

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÕES PROTEICAS PARA
ESTUDO PROTEÔMICO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA
UMBILICAL HUMANA

JULYANE NATSUMI SAITO KAIHARA

ORIENTADORA PROF^a. DR^a. VALÉRIA CRISTINA SANDRIM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Botucatu – SP

2023

JULYANE NATSUMI SAITO KAIHARA

**PADRONIZAÇÃO DE EXTRAÇÕES PROTEICAS PARA ESTUDO PROTEÔMICO
DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Campus de
Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria Cristina
Sandrim

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Lucilene Delazari
dos Santos

Botucatu – SP

2023

K13p

Kaihara, Julyane Natsumi Saito

Padronização de extrações proteicas para estudo proteômico de células endoteliais de veia umbilical humana / Julyane Natsumi Saito
Kaihara. -- Botucatu, 2023

49 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Valéria Cristina Sandrim

Coorientadora: Lucilene Delazari dos Santos

1. Gravidez. 2. Células. 3. Extração proteica. 4. Proteínas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Para todos que fizeram parte da minha
trajetória acadêmica: amigos, professores e
família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Suely e Ivam, e irmãos, Matheus e Leandro, pilares do meu crescimento e fonte de toda minha força. Obrigada pelo amor incondicional, incentivo à dedicação aos estudos, encorajamento nas horas difíceis e pelos puxões de orelha também. Sem vocês, nada disso seria possível.

Às minhas batians e ditian, Morie, Marika e Ryoichi, pelo apoio total, mesmo sem entenderem exatamente o que significam os “termos difíceis” que a neta comenta sobre o estágio. Aos parentes e familiares.

À minha orientadora, professora Valéria, pela oportunidade de desenvolver o projeto de pesquisa, por seus ensinamentos e por toda confiança e paciência depositadas a mim. Sou grata por cada conselho e admiro muito seu trabalho.

À professora Lucilene, pelos conhecimentos compartilhados e pelo empenho em explicar cada etapa, em detalhes, da preparação das amostras e extração até a espectrometria de massas.

A todos do *Sandrim's Lab*, em especial Priscila, Caroline, Gabriela, Thainá, Mariana e prof. João Leandro, pela troca de experiências e colaboração nos resumos, pôsteres, apresentações orais e experimentos. É uma alegria ver o esforço de cada um de vocês no trabalho que realizam.

Ao pessoal do IBTEC, Eloísa, Filipe, Tauane, Camila e Bruno, que facilitaram muito o aprendizado das técnicas e o manejo das amostras. Obrigada pelas risadas durante as pequenas pausas para o cafezinho.

Às amigas e parceiras, Aline, Ariane e Beatrice, pelas horas na biblioteca, pelas gargalhadas e pelos conselhos valiosos, mesmo a alguns quilômetros de distância. Nossos caminhos se cruzaram e se separaram por motivos distintos, mas vocês continuam juntas no meu coração.

Às companheiras de sempre, Carolina e Geovana, por ouvirem minhas aflições e reclamações prontamente dispostas a me ampararem. Agradeço por esses vários anos de amizade.

Aos demais professores, alunos e funcionários do departamento de Farmacologia e do IBTEC, pela disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

À Alexandra Elbakyan, grande responsável por derrubar barreiras e democratizar o acesso ao conhecimento científico. A ciência é de e para todos.

Aos meus professores da graduação, pelos esforços investidos à arte da docência e da pesquisa, apesar das adversidades.

Ao IBB, à UNESP e a todos os funcionários dessa grande instituição, em especial aos funcionários da Seção de Graduação e da Biblioteca, pela atenção aos alunos e pelo empenho incansável em criar um ambiente confortável e acolhedor.

A todos envolvidos, direta ou indiretamente, na minha longa jornada e que contribuíram para a concretização deste trabalho.

The more science belongs to all of us, the less likely it is to be misused. These values undermine the appeals of fanaticism and ignorance, and, after all, the universe is mostly dark, dotted by islands of light.

– *Neil deGrasse Tyson, em Cosmos: A Spacetime Odyssey*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura esquemática da metodologia adotada para a extração proteica das HUVECs com vórtex e sonicação.....	25
Figura 2. Figura esquemática da metodologia adotada para a repetição da extração proteica das HUVECs com apenas vórtex.....	26
Figura 3. Curva-padrão obtida para a quantificação de proteínas de Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs pelo método de Bradford, tendo BSA como proteína padrão.....	30
Figura 4. Curva-padrão obtida para a quantificação de proteínas de A', B' e C' pelo método de Bradford, tendo BSA como proteína padrão.	31
Figura 5. Perfil eletroforético de amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs em gel de poliacrilamida 12% [m/v] corado com 0,025% [m/v] Coomassie R-250. Gel 1.....	32
Figura 6. Perfil eletroforético de amostras A', B' e C' aplicadas com volumes de 20 e 10 µL em gel de poliacrilamida 12% [m/v] corado com 0,025% [m/v] Coomassie R-250. Gel 2.	34
Figura 7. Cromatograma de íons extraído das amostras Bv e Cv pelo LC-MS/MS.	35
Figura 8. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com suas funções moleculares.	37
Figura 9. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com seus processos fisiológicos.	38
Figura 10. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com os componentes celulares.	38
Figura 11. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com suas classes proteicas.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tampões salinos utilizados para extração proteica de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs).	20
Tabela 2. Composição dos tampões de extração proteica de células endoteliais de via umbilical humana.	24
Tabela 3. Composição dos géis de poliacrilamida: de resolução 12% [m/v] e de empilhamento 6% [m/v].	27
Tabela 4. Concentrações de proteínas totais em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e massa de proteínas totais em μg das amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs, e o rendimento de cada amostra em relação às amostras sem sonicação (apenas com vórtex).	31
Tabela 5. Concentrações de proteínas totais em cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e massa de proteínas totais em μg das amostras A', B' e C'.	32
Tabela 6. Proteínas significativas identificadas na amostra Bv a partir de análise por LC-MS/MS.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

A'	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com 500 μ L do tampão A + vórtex
A'10	A' aplicada com 10 μ L no gel
A'20	A' aplicada com 20 μ L no gel
AmBic	Bicarbonato de Amnio
Ang II	Angiotensina II
APOH	Apolipoproteína H
As	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão A + sonicação
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
Av	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão A + vórtex
B'	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com 500 μ L do tampão B + vórtex
B'10	B' aplicada com 10 μ L no gel
B'20	B' aplicada com 20 μ L no gel
B23	<i>Nucleophosmin</i> (Nucleofosmina)
Bs	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão B + sonicação
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Bovina Sérica)
Bv	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão B + vórtex
C'	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com 500 μ L do tampão C + vórtex
C'10	C' aplicada com 10 μ L no gel
C'20	C' aplicada com 20 μ L no gel
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propanesulfonate Hydrate</i>
Cs	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão C + sonicação
Cv	Amostra de proteínas de HUVECs extraídas com tampão C + vórtex
DDA	<i>Data-Dependent Acquisition</i> (Aquisição Dependente de Dados)
DENV	Vírus da Dengue
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (cido Desoxirribonucleico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (cido Etilenodiamino Tetra-Acético)
eIF4A	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A</i> (Fator de Iniciação de Tradução Eucaritica 4A)
eIF4H	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4H</i> (Fator de Iniciação de Tradução Eucaritica 4H)

eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Endotelial)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina 1
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
H1	Proteína histona do tipo H1
H2A	Proteína histona do tipo H2A
H2B	Proteína histona do tipo H2B
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets</i> (Hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa contagem de plaquetas)
HMEC-1	<i>Human Microvascular Endothelial Cell Line</i> (Linhagem de Células Microvasculares Endoteliais Humanas)
HMG-17	<i>Non-histone chromosomal protein HMG-17</i> (Proteína cromossomal não-histona HMG-17)
HMGN2	<i>Non-histone chromosomal protein HMG-17</i> (Proteína cromossomal não-histona HMG-17)
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteína de Choque Térmico)
HSP27	<i>Heat shock 27 kDa protein</i> (Proteína de Choque Térmico de 27 kDa)
HSPB1	<i>Heat shock 27 kDa protein</i> (Proteína de Choque Térmico de 27 kDa)
Huh 7	Linhagem Celular de Hepatoma Humano
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (Células Endoteliais de Veia Umbilical Humana)
IAA	Iodoacetamida
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de Adesão Intercelular-1)
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-18	Interleucina 18 ou Fator Indutor de Interferon-Gama
IMC	Índice de Massa Corpórea
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> (Fator Inibidor da Migração de Macrófagos)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico Mensageiro)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)

NADPH-d	<i>Dicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Diaphorase</i> (Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Diaforase)
NEB	Nebulina
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and Pyrin domain-containing protein 3</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
NPM1	<i>Nucleophosmin</i> (Nucleofosmina)
PA	Pressão Arterial
P.A.	Persulfato de Amônio
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i> (Inibidor do Ativador do Plasminogênio tipo 1)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PE	Pré-eclâmpsia
PGI ₂	Prostaciclina
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Placentário)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil)
PPIases	Peptidil-prolil cis-trans isomerases
R ²	Coefficiente de Determinação
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i> (Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
ROCK1	<i>Rho Associated Protein Kinase 1</i> (Proteína Quinase 1 Associada a Rho)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Dodecil Sulfato de Sódio–Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
sEng	<i>Soluble Endoglin</i> (Endoglina Solúvel)
SFB	Soro Fetal Bovino
sFlt-1	<i>Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1</i> (Tirosina Quinase-1 Solúvel do Tipo Fms)
–SH	Grupo tiol
SNPs	<i>Single Nucleotide Polimorphism</i> (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i> (Ativador do Plasminogênio Tecidual)

Tris-HCl	<i>Tris hydrochloride</i> (Tris Hidrocloroeto)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Fator</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
Vim ^{-/-}	Genótipo dos camundongos homozigóticos <i>knockout</i> para o gene da vimentina
Vim ^{+/+}	Genótipo dos camundongos homozigóticos selvagens
vWF	<i>von Willebrand Factor</i> (Fator de von Willebrand)

LISTA DE SÍMBOLOS

% [m/v]	Percentual massa/volume
% [v/v]	Percentual volume/volume
[]	Concentração
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
Å	Angström
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
h	Hora
kDa	Quilodalton
kHz	Quilohertz
M	Molar
m/z	Razão Massa-Carga
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
ms	Milissegundo
NaCl	Cloreto de sódio
(NH ₄)HCO ₃	Bicarbonato de Sódio
nL/min	Nanolitro por minuto
nm	Nanômetro
ppm	Parte por milhão
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Força Centrífuga Relativa)
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
µg	Micrograma

