

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Química e Bioquímica



**Determinação das proteínas diferencialmente expressas nos
coelomócitos da estrela-do-mar (*Marthasterias glacialis*) durante 3
fases distintas da regeneração**

Joana Filipa Raimundo Martins

DISSERTAÇÃO

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica médica

2012

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Química e Bioquímica



**Determinação das proteínas diferencialmente expressas nos
coelomócitos da estrela-do-mar (*Marthasterias glacialis*) durante 3
fases distintas da regeneração**

Joana Filipa Raimundo Martins

DISSERTAÇÃO

Mestrado em Bioquímica
Especialização em Bioquímica médica

Orientação: Doutora Ana Varela Coelho, ITQB-UNL, Oeiras; e Professora Doutora Maria luisa Serralheiro, Faculdade de Ciências, UL

2012

Abstract

Regeneration is the ability to replace lost body parts, process that varies widely among animal kingdom. In deuterostomes the regenerative potential is maximally expressed in echinoderms, animals that can replace all injured organs. Coelomocytes, a morphologically heterogeneous population of free roaming cells, are recognized as the main cellular components of the echinoderm immune system. They are the first line of defence and their number and type can vary dramatically during infections or following injury. These cells have many functions, which include phagocytosis, encapsulation, clotting, cytotoxicity, wound healing, among others. Echinoderms, in particular starfish, have been used as a model system in regeneration studies. However, only recently these important animals have been used in proteomic approaches. For present work we examined the differentially expressed proteins from starfish coelomocytes (*Marthasterias glacialis*), in three stage of regeneration (48 hours, 13 days and 10 weeks) after arm tip amputation. For identification of proteins with relevant activity in the regeneration events, several proteomics approaches were used: protein separation by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE); determination of differentially expressed proteins by difference gel electrophoresis (DIGE); and finally the selected proteins were identified by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The work presented in this thesis pretends contribute to an increase molecular knowledge and of the biochemical systems involved in echinoderm regeneration, mediated by coelomocytes. The identified proteins in this study seem to have important roles into regeneration process, in particular, functions that include proliferation, growth and cellular differentiation.

Key-words: Regeneration/2-DE/ DIGE / MALDI-TOFTOF / coelomocytes / starfish

Resumo

A regeneração define-se pela capacidade de um ser vivo reconstruir as partes do corpo perdidas, num processo que é extramente diverso ao longo do reino animal. Nos deuterostómios o potencial de regeneração tem a sua máxima expressão nos equinodermes, animais que têm capacidade de repor os seus órgãos internos e externos após um dano à sua integridade física. Os coelomócitos circulam livres no fluido celómico e são reconhecidos como os componentes celulares do sistema imunitário. Desempenham funções variadas, nomeadamente na resposta imune inata e sabe-se que apresentam um papel importante na regeneração. Participam em várias funções fisiológicas, tais como na formação de coágulos, na fagocitose, defesa contra microrganismos, cicatrização, resposta inflamatória e transporte de oxigénio. Os equinodermes, e em particular as estrelas-do-mar, têm sido utilizados como animais modelo para estudar os processos de regeneração. No entanto, foi apenas recentemente que estes importantes deuterostómios têm sido estudados através de abordagens de proteómica. Este trabalho tem como objetivo a determinação das proteínas diferencialmente expressas nos coelomócitos na estrela-do-mar (*Marthasterias glacialis*) durante 3 fases de regeneração (48 horas, 13 dias e 10 semanas após a amputação da ponta do braço). A identificação do proteoma diferencial dos coelomócitos combina a separação de proteínas por 2-DE (electroforese bidimensional), deteção das diferenças de expressão das proteínas através da metodologia DIGE e a sua identificação por espetrometria de massa (MALDI-TOF/TOF). Este estudo visa contribuir para o conhecimento das proteínas e dos processos bioquímicos envolvidas na regeneração em equinodermes. Pensa-se que as proteínas identificadas neste estudo têm um envolvimento na regeneração, nomeadamente nas fases mais avançadas deste processo, desempenhando funções como proliferação, controlo de crescimento e diferenciação celular.

Palavra-chave: Regeneração/2-DE/ DIGE / MALDI-TOFTOF / Coelomócitos / Estrela-do-mar

Agradecimentos

Primeiro, os meus sinceros agradecimentos à doutora Ana Coelho pela oportunidade de trabalhar no laboratório de espectrometria de massa, neste projeto extramente fascinante. Agradeço toda a orientação, suporte, disponibilidade, ensino e por ter tornando esta experiência muito gratificante pra mim.

Segundo, agradeço ao André Almeida, por ter-me introduzido à proteómica, por todo o apoio, amizade, ideias, e pela disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

À Elizabete, à Catarina e à Renata, um grande obrigado por tudo aquilo que me ensinaram durante este ano de trabalho. À Beta por todo o sentido do humor, momentos divertidos e toda ajuda no meu trabalho. À Catarina por toda a boa instrução que me deu, pela oportunidade de trabalhar com as suas estrelas-do-mar e permitir o meu contributo no seu trabalho. À Renata por todo o suporte, paciência e ajuda na parte de espectrometria de massa.

Agradeço aos meus camaradas Rita e Luís, por todos os bons momentos e por tudo aquilo que partilhamos neste ano cheio de aventuras e desventuras.

À minha conterrânea Isabel Marcelino e a todos os colegas que proporcionaram um agradável ambiente de trabalho como Miguel Ventosa, Rui Palhinhas, Kamila Koci, Natacha Couto, Filipa Blastos, Lorenzo Henriquez e Conceição Almeida, um grande obrigado.

Um especial obrigada aos meus pais e à minha irmã, que sempre acreditaram em mim e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões. Sem eles nada disto seria possível.

Grande obrigada, aos meus amigos de sempre, que tiveram presentes em todas as alturas boas e menos boas da minha vida, Filipa, Cláudia, Tiago, Gustavo e especialmente à minha amiga e colega de casa Cátia, por toda a amizade, paciência, apoio e companheirismo. Sem esquecer de agradecer aos elementos do grupo “Débito de Disparates”, pelos momentos de diversão e descontração.

OBRIGADA!

