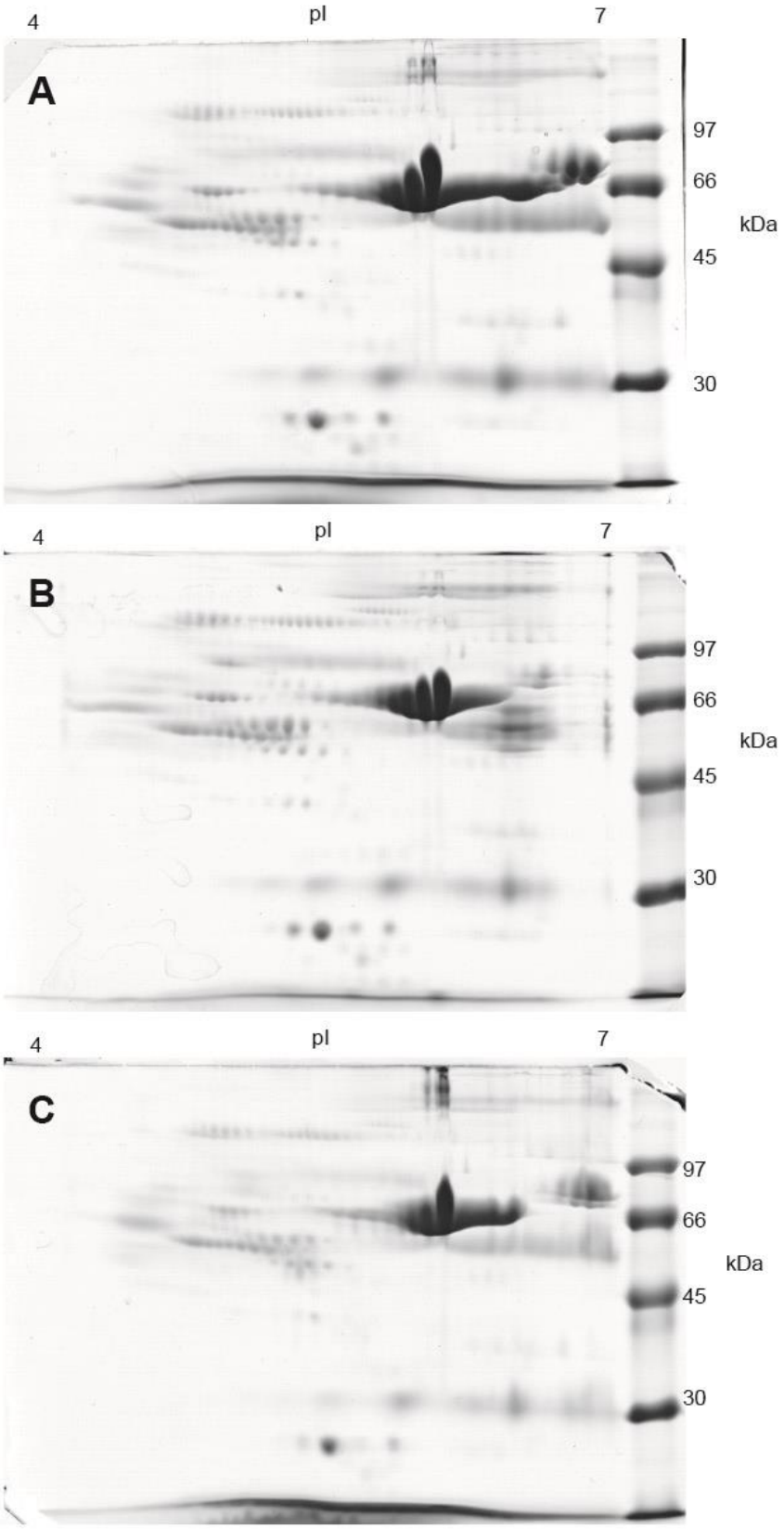


Figura 1: Perfis proteicos obtido pela técnica de eletroforese bidimensional do plasma sanguíneo (A), crioprecipitado (B) e soro (C) de búfalos clinicamente sadios da espécie *Bubalus bubalis*, raça Murrah.

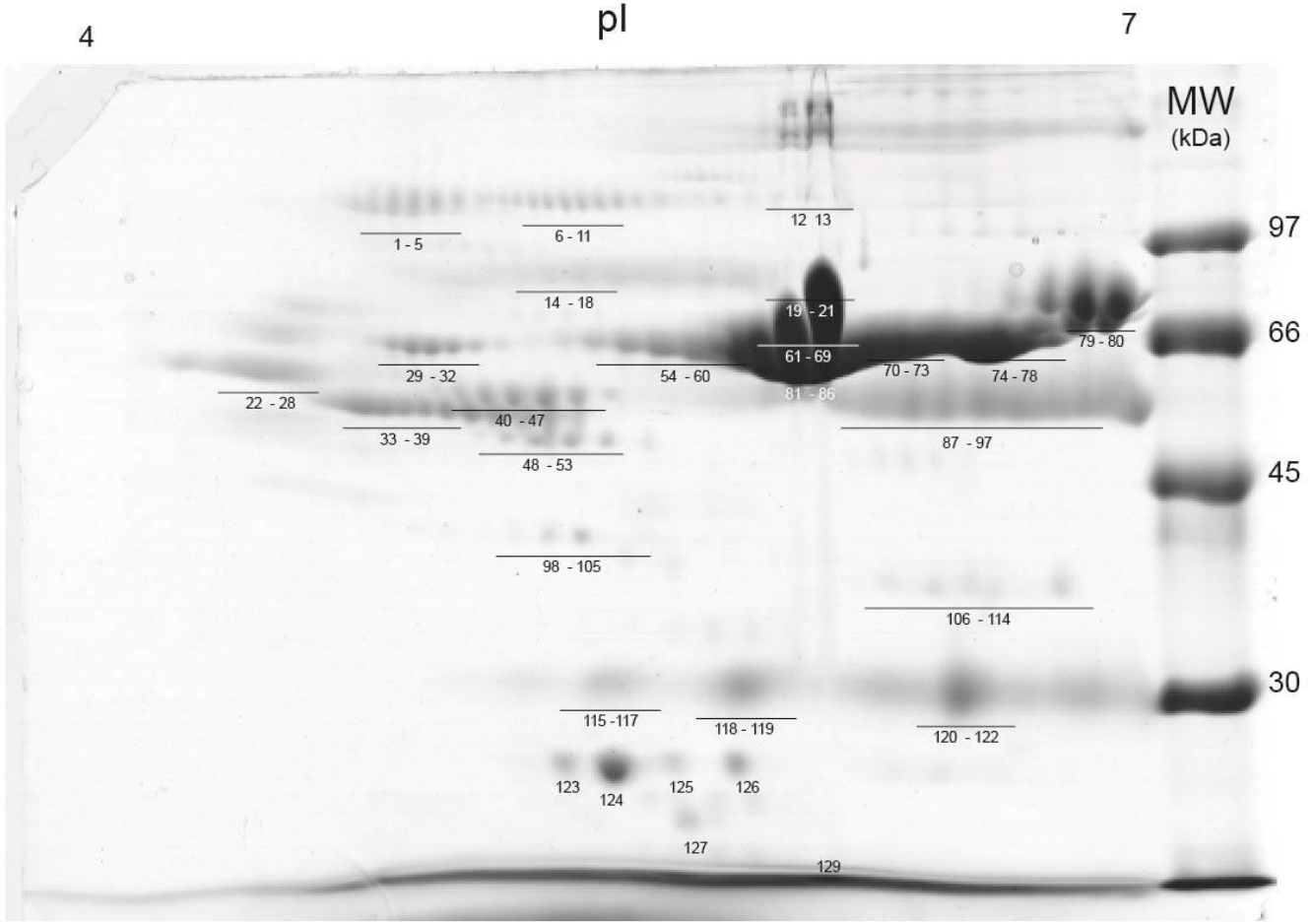


Figura 2: Análise de imagem do perfil proteico bidimensional do plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis*, raça Murrah, onde 129 *spots* proteicos foram evidenciadas pela ferramenta *Platinum* (GE Healthcare), os quais apresentaram massas moleculares entre 110 e 20 kDa e ponto isoelétrico de 4 a 7.

Então, todos os spots proteicos do plasma sanguíneo foram excisados e hidrolisados, sendo que 112 destas proteínas foram identificadas com sucesso e validadas estatisticamente pela ferramenta de bioinformática *Mascot*. Muitos *spots* proteicos revelaram ser a mesma proteína, ou seja, o plasma sanguíneo de bubalinos apresentam múltiplas formas da mesma espécie de algumas proteínas. A tabela I do Anexo I mostra integralmente, todas as proteínas identificadas, juntamente com seus códigos de acesso no banco de dados NCBI, massas moleculares e pontos isoelétricos experimentais, valores de *Mascot Score*, % de cobertura das sequências reveladas em relação aos dados depositados no banco de dados e as cinco sequências peptídicas que apresentaram os maiores valores de *ion score.*

No total, 17 grupos de proteínas foram subdivididas neste trabalho, dentre elas, albumina (31 *spots* - 28%), fibrinogênio-*α* (18 *spots* - 16%), fibrinogênio-β (13 *spots* - 12%), fibrinogênio-γ (6 *spots* - 5%), imunoglobulinas (8 *spots* - 7%), *α*-1-antiproteinase (6 *spots* - 5%), *α*-1B-glicoproteína (6 *spots* - 5%), *α*-2-HS-glicoproteína (5 *spots* - 4%), *α*-2-macroglobulina (4 *spots* - 4%), apoliproteina A-1 (5 *spots* - 4%), antitrombina-III (2 *spots* - 2%), endopina 2B (2 *spots* - 2%), fetuína-B (1 *spot* - 1%), proteína ligante de retinol (1 *spot* - 1%), serotransferrina (1 *spot* - 1%), transtiretina (1 *spot* - 1%) e proteína ligante de vitamina-D (2 *spots* 2%). A Figura 3 ilustra a distribuição dessas proteínas identificadas entre os 17 grupos de proteínas assumidos neste trabalho.

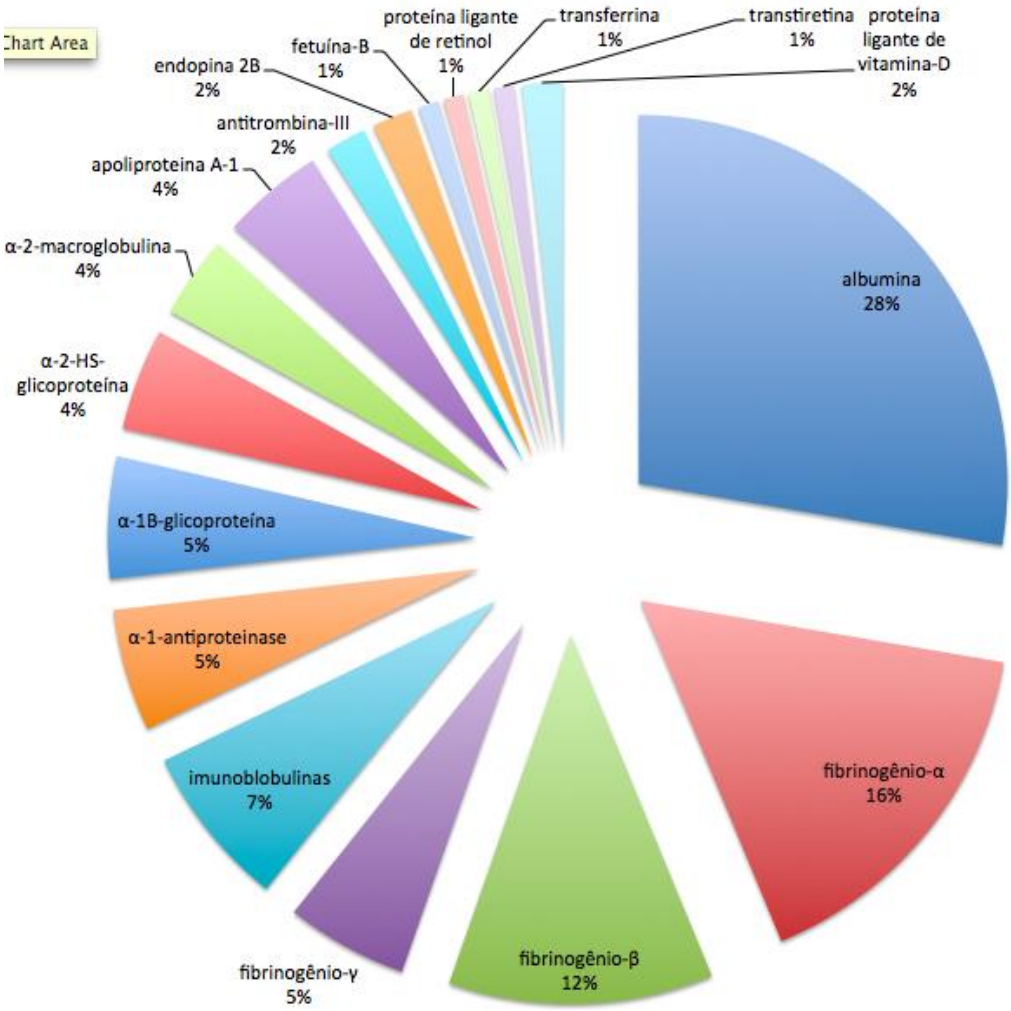


Figura 3: Proteínas majoritárias presentes no plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis* identificadas por Nano-LC MS/MS.