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Micrograma por microlitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Importância do estudo da pré-eclâmpsia	17
1.2 Definição de PE e características clínicas	17
1.3 Fisiopatologia da PE.....	18
1.4 O endotélio vascular: disfunção endotelial e PE	18
1.5 Proteômica e cultura celular	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Preparação dos tampões de extração proteica	24
3.2 Cultura celular e extração proteica	24
3.3 Quantificação de proteínas	26
3.4 Eletroforese unidimensional	26
3.5 Digestão enzimática em solução	28
3.6 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massa (LC – MS/MS).....	28
3.7 Análise bioinformática e análises estatísticas	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Análise quantitativa e qualitativa do extrato proteico	30
4.2 Identificação quantitativa das proteínas	34
4.3 Identificação funcional das proteínas	37
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença específica da gestação humana e uma das principais responsáveis pela morbimortalidade materna e perinatal. Sabe-se que a fisiopatologia da PE está relacionada à invasão trofoblástica incompleta nas artérias espiraladas seguida de hipoperfusão e isquemia placentárias. Como consequência, o organismo da gestante desenvolve um estado de estresse oxidativo com disfunção endotelial generalizada. Esta disfunção do endotélio é um fenótipo comum na PE e é definida pelo desequilíbrio entre produção endotelial dos agentes vasodilatadores e dos vasoconstritores, redução do fluxo sanguíneo para os órgãos, ativação plaquetária e inflamação vascular. A proteômica é uma ciência que descreve o conjunto de proteínas de células, tecidos, órgãos ou organismos, de modo a possibilitar um estudo aprofundado das patologias humanas, incluindo suas bases moleculares, fisiopatologia, prognóstico e biomarcadores para diagnóstico e tratamento, como demonstrado por estudos anteriores. Entretanto, um obstáculo para a extração adequada de proteínas das células para proteômica é a escolha de um tampão e de um método mecânico apropriados para extrair determinadas proteínas da célula e eliminar moléculas indesejadas, mas que não inative e degrade proteínas lábeis por calor ou oxidação. Nesse sentido, evidencia-se a importância da proteômica no estudo de uma síndrome complexa como a PE. Para isso, analisamos o conteúdo proteico das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) por meio de quantificação, eletroforese e espectrometria de massas, testando diferentes métodos químicos e físicos de extração. Os dados alcançados indicaram que o tampão contendo o detergente não-iônico n-octyl- β -D-glucopyranoside associado ao processo de homogeneização por vórtex extraiu uma maior quantidade e diversidade de proteínas das HUVECs. A espectrometria de massas evidenciou que essas proteínas eram, principalmente, proteínas de ligação, estruturais ou com atividade catalítica, associadas a atividades fisiológicas. Os resultados obtidos por essa padronização permitiram identificar o conteúdo proteico das HUVECs. Ademais, os resultados poderão contribuir para pesquisas futuras relacionadas à descoberta de potenciais novos alvos farmacológicos e novos fármacos capazes de reduzir a disfunção endotelial em pacientes diagnosticadas com PE, além de auxiliar novas análises proteômicas aperfeiçoadas do extrato proteico proveniente de HUVECs.

Palavras-chave: Célula endotelial. Extração proteica. Gravidez. Proteômica.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a disease specific to human pregnancy and a major cause to maternal and perinatal morbidity and mortality. It is known that the pathophysiology of PE is related to incomplete trophoblastic invasion into the spiral arteries followed by placental hypoperfusion and ischemia. Consequently, the pregnant woman's organism develops a state of oxidative stress and generalized endothelial dysfunction. This endothelial dysfunction is a typical phenotype in PE and is defined by the imbalance between endothelial production of vasodilator and vasoconstrictor agents, reduced blood flow to the organs, platelet activation, and vascular inflammation. Proteomics is a science that describes the set of proteins from cells, tissues, organs, or organisms to enable an in-depth study of human pathologies, including their molecular basis, pathophysiology, prognosis, and biomarkers for diagnosis and treatment, as demonstrated by previous studies. However, an obstacle to the proper extraction of proteins from cells is the choice of an appropriate buffer and mechanical methods to extract certain proteins from the cell and eliminate unwanted molecules, but without inactivation and degradation of labile proteins by heat or oxidation. In this sense, the importance of proteomic study in a complex syndrome such as PE becomes evident. To this end, we analyzed the protein content of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by quantification, electrophoresis, and mass spectrometry, testing different chemical and physical extraction methods. The achieved data indicated that the buffer with non-ionic detergent n-octyl- β -D-glucopyranoside associated with the vortex homogenization process extracted a greater amount and diversity of proteins from HUVECs. Mass spectrometry revealed that these proteins were mainly binding proteins, structural proteins or with catalytic activity, associated with physiological activities. The results obtained by this standardization allowed the identification of the protein content of HUVECs. Furthermore, the results may contribute to future research related to the discovery of potential new pharmacological targets and new drugs capable of reducing endothelial dysfunction in patients diagnosed with PE, as well as aiding further improved proteomic analyses of the protein extract from HUVECs.

Keywords: Endothelial cell. Pregnancy. Protein extraction. Proteomics.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do estudo da pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença relacionada à complicação de 2% a 8% das gestações (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2020), com aumento de efeitos potencialmente adversos como desenvolvimento de maior risco de doenças cardiovasculares, renais e metabólicas para a gestante (GAROVIC; HAYMAN, 2007; HERMES et al., 2013; SMITH; PELL; WALSH, 2001), e nascimento prematuro do neonato e com baixo peso (GOLDENBERG et al., 2008). Ou seja, a PE leva a um aumento da morbidade grave, como edema pulmonar e acidente vascular cerebral, e mortalidade materna e perinatal (PERAÇOLI et al., 2019). Dados indicam que doenças hipertensivas, incluindo a PE, estão entre as principais causas diretas de mortalidade materna em países em desenvolvimento como o Brasil (KHAN et al., 2006; LAURENTI; JORGE; GOTLIEB, 2004; SAY et al., 2014).

1.2 Definição de PE e características clínicas

Caracterizada por hipertensão arterial com pressão arterial (PA) ≥ 140 e/ou 90 mmHg em gestante previamente normotensa associada a quadro de proteinúria significativa manifestados a partir da 20^a semana de gestação (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2020), o diagnóstico de PE também engloba hipertensão arterial associada a disfunção de órgãos-alvo – como insuficiência renal, disfunção hepática, manifestações neurológicas, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2020; BROWN et al., 2018; PHIPPS et al., 2019) – na ausência de proteinúria, pois a PE é uma síndrome específica da gravidez e apresenta perfil multifatorial e multissistêmico (AMARAL et al., 2017). Diversos fatores de risco como hipertensão crônica, diabetes gestacional, obesidade (índice de massa corpórea – IMC > 30), nuliparidade, histórico familiar de PE, entre outros, têm sido associados ao desenvolvimento da doença (BARTSCH et al., 2016; MARCHI et al., 2015). Além disso, se não tratada, pode evoluir para quadros graves como insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, eclâmpsia e síndrome HELLP (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2020; PERAÇOLI et al., 2019). Atualmente, a realização do parto, com a liberação do feto e da

placenta, é a forma efetiva de resolver e impedir a progressão da PE (LISONKOVA; JOSEPH, 2013).

1.3 Fisiopatologia da PE

Detalhes da fisiopatologia da doença ainda não foram completamente elucidados (PHIPPS et al., 2016). Porém, sabe-se que sua progressão está relacionada à placentação anormal resultante da falha das células trofoblásticas em invadirem adequadamente as artérias espiraladas (PHIPPS et al., 2016; ROBERTS; GAMMILL, 2005; SIRCAR; THADHANI; KARUMANCHI, 2015), resultando em hipoperfusão e isquemia placentárias (PHIPPS et al., 2016). Assim, há o desenvolvimento da chamada síndrome materna com maior liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do inglês *Reactive Oxygen Species*), além de desbalanço dos fatores angiogênicos circulantes como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e PlGF (fator de crescimento placentário) em relação aos fatores antiangiogênicos como sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase-1*) e sEng (endoglin solúvel) (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2020; LEVINE et al., 2006; REDMAN; STAFF, 2015; TOMIMATSU et al., 2019). Em consequência, há instauração de disfunção endotelial materna generalizada com redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (GUERBY et al., 2021; MAYNARD et al., 2003; POSSOMATO-VIEIRA; KHALIL, 2016), estresse oxidativo pela perfusão intermitente (PHIPPS et al., 2016), reação inflamatória local, e outros distúrbios sistêmicos (TOMIMATSU et al., 2019).

1.4 O endotélio vascular: disfunção endotelial e PE

O endotélio saudável é responsável pelo controle do tônus vascular, adesão celular, agregação plaquetária, fibrinólise, coagulação, proliferação de células musculares lisas e inflamação da parede do vaso (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007). Essa atividade do endotélio se dá pela sua produção de fatores vasodilatadores como NO e prostaciclina (PGI₂); fatores vasoconstritores como endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang II), tromboxano A₂ (TXA₂), e espécies reativas de oxigênio (EROs); fatores pró-trombóticos como inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fator de von Willebrand (vWF); e fatores anticoagulantes como ativador do plasminogênio tecidual (tPA) (AMARAL et al., 2017;

DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; INCALZA et al., 2018; LAMARCA; CORNELIUS; WALLACE, 2013). Portanto, a disfunção endotelial resulta do desequilíbrio entre a produção endotelial dos agentes vasodilatadores e vasoconstritores, promovendo fenótipo pró-aterogênico e pró-trombótico à vasculatura. Assim, disfunção endotelial é caracterizada por vasoconstrição – decorrente de prejuízo no relaxamento muscular dependente de endotélio – e por redução do fluxo sanguíneo para os órgãos, além de ativação plaquetária, inflamação vascular e trombose (AMARAL et al., 2017; INCALZA et al., 2018). A disfunção endotelial tem sido um fenótipo comum na PE (AMARAL et al., 2017), sendo o endotélio fenestrado, que possui poros (fenestras) por onde passam rapidamente grandes volumes de água e pequenos solutos e está presente em órgãos como rins e pâncreas, particularmente afetado. Em função de disfunção endotelial persistente, ocorre a endoteliose glomerular característica da PE, uma lesão renal em que as células endoteliais glomerulares sofrem edema e perdem suas fenestrações (STILLMAN; KARUMANCHI, 2007; TANNETTA; SARGENT, 2013), de forma a aumentar a permeabilidade vascular, aumentar a passagem de proteínas para o filtrado glomerular e, por isso, decorrer em proteinúria.

1.5 Proteômica e cultura celular

A proteômica é uma ciência que descreve e estuda o proteoma, o qual é definido como o conjunto de proteínas em uma célula, tecido, órgão ou organismo e corresponde ao complemento proteico do genoma (LIEBLER, 2002; MISHRA, 2010). As ferramentas proteômicas são amplamente aplicadas no estudo de patologias humanas. Permitem a compreensão das vias bioquímicas e interações proteína-proteína, além de classificação das doenças com base molecular, de modo a fornecer conhecimento aprofundado da fisiopatologia e do prognóstico dos distúrbios e, finalmente, proporcionando uma busca sistemática de alvos (biomarcadores) diagnósticos e terapêuticos (SANCHEZ; CORTHALS; HOCHSTRASSER, 2004). Assim, pesquisas acerca de síndromes complexas como a PE utilizando abordagem baseada em proteômica possibilitam analisar uma perspectiva abrangente dos mecanismos da doença. A proteômica é uma importante ferramenta de pesquisa capaz de gerar novas hipóteses e abrir caminho para novas descobertas. O método da proteômica faz uso de técnicas para separação de proteínas em bandas no gel de eletroforese, e de técnicas analíticas avançadas, como a espectrometria de massa, combinadas com a bioinformática, eficazes na identificação proteica em larga escala e com alta sensibilidade (CRAVATT; SIMON; YATES III, 2007; LI; WANG; CHEN, 2017). Ainda, a cultura de células possui a vantagem de ter menor

variabilidade biológica em comparação com outros tipos de modelos experimentais, por serem cultivados em condições controláveis; geralmente, exige menos despesas financeiras e envolve menos demandas éticas (KASPER; CHARWAT; LAVRENTIEVA, 2018).