Índice

Abstract	iii
Resumo.....	iv
Agradecimentos	v
Índice de ilustrações.....	vii
1. Introdução Geral	1
1.1. Equinodermes como modelo animal para estudos de regeneração	3
1.2. Estrelas-do-mar – <i>Masthasterias glacialis</i>	4
1.3. Sistema Imunitário de equinodermes	5
1.4. Coelomócitos - mediadores da resposta imunitária.....	7
1.5. Proteômica em regeneração animal.....	9
1.5.1. Electroforese bidimensional (2-DE)	10
1.5.2. Espectrometria de Massa	12
2. Objetivo.....	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Captura e manipulação dos animais	16
3.2. Recolha do Fluido Celómico e isolamento dos coelomócitos.....	16
3.3. Extração de Proteínas	17
3.4. Quantificação de Proteínas	18
3.5. Separação de Proteínas	19
3.5.1. SDS-PAGE.....	19
3.5.2. Electroforese bidimensional (2-DE)	19
3.5.3. Electroforese diferencial (2-D DIGE).....	21
3.6. Análise por espetrometria de massa	24
3.7. Identificação de Proteínas	25
4. Resultados.....	28
4.1. Otimização das condições de extração e quantificação de proteínas	28
4.2. Otimização da separação de proteínas por IEF	30
4.3. Proteínas diferencialmente expressas (2-D DIGE)	33
4.4. Identificação das Proteínas	39
5. Discussão dos resultados	43

5.1. Proteínas diferencialmente expressas.....	44
5.1.1. Proteínas relacionadas com a regulação do citosqueleto.....	44
5.1.2. Proteínas envolvidas na regulação celular.....	45
5.1.3. Proteínas relacionadas com o transporte de moléculas.....	46
5.2. Eventos de proteólise associados à regeneração.....	46
5.3. Proteínas não identificadas.....	47
6. Conclusões e perspetivas futuras.....	48
7. Bibliografia.....	50
Anexos.....	54
Anexo 1 - Estudo da exatidão e precisão do método A 280 modificado	
Anexo 2 – Identificação dos spots (teste para método de extração simples	
Anexo 3 – Parâmetros IEF de optimização	
Anexo 4 – Imagem do gel DIGE (48horas após amputação)	
Anexo 6 – Imagem do gel DIGE (13 dias após amputação)	
Anexo 7 – Imagem do gel DIGE (10 semanas após amputação)	
Anexo 8 – Identificações das proteínas diferencialmente expressas)	
Anexo 9 – Padrões de fragmentação	

Índice de ilustrações

Figura 1 - Propriedades regenerativas variadas ao longo do reino animal.....	2
Figura 2 - Anatomia da estrela-do-mar <i>Marthasterias glacialis</i>	4
Figura 3 - Localização das estrelas-do-mar <i>Marthasterias glacialis</i>	5
Figura 4 - Árvore filogenética.....	6
Figura 5 - Tipos de coelomócitos.....	7
Figura 6 - Separação Bidimensional.....	10
Figura 7 - Esquema representativo do protocolo 2-D DIGE.....	11
Figura 8 - MALDI (<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>).....	12
Figura 9 - Espectro MS/MS da fragmentação de um péptido.....	13
Figura 10 - Esquema experimental da metodologia utilizada neste estudo.....	14
Figura 11 - Esquema experimental utilizado no tratamento dos animais para o estudo.....	16
Figura 12 - Modelo de Sonicação.....	17
Figura 13 - Motores de busca e bases de dados usadas na identificação das proteínas.....	27

Figura 14 - Electroforese 2-DE de géis 24cm, pH 3-10.....	28
Figura 15 - Electroforese 1-DE (quantificação com método A280 modificado).....	29
Figura 16 - Electroforese 1-DE (quantificação com 2D Quant Kit).....	30
Figura 17 - Electroforese 1-DE (amostras descongeladas).....	30
Figura 18 - Electroforese 2-DE, 7cm, pH 3-10, com 0.5% de anfólitos.....	31
Figura 19 - Electroferese 2-DE, géis de 24 cm, pH 3-10.....	32
Figura 20 – Esquema biológico de regeneração em estrelas-do-mar.....	43
Gráfico 1 - expressão diferencial de proteínas (48 horas após-amputação do braço).....	34
Gráfico 2 - Representação da variação da expressão das proteínas (48 horas).....	35
Gráfico 3 - Representação gráfica da PCA (48horas).....	35
Gráfico 4 - Expressão diferencial de proteínas (13 dias após-amputação do braço).	36
Gráfico 5 - Representação da variação da expressão das proteínas (13 dias).....	37
Gráfico 6 - Representação gráfica da PCA (13dias).....	37
Gráfico 7 - Volumes médios normalizados amostras (10 semanas após amputação).	38
Gráfico 8 - Representação da variação da expressão das proteínas (10 semanas).....	38
Gráfico 9 - Representação gráfica da PCA (10 semanas).....	39
Tabela 1 – Programa de focagem isoelectrica (tiras 7cm, no sistema IPGphor).	20
Tabela 2 - Programa de focagem isoelectrica (tira 24cm, no sistema IPGphor)	21
Tabela 3 - Desenho experimental (2-D DIGE) das amostras de coelomócitos em regeneração	22
Tabela 4 - Programa de focagem isoelectrica utilizado para o ensaio DIGE	23
Tabela 5 - Critérios estatísticos mínimos considerados para seleção dos spots.....	34
Tabela 6 – Resultados das identificações.....	40

1. Introdução Geral

A regeneração é um processo extremamente importante para a sobrevivência dos seres vivos, já que lhes permite substituir as partes do corpo danificadas, gastas, ou que simplesmente se perdem derivado às várias relações bióticas ⁽¹⁾. Todos os organismos vivos, exibem de certa forma capacidades regenerativas, permitindo-lhes lidar com os vários eventos ambientais, stress físico, doenças ou mesmo manutenção celular ⁽²⁾. No entanto, essas propriedades são extremamente variadas, e podem ocorrer a vários níveis de organização biológica ⁽³⁾. Por exemplo, em planárias e na maioria das espécies de equinodermes, as capacidades regenerativas são extremamente poderosas, dado que conseguem substituir todos os tecidos do seu corpo. Em vertebrados esta capacidade é bem mais limitada, sendo restrita apenas a alguns tecidos pontuais, com exceção dos anfíbios que do grupo dos vertebrados, são aqueles que apresentam uma capacidade de regeneração mais impressionante, que lhes permite regenerar, por exemplo, os membros completos, sistema nervoso, retina, etc. Os répteis estão limitados á regeneração de partes específicas do corpo, como a cauda, o peixe-zebra as barbatanas, os tubarões estão continuamente a repor os dentes perdidos, e por exemplo os aracnídeos que conseguem regenerar todas as patas ⁽⁴⁾.

No entanto, o processo de regeneração de membros não é comum a todos os animais, no caso dos humanos e outros vertebrados, os poderes de regeneração estão confinados à regeneração de tecidos, unicamente para manter a homeostase celular e a integridade fisiológica ⁽⁶⁾. Excetuando alguns órgãos internos, como o fígado e as glândulas suprarrenais, que possuem uma considerável taxa de regeneração, podendo regenerar na totalidade se uma parte suficiente permanecer para dar o ponto de partida para a regeneração, num fenómeno chamado de hipertrofismo ^{a (4,5)}. (Figura 1)

A capacidade dos animais produzirem novas estruturas do seu corpo para repor partes perdidas é conhecida desde a antiguidade, mas só nestas últimas décadas tem despertado maior interesse por parte dos cientistas. Avanços recentes têm surgido no âmbito da biologia da regeneração, principalmente a nível de estudos de desenvolvimento, biologia evolutiva, ecologia funcional e biologia de células estaminais ⁽⁷⁾. Contudo a maioria destes estudos não abrange os sistemas bioquímicos envolvidos nos processos celulares de regeneração. Outro obstáculo é a escolha do organismo modelo ideal, devido à variabilidade das capacidades regenerativas entre espécies que é

^aProcesso, em que um órgão após ter-lhe sido removida uma parte, aumenta de volume para responder às necessidades fisiológicas, mas que nunca chega a recuperar a sua forma inicial.

muito acentuada ⁽²⁾.