Uma vez identificadas as proteínas presentes em maior abundância no plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis*, estas foram analisadas em relação aos processos biológicos que atuam, função molecular e localização celular (componente celular), segundo as anotações depositadas no banco de dados *Gene Ontology.* Os resultados destas análises estão representados nas Figuras 4 e 5.

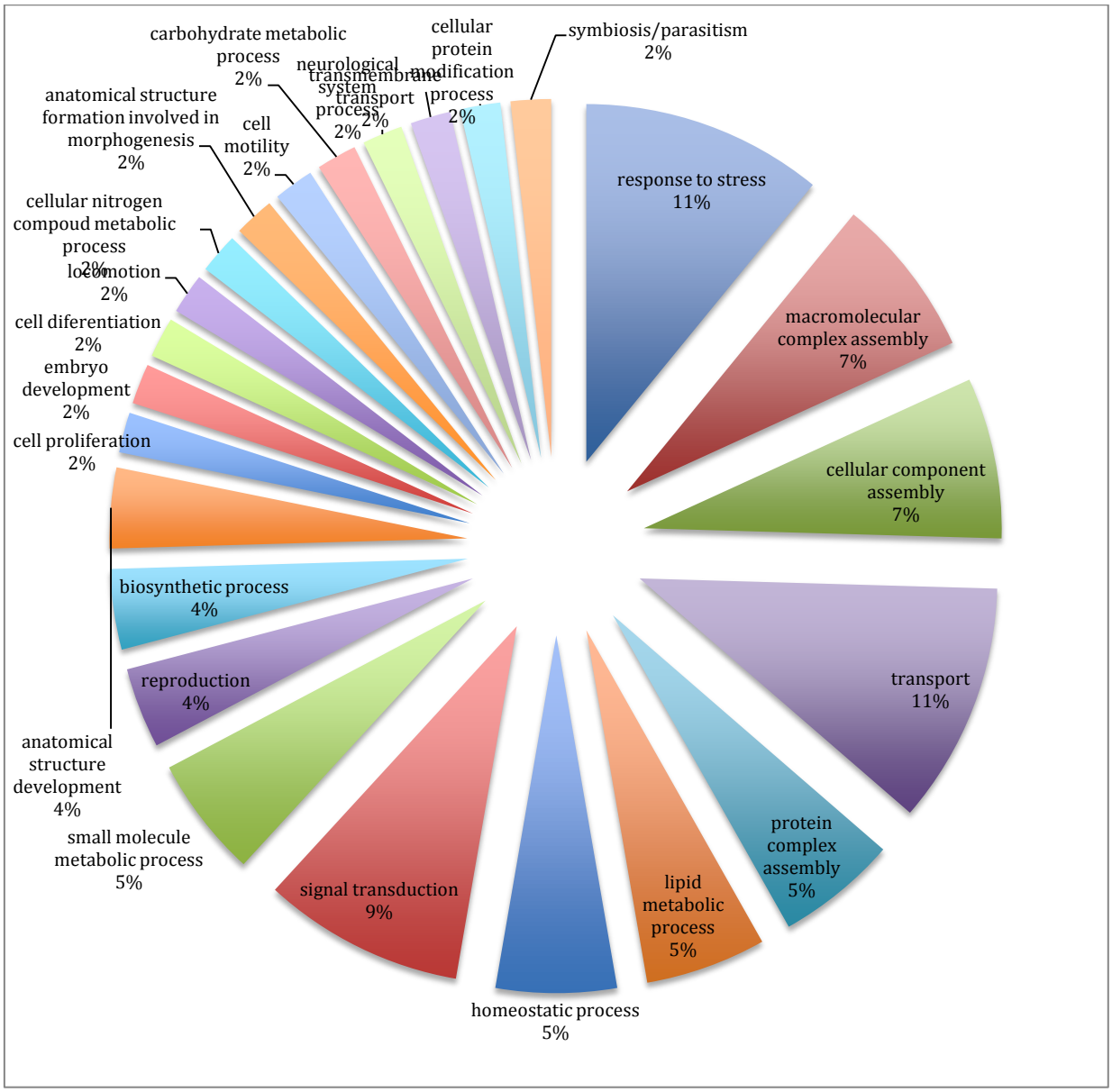
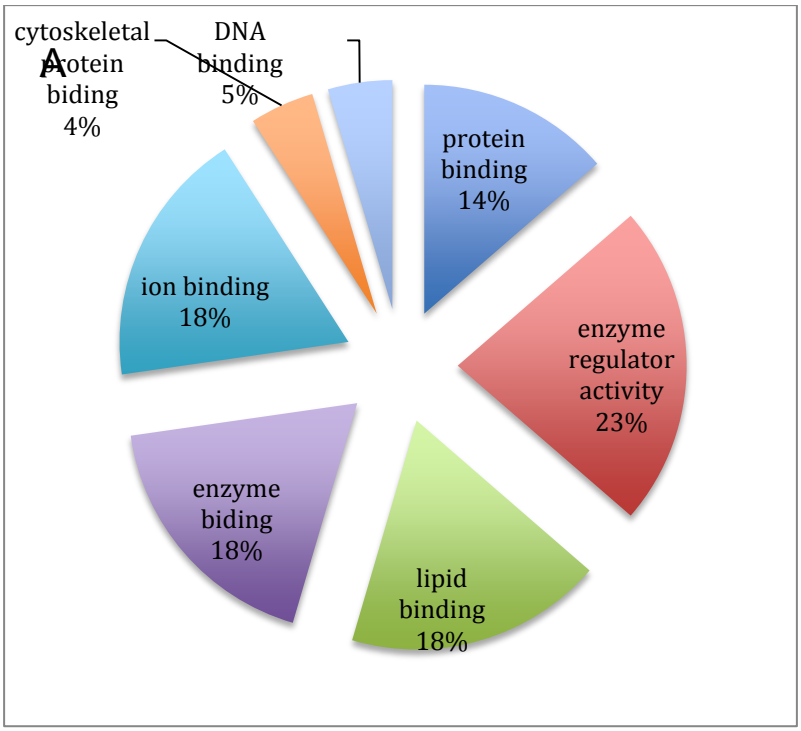


Figura 4: Classificação das proteínas presentes no plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis* segundo sua participação em processos biológicos. A classificação das proteínas foi analisada pelo software *String*, segundo as anotações depositadas no banco de dados *Gene Ontology*.



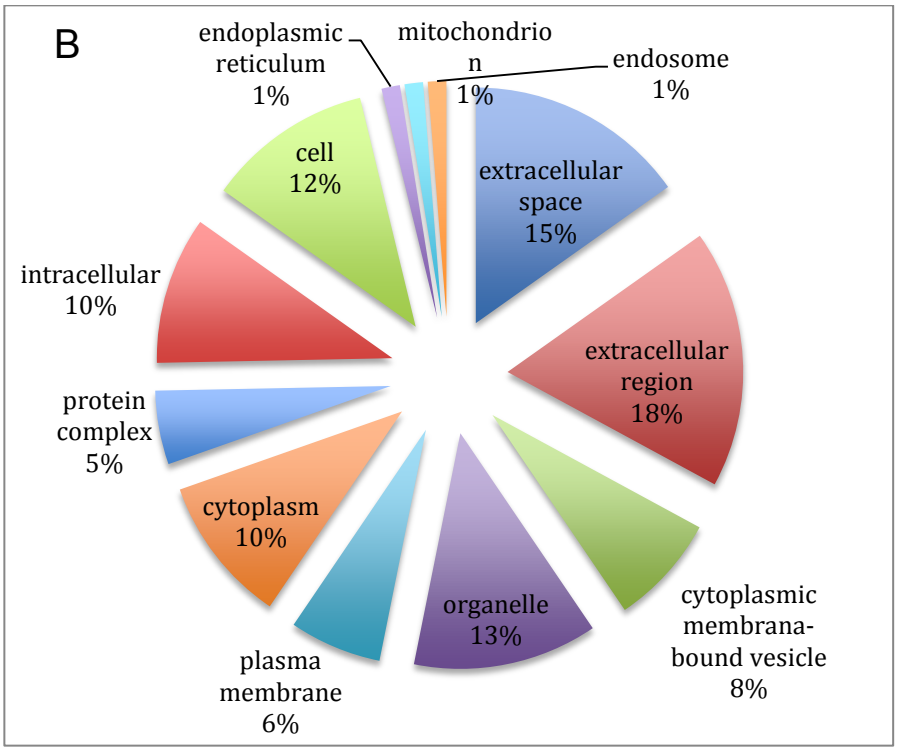


Figura 5: Classificação das proteínas presentes no plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis* segundo sua participação em **A)** função molecular e **B)** componente celular. A classificação das proteínas foi analisada pelo software *String*, segundo as anotações depositadas no banco de dados *Gene Ontology*.

Uma vez classificadas as 112 proteínas identificadas, a rede de interações proteína-proteína também foi elaborada de forma a melhor compreender a relação existente entre as proteínas presentes no plasma sanguíneo dos bubalinos. A Figura 6A representa a rede de interações obtida pela ferramenta de bioinformática *String*. As proteínas envolvidas com o sistema complemento e a cascata de coagulação sanguínea foram evidenciadas em vermelho na Figura 6B. As associações entre as seis proteínas desta via de sinalização da cascata de coagulação foram detectadas pela ferramenta KEGG (*Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes*).