A análise proteômica de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), por exemplo, já possibilitou a descoberta de que a isquemia não aumentou e nem reduziu a via canônica de macroautofagia dependente de Beclin 1/LC3-II nessas células (via relacionada à sobrevivências de enxertos de pele), diferente do que trabalhos anteriores haviam demonstrado (MA et al., 2022). Mais um estudo fez análise proteômica de HUVECs e, para mimetizar quadro diabético, as incubou com albumina sérica humana glicada, permitindo a identificação de proteínas diferencialmente reguladas (como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), vWF, PAI-1 e caveolina-1) envolvidas em processos associados a disfunção endotelial e tendo o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) como um possível mediador da disfunção endotelial (BANARJEE et al., 2018). Outro estudo proteômico também em HUVECs identificou pequenas moléculas moduladoras da autofagia, bem como seu uso potencial como agentes terapêuticos anticancerígenos por sua capacidade de reduzir os níveis de proteínas do citoesqueleto e de proteínas envolvidas no tráfego de membrana, moléculas importantes para a fusão autofagossomo-lisossomo (ZHANG et al., 2019). Outro grupo de pesquisa realizou uma análise integrada abrangente do transcriptoma e da proteômica de HUVECs, o que permitiu o reconhecimento de diversos genes específicos do tipo celular, levou à identificação de quase 6.500 proteínas incluindo novas proteínas e muitas modificações pós-traducionais (MADUGUNDU et al., 2019). Detalhes da metodologia da extração proteica desses quatro estudos estão detalhados na tabela 1.

Tabela 1. Tampões salinos utilizados para extração proteica de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs).

Autores	Tipo de tampão de extração proteica
(MA et al., 2022)	Ureia 8 M + coquetel de inibidor de protease 1%
(BANARJEE et al., 2018)	RapiGest® SF a 0,2% [m/v] em bicarbonato de amônio 50 mM + coquetel de inibidor de protease
(ZHANG et al., 2019)	Tampão de lise: Tris-HCl (pH 6.8), 2% [m/v] SDS, glicerol, PMSF, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol + coquetel de inibidor de protease
(MADUGUNDU et al., 2019)	Tampão de lise: Tris (pH 7.6), 4% [m/v] SDS

Existem muitos obstáculos para a extração adequada de proteínas das células. Em níveis fisiológicos, a quantidade de proteínas intracelulares expressas representa apenas < 0,001% do total de proteínas da célula, o que dificulta a sua extração e recuperação sem proteólise ou perda da atividade enzimática. Ademais, os extratos celulares contêm grandes quantidades de ácido nucleico, material ribossômico, lipídios, carboidratos, debris celulares e pequenas moléculas que podem dar aspecto viscoso indesejado ao extrato. Os métodos para a desintegração celular e para essa extração proteica vão desde digestão enzimática e choque osmótico até ultrasonicação e ruptura por pressão. Porém, métodos mecânicos podem inativar e degradar proteínas lábeis por excesso de calor ou oxidação, enquanto tratamentos mais delicados podem não ser o suficiente para liberar determinadas proteínas da célula. No caso do método de lise celular utilizando tampões utilizado nesse estudo, considerou-se um tampão de lise especificamente projetado para extrair as proteínas de interesse e remover moléculas indesejadas para a análise, particularmente com uso de desnaturantes e detergentes para extração e solubilização de proteínas. A composição e o volume do tampão são importantes para uma extração eficaz, mas também podem afetar as etapas subsequentes de purificação e a estabilidade das proteínas. Critérios como pH, força iônica, escolha de desnaturantes e detergentes, aditivos para evitar a degradação e melhorar a estabilidade ou prevenir proteólise e a proporção de tampão em relação às células são essenciais para a produção de um tampão eficiente (GRABSKI, 2009; PEACH et al., 2015). Estudos anteriores utilizaram diferentes métodos para extração (BANARJEE et al., 2018; LI et al., 2021; MA et al., 2022; MADUGUNDU et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

A combinação de ureia, tioureia e CHAPS (*3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propanesulfonate Hydrate*) como tampão de extração já é utilizado em diversos estudos para a solubilização proteica (LAU; OTHMAN, 2019; WU et al., 2009; ZHENG et al., 2022). Ureia e tioureia juntas são eficazes em desfazer ligações de hidrogênio, auxiliando no desdobramento e desnaturação das proteínas, além de reduzirem as interações hidrofóbicas entre proteínas. A tioureia aumenta a solubilidade de proteínas de membrana (RABILLOUD, 1998) e CHAPS é um detergente de estrutura semelhante aos sais biliares, eficaz em desagregar complexos proteicos sem afetar as estruturas secundárias e terciárias, em reduzir as interações proteicas e em extrair proteínas de membrana (RODI et al., 2014). O detergente não-iônico n-octyl- β -D-glucopyranoside foi indicado como qualificado em fornecer maiores rendimentos de proteínas extraídas, permitindo um maior número de proteínas identificadas com proteínas de membrana e transmembrana entre elas (SHEVCHENKO et al., 2012). Também há tampões sem a adição

de detergentes, compostos por solução tampão (como Tris-HCl) e sais (como NaCl e MgCl₂), os quais, em solução, formam cargas que interagem com as proteínas, reduzindo assim a interação das moléculas proteicas entre si.

Portanto, considerando a complexidade de uma síndrome como a PE e suas repercussões a longo prazo para a gestante e para o neonato, torna-se apropriado explorar o proteoma de HUVECs, um tipo celular biodisponível para estudos relacionados à PE. Buscando obter uma análise aperfeiçoada das proteínas provenientes da HUVEC para contribuir com avanços na compreensão dos processos da PE e para descoberta de novos alvos farmacológicos, foi testada a hipótese de que os tampões são eficazes para o isolamento de uma ampla gama de proteínas, tanto em massa de proteínas quanto em variabilidade proteica, de modo a possibilitar uma investigação adequada do proteoma celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar 3 diferentes tampões de extração proteica e analisar qual deles apresenta capacidade de manter uma maior diversidade de proteínas em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs).

2.2 Objetivos específicos

A) Determinar o rendimento proteico das extrações química e física ao quantificar, pelo método de Bradford, proteínas extraídas das HUVECs;

B) Avaliar a variabilidade proteica (diversidade de bandas) de cada procedimento por meio de eletroforese unidimensional;

C) Identificar as proteínas por meio das análises de espectrometria de massa associadas com análises de dados por ferramentas de bioinformática proteômica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação dos tampões de extração proteica

As células foram submetidas a três processos de lises celulares distintas. Em cada um dos três grupos, foi adicionado um tampão salino diferente para desagregação e solubilização das proteínas totais. Os tampões de extração proteica utilizados denominados A, B e C foram adequadamente preparados de acordo com a composição e quantidade de sais e detergente demonstrada na tabela 2, sendo o inibidor de protease adicionado imediatamente antes da extração. Os tampões foram mantidos em baixa temperatura até o momento da utilização.

Tabela 2. Composição dos tampões de extração proteica de células endoteliais de via umbilical humana.

Tampão	Composição
A	Ureia 8 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2% [m/v], Coquetel de Inibidores de Proteases Roche Pi
B	Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, n-octyl- β -D-glucopyranoside 1% [m/v], Coquetel de Inibidores de Proteases Roche Pi
C	Ureia 8 M, Tris-HCl 25 mM pH 8.2, NaCl 75 mM, MgCl ₂ 2 mM, Coquetel de Inibidores de Proteases Roche Pi

Na preparação dos tampões de extração proteica, o tampão B apresentou uma maior dificuldade de solubilização, de modo que o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi removido da composição inicialmente planejada e a composição foi alterada para Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, n-octyl- β -D-glucopyranoside 1% [m/v], Coquetel de Inibidores de Proteases Roche Pi.

3.2 Cultura celular e extração proteica

Para o estudo, foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), linhagem CRL 2873, da ATCC (American Type Cell Culture – ATCC, Manassas, Virginia, USA). As HUVECs foram mantidas em estufa a 37°C em 5% CO₂, em meio suplementado com 10% [v/v] soro fetal bovino (SFB), 50 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,5 μ g/mL de anfotericina B, e cultivadas até atingirem confluência de 80-90%. A seguir, o meio de cultura foi removido, as células aderidas à parede da garrafa de cultivo foram removidas com

uso de tripsina e foram lavadas com PBS para remoção de traços de SFB e tripsina. O material foi centrifugado a 1500 rpm (Centrífuga 80-2B, CentriBio/CentriLab) por 10 min em temperatura ambiente; o sobrenadante descartado e foi adicionado 3 mL de meio de cultivo completo ao pellet formado. Uma alíquota de 10 μ L de meio com células + 10 μ L de 0,4% de solução Trypan Blue foi utilizada para a contagem automática das células pelo Invitrogen Countess Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific Inc., cat. #AMQAX1000), que indicou um total de $2,3 \times 10^6$ células nos 3 mL de meio. Assim, o conteúdo foi dividido igualmente em três alíquotas, ou seja, 1 mL ou cerca de 766 666,667 células colocadas em tubos Falcon identificados com A, B e C. Novamente, o material foi centrifugado (Centrífuga 80-2B, CentriBio/CentriLab), o sobrenadante descartado e o pellet foi ressuspensão em 500 μ L do tampão correspondente ao tubo. O conteúdo foi bem homogeneizado para desfazer o pellet. As amostras foram mantidas em gelo até a realização das próximas etapas. 250 μ L de cada amostra foram separados para serem submetidos a um processo adicional de sonicação no equipamento Sonics Vibra-Cell VCX-600 Ultrasonic Processor, com 5 pulsos de 1 min (25 kHz de potência/20% amplitude) e intervalos de 1 min entre cada pulso, mantendo as amostras em gelo durante todo o processo a fim de evitar aumento excessivo de temperatura. Essas amostras foram identificadas, respectivamente, por As, Bs e Cs. Os 250 μ L restantes foram submetidos apenas a 1 min de vórtex e identificados por Av, Bv e Cv. A figura 1 demonstra esquematicamente essas etapas descritas para a extração proteica.

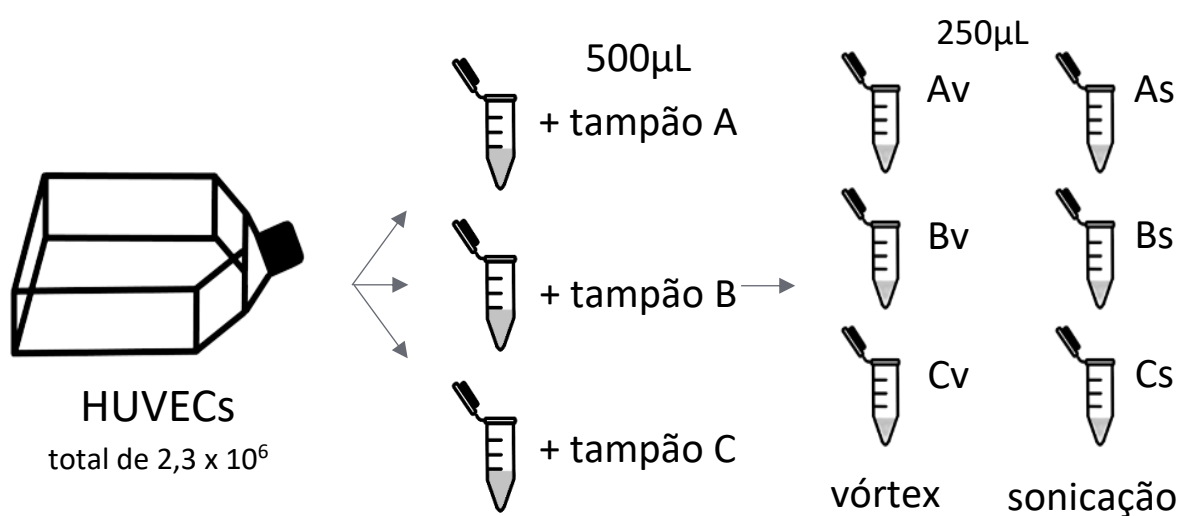


Figura 1. Figura esquemática da metodologia adotada para a extração proteica das HUVECs com vórtex e sonicação.