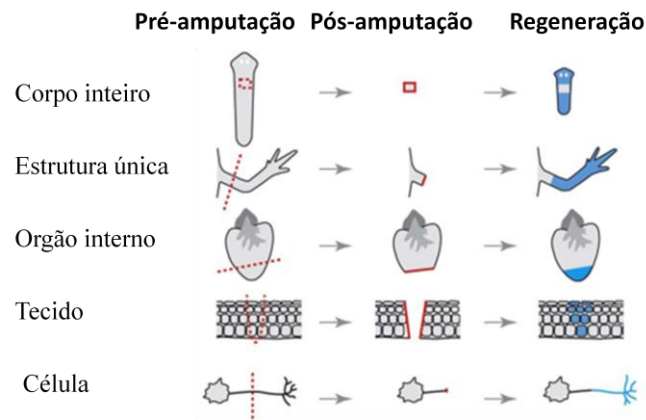


Figura 1 – Os organismos vivos exibem propriedades regenerativas variadas que ocorrem a vários níveis de organização biológica. Existem animais que conseguem reconstruir todos os órgãos do corpo; outros têm capacidades mais limitadas sendo restritas apenas a uma região do corpo; outros, tais como a maior parte dos vertebrados, apenas conseguem regenerar tecidos de forma a manter a homeostase celular. (imagem adaptada ref. 7)

É nos equinodermes que o potencial de regeneração apresenta a sua máxima expressão, no entanto os estudos nestes animais são principalmente ao nível da determinação de alterações histológicas, como taxas de crescimento celular e alterações morfológicas, também já existem alguns estudos genéticos em regeneração de equinodermes ⁽²⁾. A identificação de proteínas importantes na regeneração de equinodermes resultou essencialmente em estudos de imunolocalização específicos, cujas proteínas candidatas eram conhecidos alvos com impacto na regeneração em outros organismos ⁽⁸⁾.

Estudos anteriores mostraram a existência de uma interligação entre o sistema imunitário e a capacidade de regeneração de cada espécie animal. É sabido que após a lesão de um determinado tecido, existe uma cascata de acontecimentos inflamatórios que visam reconstruir a zona lesada por substituição do tecido por tecido fibroso (cicatrização), por tecido funcional (regeneração), ou pelos dois processos conjuntos, primariamente uma fase de cicatrização e posteriormente regeneração ⁽⁹⁾. A resposta imunitária inata tem um papel fundamental nesses mecanismos, através da libertação de citocinas, fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras que promovem a reconstrução da região danificada ⁽¹⁰⁾. Durante a primeira fase de regeneração de um tecido a zona lesada é invadida por células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e outros componentes da matriz extracelular que facilitam a adesão, migração e proliferação celular ⁽¹¹⁾. Estudos mais específicos, em *Xenopus*

identificaram vários genes associados a resposta imunitária que se apresentam sobre-expressos nas fases iniciais da regeneração após a amputação do membro ⁽¹²⁾. Outros estudos, no âmbito da biologia evolutiva, observaram a existência de uma tendência, na perda da capacidade regenerativa das espécies estar paralelamente relacionada com a evolução da complexidade do sistema imunitário ^(13, 14).

1.1. Equinodermes como modelo animal para estudos de regeneração

Os equinodermes são animais invertebrados existentes em ambientes unicamente marinhos. Constituem um grupo de cerca de 7000 espécies documentadas até à atualidade e ocupam habitats extremamente variados, desde fundos abissais até zonas costeiras, entre o equador e os mares polares. Trata-se de um grupo muito antigo de animais, já perfeitamente diferenciados desde o início da Era Paleozóica. Distribuem-se em cinco classes: equinóides (como ouriços-do-mar); holotúrias (como pepinos-do-mar); asteróides (como estrelas-do-mar); crinóides (como lírios-do-mar) e finalmente ofiuróides (como serpentes-do-mar). Uma característica muito peculiar de todos os equinodermes é a existência de um sistema hidrovacular formado por uma rede interna de canais e reservatórios onde circula um fluido aquoso sob pressão, o fluido celómico. Este tecido consiste num filtrado a partir de água do mar que entra pela placa madreporita e banha todos os órgãos internos, sendo responsável por várias funções biológicas como locomoção, respiração, alimentação e imunidade ⁽¹³⁾. Apesar da ausência de cérebro, o sistema nervoso é capaz de coordenar todas as funções corporais básicas, sendo constituído por um anel central com extensões radiais de centenas de células nervosas. Apresentam uma reprodução essencialmente sexuada, com fecundação externa, e na maioria das espécies são libertados ovos que apresentam um estado larval livre e planctónico. Os embriões possuem desenvolvimento com simetria bilateral, o chamado desenvolvimento deuterostómio, que é também característico dos cordados, e em nada se assemelha com o desenvolvimento de outros invertebrados ⁽¹⁵⁾. Apesar de exclusivamente marinhos e de aspeto primitivo, os equinodermes estão bem mais próximos dos humanos do que se poderia supor. A simetria radial presente nestes animais resultou de uma evolução secundária, a partir de um antepassado com simetria bilateral. Diversas peculiaridades do desenvolvimento embrionário destes animais sugerem a existência de um antepassado pré-paleozóico comum entre os equinodermes e os vertebrados ⁽¹⁶⁾.

Recentemente, os equinodermes têm recebido alguma atenção, principalmente devido ao seu potencial de regeneração. Em estrelas-do-mar e ouriços-do-mar, a regeneração decorre

essencialmente através de um processo morfolático, que envolve o recrutamento de células pré-existentes provenientes de desdiferenciação^b, transdiferenciação^c e migração de células^(17,18). Este processo extremamente complexo de regeneração, deve-se a um mecanismo evolutivo de adaptação e sobrevivência. Como são animais constantemente ameaçados por predadores, a amputação traumática dos braços ou autotomia é essencial para a sobrevivência da maioria das estrelas-do-mar, uma vez que dependem dos braços para alimentar-se e deslocar-se. Outro aspeto onde a regeneração é fulcral para estes animais, é em casos de necessidade de reprodução assexuada por simples divisão binária, sendo igualmente capazes de regenerar uma parte inteira do seu corpo após este se ter dividido⁽¹⁹⁾.