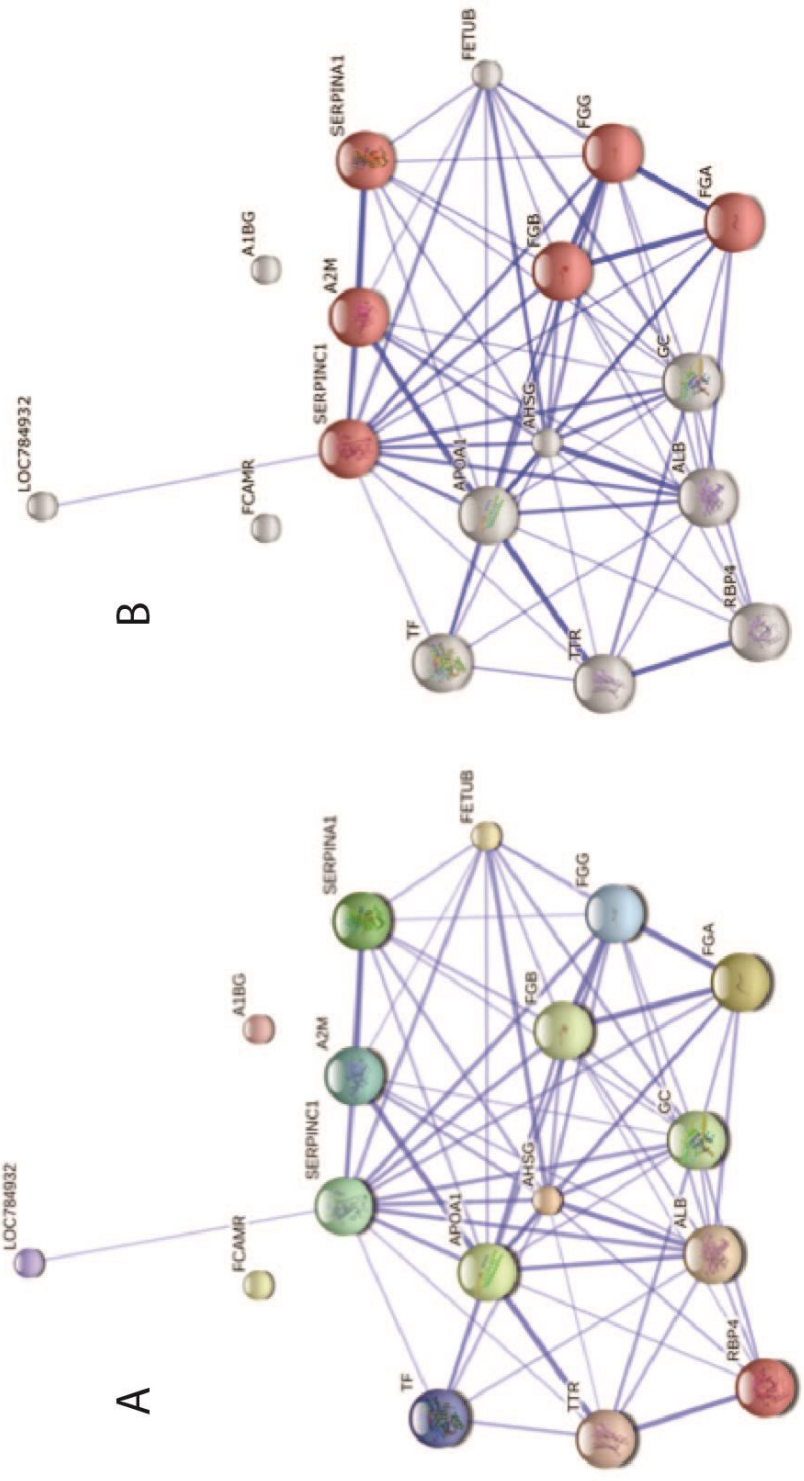


Figura 6: A) Rede de interações entre os 17 grupos de proteínas presentes no plasma sanguíneo de búfalos da espécie *Bubalus bubalis*, raça Murrah. As associações mais fortes são representadas pelas linhas mais grossas. **B)** Em vermelho, as proteínas que participam do sistema complemento e a cascata de coagulação sanguínea, uma das via de sinalização do sistema imune. A rede de proteínas foi analisada pelo software *String e* as associações entre as seis proteínas desta via de sinalização foram detectadas pela ferramenta KEGG (*Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes*). ALB – albumina; FGA – fibrinogênio-α; FGB – fibrinogênio-β; FGG – fibrinogênio-γ; FCAMR – imunoglobulinas; SERPINA1- α-1-antiproteinase; A1BG - α-1B-glicoproteina; AHSG – α-2-HS-glicoproteina; A2M - α-2-macroglobulina; APOA1 – apoliproteína A1; SERPINC1 – antitrombina-III; LOC784932 – endopina 2B; FETUB – fetuína B; RBP4 – proteína ligante de retinol; TF – trasnferrina; TTR – transtiretina; GC – proteína ligante de vitamina D.

5. DISCUSSÃO

A análise das proteínas expressas por um organismo ou tecido específico, vem sendo investigada por meio de várias estratégias da abordagem proteômica, a qual tem por objetivo isolar e identificar proteínas, determinar suas propriedades estruturais, suas funções, modificações pós-traducionais, interações proteicas e mecanismos regulatórios.

Conforme os perfis proteicos apresentados nas Figuras 1 e 2, 129 *spots* proteicos foram evidenciados no plasma sanguíneo, enquanto que 100 *spots* aproximadamente, foram encontrados no perfil proteico do crioprecipitado e no soro dos bubalinos *Bubalus bubalis.* As diferenças destas 29 proteínas a mais detectadas no plasma sanguíneo estão em alguns *spots* identificados como albuminas e fibrinogênios, na região dos géis de eletroforese bidimensional em torno das massas moleculares de 50 e 66 kDa e ponto isoelétrico 6 e 7 nas amostras de crioprecipitado e soro. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de que, a ausência de anticoagulantes durante a obtenção do soro de bubalinos, promova a precipitação de proteínas importantes do processo de coagulação como os fatores de coagulação descritos anteriormente e, principalmente, das moléculas de fibrinogênio, o qual é o substrato principal da ação das enzimas trombinas-símiles durante a formação da fibrina ou do coágulo. Em relação ao crioprecipitado, esta diferença já era esperada, uma vez que, o crioprecipitado de bubalinos é obtido a partir do plasma sanguíneo destes animais, o qual é submetido à diversas etapas de precipitação e centrifugação.

Estudos de caracterização proteômica do plasma sanguíneo de equinos [25, 26] e de bovinos [27] mostraram várias proteínas em comum em relação às identificadas no plasma sanguíneo de búfalos do presente trabalho, como por exemplo, fibrinogênio, albumina, serpinas, apolipoproteina A1, proteínas ligantes de retinol, α-1-antitripsina, fetuínas e imunoglobulinas em geral. No entanto, dois fatos singulares mostram particularidades entre os perfis proteicos bidimensionais dos plasmas sanguíneos de

equinos, bovinos e búfalos. Primeiramente, está no fato de que, a proteína haptomioglobina não foi identificada no plasma sanguíneo de búfalos em relação aos perfis proteicos bidimensionais de equinos e bovinos citados anteriormente. Uma vez que, esta proteína é considerada uma importante proteína de fase aguda em búfalos [28] e, potencialmente, poderia servir como um marcador molecular em potencial em estudos futuros, acredita-se que esta proteína se apresente em baixa abundância nesta amostra biológica. Como é sabido, fatores de coagulação como os fatores VIII e XIII, fator de von Villebrand, fibronectina [29] também são moléculas importantes e que estão presentes no plasma sanguíneo dos animais em geral. Acredita-se que todas estas proteínas sejam proteínas menos abundantes no plasma sanguíneo de bubalinos, assim como a haptomioglobina. Desta forma, nota-se que este trabalho descreverá as proteínas mais abundantes presentes no plasma sanguíneo e no crioprecipitado de bubalinos. Muitas são as técnicas de depleção de proteínas, mas neste primeiro momento, se fez necessário não modificar/manipular estas amostras biológicas devido a atividade biológica de cola adesiva do selante de fibrina atrelada a composição atual do plasma sanguíneo desses bubalinos.

A segunda singularidade está no fato da presença de 37 formas da proteína fibrinogênio (fibrinogênio-*α* [18 *spots*], fibrinogênio-β [13 *spots*], fibrinogênio-γ [6 *spots*]) no plasma sanguíneo de búfalos em relação a números inferiores desta molécula nos perfis proteicos bidimensionais do plasma sanguíneo de equinos e bovinos. No entanto, esta segunda singularidade apontada, ratifica os estudos de Thomazini-Santos e colaboradores [9], os quais evidenciaram por meio de ensaios bioquímicos que, o plasma sanguíneo de búfalos da espécie *Bubalus bubalis* apresentava uma concentração de fibrinogênio superior em relação ao plasma de seres humanos, bovinos, equinos e ovinos), e o tempo de coagulação do plasma de bubalinos era próximo àqueles obtidos nas amostras de seres humanos [9]. A partir desta observação que, o selante de fibrina do CEVAP foi proposto associando uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* ao

crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído de bubalinos, com a proposta de substituir o uso de sangue humano nas preparações de um novo selante livre de chances de transmissão de doenças infecciosas humanas.

Segundo as anotações depositadas no banco de dados *Gene Ontology,* pôde-se classificar a maioria das 112 proteínas identificadas no plasma sanguíneo de búfalos *Bubalus bubalis* em relação aos processos biológicos**,** funções moleculares e localização celular das quais participam. Desta forma, esta classificação auxiliou a melhor compreender o papel de cada proteína presente nesta amostra biológica e, a realçar a importância de várias proteínas presentes no plasma de bubalinos em futuros estudos proteômicos na busca por candidatos à marcadores moleculares numa rotina de diagnóstico de sanidade animal.

A molécula de fibrinogênio é uma das proteínas do plasma sanguíneo produzida no fígado dos organismos, diante das demais proteínas que são originárias dos órgãos hematopoiéticos e do intestino [30]. O fibrinogênio é uma glicoproteína complexa com massa molecular em torno de 340 kDa e é composto por estruturas secundárias denominadas cadeia alfa, cadeia beta e cadeia gama, as quais interagem por meio das pontes de dissulfetos formadas[30,31]. Porém, estas três cadeias podem ser encontradas circudantes no plasma sanguíneo, as quais desempenham vários papéis-chave na manutenção da homeostasia de um organismo vertebrado. Na presença de enzimas do tipo trombina circundantes no próprio plasma sanguíneo, o fibrinogênio é degradado em uma malha de fibrina, a qual atua como uma rede estrutural insolúvel denominado de coágulo [32]. Tanto o fibrinogênio quanto o coágulo de fibrina, desempenham papéis sobrepostos na coagulação do sangue, nas interações celulares, na resposta inflamatória, na cicatrização de feridas e no processo de neoplasias em geral [31].

Em relação a proteína albumina, muitos estudos proteômicos em bovinos e equinos evidenciaram a presença desta proteína e, na maior parte das vezes,

encontraram dificuldades de se identificar outras proteínas minoritárias devido a interações químicas fortes com a albumina [26, 27]. As propriedades fisiológicas da proteína albumina foram reveladas pela primeira vez em 1837 por Ancell e colaboradores [33] e, a partir de então, sua complexidade vem sendo revelada. Entretanto, o seu papel fisiológico no sangue animal ainda não é totalmente conhecido, despertando, ainda hoje, a curiosidade de muitos pesquisadores [34]. Comparada à outras proteínas, ela é uma molécula relativamente pequena, formada por uma cadeia de 584 aminoácidos, constituindo-se em um polipeptídeo simples com uma massa molecular em torno de 69 kDa, e organizada predominantemente em estruturas α-hélices unidas por 17 pontes dissulfeto. Uma de suas funções é atuar na manutenção do volume plasmático circulante, devido a sua massa molecular relativamente baixa e sua alta concentração. A albumina é responsável por 80% da pressão coloidosmótica, porém, sob condições de concentrações de albumina extremamente reduzidas, observa-se edema discreto, sugerindo que esta função pode ser desempenhada por outras proteínas plasmáticas [35]. Segundo Santos e colaboradores[16] não se pode descartar a possibilidade de que a proteína soro albumina desempenhe também, um papel na manutenção do equilíbrio ácido-básico, pois os resíduos de aminoácidos de histidina presentes em sua estrutura primária (pKa em torno de 7,4), conferem à ela uma função de tamponamento em situações de acidose metabólica, enquanto que na vigência de alcalose metabólica, ela também exerce função tampão, já que é capaz de liberar seus íons hidrogênio [35,36]. Além disso, a albumina está envolvida no transporte de várias substâncias fisiológicas, como por exemplo, moléculas lipossolúveis como os ácidos graxos de cadeia longa, hormônios como a tiroxina, o cortisol e a aldosterona e pequenos íons como o cálcio, o cobre, o níquel e o zinco. A albumina ainda pode atuar como um reservatório de aminoácidos, contribuindo com cerca de 5% dos aminoácidos necessários aos tecidos periféricos, sendo que, esta oferta pode ser ainda maior na presença de algumas doenças malignas em seres humanos [37,38].

A proteína fetuína-B identificada no presente estudo é uma glicoproteína produzida no fígado dos animais vertebrados e tipicamente encontrada na corrente sanguínea. Sua principal função é atuar como uma proteína carreadora/transportadora de várias substâncias na corrente sanguínea, assim como a albumina e pertencem à superfamília das proteínas cistatinas, proteínas estas ricas em histidina que atuam também como inibidores de proteases. Estudos evidenciam que as proteínas fetuínas-B são mais abundantes em sangue fetal, por isso, a denominação de fetuína (do latim, fetus) e em seres humanos, elas se expressam duas vezes mais nas mulheres do que em homens [39]. No entanto, a α-2-HS-glicoproteína (AHSG) identificada neste trabalho, também pertence à família das fetuína-B, sendo uma proteína glicosilada presente no sangue de bovinos que atua como supressora de linfócitos à fitohemaglutinina (PHA) [40,41]. Estudos evidenciaram também que, proteínas da família das fetuinas também pode atuar como um potente inibidor da calcificação sistémica em ratos, uma vez que, roedores submetidos à técnica de *knocking out* do gene para a fetuína-A (roedores sem o gene codificador da proteína fetuína-A), mesmo que submetidos à uma dieta rica em minerais, apresentaram severos quadros de calcificação óssea [42]. Já Goldstein e colaboradores [43] observaram que, a fetuína-B atua também como reguladora dos mecanismos moleculares em estratégias de implantação e na manutenção de oócitos na reprodução de camundongos [43]. Em seres humanos, a fetuina foi evidenciada diferencialmente expressa por Tuttolomondo e colaboradores [44] em quadros pró-inflamatórios de pacientes acometidos por acidentes vasculares cerebrais, sugerindo assim que, a fetuína poderia ser um dos biomarcadores em potenciais no prognóstico/diagnóstico de doenças neurodegenerativas [44]. Neste contexto, um olhar diferencial às fetuínas poderão ser projetados quando bubalinos infectados por doenças neurodegenerativas, como por exemplo, a doença da vaca louca, forem diagnosticados clinicamente em nossa rotina.