Buscando aprimorar e aumentar a quantidade de proteínas extraídas por cada tampão, uma repetição da cultura de células foi feita, com obtenção de 3×10^6 células também divididas em 3 tubos e que foram submetidas às etapas anteriormente citadas, exceto pela sonicação. Ou seja, essas células foram ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ do respectivo tampão e submetidas apenas a 1 min de vórtex, identificadas por A', B' e C', como ilustrado pela figura 2. Ao final desse processo de extração mecânica, todas as amostras foram levadas para centrifugação a 14.000 rcf (5415 R Refrigerated Centrifuge, Eppendorf AG, Germany), por 20 min em temperatura ambiente e os sobrenadantes foram coletados em microtubos plásticos novos.

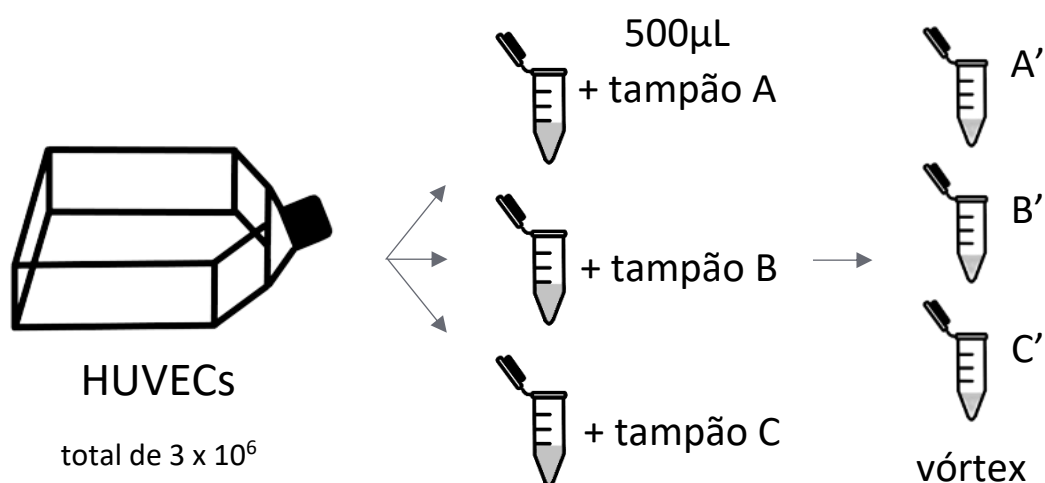


Figura 2. Figura esquemática da metodologia adotada para a repetição da extração proteica das HUVECs com apenas vórtex.

3.3 Quantificação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas em solução foi feita com o kit comercial BioRad® Protein Assay (cod. 500-0001), seguindo as instruções do fabricante. O método de quantificação é por Bradford com BSA (proteína albumina bovina sérica) como proteína padrão e a leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro a 595 nm.

3.4 Eletroforese unidimensional

Análises eletroforéticas em condições redutoras e desnaturantes (SDS-PAGE) foram realizadas, a fim de observar a qualidade/viabilidade dos extratos proteicos. Este procedimento

foi realizado de acordo com a literatura (LAEMMLI, 1970), em que foram preparadas as soluções dos géis de resolução 12% e de empilhamento 6% para a produção do gel de eletroforese (tabela 3). As amostras foram liofilizadas (Concentrator plus/Vacufuge, Eppendorf AG, Germany) durante 60 min em temperatura ambiente. Após, foram solubilizadas em 15 μ L de tampão de amostra (2x Laemmli Sample Buffer, BioRad, cod. 1610737) e levadas para denaturação em termobloco (Banho Seco K80-01, Kasvi) a 70°C por 5 min. A cuba foi preparada com 200 mL do tampão de corrida 5x concentrado (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% [m/v] de SDS) diluído em 800 mL de água Milli-Q (obtem tampão de corrida 1x concentrado). Em seguida, houve a aplicação de 2 μ L do padrão de amostra (LMW Calibration Kit, cód. 17-0446-01), de 10 μ L das amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs nos poços do primeiro gel e 20 μ L de cada amostra A', B' e C' (identificados por A'20, B'20 e C'20) e 10 μ L (A'10, B'10 e C'10) nos poços do segundo gel. Os eletrodos foram conectados para dar início à corrida, separando as proteínas de acordo com o peso molecular de cada. Após o fim da corrida, as proteínas foram fixadas ao gel por incubação com solução de etanol e ácido acético (solução fixing: 40% etanol e 5% ácido acético), seguida por coloração do gel com "Coomassie Brilliant Blue" R-250 à 0,025% (0,025g Coomassie R-250, 50% etanol e 5% ácido acético). O gel foi lavado e incubado sucessivamente com solução de etanol e ácido acético (solução destain: 30% etanol e 10% ácido acético) e, depois, incubado com solução de ácido acético (solução *preserving*: 7% ácido acético). Por fim, o gel foi escaneado e analisado.

Tabela 3. Composição dos géis de poliacrilamida: de resolução 12% [m/v] e de empilhamento 6% [m/v].

Componente	Gel de resolução 12% [m/v]	Gel de empilhamento 6% [m/v]
Água Milli-Q	1,6 mL	2,6 mL
Acrylamide mix	2,0 mL	1,0 mL
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 mL	1,3 mL
10% [m/v] SDS	50 μ L	50 μ L
10% [v/v] P.A.	50 μ L	50 μ L
TEMED	2 μ L	4 μ L

3.5 Digestão enzimática em solução

Inicialmente, 50 µg de proteínas totais de cada amostra foram diluídas em 60 µL de AmBic ((NH₄)HCO₃) 50 mM. Em seguida, 25 µL do surfactant Padrão RapiGest SF 0,2% (Waters, cat. #186001861) foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas a 37°C por 60 min (Banho Seco K80-01, Kasvi). As amostras foram submetidas às etapas de redução e alquilação, respectivamente utilizando 2,5 µL de ditioneitol (DTT, Sigma, BioRad, cat. #161-0611) 100 mM e 2,5 µL de iodoacetamida (IAA, Sigma, cat. #161125-25G) 300 mM protegido da luz. A digestão enzimática em solução foi realizada por meio da enzima tripsina a 0,1 µg/µL (Promega, cat. #V55111 – 20 µg) na concentração 1:50 (enzima:amostra) solubilizada em tampão AmBic 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 h e foi interrompida com a adição de 10µL de ácido trifluoroacético 5% [v/v] (TFA, Sigma, cat. #302031). As amostras foram incubadas por 90 min em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugadas a 14.000 rcf (5415 R Refrigerated Centrifuge, Eppendorf AG, Germany) por 30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido para um tubo novo. Os digestos tripticos contidos em cada amostra foram submetidos às colunas de dessalinização Sep-Pak® C18 Cartridge (Waters, cat. #50818603), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massa (LC – MS/MS)

A digestão enzimática hidolisou as proteínas em fragmentos menores e estes foram quantificados utilizando o Qubit® Protein and Protein Broad Range Assay kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific Inc., cat. #Q33211) com leitura realizada pelo Fluorímetro Qubit® 2.0 (ThermoFisher Scientific Inc., cat. #Q32866).

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado a um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B) ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 µm x 5 mm (ThermoFisher Scientific Inc., cod. 164649), e dessalinizados em gradiente isocrático de 4%B por 3 min a um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, 105 mm (PICOCHIP, cod. 1PCH7515-105H354-NV), utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% a 90%B por 1 min, mantido a 90%B por 5 min e reequilibrado a 4%B por 20 min a

um fluxo de 300 nL/min.

A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA (aquisição dependente de dados). Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 a m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 e 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10 s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

3.7 Análise bioinformática e análises estatísticas

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato .RAW foram submetidos ao software RawVegetable do PatternLab [versão 4.0.0.84] para a obtenção da identificação das proteínas (CARVALHO et al., 2016). Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (Taxonomy Homo sapiens); enzima tripsina: permissão de 2 clivagens perdidas: modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas: modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina: erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (False Discovery Rate) máxima considerada foi de $\leq 1\%$.

As proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento por meio da classificação de Ontologia Genética (Gene Ontology – GO) tais como “função molecular”, “processo biológico” e “componente celular” utilizando a ferramenta de bioinformática Panther DB (<http://www.pantherdb.org/> – 17.0).

4. RESULTADOS

4.1 Análise quantitativa e qualitativa do extrato proteico

A quantificação por Bradford das amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs resultou na curva-padrão apresentada na figura 3 e representa os quatro pontos de calibração com 1, 2, 4 e 6 μg de BSA e suas respectivas absorvâncias. A curva resultante aproxima-se de uma distribuição linear de acordo com a equação da reta obtida $y = 0,1155x + 0,0466$ e coeficiente de determinação ou $R^2 = 0,9925$. As quantificações de proteínas totais das amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs foram estimadas através da curva-padrão e estão indicadas na tabela 4, em concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e massa (μg). A amostra As foi a que apresentou maior concentração de proteínas totais em comparação com todas as outras amostras, enquanto Bv apresentou a menor concentração. Isso significa que o tampão A complementado com sonicação extraiu uma maior massa de proteínas, e o tampão B combinado com vórtex extraiu a menor massa de proteínas. A tabela 4 também mostra o rendimento das amostras extraídas que incluem sonicação comparando com as amostras sem sonicação. Esses resultados indicam que, numericamente, as extrações com sonicação extraíram maior quantidade de proteínas com os tampões A e B com 195,61% e 186,91% de rendimento, respectivamente. Já com o tampão C, a sonicação prejudicou a extração, podendo indicar perdas de volume durante o processamento da amostra ou degradação de proteínas pelo excesso de calor que a sonicação gera.

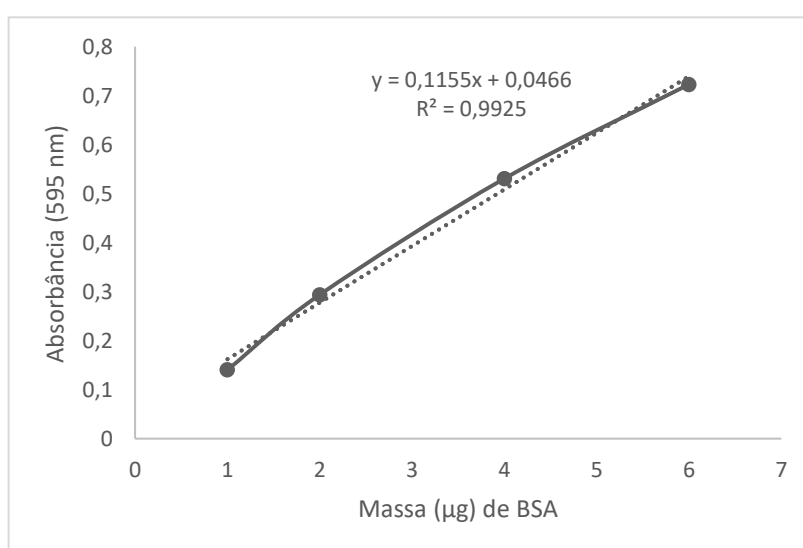


Figura 3. Curva-padrão obtida para a quantificação de proteínas de Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs pelo método de Bradford, tendo BSA como proteína padrão.

Tabela 4. Concentrações de proteínas totais em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e massa de proteínas totais em μg das amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs, e o rendimento de cada amostra em relação às amostras sem sonicação (apenas com vórtex).

Amostra	[] em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Massa em μg	Rendimento em %
Av	0,60	149,42	100,00
As	1,11	277,49	195,61
Bv	0,43	107,22	100,00
Bs	0,75	186,94	186,91
Cv	1,04	260,56	100,00
Cs	0,96	238,89	91,17

As amostras A', B' e C' também foram submetidas a quantificação por Bradford. A curva-padrão obtida está apresentada na figura 4 e representa os quatro pontos de calibração com 1, 2, 4 e 6 μg de BSA e suas respectivas absorbâncias. A curva resultante aproxima-se de uma distribuição linear de acordo com a equação da reta obtida $y = 0,1049x + 0,0631$ e coeficiente de determinação ou $R^2 = 0,9912$. As quantificações de proteínas totais das amostras A', B' e C' foram estimadas através da curva-padrão e estão indicadas na tabela 5, em concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e massa (μg). O tampão B foi o que apresentou maior extração de proteínas.