1.2. Estrelas-do-mar – *Mastasterias glacialis*

As estrelas-do-mar são caracterizadas pelo corpo achatado de onde emergem pelo menos cinco braços, mais ou menos longos e cobertos, na face oral, por pés ambulacrários. A boca está situada na região oral, enquanto o ânus e a placa madreporita se localizam na face aboral⁽⁸⁾. (Figura 2) Tratam-se de predadores carnívoros, que atacam presas pouco ágeis como moluscos ou vermes. A matriz biomineral que compõe a epiderme é constituída essencialmente por placas calcárias de bicarbonato de cálcio (ossículos), interligadas por músculos e por um tecido do tipo colagénico, também conhecido como tecido conjuntivo mutável, cuja consistência pode variar rapidamente entre dura a maleável, permitindo a movimentação, defesa ou simplesmente dividir-se em dois^(2,15).

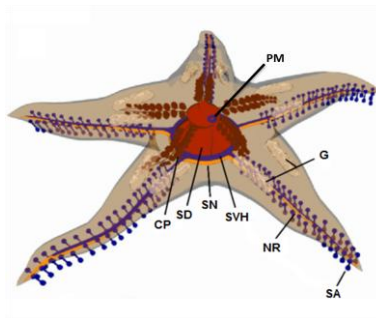
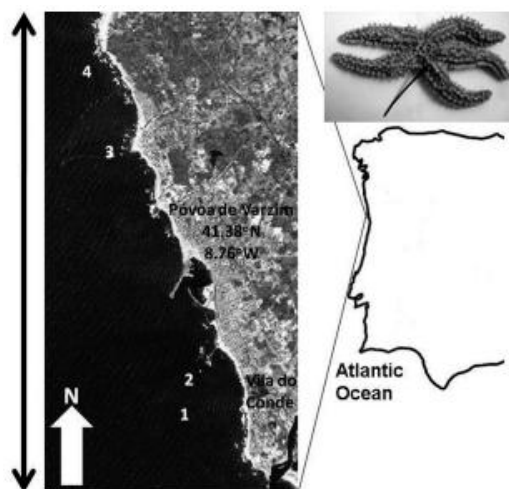


Figura 2 - Anatomia da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*. Sistema nervoso: CN; Nervo radial: NR; Sistema digestivo: SD; Sistema vascular Hídrico: SVH; Sistema ambulacrário: SA; Placa madreporita: PM. Gónadas: G, (Figura adaptada partir da referencia 8).

^b Processo onde uma determinada célula diferenciada perde a especificidade ao tecido onde está integrada e torna-se numa célula indiferenciada.

^c Processo onde uma célula previamente desdiferenciada volta a adquirir especificidade, mas para uma linhagem diferente da sua originária.

Uma das espécies de estrela-do-mar mais comuns na costa portuguesa é a *Marthasterias*



glacialis, conhecida como estrela-do-mar espinhosa, uma vez que a sua superfície é coberta por espinhos cónicos. Embora esteja presente em toda a costa portuguesa, é frequentemente encontrada na costa centro/norte de Portugal, devido à sua preferência por águas frias (*glacialis* significa glacial). (Figura 3) Normalmente atingem os 25-30 cm de diâmetro (de uma ponta do braço a outra diametralmente oposta), mas podem chegar a medir 70 cm de diâmetro ⁽⁸⁾.

Figura 3 - Localização das estrelas-do-mar *Marthasterias glacialis* ao longo da costa portuguesa. Sendo a sua maior incidência no Litoral Norte. ⁽¹⁸⁾

Várias são as razões pela escolha desta espécie de equinoderme como modelo para este estudo. Primeiro, é uma estrela-do-mar facilmente encontrada em superfícies rochosas em praias da costa do Estoril, especialmente

durante o inverno; segundo, é fácil manter esta espécie em cativeiro num ambiente controlado proporcionado por um aquário; terceiro, os equinodermes apresentam aproximadamente 70% de homologia com os genes humanos, o que os torna um ótimo modelo para estudos. Finalmente, tal como todas as outras espécies de estrela-do-mar, esta espécie apresenta uma elevada capacidade de regeneração ⁽¹⁸⁾.

1.3. Sistema Imunitário de equinodermes

Nas últimas décadas, vários investigadores têm observado evidências de que os equinodermes possuem um sistema imunitário primitivo mas com respostas imunitárias funcionalmente semelhantes ao observado em vertebrados. No final do século XIX, foi descoberto a presença de células fagocíticas em equinodermes, após a introdução de um corpo estranho numa larva de estrela-do-mar *Astropecten pentacanthus* ⁽²⁰⁾. A sequenciação do genoma do ouriço-do-mar, *Strongylocentrotus purpuratus*, também veio contribuir para uma nova perspetiva relativamente ao sistema imunitário dos equinodermes, que ao contrário do que se pensava, é extremamente complexo, partilhando várias famílias de genes comuns aos vertebrados ⁽²¹⁾. Isto acontece, devido à existência de

um órgão axial que contém todos os elementos essenciais para uma resposta imunitária, o que pode ser considerado um ancestral de um órgão linfóide comum entre equinodermes e cordados ⁽²²⁾. De facto, a posição dos equinodermes na árvore evolutiva é muito próxima à dos vertebrados, partilhando o mesmo superfilo (Deuterostómios). (Figura 4) Isto torna interessante comparar ambos os sistemas imunitários e também impulsiona informações sobre a evolução da resposta imunitária no reino animal ⁽²³⁾.

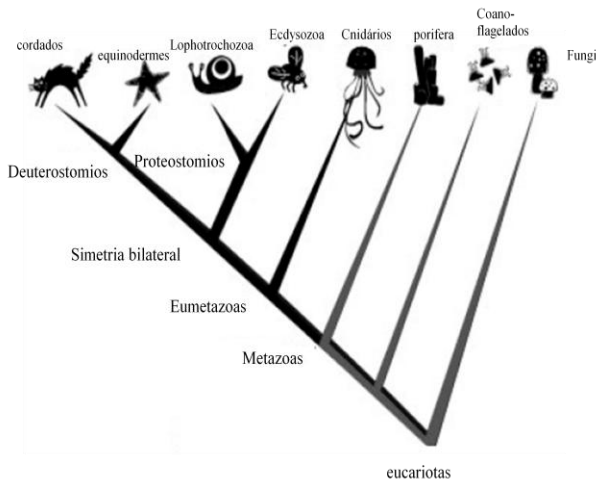


Figura 4 - Árvore filogenética destacando a proximidade entre os cordados e os equinodermes. (Imagem adaptada da referência 24)

mediada por coelomócitos, uma população de células especializadas que se move livremente no fluido celómico. Por outro lado, a resposta humoral é principalmente mediada por vários compostos secretados por vários tecidos. Este tipo de resposta humoral tem como principal papel a defesa contra infeções, onde se enquadram compostos tipo lectinas, aglutininas, perforinas, sistema complemento e citocinas ⁽²³⁾. Curiosamente, a imunidade celular de equinodermes escapa à clássica caracterização fenotípica dos linfócitos observados em vertebrados, nomeadamente na identificação de células específicas através da expressão de epítomos nas membranas celulares. A falta de marcadores específicos de cada população celular dificulta a distinção entre elas, limitando-se os estudos a variações essencialmente morfológicas ⁽²⁵⁾.