Outra importante proteína identificada no plasma sanguíneo de bubalinos foi a α-1B-glicoproteína, e é produzida no fígado em crianças e adultos [45]. Pertencente ao grupo de proteínas de fase aguda, a α-1B-glicoproteína juntamente com as proteínas α2-macroglobulina e transferrin, se apresentaram em níveis elevados no soro de seres humanos com tuberculose pulmonar [46]. Já em bovinos, α-1B-glicoproteína foi considerada uma forte candidata à marcador molecular em quadros subclínicos de infecções pelos fungos *Mycobacterium bovis* e *M. paratuberulosis*, causadores da doença infecciosa tuberculose bovina [47], por meio do uso de estratégias proteômicas similares à este trabalho. Desta forma, sugere-se que esta proteína de fase aguda possa ser de grande valia nos futuros estudos que envolvam quadros clínicos de tuberculose em bubalinos, uma vez que, esta proteína tem sido descrita como marcadores moleculares de defesa dos hospedeiros em vertebrados.

A proteína ligante de retinol (*Retinol-binding protein*) identificada é conhecida como proteína transportadora de retinol no sangue dos organismos vertebrados, sendo responsável pela homeostasia de vitamina A (retinol) nestes animais. Esta proteína é uma glicoproteína pertencente à família das α-globulinas, e é uma enzima de baixa massa molecular com cerca de 21kDa, produzida pelos hepatócitos [48]. A proteína transportadora de retinol possui um sítio de ligação em sua estrutura terciária para a molécula de retinol e, cerca 90% dessa proteína circudante no plasma sanguíneo está associada à pré-albumina (transtiretina) na forma de um complexo protéico [48,49]. Ensaios realizados por Norseen e colaboradores [50] apontaram que, esta proteína induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos de camundongos e de seres humanos, uma vez que, a proteína transportadora de retinol inativou a produção de insulina pelos adipócitos, desencadeando os processos inflamatórios via macrófagos [50]. Paralelamente, ensaios realizados por Muenzner e colaboradores [51] com camundongos obesos evidenciaram que, a expressão da proteína transportadora de retinol se encontrava extremamente elevada, evoluindo à

quadros de resistência à insulina, sugerindo assim que, a proteína transportadora de retinol pode ter implicações importantes no tratamento da obesidade [51]. Em equinos, a proteína ligante de retinol foi indicada como um marcador em potencial relacionado à danos celulares e vasculares em cavalos de corrida após períodos prolongados de estresse físico [26].

Inibidores de proteases são encontrados no plasma sanguíneo dos vertebrados em geral [25]. No presente estudo, inibidores do tipo endopina 2B, antitrombina-III e *α*-1-antiprotease (*α*-1-antitripsina) foram identificados. As endopinas 2B inibem cisteinoproteases, papaína e catepsina, as quais participam da produção de peptídeos neurotransmissores [52]. Estudos de Xia e colaboradores [53] sugerem que as endopinas 2B atuam na regulação de funções neuroendócrinas, uma vez que, se mostram diferencialmente expressas (superexpressas) em quadros clínicos da doença da febre do leite em bovinos [53]. Desta forma, este tipo de inibidor de protease também pode ser um alvo molecular para avaliar a sanidade dos bubalinos em estudos futuros.

Em relação aos demais inibidores identificados neste estudo, tanto a antitrombina-III quanto a proteína *α*-1-antiprotease (*α*-1-antitripsina) pertencem à família das serpinas. Sabe-se que as serpinas desempenham papéis essenciais em muitos organismos. Em artrópodes, estas proteínas estão envolvidas no sistema imunológico inato, morfogênese e desenvolvimento [54]. Nos mamíferos, as serpinas regulam vias de sinalização essenciais para a vida, tais como a coagulação sanguínea, fibrinólise, inflamação e ativação do complemento, algumas das quais são consideradas a primeira linha de defesa para parasitas hematófagos [54,55.] As serpinas também são alvos de alguns estudos na medicina veterinária, como por exemplo, os achados de Romao e colaboradores [56] sobre os efeitos da idade em relação à gordura subcutânea em bovinos, focando nas eventuais variações fisiológicas em bovinos de corte, podendo assim, auxiliar os trabalhos futuros com bubalinos.

A antitrombina-III é potente inibidor das reações da cascata de coagulação [57]. Embora o nome implique que a antitrombina só atue sob trombinas, na verdade, ela inibe praticamente todas os fatores de coagulação, tais como fatores Xa, fator IX, trombina (fator IIa), fator XII, fator XI e fator VIIa [57]. Sua capacidade de limitar a coagulação através de múltiplas interações torna uma das proteínas anticoagulantes naturais mais importantes e já descritas na literatura e, atualmente, a proteína antitrombina é utilizada como uma proteína terapêutica [58]. A antitrombina tem a aprovação do órgão regulatório *Food Drug Administration* (FDA) como um anticoagulante para a prevenção de coágulos no sangue, antes e durante ou depois de intervenções cirúrgicas ou administração em pacientes com doenças hereditárias que apresentam deficiência antitrombina [59]. E por fim, as *α*-1-antiprotease (*α*-1-antitripsina) identificadas neste estudo, já foram caracterizadas como possíveis biomarcadores diagnóstico e prognóstico para metástases em seres humanos[60] e se encontram superexpressas em pacientes acometidos por Mal de Alzheimer [61-63], sugerindo assim que, estas proteínas podem ser alvos de possíveis alterações/expressões diferenciais em doenças neurológicas de ruminantes.

As imunoglobulinas também foram identificadas no plasma de bubalinos. Como é sabido, estas são glicoproteínas semelhantes aos demais organismos vertebrados e conferem imunidade humoral. Dividem-se em cinco grandes classes, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE e são compostas por 82-96% de cadeias polipeptídicas e 4-18% de carboidratos [64]. Elas são heterodiméricas, podendo ser separadas funcionalmente em domínios variáveis que se ligam a antígenos e domínios constantes que caracterizam sua função [65]. As diferentes estruturas e funções de todas as subclasses de imunoglobulinas humanas têm sido estudadas extensivamente, mas nem todas possuem sua função totalmente conhecida, mesmo assim, contudo elas são conhecidas por ativar o sistema complemento ou auxiliar na ligação de receptores de antígeno [66, 67]. A Imunoglobulina M (IgM) é o primeiro anticorpo produzido em resposta a um antígeno [68]. Neste estudo, uma das imunoglobulinas identificadas foi a proteína

imunoglobulina M de cadeia pesada (IgM *heavy chain)*, a qual também já foi evidenciada no soro de vários vertebrados [69], colostro e leite de mamíferos [70] . Em bovinos e outros ruminantes, a imunoglobulina M de cadeia pesada tem sido descrita no combate à septicemia [71]. Porém, nada consta sobre estas moléculas se expressarem diferentemente em doenças infecciosas em ruminantes.

Entre as demais proteínas minoritárias, a proteína transportadora de vitamina-D também foi identificada no plasma de bubalinos. Ela é considerada uma proteína multifuncional no plasma sanguíneo [72] e em outros fluídos corpóreos como urina [73]. A proteína ligante de vitamina-D se associa à imunoglobulinas, as quais se ligam em membranas da superfície celular de linfócitos-B e com receptores de IgG de membranas de linfócitos-T [74]. Em seres humanos, esta proteína já foi associada à quadros clínicos de escleroses múltiplas [75], desta forma, esta proteína poderia atuar como uma forte candidata à marcador molecular de doenças crônicas neurológicas em ruminantes como encefalopatia espongiforme bovina [76], popularmente denominada doença da vaca louca, a qual é uma doença infecciosa que pode ser transmitida ao homem.

Já a proteína transferrina identificada neste trabalho é uma glicoproteína formada por uma única cadeia polipeptídica e sua principal função é o transporte de Fe^{+3} através do plasma [77]. A transferrina é considerada uma importante proteína de fase aguda nos animais pois em quadros clínicos de infecções em geral e trauma de tecidos, sua concentração no plasma é alterada rapidamente [78]. Além disso, esta proteína está também envolvida em processos tumorais em seres humanos, correlacionando-se com a gravidade da doença [79] e, em pacientes com doença cardíaca vascular, foi observado uma diminuição considerável da expressão de transferrina [80]. Em ruminantes, a proteína transferrina já foi evidenciada como um marcador molecular pela abordagem proteômica, tendo sua expressão elevada em animais infectados pelo fungo *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* causador

da Doença de Johne's em bovinos, a qual é representada por um processo inflamatório crônico no intestino de ruminantes [81].

Múltiplas formas da proteína apolipoproteina-A1 foram identificadas no plasma de bubalinos *Bubalus bubalis*. Esta proteína é conhecida por possuir efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios [82] e também participa no transporte de colesterol dos tecidos para o fígado [83]. Existem poucos estudos sobre apolipoproteinas como biomarcadores moleculares, porém em seres humanos, esta apoliproteína se revelou um forte candidato à marcador molecular no prognóstico de doenças cardiovasculares em seres humanos [84]. Em ruminantes, há relatos que os níveis da proteína apoliproteína se encontraram alterados em ovelhas em quadros de clínicos de rino-tracheo-bronquites e em períodos peripartos, a qual é a fase de maior incidência de doenças infecciosas e parasitárias [85], enquanto que, esta mesma foi indicada como um marcador molecular em quadros clínicos de mastites em bovinos [27].

Outro grupo de proteínas identificadas no plasma de bubalinos foram as glicoproteínas *α-2*-macroglobulinas. Elas estão presentes em vários fluídos corpóreos em invertebrados e vertebrados e atuam como inibidoras de proteases em geral. Sua função principal é inibir o excesso de proteases liberadas durante a injúria de tecidos nos locais de inflamação. Além disso, as *α-2*-macroglobulinas regulam a ligação da proteína transferrina em seus receptores de superfície e interagem com diversas citocinas importantes [86]. Em seres humanos, as *α-2*-macroglobulinas foram consideradas marcadores moleculares diagnósticos e prognóstico de diversas doenças como fibrose hepática [87] e hipertrofia cardíaca [88]. Já em animais, destacou-se a proteína *α*-2-macroglobulina como uma forte candidata a marcador molecular nos estudos que envolveram estresse físico [esforço físico prolongado em cavalos de corrida] [26] e artrites não infecciosas em equinos [89].

E por fim, a proteína transtiretina identificada neste estudo foi caracterizada como uma proteína do tipo pré-albumina, segundo Shenkin e colaboradores [90] (2006)

e Neyra e colaboradores [91], por ser uma proteína transportadora de moléculas em geral. Relatos na literatura indicam que a transtiretina atua como uma proteína transportadora do hormônio da tireóide e provavelmente transporta tiroxina do sangue para o cérebro em seres humanos [92]. Doenças do tipo amiloidoses em seres humanos podem estar relacionadas com o acúmulo de transtiretinas em vários órgãos vitais como o sistema nervoso central [93]. Até o momento, não existem relatos sobre que esta proteína possa atuar como marcador molecular em ruminantes em quadros clínicos neurológicos.

A rede de interações proteína-proteína obtida neste estudo a partir dos 17 grupos de proteínas majoritárias possibilitou melhor compreendermos a relação existente entre as proteínas presentes no plasma sanguíneo dos bubalinos. Conforme citado anteriormente, 68 interações foram possíveis serem reveladas neste estudo. Nota-se que nesta análise, as proteínas α-1B-glicoproteína e as imunoglobulinas não apresentam nenhum tipo de associação entre os demais grupos de proteínas identificadas nesta amostra biológica, sugerindo que todas as demais proteínas se relacionem para a ativação da via de sinalização do sistema complemento e cascata de coagulação sanguínea, os quais são ancorados pelas proteínas α-1-antiproteinase, α-2-macroglobulina, antitrombina-III, fibrinogênio-*α*, fibrinogênio-β e fibrinogênio-γ segundo a ilustração da Figura 5B. Este estudo de interações proteína-proteína mostrou de extrema valia ao final deste trabalho, uma vez que, o plasma de bubalinos da espécie *Bubalus bubalis* reúnem moléculas majoritárias importantes que atuam na formação da malha de fibrina, produto final da cascata de coagulação sanguínea. A formação de um coágulo de fibrina é a proposta central do selante de fibrina do CEVAP, bioproduto produzido a partir do crioprecipitado de bubalinos e de uma serinoprotease do veneno de serpentes, selante este, atualmente, testado em pacientes acometidos por úlceras venosas crônicas.

6. CONCLUSÃO

A caracterização de 112 proteínas majoritárias presentes no plasma de búfalos *Bubalus bubalis*, raça Murrah clinicamente sadios foi realizada por meio das técnicas analíticas eletroforese bidimensional e espectrometria de massas RP-UPLC-ESI MS/MS. Este trabalho apresenta um caráter inédito, pois a composição do plasma de bubalinos esta sendo descrita pela primeira vez. Apesar dos esforços obtidos na área da genômica para este ruminante por meio do sequenciamento genético de búfalos da espécie *Bubalus bubalis*, ainda não se tem a codificação de todas essas sequências genômicas para suas respectivas proteínas. Esta descrição protéica é de extrema valia pois fornecerá, não apenas um mapeamento do conjunto de proteínas para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação do plasma e do crioprecipitado de bubalinos, mas também, dará suporte, futuramente, ao desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica mais específica para avaliar a sanidade de búfalos *Bubalus bubalis* doadores de matéria-prima na rotina de produção do selante de fibrina do CEVAP. Outros estudos proteômicos serão realizados pelo nosso grupo de pesquisa de forma a caracterizar as proteínas minoritárias (menos abundantes) por meio do uso de técnicas de depleção das proteínas mais abundantes como por exemplo, a albumina, a fim de obtermos mais informações a respeito da composição proteica do plasma e do crioprecipitado desses bubalinos.