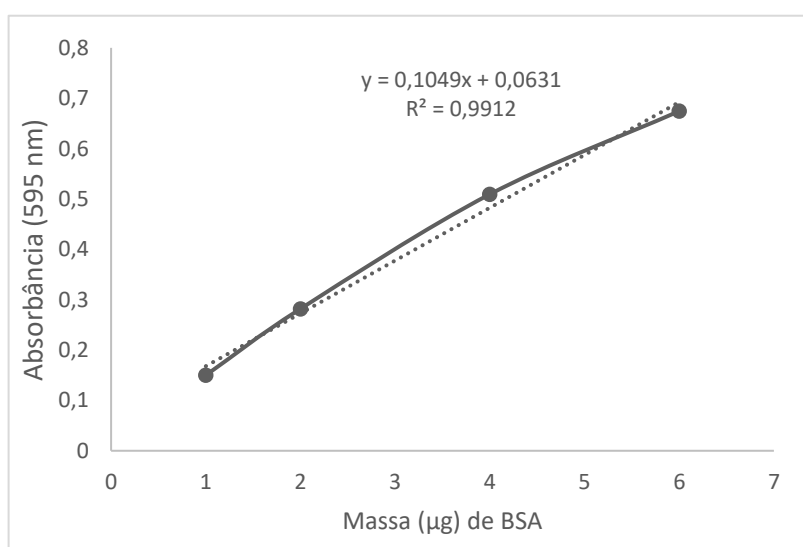


Figura 4. Curva-padrão obtida para a quantificação de proteínas de A', B' e C' pelo método de Bradford, tendo BSA como proteína padrão.

Tabela 5. Concentrações de proteínas totais em cada amostra em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e massa de proteínas totais em μg das amostras A', B' e C'.

Amostra	[] em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Massa em μg
A'	1,40	699,63
B'	2,00	1002,30
C'	1,32	661,50

Para a eletroforese (SDS-PAGE), foram aliqüotados volumes de cada amostra que continham 20 μg de proteínas, sendo eles: 33,80 μL da amostra Av, 17,28 μL de As, 49,36 μL de Bv, 26,41 μL de Bs, 18,48 μL de Cv e 20,27 μL de Cs. Após a liofilização e adição de tampão de amostra, 20 μL das soluções de solução amostra + tampão de corrida foram aplicadas em cada poço do gel, e o padrão de amostra aplicado no primeiro poço. O resultado está apresentado na figura 5 (gel 1). As setas destacam algumas bandas das amostras submetidas a vórtex.

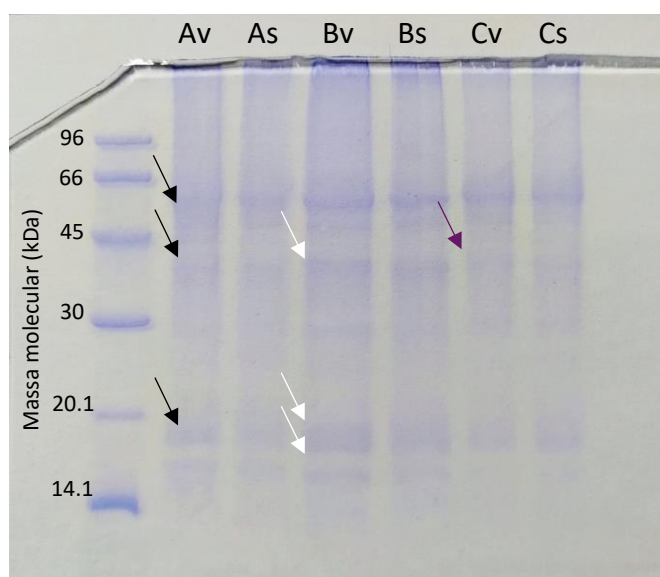


Figura 5. Perfil eletroforético de amostras Av, As, Bv, Bs, Cv e Cs em gel de poliacrilamida 12% [m/v] corado com 0,025% [m/v] Coomassie R-250. Gel 1.

Comparando as amostras sem (v) e com sonicação (s), percebe-se que as amostras com sonicação foram menos eficazes em extrair uma diversidade de proteínas, pois há menor quantidade de bandas observadas e menor intensidade de bandas, o que indica menor

quantidade de proteína daquela faixa de massa molecular extraída. Já comparando as amostras A, B e C submetidas a vórtex (Av, Bv e Cv), o tampão B apresenta maior diversidade de bandas e bandas mais intensas, com destaque para proteínas de menor massa molecular. Os três tampões foram capazes de extrair proteínas na faixa entre 66 e 45 kDa, mas B apresenta maior intensidade, assim como na faixa entre 20,1 e 14,1 kDa. Além disso, analisando os resultados da eletroforese e da quantificação, é possível entender que, apesar de extrair uma massa maior com os tampões A e B, a sonicação não é capaz de manter uma diversidade e variedade de proteínas. Assim, as próximas etapas não incluíram as amostras com sonicação, que, até aqui, demonstraram que esse método não é eficaz para a análise desejada. Por fim, a presença de uma grande variedade de bandas proteicas, tanto de alto quanto de baixo pesos moleculares, indica uma boa qualidade durante o processo de extração proteica. A pouca definição das bandas pode indicar características da própria amostra e/ou baixa massa de proteína aplicada no gel, ou mesmo tempo além do necessário de incubação com a solução destain (descorante).

Desse modo, foi feita eletroforese das amostras A', B' e C' que foram obtidas a partir de uma maior quantidade de células e em cada poço foram aplicados volumes de 20 e 10 µL de solução de amostra + tampão de corrida. Para isso, foram aliqüotados volumes de cada amostra que continham 60 µg de proteínas, sendo eles: 42,88 µL de A', 29,93 µL de B' e 45,35 µL de C'. Após a liofilização, foram adicionados 30 µL de tampão de corrida, permitindo o uso de 20 e 10 µL para aplicação no gel de eletroforese (gel 2) e, respectivamente, os poços foram denominados A'20, B'20, C'20 e A'10, B'10 e C'10. O resultado está apresentado na figura 6. As setas destacam algumas bandas mais intensas das amostras aplicadas com 20 µL.

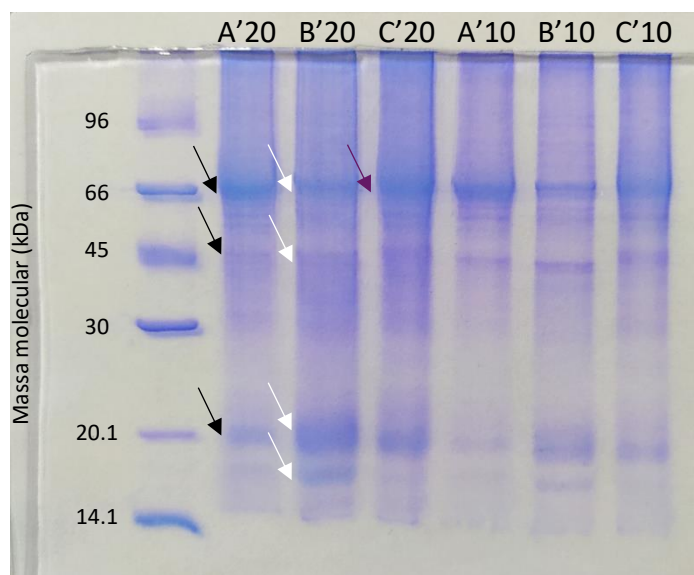


Figura 6. Perfil eletroforético de amostras A', B' e C' aplicadas com volumes de 20 e 10 μL em gel de poliacrilamida 12% [m/v] corado com 0,025% [m/v] Coomassie R-250. Gel 2.

Como esperado, os poços que receberam 20 μL das amostras apresentaram maior intensidade das bandas. O perfil das bandas foi semelhante ao perfil obtido pela primeira eletroforese realizada, com a amostra B apresentando maior intensidade e diversidade e com destaque para as faixas entre 66 e 45 kDa e entre 20,1 e 14,1 kDa.

4.2 Identificação quantitativa das proteínas

A quantificação dos fragmentos proteicos hidrolisados pelo fluorímetro indicou que a amostra Av apresentou uma quantidade que extrapolou o máximo da capacidade do equipamento, mesmo após diluições. A amostra Bv apresentou 0,191 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de fragmentos de proteínas, enquanto Cv apresentou 0,33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Com isso, apenas as amostras Bv e Cv seguiram para o espectrômetro de massas. O cromatograma de íons extraído obtido dessa análise está apresentado na figura 7, em que as linhas vermelhas indicam o espectro da amostra Bv e as azuis, o espectro da amostra Cv. É possível identificar que a massa intacta dos íons foi detectada, mas a massa fragmentada resultante da ionização dos peptídeos não foi. Ou seja, os dados parciais indicam que o equipamento não foi capaz de realizar o sequenciamento adequado dos peptídeos para posterior identificação da proteína correspondente, o que prejudica a comparação com as bases de dados.

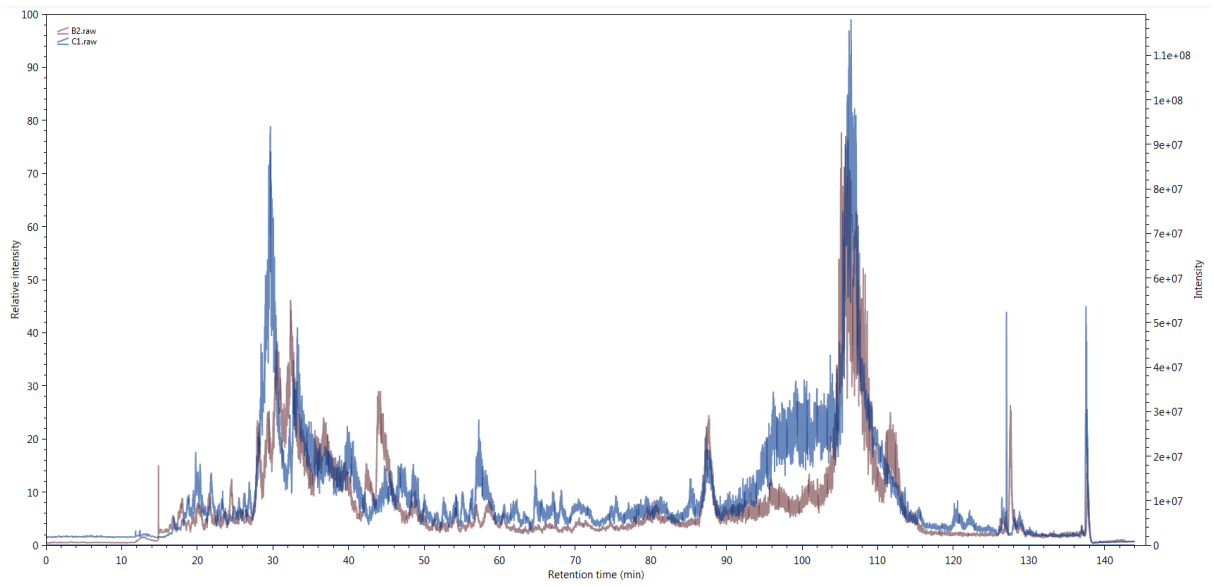


Figura 7. Cromatograma de íons extraído das amostras Bv e Cv pelo LC-MS/MS.

A tabela 6 mostra as proteínas identificadas na amostra Bv. A proteína mais abundante foi a BSA (albumina bovina sérica) e está indicada como contaminação da amostra. Isso indica que a BSA utilizada na cultura das células não foi removida completamente.