A análise do proteoma do fluido celómico de ouriço do mar *Strongylocentrotus purpuratus* permitiu a identificação de várias proteínas envolvidas na resposta imunitária em equinodermes. Tais como, componentes do sistema complemento do tipo SpC3 e SpBf e recetores *scavenger* ricos em cisteínas, Sp185/333. Foram também identificados enzimas lisossomais e α -2-macroglobulinas que

O sistema imunitário dos equinodermes dispõe dos mesmos mecanismos básicos que o resto dos animais multicelulares, como o reconhecimento do *self* e do *non-self*, desencadeamento de uma resposta imunitária face à presença de substâncias externas na cavidade celómica, e são capazes de neutralizar e eliminar corpos estranhos ⁽²⁰⁾. Podem ser observados dois tipos de resposta imune em estrelas-do-mar: resposta imune celular mediada por células e uma resposta imune humoral mediada por moléculas livres presentes no fluido celómico. A resposta imunitária baseada em células é

são responsáveis pela destruição de agentes patogénicos. Amassina, anexina V e factores Von Willerbrand que são responsáveis pelos fenómenos de coagulação. Proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto, como actina, profilina, fascina, cofilina, gelsolina, miosina, proteínas associadas a microtúbulos, complexo proteico Arp2/3, coronina, tubulina, α -actinina, tetraspanina, talina, vinculina e proteínas Rab. Também foram identificadas proteínas de adesão celular como a integrina, selectina, cadherina e fibronectina. Proteínas de sinalização (Proteínas Ras), e finalmente, enzimas oxidativas provenientes do citoplasma ⁽¹³⁾.

1.4. Coelomócitos - mediadores da resposta imunitária

Como referido no ponto anterior, os coelomócitos são as células presentes no fluido celómico em diversa tipologia e abundância responsáveis pela imunidade celular nos equinodermes. O fluido celómico permite a sua circulação, permitindo-lhes alcançar todos os tecidos ^(13,23). Estas células têm recebido uma considerável atenção por várias razões: 1) a sua relação e homologia com as células do sistema imunitário de vertebrados; 2) acesso a um novo modelo para estudos de sistema imunitário; 3) desenvolvimento de estudos relacionados com a regeneração animal. Os coelomócitos participam em várias funções vitais, tais como formação de coágulos celulares, fagocitose, encapsulação, no transporte de oxigénio e na defesa contra microrganismos e outros corpos estranhos que entram na cavidade celómica ⁽²⁶⁾. (Figura 5)

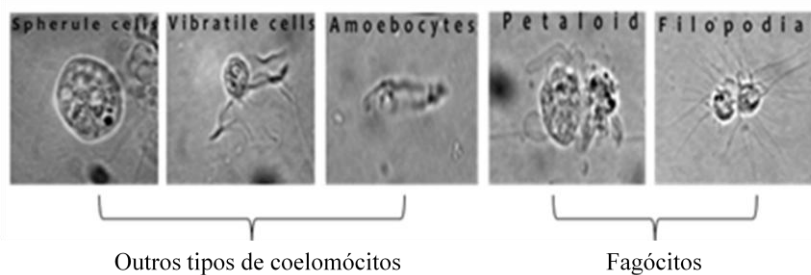


Figura 5 - Coelomócitos encontrados do fluido celómico da *Marthasterias glacialis*. As células com maior abundância são os coelomócitos do tipo fagócitos, que foram encontrados em diferentes tipologias, petaloide (inativa) e filopodial (ativa). Estão representados também outros tipos de coelomócitos, menos abundantes mas igualmente encontrados no fluido celómico. (imagem adaptada da referencia 8)

Alguns destes tipos de coelomócitos são encontrados em todas as espécies de equinodermes, mas existem outros que são exclusivos apenas de algumas. A distribuição dos coelomócitos é muito

dinâmica, alterando de acordo com a fisiologia ou com o estado imunitário do animal. Em ouriços-do-mar existem, em média, $7,5 \times 10^6$ coelomócitos por mililitro de fluido celômico, variando entre 3 a 20 μm de tamanho ⁽²²⁾. Em estrelas-do-mar mais de 90% dos coelomócitos existentes são do tipo fagócitos e amoebócitos. Coelomócitos do tipo fagócitos desempenham papéis tais como rejeição de tecidos, quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio, encapsulação, citotoxicidade, expressão de genes, aglutinação e coagulação. Os fagócitos são caracterizados pelo seu tamanho e morfologia, sendo esta classificação distinta para cada equinoderme. Os amoebócitos são caracterizados pela presença de vesículas no citoplasma, podendo apresentar pigmentação. Têm um tamanho que varia entre 8 a 20 μm e a sua distribuição varia substancialmente entre espécies. São frequentemente associados a atividade antibacteriana, resposta inflamatória, remodelação da matriz extracelular e processos de cicatrização ^(13,27).

Estudos realizados em *Asterias rubens* (estrela-do-mar comum europeia) mostraram que a agregação dos coelomócitos a partir de tecidos adjacentes tem uma elevada contribuição na reparação de tecidos. Por outro lado, a perda do fluido celômico afetava seriamente todas as funções fisiológicas ⁽²⁶⁾.

Outros estudos também realizados em *Asterias rubens*, com objetivo de investigar a atividade celular e bioquímica dos coelomócitos, evidenciaram a sua resposta a stress traumático por amputação do braço. A contagem de coelomócitos em circulação foi realizada ao longo do tempo entre as 0 e as 24 horas pós-amputação, tendo-se verificado um aumento da quantidade total de coelomócitos entre a primeira hora após-amputação e as seis horas seguintes. Os níveis de expressão da proteína Hsp70 também aumentaram simultaneamente com os coelomócitos em circulação ^(25, 26).

Em ouriços-do-mar foi evidenciado um aumento de coelomócitos do tipo amoebócitos e em semelhança ao descrito anteriormente, também foi observado um aumento de expressão da Hsp70, em resposta a stress traumático por ferimentos. As proteínas Hsp70 parecem estar também envolvidas na cicatrização e regeneração de tecidos. Estudos anteriores reportaram uma associação entre o aumento do número total de coelomócitos em resposta a ferimentos em simultâneo com indução de hipoxia ⁽¹³⁾.

Como em muitos outros organismos, posteriormente à amputação existe uma fase de cicatrização que, nos equinodermes, é mediada por coelomócitos. Estes migram até à zona lesada para prevenir o sangramento através da contração muscular e da interação com a matriz extracelular ⁽²⁸⁾. Vários trabalhos em regeneração reportaram a existência de acumulação de coelomócitos na zona inferior à

epiderme após amputação do braço, mas não a sua proliferação. O que sugere que a migração dos coelomócitos é recrutada não apenas para eventos de cicatrização, mas também para uma fase mais posterior, eventualmente na regeneração.^(13, 28)

Várias são as evidências da função dos coelomócitos na regeneração, no entanto as proteínas envolvidas ainda permanecem desconhecidas. Um estudo realizado anteriormente em estrelas do mar *M.glacialis* teve como objetivo caracterizar o proteoma dos coelomócitos nesta espécie, através da combinação de 1-DE e 2-DE PAGE acoplado com espectrometria de massa. Neste estudo foram identificadas 358 proteínas, nas quais 30% apresentaram homologia com outras espécies de equinodermes e 34% homologia com os cordados. As proteínas identificadas desempenham funções ao nível da reorganização da dinâmica do citoesqueleto, regulação da adesão celular, regulação da divisão celular, ciclo celular e apoptose, proteínas de transdução de sinal, regulação de tráfego/migração de células imunitárias, proteínas envolvidas na inflamação, proteínas de secreção vesicular e regulação da proliferação celular⁽²⁷⁾.