7. REFERÊNCIAS

[1] Galdos ACR. Análise proteômica do saco vitelino de bovinos [Dissertação Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo, 2009.

[2] Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 2004; 74:2157-84.

[3] Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoides and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7:357-69.

[4] Borghese A, Mazzi M. Buffalo Population and Strategies in the World. Production and Research 2005; 5:12-35.

[5] Ranjhan SK. Buffalo as a social animal for humanity. In: World Buffalo Congress, 8, 2007, Caserta, Italy. Caserta: WBC, 2007, p. 30-38.

[6] Silva MST. Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PROnAF. Pará, agosto de 2003. Disponível em: <www.cpatu.br/bufalo>. Acesso em: 20 de fev. 2014.

[7] Loose HW, Haslam PJ. The management of peripheral arterial aneurysms using percutaneous injection of fibrin adhesive. Br J Radiol. 1998; 71(852):1255-9.

[8] Pizzol MMD, Roggia MF, Kwitko S, Marinho DR, Rymer S. Utilização de adesivo de fibrina em cirurgias oftalmológicas. Arq Bras Oftalmol. 2009; 72(3):308-12.

[9] Thomazini-Santos IA, Giannini MJS M, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase® and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitades. J Venom Anim Toxins. 1998;4:120-36.

[10] Idris SF, Hadjinicolaou AV, Sweeney M, Winthrop C, Balendran G, M Besser. A eficácia e segurança do crioprecipitado, no tratamento de hipofibrinogenemia adquirida. Br J Haematol. 2014; 12(10):111.

[11] Nascimento B, Goodnough LT, Levy JH. Cryoprecipitate therapy. Br J Anaesth. 2014; (27):158.

[12] Stolf HO. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from the patient's naso labial fold. J. Venom. Anim. Toxins. 1999; 5(2):227.

[13] Barbosa MDS, Stipp AC, Passanezi E, Greghi SL. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. histological analysis. J Appl Oral Sci. 2008;16(5): 310-5.

[14] Gatti M, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. J Venom Anim Toxins incl Trop. 2011;17:226-9.

[15] Santos LD, Menegasso ARS, Pinto JRAS, Santos KS, Castro FM, Kalil JE, Palma MS. Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Proteomics. 2012;11:1403-12.

[16] Ferreira AM, Torres CAA. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. Pesquisa Agropecuária Brasileira 1993; 28: 411- 418.

[17] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. – Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. 440 p.

[18] Marques F. Bioética: sem eles não há avanço. Pesquisa FAPESP 2008; 144: 24-31.

[19] Barros LC, Ferreira RSJR, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: Applications in Medicine. J Toxicol Environmental Health, Part B 2009;12(8):553-71.

[20] Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, Gallacci M, Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Barraviera B, Ferreira Rs Jr. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2011;17(1):23-33.

[21] Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, Ferreira Jr. RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy 2014**,** 5**:**78 doi:10.1186/scrt467013.

[22] Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2001;7(2):159-71.

[23] Bradford MM. Quantificação de microgramas de proteína utilizando o princípio da proteína de ligação de corante. Analytical Biochemistry. 1976;72:248-54.

[24] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1(6)2856-60.

[25] Miller I, Friedlein A, Tsangaris G, Maris A, Fountoulakis M, Gemeiner M. The serum proteome of *Equus caballus*. Proteomics. 2004;4(10):3227-34.

[26] Scoppetta F, Tartaglia M, Renzone G, Avellini L, Gaiti A, Scaloni A, Chiaradia E. Plasma protein changes in horse after prolonged physical exercise: a proteomic study. J Proteomics. 2012; 75(14):4494-504.

[27] Turk R, Piras C, Kovačić M, Samardžija M, Ahmed H, De Canio M, Urbani A, Meštrić ZF, Soggiu A, Bonizzi L, Roncada P. Proteomics of inflammatory and oxidative stress response in cows with subclinical and clinical mastitis. J Proteomics. 2012;75(14):4412-28.

[28] Simplício KMMG, Sousa FC, Fagliari JJ, Silva PC. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2013; 65(5): 1339-1347.

[29] Holcomb JB, Fox EE, Zhang X, White N, Wade CE, Cotton BA, *et al*. Cryoprecipitate use in the PROMMTT study. J Trauma Acute Care Surg. 2013;75:31-39.

[30] Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb.Haemost. 2005;3(8):1894-904.

[31] Madrazo J, Brown JH, Litvinovich S, Dominguez R, Yakovlev S, Medved L, Cohen C. Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E5 fragment) at 1.4-Å resolution. Biochemistry. 2001;198(21)11967-72.

[32] Levy JH, Szlam FF, Tanaka KA, Sniecienski RM. Fibrinogen and hemostasis: a primary hemostatic target for the management of acquired bleeding. Anesth.Analg. 2012;114:261-74.

[33] Ancell H. Course of lectures on the physiology and pathology of the blood and the other animal fluids. Lancet 1837;1:222-3.

[34] Kaysen GA. Why measure serum albumin levels? J. Renal. Nutr. 2002;12(3):148-50.

[35] Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. JPEN. 1991;15(2):207-11.

[36] Schaefer S, Hassa PO, Sieber-Ruckstuhl NS, Piechotta M, Reusch CE, Roschitzki B, Boretti FS. Characterization of recombinant human and bovine thyroid-stimulating hormone preparations by mass spectrometry and determination of their endotoxin content. BMC Veterinary Research 2013,9:(14)1-7.

[37] Whicher J, Spence C. When is serum albumin worth measuring? Ann. Clin.Biochem.1987;24:572-80.

[38] Santos NSJ, Draibe SA, Kamimura MA, Cuppari L. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. Ver.Nutr. 2004;17(3):339-49.

[39] Kubler D, Gosenca D, Wind M, Heid H, Friedberg I, Jahnen- Dechent W, Lehmann WD. Proteolytic processing by matrix metalloproteinases and phosphorylation by protein kinase CK2 of fetuin-A, the major globulin of fetal calf serum. Biochimie 2007; 89:410-18.

[40] Splitter GA, Everlith KM. Suppression of bovine T- and B-lymphocyte responses by fetuin, a bovine glycoprotein. Cell Immunol.1982; 70:205-18.

[41] Goto K, Yoshida K, Suzuki Y, Yamamoto K, Sinohara H. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding plasma coun-tertrypin, a member of mammalian fetuin family, from the Mongolian gerbil, Merionesunguiculatus. J.Biochem.1997; 121:619-25.

[42] Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein α2–Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. J. Clin. Invest. 2003;112(3):357-66.

[43] Goldstein JW. Gene Deletion and Functional Analysis of Fetuin-B [Dissertação de Mestrado] 2007. Mündlichen Prüfung: Internetseiten der Hochschulbibliothek; Von der Fakultätfür Mathematik.

[44] Tuttolomondo AA, Raimondoa DID, Sciacca ADIR, Casuccio CA, Bivona BG, Bellia C, Barreca AL, et al. Fetuin-A and CD40 L plasma levels in acute ischemic stroke: Differences in relation to TOAST subtype and correlation with clinical and laboratory variables. Atherosclerosis 2010; 208:290-96.

[45] Udby L, Sørensen OE, Pass J, Johnsen AH, Behrendt N, Borregaard N, Kjeldsen L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha1B-glycoprotein in human plasma. Biochemistry 2004; 43(40): 12877–86.

[46] Grange JM, Kardjito T, Setiabudi I. A study of acute-phase reactant proteins in Indonesian patients with pulmonary tuberculosis. Tubercle. 1984;65:23–39.

[47] Seth M, Lamont EA, Janagama HK, Widdel A, Vulchanova L, Stabel JR, Waters WR, Palmer MV, Sreevatsan S. Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. PLoS One. 2009;4(5):e5478

[48] Kuźniar J, Marchewka Z, Kraznowski R, Boratyńska M, Długosz A, Klinger M. Enzymuria and low molecular weight protein excretion as the differentiating marker of complications in the early post kidney transplantation period. Int.Urol.Nephrol. 2006,38(3-4):753-8.

[49] MastroianniKirsztajn G, Nishida SK, Silva MS, Ajzen H, Pereira AB. Urinary retinol-binding protein as a prognostic marker in the treatment of nephrotic syndrome. Nephron. 2000;86(2):109-14.

[50] Norseen J, Hosooka T, Hammarstedt A, Yore MM, Kant S, Aryal P, Kiernan UA, Phillips DA, Maruyama H, Kraus BJ, Usheva A, Davis RJ, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory

cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. Mol. Cell. Biol. 2012; 32:2010-9.

[51] Muenzner M, Tuvia N, Deutschmann C, Witte N, Tolkachov A, Valai A, Henze A, Sander LE, Raila J, Schupp M. Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor α activity. Mol. Cell. Biol. 2013; 33:4068-82.

[52] Hook VY, Hwang SR. Novel Secretory vesicle serpins, endopin 1 and endopin 2: endogenous protease inhibitors with distinct target protease specificities. Biological Chemistry 2002; 383: 1067–1074.

[53] Xia C, Zhang HY, Wu L, Xu C, Zheng JS, Yan YJ, Yang LJ, Shu S. Proteomic analysis of plasma from cows affected with milk fever using two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry. Res Vet Sci. 2012;93(2):857-61.

[54] Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev. Comp. Immunol. 1999;23(4-5):291-301.

[55] Tirloni L, Seixas A, Mulenga A, Vaz Ida SJr, Termignoni C. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. Exp.Parasitol. 2014;137:25-34.

[56] Romao JM, He ML, McAllister TA, Guan LL. Effect of age on bovine subcutaneous fat proteome: Molecular mechanisms of physiological variations during beef cattle growth. J.Anim. Sci. 2014;92(8):3316-27.

[57] Bjork I, Olson JE. Antithrombin: a bloody important serpin. *In* Chemistry and Biology of Serpins. Plenum Press. 1997; 17-33.

[58] Blajchman MA, Austin RC, Fernandez-Rachubinski F, Sheffield WP. Molecular basis of inherited human antithrombin deficiency. Blood 1992; 80(9):2159-71.

[59] Chang WS, Harper PL. Commercial antithrombin concentrate contains inactive L-forms of antithrombin. Thromb.Haemost. 1997;77(2):323-28.

[60] Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H. Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. Cell. 1988; 52:487-501.

[61] Harigaya Y, Shoji M, Nakamura T, Matsubara E, Hosoda K, Hirai S. Alpha 1-antichymotrypsin level in cerebrospinal fluid is closely associated with late onset Alzheimer's disease. Intern. Med.1995; 34:481-4.

[62] Licastro F, Parnetti L, Morini MC, Davis LJ, Cucinotta D, Gaiti A, et al. Acute phase reactant alpha 1-antichymotrypsin is increased in cerebrospinal fluid and serum of patients with probable Alzheimer disease. Alzheimer Dis. Assoc. Disord.1995;9:112-8.

[63] DeKosky ST, Ikonomovic MD, Wang X, Farlow M, Wisniewski S, Lopez OL, et al. Plasma and cerebrospinal fluid alpha1-antichymotrypsin levels in Alzheimer's disease: correlation with cognitive impairment. Ann. Neurol. 2003;53:81-90.

[64] Mousavi M, Rabbani H, Pilstrom L, Hammarstrom L. Characterization of the gene for the membrane and secretory form of the IgM heavy-chain constant region gene (Cp) of the cow (*Bos taurus*). Immunology 1998; 93:581-588.

[65] Brodeur PH, Riblet RJ. The immunoglobulin heavy chain variable region (IgH-V) locus in the mouse. Eur J Immunol 1984;14:922-30.

[66] Harry W, Schroeder Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. J. Allergy. Clin. Immunol. 2010; 125(202): S41-S52.

[67] Lefranc M PIMGT. The international Immunogenetics information system. In: Lo BKC (ed) 2004. Antibody engineering methods and protocols, 2nd ed. Methods in Molecular Biology, vol 248. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp 27–49.

[68] Carroll EJ, Crenshaw GL. Bactericidal activity of bovine neonatal serums for selected coliform bacteria in relation to total protein and immunoglobulin GI and immunoglobulin M concentrations. Am. J. Vet. Res. 1976; 37; 389.

[69] Ungar-Waron H, Gluckman A, Meirom A, Trainin Z. Purification and characterization of IgM and of its g-chain from bovine serum. J. Immunol. Meth. 1978; 23: 213.