Tabela 6. Proteínas significativas identificadas na amostra Bv a partir de análise por LC-MS/MS.

Protein	Locus	Length	Unique peptides	MolWt	Sequence Count	Spectrum Count	NSAF	Coverage	Protein Score
Albumin bovine serum	contaminant_INT-STD1	607	5	69207,4	7	13	0,102033	0,1137	58,5439
Vimentin	P08670	466	3	53601,1	4	7	0,071565	0,0880	27,4688
Histone H2B type 1-K	O60814	126	0	13863,6	3	5	0,189054	0,2143	17,9006
Metallothionein-2	P02795	61	1	6019,2	2	3	0,234303	0,4918	15,9275
Histone H2B type 1-H	Q93079	126	0	13865,5	3	4	0,151243	0,2143	13,2452
POTE ankyrin domain family member E	Q6S8J3	1075	0	121267,7	3	3	0,013295	0,0195	11,3073
Histone H2A	A0A0U1RRH7	170	0	18523,4	2	2	0,056049	0,0529	6,6364
Heat shock 27 kDa protein	A0A6Q8PGK1	215	0	23671,8	1	1	0,022159	0,0791	6,0423
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	165	1	17982,9	1	1	0,028874	0,0667	5,4267
Non-histone chromosomal protein HMG-17	P05204	90	1	9369	1	1	0,052935	0,1667	5,3729
Nucleophosmin	A0A7I2YQC0	323	0	35673,3	1	1	0,014750	0,1146	4,6323
Macrophage migration inhibitory factor	P14174	115	1	12450,2	1	1	0,041428	0,0957	4,3178
Eukaryotic translation initiation factor 4H	Q15056	248	0	27350,4	1	1	0,019210	0,1290	3,5836
Protein Shroom3	Q8TF72	1996	0	216706,3	1	1	0,002387	0,0045	2,6663
Nebulin	P20929	6669	0	772410,3	1	1	0,000714	0,0009	2,6146

4.3 Identificação funcional das proteínas

As proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento funcional por meio da classificação de Ontologia Genética e os resultados estão apresentados abaixo (figuras 8-11). A figura 8 indica a porcentagem de proteínas identificadas por LC-MS/MS em relação às funções moleculares em que atuam; 66,7% das proteínas apresentam função de ligação, por exemplo, cromatina-cromatina ou actina-actina, 16,7% apresentam atividade catalítica como de carboxilase, e 16,7% possuem atividade de molécula estrutural como a vimentina, que compõe o citoesqueleto. A figura 9 destaca as porcentagens dos grupos de proteínas de acordo com seus processos fisiológicos. 45,5% estão associadas a processos celulares, 18,2%, a processos de desenvolvimento, outros 18,2%, a processos de organismo multicelular, 9,1%, a localização e os outros 9,1%, a locomoção. A figura 10 mostra as porcentagens dos grupos de proteínas de acordo com os componentes celulares. 85,7% são entidades anatômicas celulares e os 14,3% restantes são de complexo contendo proteína. Por fim, a figura 11 indica as porcentagens de classes proteicas relacionadas às proteínas identificadas, em que 30% são da classe de ligação de cromatina-cromatina ou de proteínas regulatórias, outros 30% são proteínas do citoesqueleto, 10 são de proteínas chaperonas, 10% são proteínas de defesa/imunidade, 10% de enzimas de interconversão de metabólitos, e os outros 10% são de proteínas translacionais.

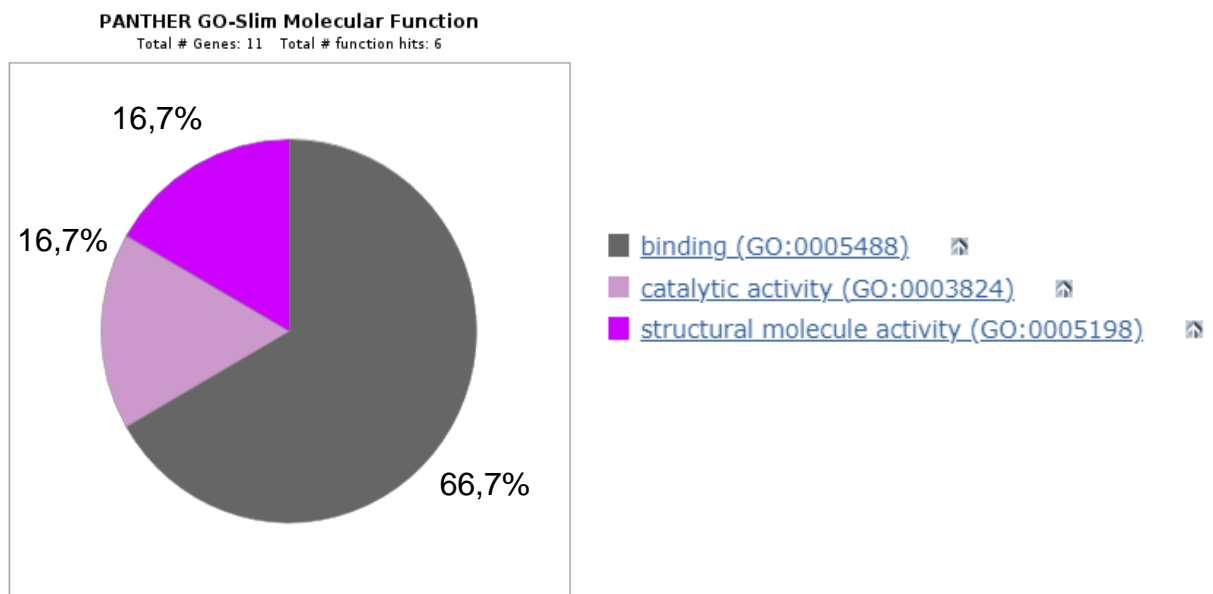


Figura 8. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com suas funções moleculares.

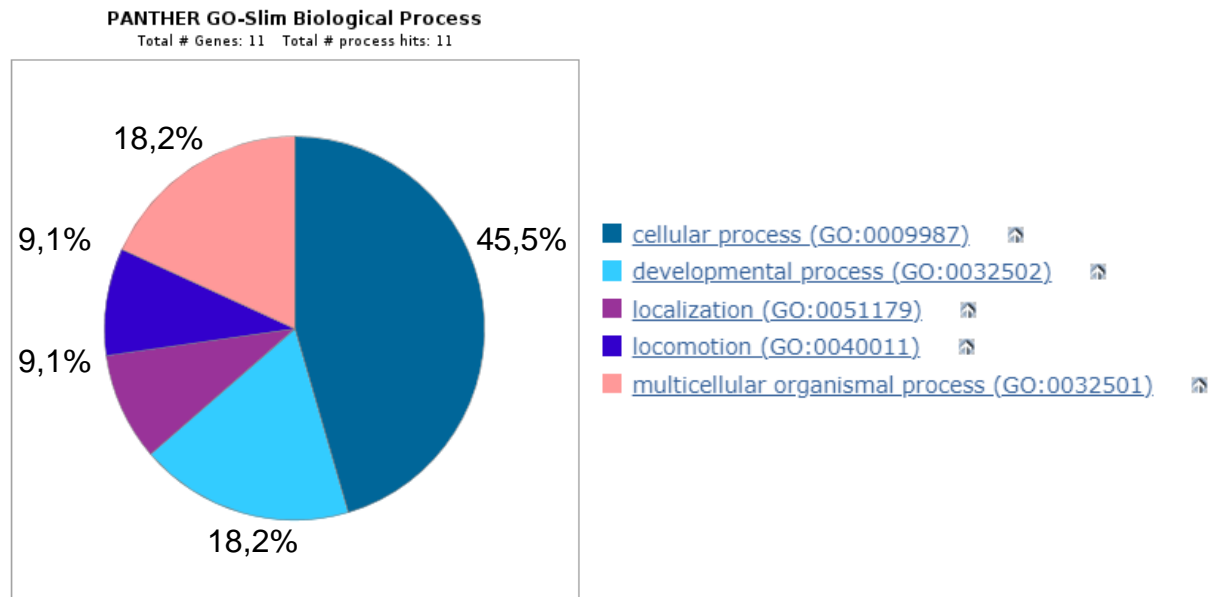


Figura 9. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com seus processos fisiológicos.

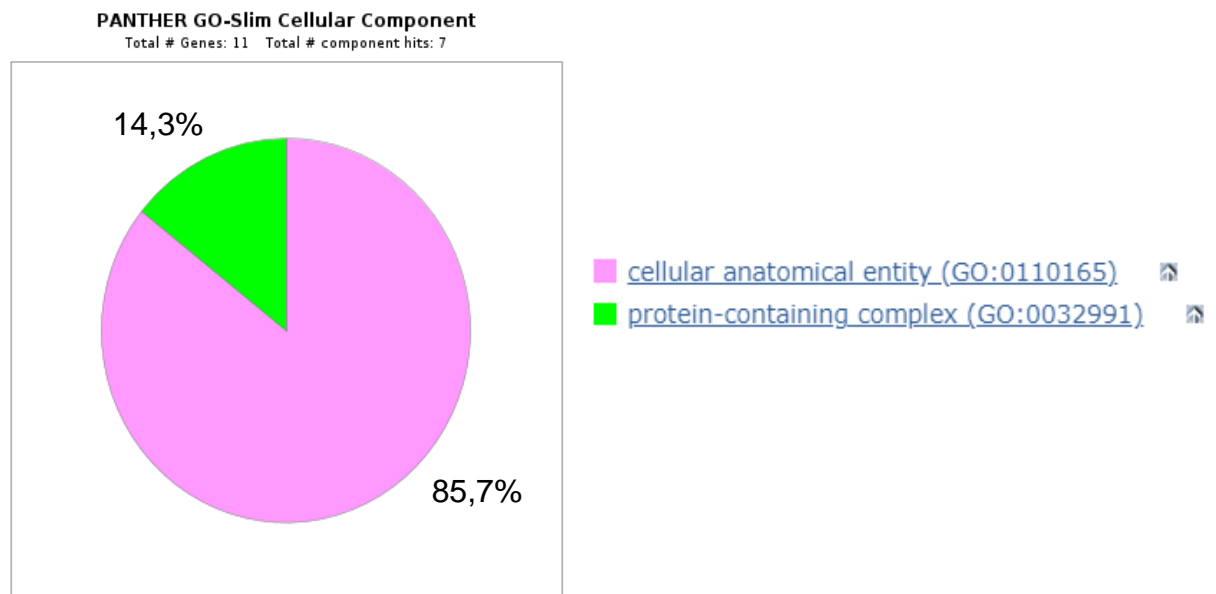


Figura 10. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com os componentes celulares.