1.5. Proteômica em regeneração animal

Todos os processos celulares envolvem proteínas e por isso, a identificação das proteínas e a caracterização da sua atividade funcional tornam-se cada vez mais importantes para perceber os processos biológicos dos seres vivos. As abordagens em proteômica experimental baseiam-se na identificação de todas as proteínas de um tecido, para obtenção de informações relativamente a proteômica funcional, quantificação e identificação de proteínas diferencialmente expressas num tecido em condições distintas, identificação de interações entre proteínas e caracterização de alterações pós-tradução⁽⁸⁾.

Poucos são os estudos sobre proteínas envolvidas em processos de regeneração. A maior parte dos estudos de larga escala têm sido realizados principalmente por técnicas de transcriptômica ou genómica. No entanto sabe-se que os níveis de RNA mensageiro não correspondem necessariamente à mesma quantidade de proteína nas células, uma vez que os níveis de proteína são determinados por vários processos pós-transcrição a que o RNA é sujeito. Por estes motivos, técnicas como as de proteômica são de extrema importância, dado que permitem a quantificação relativa das proteínas. Neste trabalho foi utilizada uma abordagem proteômica conjunta com espectrometria de massa com o objectivo de perceber mais sobre os processos de regeneração em equinodermes, numa tentativa de explorar o proteoma diferencial das células mediadoras da resposta imune celular em *M.glacialis*⁽²⁹⁾.

1.5.1. Electroforese bidimensional (2-DE)

O princípio de separação 2-DE, tal como o nome indica consiste na separação de proteínas em duas dimensões distintas e independentes entre si. Na primeira dimensão da separação, designada por focagem isoeétrica (IEF), depende do ponto isoelectrico^d (*pI*) de cada proteína. Na segunda dimensão as proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular num gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. (Figura 6) O facto de se conseguir separar as proteínas por carga e por massa, permite ainda separar diferentes isoformas da mesma proteína, uma vez que proteínas com a mesma massa molecular podem ser separadas de acordo com o seu diferente ponto isoelectrico. Esta metodologia permite a separação de amostras complexas de proteínas, e numa única análise fornecer informações sobre a sua carga, abundância (acoplado com densitometria), localização, distribuição de isoformas e presença de alterações pós-tradução⁽³⁰⁾. Através desta técnica é possível detetar cerca de 600-2000 proteínas numa única amostra biológica com boa resolução⁽²⁹⁾.

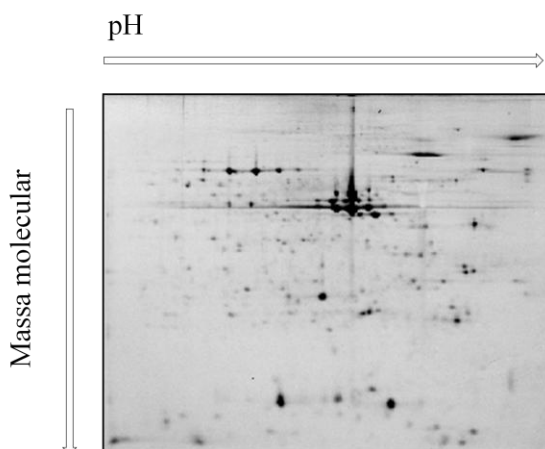


Figura 6 – Electroforese Bidimensional. A primeira dimensão, focagem isoeétrica (IEF), é dependente do ponto isoelectrico (*pI*) de cada proteína; a segunda dimensão consiste na separação das proteínas por massa molecular através de electroforese desnaturante, num gel de poliacrilamida.

No entanto, quando o estudo incide na determinação de proteínas diferencialmente expressas num conjunto de amostras expostas a diferentes condições, torna-se difícil usar 2-DE convencional, uma vez que esta metodologia só permite correr uma amostra por gel, a redundância e a falta de reprodutibilidade da técnica dificultam a análise diferencial⁽³²⁾.

Por outro lado, a elevada sensibilidade da técnica analítica DIGE simplifica o processo de análise de imagens de géis. Esta metodologia consiste num método de fluorescência, onde cada amostra é

^d Valor de pH no qual a carga da proteína é zero.

previamente marcada covalentemente com um conjunto de flúorocromos (Cy2, Cy3 e Cy5), o que permite a corrida de duas amostras e um padrão num único gel. Estruturalmente os três fluorócoros têm massas moleculares muito aproximadas (Cy2 - 550.6kDa, Cy3 - 582.8 kDa e Cy5 - 580kDa), mas diferentes máximos de absorção (480 nm, 540 nm e 620 nm, respetivamente) ⁽³¹⁾. Como são carregados positivamente, sofrem reações de substituição nucleofílica com os grupos amina das lisinas. A marcação das amostras com os flúorocromos ocorre em condições desnaturantes a um pH ótimo que varia entre 8.0-8.5. A reação de *quenching* de fluorescência ocorre através da saturação por excesso de aminas primárias provenientes da adição de lisina ⁽³³⁾. Após a marcação efetuada, quantidades iguais de proteína são submetidas a separação bidimensional seguida por deteção das proteínas por fluorescência. As imagens geradas são posteriormente alinhadas num software de forma a identificar proteínas com expressão diferencial nas diferentes condições estudadas.