[70] Mach JP, PAHUD JJ. Secretory IgA, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. J. Immunol. 1971; 106: 552.

[71] Brock JH, Arzabe R, Pineimo A, Olivro AM. The effect of limited proteolysis by trypsin and chymotrypsin on bovine colostral IgGI. Immunology 1977; 32; 207.

[72] Svasti J, Kurosky A, Bennett A, Bowman BH. Molecular basis for the three major forms of human serum vitamin D binding protein (group-specific component). Biochemistry 1979; 18(8): 1611–7.

[73] Lauridsen AL, Aarup M, Christensen AL, Jespersen B, Brixen K, Nexo E. Sensitive automated ELISA for measurement of vitamin D-binding protein (Gc) in human urine. Clin Chem. 2005;51(6):1016-8.

[74] Osawa M, Kimura A, Yukawa N, Seto Y, Saito T, Tsuji T, Takeichi S. Epitope analysis of monoclonal antibodies to human Gc globulin (vitamin D-binding protein). Biochem Mol Biol Int. 1998;44(2):293-303.

[75] Yang M, Qin Z, Zhu Y, Li Y, Qin Y, Jing Y, Liu S. Vitamin D-binding protein in cerebrospinal fluid is associated with multiple sclerosis progression. Mol Neurobiol. 2013;47(3):946-56.

[76] Ebringer A, Rashid T, Wilson C. Bovine spongiform encephalopathy, multiple sclerosis, and creutzfeldt-jakob disease are probably autoimmune diseases evoked by *Acinetobacter bacteria*. Ann N Y Acad Sci. 2005;1050:417-28.

[77] Andres MT, Fierro JF. Antimicrobial mechanism of action of transferrins: selective inhibition of H+-ATPase. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 4335–4342.

[78] Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a piratical, simple and clinically relevant approach in larg cohort. J. Clin. Lab. Anal. 1999;13(6), 273-279.

[79] Aguilera O, Quiros LM, Fierro JF. Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes. FEBS Lett 2003; 548: 5–10.

[80] Gao G, Xuan C, Yang Q, Liu X-C, Liu Z-G, Liu,G-W H. Identification of Altered Plasma Proteins by Proteomic Study in Valvular Heart Diseases and the Potential Clinical Significance. PLoS ONE 2013; 8(8): e72111.

[81] You Q, Verschoor CP, Pant SD, Macri J, Kirby GM, Karrow NA. Proteomic Analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (MAP). Vet. Immunol. Immunopath. 2012; 148: 243-251.

[82] Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. Lancet. 2001;358:2026–2033.

[83] Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. QJM. 2005;98(12):845-56.

[84] Florvall G, Basu S, Larsson A. Apolipoprotein A1 Is a Stronger Prognostic Marker Than Are HDL and LDL Cholesterol for Cardiovascular Disease and Mortality in Elderly Men. Journal of Gerontology: Biological Sciences. 2006; 61A(12), 1262–1266.

[85] Chiaradia E, Avellini L, Tartaglia M, Gaiti A, Just I, Scoppetta F, Czentnar Z, Pich A. Proteomic evaluation of sheep serum proteins. BMC Vet Res. 2012; 25(8):66-72.

[86] Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. α-2-Macroglobulin: a physiological guardian. J Cell Physiol. 2013; 228(8):1665-75.

[87] Ho AS, Cheng CC, Lee SC, Liu ML, Lee JY, Wang WM, Wang CC. Novel biomarkers predict liver fibrosis in hepatitis C patients: Alpha 2 macroglobulin, vitamin D binding protein and apolipoprotein AI. J Biomed Sci 2010; 17:58–64.

[88] Annapoorani P, Dhandapany PS, Sadayappan S, Ramasamy S, Rathinavel A, Selvam GS. Cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin—A new biomarker for myocardial infarcted diabetic patients. Atherosclerosis 2006;186:173–176.

[89] Hultén C, Grönlund U, Hirvonen J, Tulamo RM, Suominen MM, Marhaug G, Forsberg M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. Equine Vet J. 2002; 34(7):699-704.

[90] Shenkin A. Serum Prealbumin: Is It a Marker of Nutritional Status or of Risk of Mal nutrition? Clinical Chemistry 2006; 52(12):2177-2179.

[91] Neyra NR, Hakim RM, Shyr Y, Kikizler TA. Serum transferrin and serum prealbumin are early predictors of serum albumin in chronic hemodialysis patients. J Ren Nutr. 2000; 4:184-90.

[92] Schweizer U, Johannes J, Bayer D, Braun D. Structure and function of thyroid

hormone plasma membrane transporters. Eur Thyroid J. 2014;3(3):143-53.

[93] Ferreira N, Pereira-Henriques A, Attar A, Klärner FG, Schrader T, Bitan G, Gales L, Saraiva MJ, Almeida MR. Molecular tweezers targeting transthyretin amyloidosis. Neurotherapeutics. 2014;11(2):450-61.

Anexo

Tabela 1: Identificação das proteínas presentes no plasma de búfalos clinicamente sadios da espécie *Bubalus bubalis bubalis* por espectrometria de massas do tipo ESI-Q-ToF.

Spot	*Protein Name*	*Accession Number*	*pI/Mr (KDa)*	*Identification Method*	*Matches*	*Sequence*	*Sequence coverage (%)*	*Mascot score*	*Peptide Sequences (ion score)*
1	IgM heavy chain constant region, secretory form	gi|28592070	4,30/99,3	MS/MS	8(4)	3(3)	10	270	R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (104) K.GFAPADVFVQWLQR.G (99) K.SSLICQATDFSPK.Q (66)
2	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi| |34538498	4,32/99,3	MS/MS	7(4)	5(3)	18	396	R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (135) K.GFAPADVFVQWLQR.G (95) K.SSLICQATDFSPK.Q (88) R.ESASVTCLVK.G (48) K.ALETHTYFER.H (32)
4	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi|34538498	4,33/99,3	MS/MS	10(6)	6(4)	17	458	R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (129) K.GFAPADVFVQWLQR.G (97) K.SSLICQATDFSPK.Q (83) R.DFVPNSVSFSWK.F (62) R.ESASVTCLVK.G (50)
6	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	4,34/99,3	MS/MS	7(2)	5(2)	6	313	R.LEGEDQFLEVAEAPEATQATFPVHR.A (134) R.VLSPAGPEAQFELR.G (103) R.ALWTGALTPGR.D (48) R.RGAEEQLVPR.A (14) R.CEAEVPDVSFLLLR.A (13)
7	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	4,98/99,3	MS/MS	7(2)	5(2)	24	350	R.LEGEDQFLEVAEAPEATQATFPVHR.A (122) R.VLSPAGPEAQFELR.G (96) R.ALWTGALTPGRDAVLR.C (50) R.CEAEVPDVSFLLLR.A (43) R.GAEEQLVPR.A (39)
8	Alpha-2-macroglobulin , partial	gi|440903847	4,98/99,6	MS/MS	10(0)	7(0)	7	142	R.GIPFTGKVLLVDGK.G (22) R.ASFSVLGDILGSAMR.N (27) R.LLIYAILPDGEVVGDSAR.Y (27) K.GSGGTAEHPFTVEEFVLPK.F (31) R.IVLLDESFHPLNELVPLVYVEDPK.G (15)
9	Alpha-2-macroglobulin precursor	gi|157954061	4,90/99,5	MS/MS	18(4)	10(4)	11	384	R.VTASPQSLCALR.A (77) R.ASFSVLGDILGSAMR.N (74) R.LLIYAILPDGEVVGDSAR.Y (41) K.GSGGTAEHPFTVEEFVLPK.F (60) K.VGLNFSPGQSFPASQAHLR.V (58)

10	Alpha-2-macroglobulin precursor	gi|157954061	5,55/98,1	MS/MS	18(3)	10(3)	9	338	R.NALFCLDSAWK.S (32) K.IQEEGTEVELTGK.G (60) R.ASFSVLGDILGSAMR.N (41) K.GSGGTAEHPFTVEEFVLPK.F (29) K.VGLNFSPGQSFPASQAHLR.V (65)
12	Alpha-2-macroglobulin precursor	gi|229552	5,59/98,0	MS/MS	5(1)	4(1)	8	176	K.LVNELTEFAK.T (62) R.FKDLGEEHFK.G (52) K.DAFLGSFLYEYSR.R (50) R.KVPQVSTPTLVEVSR.S (12)
13	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi|34538498	5,63/98,0	MS/MS	17(1)	10(8)	35	828	K.SSLICQATDFSPK.Q (93) K.GFAPADVFVQWLQR.G (86) R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (116) K.GETYTCVVGHEALPHMVTER.T (119) R.VFPLVSCVSSPSDESTVALGCLAR.D (115)
16	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi|34538498	5,18/77,6	MS/MS	20(14)	7(6)	27	677	R.DFVPNSVSFSWK.F (81) K.GFAPADVFVQWLQR.G (100) R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (160) R.VFPLVSCVSSPSDESTVALGCLAR.D (118) K.YVTSSPAPEPQDPSVYFVHSILTVAEEDWSK.G (87)
17	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi|34538498	5,33/77,6	MS/MS	19(14)	9(6)	33	712	R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (156) R.VFPLVSCVSSPSDESTVALGCLAR.D (124) K.GFAPADVFVQWLQR.G (100) K.YVTSSPAPEPQDPSVYFVHSILTVAEEDWSK.G (90) K.SSLICQATDFSPK.Q (95)
18	Immunoglobulin heavy chain constant region	gi|34538498	5,41/77,6	MS/MS	18(14)	8(6)	29	726	R.VFPLVSCVSSPSDESTVALGCLAR.D (162) R.IVSGISEGQVETVQSSPITFR.A (135) K.GFAPADVFVQWLQR.G (100) K.YVTSSPAPEPQDPSVYFVHSILTVAEEDWSK.G (89) K.SSLICQATDFSPK.Q (86)
19	Serum albumin	gi|1351907	5,50/77,5	MS/MS	29(14)	14(5)	25	710	K.LGEYGFQNALIVR.Y (110) R.MPCTEDYLSLILNR.L (102) K.LVNELTEFAK.T (71) K.TVMENFVAFVDK.C (70) K.DAFLGSFLYEYSR.R (69)
20	Serum albumin	gi|1351907	5,92/75,5	MS/MS	25(13)	14(7)	26	856	K.LGEYGFQNALIVR.Y (129) R.MPCTEDYLSLILNR.L (126) K.DAFLGSFLYEYSR.R (87) K.TVMENFVAFVDK.C (69) R.RHPYFYAPELLYYANK.Y (66)

21	Serum albumin	gi|1351907	6,72/74,9	MS/MS	10(7)	5(3)	6	333	K.VIEQVQHINLLQK.N (103) K.GLIDEVDQDFTSR.I (96) K.QLEQVIAINLLPSR.D (84) R.DIQYLPLIK.M (35) R.KVIEQVQHINLLQK.N (16)
24	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	gi|27806751	6,55/74,5	MS/MS	3(1)	2(1)	5	111	K.CNLLAEK.Q (16) K.QDGQFSVLFTK.C (96)
25	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	gi|57526674	6,58/74,5	MS/MS	3(3)	2(2)	12	230	R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T (136) K.QDGQFSVLFTK.C (94)
26	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	gi|57526674	6,00/73,9	MS/MS	5(4)	3(2)	10	212	R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T (99) K.QDGQFSVLFTK.C (95) K.CNLLAEK.Q (18)
27	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	gi|57526674	4,40/68,9	MS/MS	4(2)	3(2)	8	176	R.HTFSGVASVESASGEAFHVGK.T (86) K.QDGQFSVLFTK.C (81) R.QQTEHAVEGDCDIHVLK.Q (9)
28	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	gi|27806751	4,40/68,9	MS/MS	4(1)	3(1)	5	100	K.SPDLEPVLR.Y (61) K.RPPGFSPFR.S (15)
29	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	5,47/71,3	MS/MS	6(2)	5(2)	14	348	R.LEGEDQFLEVAEAPEATQATFPVHR.A (139) R.VLSPAGPEAQFELR.G (111) R.ALWTGALTPGR.D (50) R.RGAEEQLVPR.A (32) R.CEAEVPDVSFLLLR.A (16)
30	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	5,87/70,8	MS/MS	7(4)	6(3)	20	331	R.VLSPAGPEAQFELR.G (103) R.RGAEEQLVPR.A (72) R.LEGEDQFLEVAEAPEATQATFPVHR.A (69) R.ALWTGALTPGR.D (55) R.CEAEVPDVSFLLLR.A (29)
31	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	5,98/70,7	MS/MS	14(7)	6(4)	22	457	R.LEGEDQFLEVAEAPEATQATFPVHR.A (147) R.THAAGTPSEPSATVTIEELDPPPAPTLTVDR.E (112) R.VLSPAGPEAQFELR.G (92) R.ALWTGALTPGR.D (65) R.SLLSELSDPVELR.V (37)
32	Alpha-1B-glycoprotein precursor	gi|114053019	5,77/70,3	MS/MS	9(3)	7(3)	24	340	R.VLSPAGPEAQFELR.G (103) K.DGVGQEPVHLESPAHEHR.F (65) R.GAEEQLVPR.A (69) R.ALWTGALTPGR.D (49) R.SLLSELSDPVELR.V (26)
34	Fetuin-B precursor	gi|77735387	6,07/68,8	MS/MS	2(1)	2(1)	7	121	K.GSVQYLPDWDK.K (36) K.IISVTCSFFNSQAPTRR.G (86)