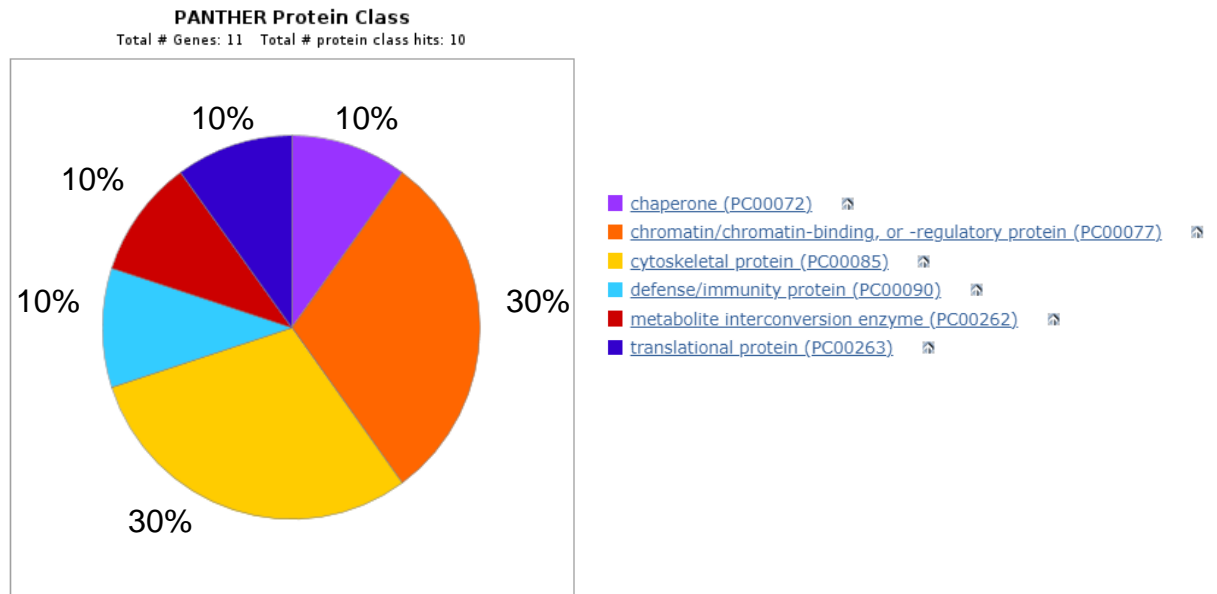


Figura 11. Porcentagens dos grupos de proteínas encontrados nas HUVECs através da análise LC-MS/MS, classificados de acordo com suas classes proteicas.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) são células biodisponíveis para o estudo da pré-eclâmpsia (HOBSON et al., 2018; WANG et al., 2019), o que permite utilizá-las em diferentes condições e analisar seu conteúdo proteico, metabólico e genético. Dessa forma, avaliar a ação de diferentes tampões de extração proteica sobre essas células é importante para escolher um tampão de alta eficiência e rendimento na extração de boa quantidade e variabilidade de proteínas. Para isso, a metodologia aplicada nesse projeto incluiu a abordagem *shotgun* para a análise de amostra complexa e obtenção de dados detalhados das proteínas extraídas, o que permite atingir o objetivo do estudo. Além disso, a determinação de um tampão de extração eficiente contribui para a execução de projetos futuros utilizando esse modelo experimental.

Os resultados obtidos até o momento são dados parciais apenas de um dos tampões, o que limita uma ponderação mais profunda sobre os tampões utilizados. Entretanto, as proteínas identificadas apresentam características principalmente estruturais e a vimentina foi a encontrada em maior quantidade. Vimentina é uma proteína de filamento intermediário citoplasmático do tipo III e compõe o citoesqueleto (PAULIN et al., 2022; RIDGE et al., 2022). Um estudo indicou que camundongos *knockout* para o gene responsável por codificar a vimentina (*Vim*^{-/-}) e submetidos a nefrectomia parcial apresentavam produção renal de ET-1 e NO alterada em comparação com animais do fenótipo selvagem (*Vim*^{+/+}) também submetidos a nefrectomia parcial: a proteína ET-1 estava aumentada no rim não operado e a atividade da NADPH diaforase (NADPH-d) estava reduzida no rim remanescente e no rim não operado, indicando menor produção de NO pelos camundongos *Vim*^{-/-} (TERZI et al., 1997). Ou seja, isso indica que a vimentina está relacionada à regulação do endotélio vascular através do eixo endotelina-NO. Outro estudo demonstrou que a vimentina desempenha papel importante na sinalização de vias relacionadas a regulação da inflamação: regula a ativação do inflamassoma NLRP3, um grande complexo multiproteico que regula as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 (DOS SANTOS et al., 2015).

As histonas são proteínas de interação com o DNA eucariótico em dupla fita e são fundamentais para a organização do complexo da cromatina (BITERGE; SCHNEIDER, 2014), de forma que estão relacionadas aos processos da fisiologia nuclear, como transcrição, replicação, recombinação e reparo do DNA. As H2A e H2B identificadas são tipos de histonas e compõe o octâmero que forma a partícula central de um nucleossomo (ALBERTS et al.,

2017). Metalotioneína possui baixo peso molecular e é uma proteína intracelular ligante de metais (COYLE et al., 2002) fisiológicos e xenobióticos por meio de seus grupos –SH (apoproteína) (NIELSEN; BOHR; PENKOWA, 2007). Está relacionada a desintoxicação de metais pesados na homeostase de metais essenciais como zinco e cobre, proteção contra cádmio e outras citotoxicidades, além de proteção contra radicais do estresse oxidativo (ADAM et al., 2010; BABULA et al., 2012; RAUDENSKA et al., 2014). Um estudo de caso controle recente encontrou associação entre polimorfismos genéticos (SNPs – polimorfismos de nucleotídeo único) em genes de metalotioneínas antioxidantes e desordens hipertensivas na gestação (WEI et al., 2022). A metalotioneína-2 está presente em quase todos os tecidos de mamíferos, mais especificamente no citoplasma das células, lisossomos, mitocôndria e núcleo (GENCHI et al., 2020).

As anquirinas estão associadas à membrana e são responsáveis por ligação ao citoesqueleto; estão envolvidas na interação proteína-proteína para regulação de processos biológicos (KUMAR; BALBACH, 2021). Também auxiliam na formação de complexos proteicos de canais iônicos e transportadores, moléculas de adesão celular, proteínas de sinalização e elementos do citoesqueleto (CUNHA; MOHLER, 2009). Um estudo com *knockdown* do gene codificador da anquirina mostrou que uma expressão diminuída dessa proteína está ligada a sinalização aberrante de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e proliferação celular reduzida (LIN et al., 2022).

As chaperonas como a proteína do choque térmico (HSP) fazem parte de uma ampla classe proteica. Especificamente, a HSP27 (ou HSPB1) possui a função de manutenção da homeostase proteica, auxiliando na formação e dobramento da molécula (FU, 2014; PARCELLIER et al., 2005), de regulação dos estados redox, de atividade anti-apoptótica e de diferenciação celular (D'YDEWALLE et al., 2011). Ainda, há evidências que a regulação da fosforilação de HSP27 perturba a função da barreira endotelial (RADA et al., 2021) e foram identificados níveis séricos aumentados de HSP27 em gestantes com pré-eclâmpsia comparando com gestantes normotensas (MARTIN et al., 2021).

A isomerase pertence a uma classe de enzimas que catalisam reações envolvendo a modificação estrutural de uma molécula. As PPIases (peptidil-prolil cis-trans isomerases) realizam rearranjo da estrutura proteica por isomerização cis-trans das ligações peptídicas em resíduos de prolina, reduzindo o tempo para a interconversão entre estados cis e trans. Essa atividade é importante para o dobramento, transporte e função adequados das proteínas para os processos fisiológicos (NATH; ISAKOV, 2015; ÜNAL; STEINERT, 2014). A proteína

cromossomal HMG-17 não-histona (também chamada HMGN2) modula a conformação da cromatina ativa, ligando-se a partículas do nucleossomo (KUGLER; DENG; BUSTIN, 2012). Apresenta ação de enfraquecer a ligação das histonas H1 ao nucleossomo, desestabilizando a estrutura da cromatina e permitindo a ligação de fatores regulatórios da transcrição (JING et al., 2021).

Nucleofosmina (NPM1 ou B23) é uma fosfoproteína predominantemente nucleolar e realiza funções relativas à formação e transporte do ribossomo, à duplicação do centrossomo (KUNCHALA et al., 2018), à replicação e reparo do DNA, à atividade de histonas e chaperonas, à resposta ao estresse e à embriogênese (CELA; DI MATTEO; FEDERICI, 2020). O fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pró-inflamatória moduladora da imunidade inata com liberação de citocinas como TNF- α e IL-1 β (CHUANG et al., 2011), envolvida em processos fisiológicos (SUMAIYA et al., 2022) e expressão aumentada de seu gene está correlacionada a progressão de doenças (JANKAUSKAS et al., 2019). Um estudo demonstrou que infecção por DENV (vírus da dengue) aumentou a produção de MIF em células Huh 7 (linhagem celular de hepatoma humano) e o cultivo de células humanas endoteliais (HMEC-1) com o meio de cultura condicionado das células Huh 7 infectadas por DENV apresentaram um aumento de permeabilidade vascular por desarranjo em junções oclusivas da HMEC-1 (CHUANG et al., 2011).

O fator de iniciação de tradução eucariótica 4H (eIF4H) estimula a síntese proteica pelo mRNA (RICHTER-COOK et al., 1998) e controla a atividade da helicase eIF4A DEAD-box (ROGERS et al., 2001; SUN et al., 2012), proteína que desenrola os duplexes de RNA. Sua depleção reduz a migração celular e aumenta a sensibilização à quimioterapia (VAYSSE et al., 2015). A proteína shroom3 possui domínio de ligação ao citoesqueleto, domínio de interação com a proteína ROCK1 (proteína quinase 1 associada a Rho) (NISHIMURA; TAKEICHI, 2008) e domínio relacionado a actina e miosina. É responsável por facilitar a fosforilação da miosina (constrição apical) para regulação do formato celular (HILDEBRAND, 2005; PLAGEMAN et al., 2011).

Nebulina (NEB) é uma proteína gigante associada ao filamento de actina e expresso majoritariamente no músculo esquelético (YUEN; OTTENHEIJM, 2020); é importante para a estabilização do citoesqueleto (CHU; GREGORIO; PAPPAS, 2016). Fibras musculares sem NEB apresentam maior custo de tensão e menor produção de força (LBEIT; OTTENHEIJM; GRANZIER, 2011). Por fim, vale ressaltar ainda que a BSA foi identificada em grandes

quantidades e identificada como contaminação é um indício da necessidade de lavagens com PBS antes da extração proteica das células.

Conclui-se que, apesar de extrair uma massa maior com os tampões A e B, a sonicação não é capaz de manter uma diversidade e variedade de proteínas. Então, o tampão B e a homogeneização por vórtex foram mais eficazes em extrair uma maior diversidade de proteínas das HUVECs para ser utilizada nas aplicações da proteômica. Entretanto, considerando que o material de estudo é uma mistura complexa de proteínas, a quantidade de proteínas identificadas pela espectrometria de massas é muito pequena. Assim, serão necessárias novas análises utilizando massas maiores de proteínas a partir de mais células para uma melhor comparação dos três tampões de extração em relação ao tipo de proteínas extraídas associado a cada um. Os resultados obtidos por essa padronização permitiram identificar o conteúdo proteico das HUVECs. Ademais, os resultados poderão contribuir para pesquisas futuras relacionadas à descoberta de potenciais novos alvos farmacológicos nas células endoteliais, com descoberta e desenvolvimento de novos fármacos capazes de reduzir a disfunção endotelial em gestantes diagnosticadas com PE. Também poderão auxiliar novas análises proteômicas aperfeiçoadas do extrato proteico proveniente de HUVECs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, V. et al. Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 409–418, maio 2010.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AMARAL, L. M. et al. Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 8, p. 61, 8 ago. 2017.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG). Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG practice bulletin number 222. **Obstetrics & Gynecology**, v. 135, n. 6, p. e237–e260, jun. 2020.
- BABULA, P. et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. **Metallomics**, v. 4, n. 8, p. 739, 2012.
- BANARJEE, R. et al. Proteomic study of endothelial dysfunction induced by AGEs and its possible role in diabetic cardiovascular complications. **Journal of Proteomics**, v. 187, p. 69–79, set. 2018.
- BARTSCH, E. et al. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. **BMJ**, p. i1753, 19 abr. 2016.
- BITERGE, B.; SCHNEIDER, R. Histone variants: key players of chromatin. **Cell and Tissue Research**, v. 356, n. 3, p. 457–466, 30 jun. 2014.
- BROWN, M. A. et al. Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. **Hypertension**, v. 72, n. 1, p. 24–43, jul. 2018.
- CARVALHO, P. C. et al. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 10 jan. 2016.
- CELA, I.; DI MATTEO, A.; FEDERICI, L. Nucleophosmin in Its Interaction with Ligands. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4885, 10 jul. 2020.
- CHU, M.; GREGORIO, C. C.; PAPPAS, C. T. Nebulin, a multi-functional giant. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 2, p. 146–152, 1 jan. 2016.
- CHUANG, Y.-C. et al. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 222–231, maio 2011.
- COYLE, P. et al. Metallothionein: the multipurpose protein. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 59, n. 4, p. 627–647, 1 abr. 2002.
- CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES III, J. R. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991–1000, 12 dez. 2007.
- CUNHA, S. R.; MOHLER, P. J. Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 11–12, p. 4364–4376, nov. 2009.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial Function and Dysfunction. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 13 mar. 2007.