Nesta abordagem é importante a presença de um controlo interno, formado a partir da mistura de todas as amostras a serem analisadas. O uso do padrão interno em cada gel compreende uma quantidade igual de cada uma das amostras e permite calcular rácios para o spot da proteína dentro do próprio gel e/ou entre géis. (Figura 7)

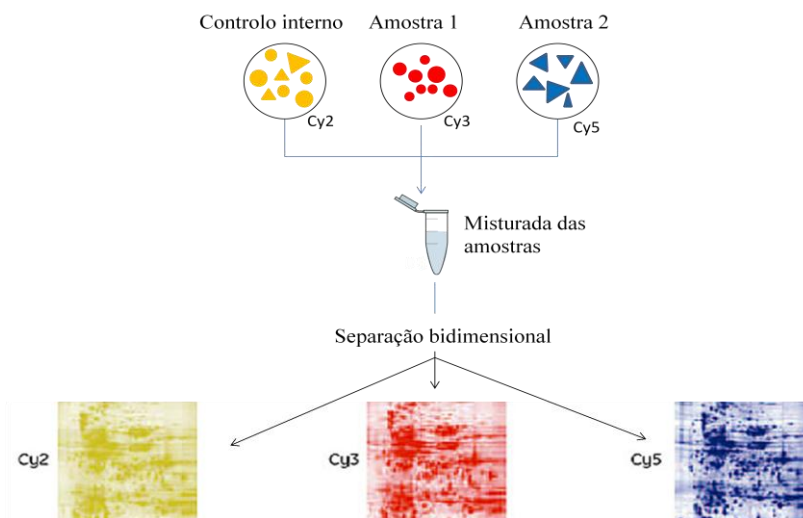


Figura 7 - Esquema representativo do protocolo 2-D DIGE (electroforese diferencial) para a marcação de 2 amostras diferentes e do controlo interno e respetiva separação bidimensional; esta técnica consiste num método de fluorescência, onde cada amostra é cova (imagem adaptada da referência 31)

1.5.2. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS) é um conjunto de metodologias que permitem a identificação e caracterização das proteínas em misturas complexas; o estudo de interações entre proteínas; e a identificação de proteomas de amostras biológicas, recorrendo a um espectrómetro de massa ⁽³⁴⁾. Este último utiliza um campo elétrico e magnético para exercer forças em partículas carregadas (iões) em vácuo. Desta forma, o composto deve ser ionizado ou ter carga de forma a possibilitar a sua análise pelo espectrómetro de massa. Além disso, os iões devem estar na fase gasosa, onde são separados de acordo com o seu rácio massa/carga (m/z). Esta razão m/z corresponde à divisão da massa, em escala atómica de cada ião, pela sua carga ⁽³⁵⁾. As proteínas são moléculas polares não voláteis, termicamente instáveis requerendo um método de ionização eficiente que transfira o analito para uma fase gasosa, sem provocar a degradação do mesmo. Portanto, o primeiro componente de um espectrómetro de massa é uma fonte de ionização que ioniza o composto a ser analisado. Seguindo-se a passagem pelo analisador de massa que mede a razão m/z do composto, e finalmente um detetor que regista o número de iões por cada valor de m/z . ^(29,36)

O método de ionização a ser utilizado, deve ser eficiente, sensível e “suave” o suficiente para ionizar mas não destruir o analito. Para proteínas, os métodos de ionização mais utilizados são uma fonte de *Electrospray* ou ionização através da interação com uma matriz, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)*. (Figura 8)



Figura 8 – MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) consiste num método de ionização, que utiliza uma fonte de luz laser que incide sobre uma matriz cristalizada composta pela amostra e por pequenas moléculas orgânicas.

MALDI consiste na irradiação de uma luz laser intensa, de elevada energia sobre uma amostra de moléculas. As proteínas e péptidos são incapazes de absorver este tipo de radiação por isso o laser incide sobre uma matriz cristalizada, que é composta pela amostra e por pequenas moléculas orgânicas, como ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico ou ácido dihidrobenzóico. A matriz absorve a energia proveniente da luz laser, ionizando as moléculas tanto da amostra como as da própria matriz. Os iões resultantes são posteriormente acelerados no analisador TOF-1 (Time-Of-Light), que mede o tempo de voo dos iões na presença de um campo elétrico ⁽³⁴⁾. O princípio do TOF-1 corresponde à fase onde os iões são separados pela sua razão massa/carga

através do tempo que levam a percorrer o analisador de massa, desde a fonte de ionização até ao

detetor. Todas as moléculas estão perante o mesmo campo elétrico e apresentam a mesma energia cinética. Durante o percurso as várias moléculas são separadas, moléculas mais pesadas levam mais tempo a percorrer o analisador de massa e moléculas mais leves percorrem-no mais rapidamente. Deste modo, cada molécula produz um sinal distinto que é usado para a deteção e caracterização das proteínas. Os resultados da análise são compilados num espectro MS. Num espectro MS, no eixo das abcissas está representada a escala m/z , e nas ordenadas o número relativo de iões que apresentam determinado valor m/z ⁽³⁶⁾.

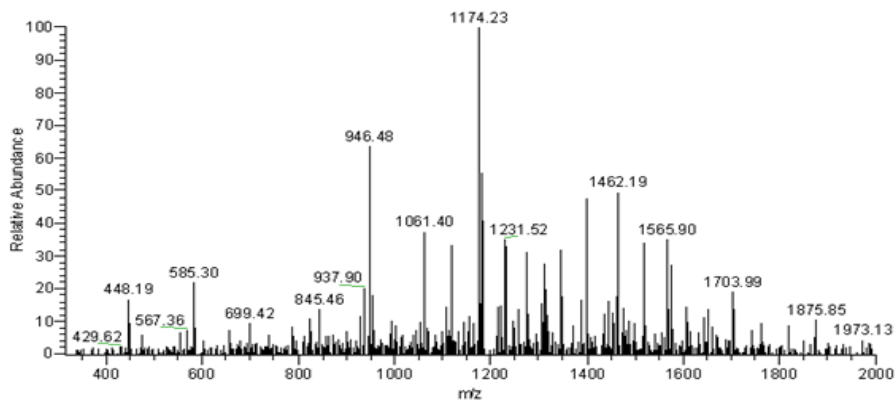


Figura 9 - Espectro MS/MS da fragmentação de um péptido. As proteínas são digeridas com tripsina e as massas dos péptidos resultantes identificados por MS. Posteriormente cada péptido é individualmente identificado através dos dados MS/MS. As massas teóricas dos péptidos presentes nas bases de dados são matched com a massa experimental obtida por MS associado a um erro experimental. Para cada péptido é esperado uma lista de fragmentos gerados por fragmentação dentro do analisador de massas.

Para obter informações adicionais quanto à sequência dos péptidos utiliza-se a abordagem MS/MS (Figura 9), onde normalmente são usados dois analisadores de massa em sequência TOF-1 e TOF-2. No modo MS/MS os precursoros iónicos mais intensos, resultante do modo MS, são fragmentados numa câmara de dissociação por colisão induzida (CID) através da colisão dos iões com gás atmosférico a alta pressão. As partículas geradas são reaceleradas no segundo analisador na presença de um campo elétrico e são separadas da mesma forma que ocorre no TOF-1, até chegarem ao detetor, onde é obtido o valor de m/z dos fragmentos resultantes ⁽³⁴⁾.

O procedimento experimental normalmente utilizado para estudos de proteômica diferencial de uma amostra biológica submetida a diferentes condições, está representado no esquema da figura 10.