36	Vitamin D-binding protein precursor	gi|78369364	6,07/68,8	MS/MS	6(1)	5(1)	9	202	K.VLDQYIFELSR.K (85) K.VPTAHLEDVLPLAEDITTILSK.C (43) R.KTQIPEVFLTK.I (37) K.DLASLGREDFTSLSMVLYSR.K (33) K.FAQKVPTAHLEDVLPLAEDITTILSK.C (4)
37	Vitamin D-binding protein precursor	gi|78369364	6,07/68,8	MS/MS	15(5)	7(3)	11	394	K.VLDQYIFELSR.K (89) R.KTQIPEVFLTK.I (89) K.VPTAHLEDVLPLAEDITTILSK.C (83) K.LCDNLSTK.N (37) K.TQIPEVFLTK.I (36)
39	Endopin 2B	gi|38683423	5,53/68,2	MS/MS	7(4)	3(3)	9	332	K.GTSVDGHSLASSNTDFAFSLYK.Q (139) K.IFTSDADFSGITDDHK.L (115) K.KIFTSDADFSGITDDHK.L (78)
40	Endopin 2B	gi|38683423	4,85/68,0	MS/MS	5(4)	2(2)	9	194	K.IFTSDADFSGITDDHK.K (102) K.GTSVDGHSLASSNTDFAFSLYK.Q (93)
41	Antithrombin-III precurso	gi|77736341	4,90/67,8	MS/MS	13(6)	6(5)	18	473	K.EQLQDMGLEDLFSPEK.S (129) R.VAESTQVLELPFK.G (110) K.ANSHFATAFYQHLADSK.N (79) K.LGACDNTLK.Q (64) R.EVALNTIIFMGR.V (59)
42	Antithrombin-III precursor	gi|77736341	5,77/67,6	MS/MS	11(4)	7(3)	21	401	K.EQLQDMGLEDLFSPEK.S (136) R.VAESTQVLELPFK.G (107) K.ANSHFATAFYQHLADSK.N (61) R.EVALNTIIFMGR.V (43) K.LGACDNTLK.Q (22)
43	Fibrinogen gamma-B chain-like	gi|426246913	5,78/67,6	MS/MS	15 (8)	5(5)	22	425	R.FGSYCPTTCGIADFLSNYQTSVDKDLR.N (112) K.AIKISYNPDEPSKPSNIESATK.N (98) K.IHLISTQSTIPYVLR.I (85) K.ESGLYFIRPLK.A (68) R.TSTADYASFK.V (63)
44	Fibrinogen gamma-B chain-like	gi|42624691	5,79/67,6	MS/MS	10(6)	5(4)	11	369	K.AIKISYNPDEPSKPSNIESATK.N (81) K.IHLISTQSTIPYVLR.I (87) R.FGSYCPTTCGIADFLSNYQTSVDKDLR.N (76) R.DNCCILDER.F (71) K.ESGLYFIRPLK.A (55)
45	Fibrinogen gamma-B chain-like	gi|426246913	5,80/67,6	MS/MS	12(6)	6(4)	22	421	R.FGSYCPTTCGIADFLSNYQTSVDKDLR.N (100) K.IHLISTQSTIPYVLR.I (90) K.AIKISYNPDEPSKPSNIESATK.N (82) R.TSTADYASFK.V (65) K.VTGENDKYR.L (40)

46	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,81/67,6	MS/MS	2(2)	2(2)	7	139	K.GDKELLIDNEK.V (80) K.QFVSSSTTVNR.G (59)
47	Fibrinogen gamma-B chain-like	gi| 3789962	5,81/67,6	MS/MS	3(3)	2(2)	7	143	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (77) K.QFVSSSTTVNR.G (66)
48	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	5,62/67,0	MS/MS	8(5)	4(3)	10	305	K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (129) K.LVDTFLEDVK.N (75) K.LSISETYDLK.S (71) K.EQPLKVSK.A (30)
49	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	4,46/66,9	MS/MS	14(5)	9(4)	20	558	K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (129) K.LSISETYDLK.S (85) K.LVDTFLEDVK.N (79) R.LGMFDLHYCDK.L (76) R.DFHVDEQTTVK.V (46)
50	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	4,54/66,9	MS/MS	14(4)	7(4)	18	383	K.LSISETYDLK.S (74) K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (69) R.DFHVDEQTTVK.V (66) K.LVDTFLEDVK.N (64) R.LGMFDLHYCDK.L (48)
51	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	4,40/66,8	MS/MS	16(5)	11(4)	20	593	K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (118) K.NLYHSEAFSINFR.D (86) K.LSISETYDLK.S (74) K.LVDTFLEDVK.N (61) R.DFHVDEQTTVK.V (55)
52	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	4,50/66,8	MS/MS	13(7)	9(5)	27	550	K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (115) K.LVDTFLEDVK.N (79) K.NLYHSEAFSINFR.D (69) R.DFHVDEQTTVK.V (63) K.LSISETYDLK.S (62)
53	Alpha-1-antiproteinase precursor	gi|27806941	4,58/66,8	MS/MS	5(1)	2(1)	6	97	K.LSISETYDLK.S (80) K.VLDPNTVFALVNYISFK.G (17)
54	Serum albumin	gi|1351907	6,13/66,7	MS/MS	17(6)	10(5)	27	517	K.LGEYGFQNALIVR.Y (80) R.MPCTEDYLSLILNR.L (79) K.TVMENFVAFVDK.C (71) K.LVNELTEFAK.T (66) K.DAFLGSFLYEYSR.R (58)

55	Serum albumin	gi|1351907	4,61/66,6	MS/MS	11(5)	6(3)	11	362	K.LGEYGFQNALIVR.Y (109) R.MPCTEDYLSLILNR.L (106) K.DAFLGSFLYEYSR.R (75) K.LVNELTEFAK.T (33) K.ATEEQLKTVMENFVAFVDK.C (14)
56	Serum albumin	gi|1351907	6,06/66,0	MS/MS	26 (6)	13 (6)	22	653	R.MPCTEDYLSLILNR.L (104) R.RHPEYAVSVLLR.L (78) K.DAFLGSFLYEYSR.R (75) K.LGEYGFQNALIVR.Y (64) K.LVNELTEFAK.T (61)
57	Serum albumin	gi|1351907	5,70/65,7	MS/MS	27(18)	15(9)	27	971	R.MPCTEDYLSLILNR.L (117) K.LGEYGFQNALIVR.Y (114) K.DAFLGSFLYEYSR.R (82) K.TVMENFVAFVDK.C (75) K.LVNELTEFAK.T (71)
58	Serum albumin	gi|1351907	5,77/64,6	MS/MS	43(23)	19(12)	31	1282	K.LGEYGFQNALIVR.Y (125) R.MPCTEDYLSLILNR.L (106) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (99) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (89) K.DAFLGSFLYEYSR.R (86)
59	Serum albumin	gi|1351907	5,98/64,4	MS/MS	51(20)	19(11)	36	1175	K.VPQVSTPTLVEVSR.S (129) R.MPCTEDYLSLILNR.L (126) K.LGEYGFQNALIVR.Y (99) K.DAFLGSFLYEYSR.R (86) K.KQTALVELLK.H (75)
60	Serum albumin	gi|1351907	6,49/63,6	MS/MS	67(25)	15(10)	32	1104	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S (114) R.MPCTEDYLSLILNR.L (112) R.RHPEYAVSVLLR.L (91) K.DAFLGSFLYEYSR.R (86) K.ATEEQLKTVMENFVAFVDK.C (82)
61	Serum albumin	gi|1351907	6,49/63,6	MS/MS	68(35)	20(10)	36	1232	R.MPCTEDYLSLILNR.L (128) K.LGEYGFQNALIVR.Y (117) R.HPYFYAPELLYYANK.Y (77) K.DAFLGSFLYEYSR.R (73) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (78)
62	Serum albumin	gi|1351907	6,54/63,6	MS/MS	63(34)	18(11)	33	1173	R.MPCTEDYLSLILNR.L (125) K.ATEEQLKTVMENFVAFVDK.C (101) K.DAFLGSFLYEYSR.R (88) R.RHPEYAVSVLLR.L (87) K.TVMENFVAFVDK.C (85)

63	Serum albumin	gi|1351907	6,54/63,6	MS/MS	75 (53)	20 (14)	36	1383	R.MPCTEDYLSLILNR.L (132) K.LGEYGFQNALIVR.Y (111) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (108) K.DAFLGSFLYEYSR.R (91) R.RHPYFYAPELLYYANK.Y (78)
64	Serum albumin	gi|1351907	6,48/61,8	MS/MS	57(30)	19(11)	30	1314	K.QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR.Y (135) R.MPCTEDYLSLILNR.L (113) K.ATEEQLKTVMENFVAFVDK.C (105) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (100) R.RHPEYAVSVLLR.L (96)
65	Serum albumin	gi|1351907	6,48/61,8	MS/MS	62(49)	15(10)	35	1146	R.MPCTEDYLSLILNR.L (116) K.LGEYGFQNALIVR.Y (116) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (113) K.TVMENFVAFVDK.C (85) R.RHPEYAVSVLLR.L (84)
66	Serum albumin	gi|1351907	6,60/61,8	MS/MS	87(58)	18(10)	34	1218	K.LGEYGFQNALIVR.Y (124) R.MPCTEDYLSLILNR.L (109) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (108) R.HPYFYAPELLYYANK.Y (103) K.DAFLGSFLYEYSR.R (91)
67	Serum albumin	gi|1351907	5,18/61,0	MS/MS	53(26)	19(11)	35	1268	K.LGEYGFQNALIVR.Y (118) R.MPCTEDYLSLILNR.L (106) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (102) K.DAFLGSFLYEYSR.S (89) K.TVMENFVAFVDK.C (85)
68	Serum albumin	gi|1351907	5,83/61,0	MS/MS	71(48)	14(11)	26	1106	R.MPCTEDYLSLILNR.L (127) K.LGEYGFQNALIVR.Y (111) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (111) R.HPYFYAPELLYYANK.Y (105) K.DAFLGSFLYEYSR.R (87)
69	Serum albumin	gi|1351907	5,12/61,0	MS/MS	79(56)	19(13)	33	1393	K.LGEYGFQNALIVR.Y (121) R.MPCTEDYLSLILNR.L (113) R.HPYFYAPELLYYANK.Y (98) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (89) R.KVPQVSTPTLVEVSR.S (87)
70	Serum albumin	gi|1351907	5,88/60,7	MS/MS	42(21)	20(9)	35	1169	R.MPCTEDYLSLILNR.L (138) K.LGEYGFQNALIVR.Y (129) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (95) K.DAFLGSFLYEYSR.R (86) K.TVMENFVAFVDK.C (85)

71	Serum albumin	gi|1351907	5,97/60,7	MS/MS	71(31)	19(14)	34	1351	K.LGEYGFQNALIVR.Y (125) R.MPCTEDYLSLILNR.L (113) K.VPQVSTPTLVEVSR.S (93) R.RHPEYAVSVLLR.L (92) K.DAFLGSFLYEYS.R (86)
72	Serum albumin	gi|1351907	5,92/60,6	MS/MS	42(17)	20(8)	36	1107	K.LGEYGFQNALIVR.Y (125) R.MPCTEDYLSLILNR.L (116) K.DAFLGSFLYEYSR.R (86) K.YICDNQDTISSK.L (73) K.ECCHGDLLECADDR.A (72)
73	Serum albumin	gi|1351907	5,75/60,4	MS/MS	29(18)	14(9)	28	969	K.LGEYGFQNALIVR.Y (129) K.DAFLGSFLYEYSR.R (87) R.RHPEYAVSVLLR.L (84) K.YICDNQDTISSK.L (83) K.TVMENFVAFVDK.C (75)
74	Serum albumin	gi|1351907	5,75/60,4	MS/MS	19(11)	8(5)	22	479	K.LGEYGFQNALIVR.Y (114) R.MPCTEDYLSLILNR.L (81) K.TVMENFVAFVDK.C (67) K.YICDNQDTISSK.L (59) K.QTALVELLK.H (39)
75	Serum albumin	gi|1351907	5,75/60,4	MS/MS	29(11)	15(5)	26	852	R.MPCTEDYLSLILNR.L (127) K.LGEYGFQNALIVR.Y (110) K.DAFLGSFLYEYSR.R (89) K.TVMENFVAFVDK.C (73) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (62)
77	Serum albumin	gi|1351907	5,75/60,4	MS/MS	21(14)	11(7)	29	729	K.LGEYGFQNALIVR.Y (125) R.MPCTEDYLSLILNR.L (116) K.DAFLGSFLYEYSR.R (97) K.TVMENFVAFVDK.C (80) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (72)
78	Serum albumin	gi|1351907	5,75/60,4	MS/MS	18(11)	10(5)	27	644	K.LGEYGFQNALIVR.Y (120) R.MPCTEDYLSLILNR.L (113) K.TVMENFVAFVDK.C (91) K.LVNELTEFAK.T (70) K.DAFLGSFLYEYSR.R (68)
79	Serum albumin	gi|1351907	6,60/59,9	MS/MS	37(18)	18(7)	29	1027	R.MPCTEDYLSLILNR.L (130) K.LGEYGFQNALIVR.Y (129) K.DAFLGSFLYEYSR.R (87) K.LKECCDKPLLEK.S (72) K.TVMENFVAFVDK.C (69)