DOS SANTOS, G. et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6574, 12 mar. 2015.

D'YDEWALLE, C. et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1–induced Charcot-Marie-Tooth disease. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 968–974, 24 ago. 2011.

FU, X. Chaperone function and mechanism of small heat-shock proteins. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 5, p. 347–356, 1 maio 2014.

GAROVIC, V. D.; HAYMAN, S. R. Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 3, n. 11, p. 613–622, nov. 2007.

GENCHI, G. et al. The Effects of Cadmium Toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, p. 3782, 26 maio 2020.

GOLDENBERG, R. L. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **The Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 75–84, jan. 2008.

GRABSKI, A. C. Advances in Preparation of Biological Extracts for Protein Purification. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463p. 285–303.

GUERBY, P. et al. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. **Redox Biology**, v. 40, p. 101861, abr. 2021.

HERMES, W. et al. Cardiovascular risk factors in women who had hypertensive disorders late in pregnancy: a cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 208, n. 6, p. 474.e1–474.e8, jun. 2013.

HILDEBRAND, J. D. Shroom regulates epithelial cell shape via the apical positioning of an actomyosin network. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 22, p. 5191–5203, 15 nov. 2005.

HOBSON, S. R. et al. Melatonin improves endothelial function in vitro and prolongs pregnancy in women with early-onset preeclampsia. **Journal of Pineal Research**, v. 65, n. 3, p. e12508, out. 2018.

INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, jan. 2018.

JANKAUSKAS, S. S. et al. Evolving complexity of MIF signaling. **Cellular Signalling**, v. 57, p. 76–88, maio 2019.

JING, Y. et al. Lysine succinylation on non-histone chromosomal protein HMG-17 (HMGN2) regulates nucleosomal DNA accessibility by disrupting the HMGN2–nucleosome association. **RSC Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 1257–1262, 2021.

KASPER, C.; CHARWAT, V.; LAVRENTIEVA, A. **Cell Culture Technology**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG, 2018.

- KHAN, K. S. et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. **The Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1066–1074, abr. 2006.
- KUGLER, J. E.; DENG, T.; BUSTIN, M. The HMGN family of chromatin-binding proteins: Dynamic modulators of epigenetic processes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 7, p. 652–656, jul. 2012.
- KUMAR, A.; BALBACH, J. Folding and Stability of Ankyrin Repeats Control Biological Protein Function. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 840, 5 jun. 2021.
- KUNCHALA, P. et al. When the good go bad: Mutant NPM1 in acute myeloid leukemia. **Blood Reviews**, v. 32, n. 3, p. 167–183, maio 2018.
- LABEIT, S.; OTTENHEIJM, C. A. C.; GRANZIER, H. Nebulin, a major player in muscle health and disease. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 3, p. 822–829, 29 mar. 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, ago. 1970.
- LAMARCA, B.; CORNELIUS, D.; WALLACE, K. Elucidating Immune Mechanisms Causing Hypertension During Pregnancy. **Physiology**, v. 28, n. 4, p. 225–233, jul. 2013.
- LAU, B. Y. C.; OTHMAN, A. Evaluation of sodium deoxycholate as solubilization buffer for oil palm proteomics analysis. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221052, 15 ago. 2019.
- LAURENTI, R.; JORGE, M. H. P. DE M.; GOTLIEB, S. L. D. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 449–460, dez. 2004.
- LEVINE, R. J. et al. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 10, p. 992–1005, 7 set. 2006.
- LI, T. et al. The COL-4A1 polypeptide destroy endothelial cells through the TGF- β /PI3K/AKT pathway. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 15761, 3 dez. 2021.
- LI, X.; WANG, W.; CHEN, J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 10, p. 1093–1113, 13 out. 2017.
- LIEBLER, D. C. **Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2002.
- LIN, R. L. C. et al. Decreased Ankyrin Expression Is Associated with Repressed eNOS Signaling, Cell Proliferation, and Osteogenic Differentiation in Osteonecrosis of the Femoral Head. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 104, n. Suppl 2, p. 2–12, 6 abr. 2022.
- LISONKOVA, S.; JOSEPH, K. S. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 209, n. 6, p. 544.e1-544.e12, dez. 2013.
- MA, Y. et al. Beclin-1/LC3-II dependent macroautophagy was uninfluenced in ischemia-challenged vascular endothelial cells. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 2, p. 549–561, mar. 2022.
- MADUGUNDU, A. K. et al. Integrated Transcriptomic and Proteomic Analysis of Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Proteomics**, v. 19, n. 15, p. 1800315, 26 ago. 2019.

- MARCHI, J. et al. Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. **Obesity Reviews**, v. 16, n. 8, p. 621–638, ago. 2015.
- MARTIN, R. L. et al. Circulating heat shock protein 27 (HSPB1) levels in prediction of pre-eclampsia: A pilot study. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, 3 nov. 2021.
- MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 649–658, 1 mar. 2003.
- MISHRA, N. C. **Introduction to Proteomics: Principles and Applications**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- NATH, P. R.; ISAKOV, N. Insights into peptidyl-prolyl cis–trans isomerase structure and function in immunocytes. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 120–131, jan. 2015.
- NIELSEN, A. E.; BOHR, A.; PENKOWA, M. The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins. **Biomarker insights**, v. 1, p. 99–111, 7 fev. 2007.
- NISHIMURA, T.; TAKEICHI, M. Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. **Development**, v. 135, n. 8, p. 1493–1502, 15 abr. 2008.
- PARCELLIER, A. et al. Small Heat Shock Proteins HSP27 and α B-Crystallin: Cytoprotective and Oncogenic Functions. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 3–4, p. 404–413, mar. 2005.
- PAULIN, D. et al. Vimentin: Regulation and pathogenesis. **Biochimie**, v. 197, p. 96–112, jun. 2022.
- PEACH, M. et al. Solubilization of Proteins: The Importance of Lysis Buffer Choice. Em: KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. (Eds.). **Western Blotting: Methods and Protocols**. New York: Springer Science+Business Media, 2015. v. 1312p. 49–60.
- PERAÇOLI, J. C. et al. Pre-eclampsia/Eclampsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 41, n. 05, p. 318–332, 10 maio 2019.
- PHIPPS, E. et al. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 6, p. 1102–1113, 6 jun. 2016.
- PHIPPS, E. A. et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 5, p. 275–289, 21 maio 2019.
- PLAGEMAN, T. F. et al. A Trio-RhoA-Shroom3 pathway is required for apical constriction and epithelial invagination. **Development**, v. 138, n. 23, p. 5177–5188, 1 dez. 2011.
- POSSOMATO-VIEIRA, J. S.; KHALIL, R. A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. Em: **Adv. Pharmacol.** [s.l.] Academic Press Inc., 2016. p. 361–431.
- RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 758–760, maio 1998.

- RADA, C. C. et al. Heat shock protein 27 activity is linked to endothelial barrier recovery after proinflammatory GPCR-induced disruption. **Science Signaling**, v. 14, n. 698, 31 ago. 2021.
- RAUDENSKA, M. et al. Metallothionein polymorphisms in pathological processes. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 55–68, 2014.
- REDMAN, C. W. G.; STAFF, A. C. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, p. S9.e1-S9.e4, out. 2015.
- RICHTER-COOK, N. J. et al. Purification and Characterization of a New Eukaryotic Protein Translation Factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 13, p. 7579–7587, mar. 1998.
- RIDGE, K. M. et al. Roles of vimentin in health and disease. **Genes & Development**, v. 36, n. 7–8, p. 391–407, 1 abr. 2022.
- ROBERTS, J. M.; GAMMILL, H. S. Preeclampsia: recent insights. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1243–1249, dez. 2005.
- RODI, P. M. et al. Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 859–866, mar. 2014.
- ROGERS, G. W. et al. Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30914–30922, ago. 2001.
- SANCHEZ, J.-CHARLES.; CORTHALS, G. L.; HOCHSTRASSER, D. F. **Biomedical applications of proteomics**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004.
- SAY, L. et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 2, n. 6, p. e323–e333, jun. 2014.
- SHEVCHENKO, G. et al. Comparison of Extraction Methods for the Comprehensive Analysis of Mouse Brain Proteome using Shotgun-based Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 4, p. 2441–2451, 6 abr. 2012.
- SIRCAR, M.; THADHANI, R.; KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 24, n. 2, p. 131–138, mar. 2015.
- SMITH, G. C.; PELL, J. P.; WALSH, D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129 290 births. **The Lancet**, v. 357, n. 9273, p. 2002–2006, jun. 2001.
- STILLMAN, I. E.; KARUMANCHI, S. A. The Glomerular Injury of Preeclampsia. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 8, p. 2281–2284, ago. 2007.
- SUMAIYA, K. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 233, p. 108024, maio 2022.
- SUN, Y. et al. The eukaryotic initiation factor eIF4H facilitates loop-binding, repetitive RNA unwinding by the eIF4A DEAD-box helicase. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 13, p. 6199–6207, jul. 2012.

TANNETTA, D.; SARGENT, I. Placental Disease and the Maternal Syndrome of Preeclampsia: Missing Links? **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 6, p. 590–599, 10 dez. 2013.

TERZI, F. et al. Reduction of renal mass is lethal in mice lacking vimentin. Role of endothelin-nitric oxide imbalance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1520–1528, 15 set. 1997.

TOMIMATSU, T. et al. Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic Factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4246, 30 ago. 2019.

ÜNAL, C. M.; STEINERT, M. Microbial Peptidyl-Prolyl “cis” / “trans” Isomerases (PPIases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 544–571, set. 2014.

VAYSSE, C. et al. Key contribution of eIF4H-mediated translational control in tumor promotion. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 39924–39940, 24 nov. 2015.

WANG, Y. et al. High levels of HtrA4 detected in preeclamptic circulation may disrupt endothelial cell function by cleaving the main VEGFA receptor KDR. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 4, p. 5058–5066, 2 abr. 2019.

WEI, S. et al. Genetic Variations in Metallothionein Genes and Susceptibility to Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Case-Control Study. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 6 jun. 2022.

WU, Y. et al. Optimized sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis of soluble proteins from chicken bursa of Fabricius. **Proteome Science**, v. 7, n. 1, p. 38, 8 dez. 2009.

YUEN, M.; OTTENHEIJM, C. A. C. Nebulin: big protein with big responsibilities. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 41, n. 1, p. 103–124, 25 mar. 2020.

ZHANG, L. et al. Identification of compound CA-5f as a novel late-stage autophagy inhibitor with potent anti-tumor effect against non-small cell lung cancer. **Autophagy**, v. 15, n. 3, p. 391–406, 4 mar. 2019.

ZHENG, W. et al. Comprehensive comparison of sample preparation workflows for proteomics. **Molecular Omics**, v. 18, n. 6, p. 555–567, 2022.