80	Serotransferrin	gi|440895298	5,33/59,8	MS/MS	11(3)	8(3)	16	337	K.FDEFFSAGCAPGSPR.N (87) K.NYELLCGDNTR.K (61) R.TAGWNIPMGLLYSK.I (58) K.ELPDPQESIQR.A (56) R.SAGWNIPMGR.L (27)
81	Fibrinogen beta chain	gi|357	6,49/59,8	MS/MS	9 (5)	7 (3)	18	369	R.TSSSTFQYITLLK.N (97) K.QGFGNIATNAEGK.K (89) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (81) K.LLIEMEDWK.G (30) K.VTALYEGFTVQNEANK.Y (21)
82	Fibrinogen beta chain	gi|357	6,55/59,8	MS/MS	7(3)	6(3)	3	370	K.LLIEMEDWK.G (18) K.QGFGNIATNAEGK.K (107) K.TSSSTFQYITLLK.K (83) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (110) K.YCGVPGEYWLGNDR.I (40)
83	Fibrinogen beta chain precursor	gi|218931172	4,91/59,6	MS/MS	14(11)	11(9)	26	714	R.TSSSTFQYITLLK.N (91) K.EDGGGWWYNR.C (83) K.QGFGNIATNAEGK.K (72) R.QNQVQDNENVVNEYSSHLEK.H (72) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (67)
84	Fibrinogen gama-B chain	gi|426246913	5,83/59,5	MS/MS	6 (4)	4 (3)	12	285	R.FGSYCPTTCGIADFLSNYQTSVDKDLR.N (100) K.IHLISTQSTIPYVLR.I (70) R.TSTADYASFK.V (65) K.ESGLYFIRPLK.A (51)
85	Fibrinogen beta chain	gi|357	5,83/59,5	MS/MS	16(10)	12(8)	31	880	R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (132) R.TSSSTFQYITLLK.N (102) K.QGFGNIATNAEGK.K (99) K.HQLYIDETVK.N (79) R.YYWGGAYTWDMAK.H (76)
86	Fibrinogen beta chain	gi|357	5,38/59,4	MS/MS	14 (10)	9 (5)	28	497	R.TSSSTFQYITLLK.N (99) K.EDGGGWWYNR.C (86) K.HQLYIDETVK.N (66) R.YYWGGAYTWDMAK.H (62) K.GGWTVIQNR.Q (47)
87	albumin	gi|229552	5,88/59,1	MS/MS	8 (3)	5 (2)	10	295	LCVLHEK (38) TVMENFVAFVDK (36) DAFLGSFLYEYSR (69) KVPQVSTPTLVEVSR (35) MPCTEDYLSLILNR (116)

88	Fibrinogen beta chain	gi|357	5,88/59,1	MS/MS	11(6)	9(5)	22	447	R.TSSSTFQYITLLK.N (93) K.HQLYIDETVK.N (66) K.LLIEMEDWK.G (64) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (62) K.QGFGNIATNAEGK.K (42)
89	Fibrinogen beta chain precursor	gi|218931172	5,42/59,0	MS/MS	14(7)	10(5)	25	556	R.TSSSTFQYITLLK.N (93) K.YCGVPGEYWLGNDR.I (83) K.EDGGGWWYNR.C (66) K.GGWTVIQNR.Q (50) K.ECEEIIR.N (42)
90	Fibrinogen beta chain precursor	gi|218931172	5,96/59,0	MS/MS	27(15)	18(10)	39	1086	R.QNQVQDNENVVNEYSSHLEK.H (100) K.QGFGNIATNAEGK.K (99) R.TSSSTFQYITLLK.N (96) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (92) K.EDGGGWWYNR.C (83)
91	Fibrinogen beta chain	gi|357	5,6/58,6	MS/MS	11(8)	7(5)	19	459	R.TSSSTFQYITLLK.N (96) R.YYWGGAYTWDMAK.H (76) K.EDGGGWWYNR.C (72) K.LLIEMEDWK.G (66) K.VTALYEGFTVQNEANK.Y (49)
92	Fibrinogen beta chain precursor	gi|218931172	5,52/58,5	MS/MS	16(9)	12(7)	30	770	K.QGFGNIATNAEGK.K (99) K.EDGGGWWYNR.C (86) R.TSSSTFQYITLLK.N (86) K.LLIEMEDWK.G (58) K.ECEEIIR.N (51)
93	Fibrinogen beta chain precursor	gi|218931172	4,97/57,7	MS/MS	14(9)	9(5)	22	527	R.TSSSTFQYITLLK.N (99) R.KPPDADGCLHADPDLGVLCPTGCK.L (98) R.YYWGGAYTWDMAK.H (72) K.EDGGGWWYNR.C (68) K.LLIEMEDWK.G (62)
94	Fibrinogen gamma-B chain	gi|426246913	5,09/57,4	MS/MS	12 (6)	7 (5)	21	485	R.FGSYCPTTCGIADFLSNYQTSVDKDLR.N (98) K.IHLISTQSTIPYVLR.I (93) K.AIKISYNPDEPSKPSNIESATK.N (78) R.DNCCILDER.F (66) R.TSTADYASFK.V (61)
95	Fibrinogen alpha chain, partia	gi|440901372	5,09/57,4	MS/MS	12(7)	8(4)	23	461	K.GLIDEVDQDFTSR.I (96) R.KVIEQVQHINLLQK.N (83) K.QLEQVIAINLLPSR.D (79) R.MKGLIDEVDQDFTSR.I (73) K.NVRDQLVDMK.R (39)

96	Fibrinogen beta chain	gi|1346006	5,09/57,4	MS/MS	16(9)	11(8)	31	768	K.QGFGNIATNAEGK.K (99) K.VTALYEGFTVQNEANK.Y (98) R.YYWGGAYTWDMAK.H (88) K.YCGVPGEYWLGNDR.I (80) R.TSSSTFQYITLLK.N (77)
97	Fibrinogen beta chain	gi|357	5,24/57,3	MS/MS	12(10)	9(8)	26	711	K.VTALYEGFTVQNEANK.Y (109) R.TPCTVTCNIPVVSGK.E (106) K.QGFGNIATNAEGK.K (104) R.TSSSTFQYITLLK.N (96) K.EDGGGWWYNR.C (80)
98	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,16/57,2	MS/MS	1(1)	1(1)	4	125	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (125)
100	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,94/44,4	MS/MS	1(1)	1(1)	4	103	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (103)
101	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,63/43,9	MS/MS	1(1)	1(1)	6	110	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (110)
102	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,80/43,8	MS/MS	2(1)	1(1)	4	111	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (111)
103	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,62/43,1	MS/MS	1(1)	1(1)	4	81	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (81)
104	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,94/42,9	MS/MS	2(1)	2(1)	6	151	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (113) K.QFVSSSTTVNR.G (38)
105	Serum albumin	gi|1351907	5,79/42,7	MS/MS	10(6)	4(3)	8	278	K.LGEYGFQNALIVR.Y (93) K.DAFLGSFLYEYSR.R (90) K.TVMENFVAFVDK.C (59) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (36)
106	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	6,13/42,6	MS/MS	6(3)	4(2)	12	242	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (83) K.QFVSSSTTVNR.G (70) R.EEGSVSSGTK.Q (47) K.GDKELLIDNEK.V (43)
107	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	6,33/41,8	MS/MS	1(1)	1(1)	4	115	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (115)
108	Serum albumin	gi|1351907	6,33/41,8	MS/MS	13(11)	6(6)	27	507	K.LGEYGFQNALIVR.Y (125) K.DAFLGSFLYEYSR.R (92) K.LFTFHADICTLPDTEK.Q (68) K.TVMENFVAFVDK.C (63) R.RHPEYAVSVLLR.L (62)
109	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,46/41,0	MS/MS	1(1)	1(1)	2	60	K.GDKELLIDNEK.V (60)
111	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,45/38,2	MS/MS	3(1)	1(1)	4	111	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (111)
112	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,61/38,1	MS/MS	3(1)	1(1)	4	104	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (104)

113	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,81/36,6	MS/MS	1(1)	1(1)	4	76	R.GDSVSQGTGLAPGSPR.K (76)
114	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,81/35,9	MS/MS	2(1)	1(1)	2	61	R.EEGSVSSGTK.Q (61)
115	Apolipoprotein A-I precursor	gi|162678	5,60/35,7	MS/MS	19(11)	9(6)	39	609	K.LLDNWDTLASTLSK.V (122) R.LEALKEGGGSLAEYHAK.A (94) R.EQLGPVTQEFWDNLEKETASLR.Q (90) R.DYVAQFEASALGK.Q (77) K.VSILAAIDEASKK.L (77)
116	Apolipoprotein A-I precursor	gi|245563	5,62/35,7	MS/MS	17(6)	11(4)	22	616	K.LLDNWDTLASTLSK.V (122) R.EQLGPVTQEFWDNLEK.E (99) K.VREQLGPVTQEFWDNLEK.E (82) K.VSILAAIDEASK.K (72) R.QQLAPYSDDLR.Q (51)
117	Apolipoprotein A-I, apoA-1	gi | 245563	5,63/35,7	MS/MS	36 (27)	15 (12)	30	1141	K.LLDNWDTLASTLSK.V (118) K.EGGGSLAEYHAK.A (107) R.DYVAQFEASALGK.Q (83) K.VSILAAIDEASK.K (74) R.QQLAPYSDDLR.Q (72)
118	Apolipoprotein A-I, apoA-1	gi|245563	6,09/29,0	MS/MS	28(12)	14(8)	50	870	K.LLDNWDTLASTLSK.V (122) R.EQLGPVTQEFWDNLEK.E (99) R.DYVAQFEASALGK.Q (77) K.VSILAAIDEASK.K (73) K.EGGGSLAEYHAK.A (69)
119	Apolipoprotein A-I precursor	gi|162678	6,30/28,7	MS/MS	2(1)	2(1)	11	95	K.LLDNWDTLASTLSK.V (100) R.EQLGPVTQEFWDNLEK.E (80) K.VSILAAIDEASK.K (70) R.DYVAQFEASALGK.Q (62) K.EGGGSLAEYHAK.A (58)
120	Fibrinogen alpha chain, partial	gi|440901372	5,27/27,6	MS/MS	11(4)	8(3)	8	409	K.QLEQVIAINLLPSR.D (111) K.GLIDEVDQDFTSR.I (100) R.KVIEQVQHINLLQK.N (63) R.DIQYLPLIK.M (28) K.VDLEDYK.N (28)
122	Fibrinogen alpha chain, partial	gi|440901372	5,28/27,1	MS/MS	26(15)	10(7)	12	725	K.QLEQVIAINLLPSR.D (114) K.VIEQVQHINLLQK.N (106) K.GLIDEVDQDFTSR.I (100) R.KVIEQVQHINLLQK.N (75) K.ETGWPFCSDEDWNTK.C (62)
124	Fibrinogen A-alpha chain	gi|3789962	5,95/22,6	MS/MS	1(1)	1(1)	2	72	K.GDKELLIDNEK.V (72)
125	Retinol-binding protein 4	gi|132403	5,49/22,1	MS/MS	3(1)	2(1)	11	72	R.DPSGFSPEVQK.I (58) K.YWGVASFLQK.G (14)

126	Ig lambda-1 chain C regions, partial	gi|440901185	5,69/21,9	MS/MS	3(2)	1(1)	14	84	K.YAASSYLSLTSTDWK.S (84)
129	Transthyretin precursor	gi|57526651	5,965/14, 6	MS/MS	10(4)	3(3)	25	258	R.HYTIAALLSPYSYSTTALVSSPK.E(96) K.AADETWEPFASGK.T (69)