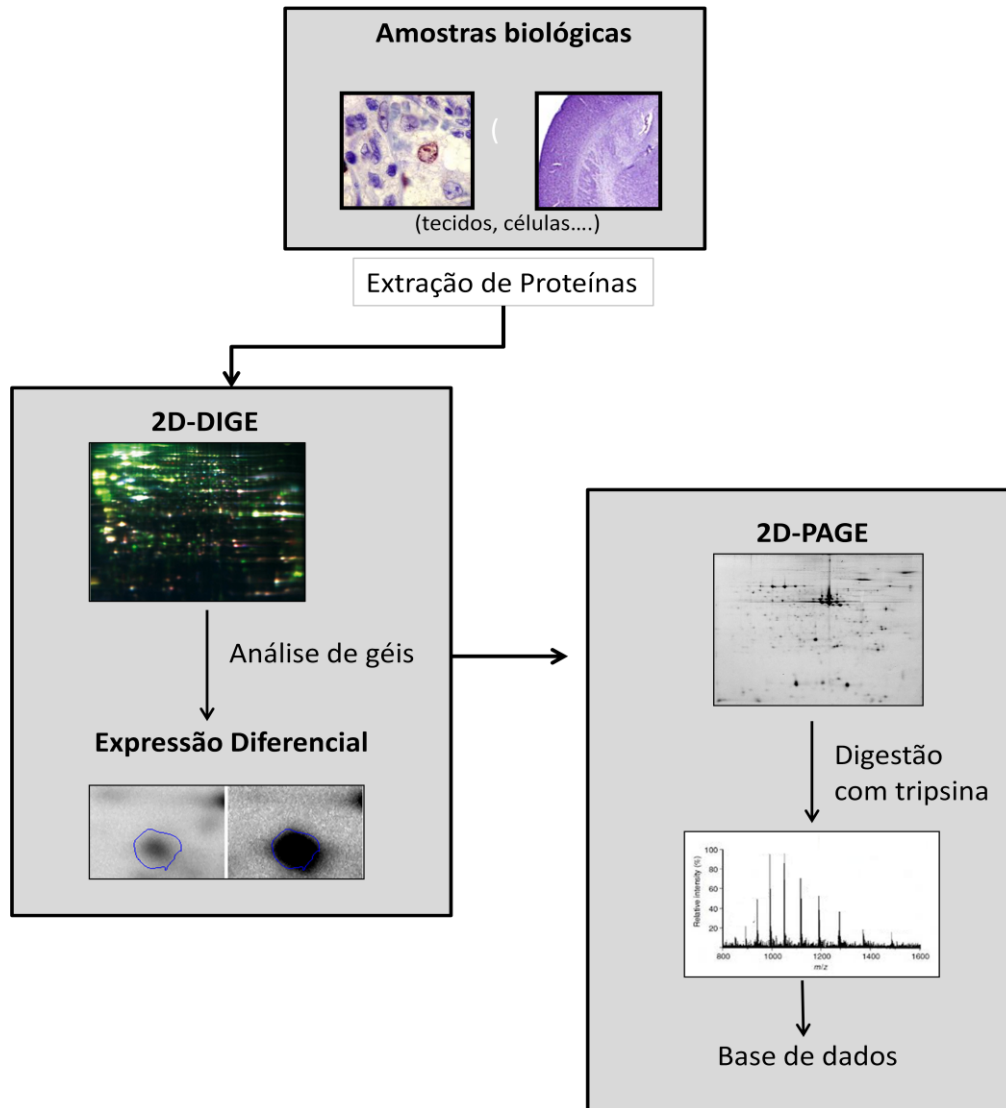


Figura 10 – Esquema experimental da metodologia utilizada neste estudo para determinar a expressão diferencial das proteínas dos coelomócitos submetidas a duas condições, regeneração e controlo. O estudo abrange duas fases distintas: 1) As proteínas são inicialmente extraídas das células e separadas por DIGE para análise diferencial, onde são selecionadas as proteínas de interesse diferencialmente expressas. 2) As proteínas são extraídas das células para separação bidimensional convencional e excisão dos spots que na fase 1) foram selecionados como diferencialmente expressos. Estes spots são digeridos (digestão triptica) e analisados por espectrometria de massa para identificação. A identificação é realizada por homologia recorrendo a bases de dados de sequências de proteínas.

2. Objetivo

Este estudo visa contribuir para um melhor conhecimento das proteínas envolvidas nos processos de regeneração em equinodermes, avaliando a expressão diferencial do proteoma dos coelomócitos, células mediadoras do sistema imunitário nestes animais. A análise de diferentes fases de regeneração, 48 horas, 13 dias e 10 semanas após amputação do braço da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*, permite entender qual o papel dos coelomócitos ao longo deste processo biológico, e em que fases é significativa a sua contribuição (fase inicial de cicatrização, no início ou manutenção da regeneração). Para tal as proteínas extraídas dos coelomócitos foram separadas e analisadas através da metodologia DIGE de forma a selecionar as proteínas que apresentam expressão diferencial. Posteriormente, as proteínas de interesse foram identificadas por espectrometria de massa usando um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF.

3. Material e Métodos

3.1. Captura e manipulação dos animais

As estrelas-do-mar utilizadas no estudo foram capturadas na costa do Estoril (Concelho de Cascais) durante o inverno, e mantidas em cativeiro num sistema de tanques com água em recirculação permanente, mantida a uma temperatura 15°C e com salinidade de 33‰, proporcionado pelo aquário Vasco da Gama (Dafundo, Oeiras). Os animais foram alimentados com moluscos recolhidos semanalmente no mesmo local da captura das estrelas-do-mar. Foram todos mantidos no mesmo tanque, mas fisicamente individualizados de forma a criar 3 grupos distintos, para manter as mesmas condições ambientais tanto para os animais controlo como para os animais testados. Cada divisória representava uma condição de estudo. (48 horas, 13 dias e 10 semanas pós-amputação da ponta do braço). Cada divisória continha 12 animais, 6 controlos (animais nos quais não foi induzida a regeneração) e 6 animais em regeneração, de acordo com a figura 11. A regeneração foi induzida a partir da amputação da ponta de um único braço e o fluido celómico recolhido nos tempos mencionados.



Figura 11 - Esquema experimental para o tratamento dos animais para o estudo. Cada divisória representa uma fase de regeneração do estudo. Divisória A: animais controlo e regeneração correspondentes à primeira fase de regeneração (48 horas após-amputação); Divisória B: animais controlos e animais em regeneração correspondentes à segunda fase de regeneração (13 dias após-amputação); Finalmente, a divisória C, animais controlos e animais em regeneração, correspondentes à terceira fase de regeneração estudada (10 semanas após-amputação). Cada tempo de regeneração estudado teve os seus próprios controlos.

3.2. Recolha do Fluido Celómico e isolamento dos coelomócitos

A recolha do fluido celómico foi realizado através da perfuração da epiderme da ponta do braços das estrelas com uma agulha, e deixado fluir por gravidade para dentro de um recipiente mantido em gelo, contendo uma mistura de inibidores de proteases para prevenir a proteólise endógena. Seguiu-se

um passo de centrifugação a 800g, a 4°C durante 20 minutos para separar o fluido celómico em duas frações, componentes celulares e componentes não-celulares. Após centrifugação o pellet, contendo os coelomócitos, foi congelado com azoto líquido e preservado a -80°C até à sua utilização no presente estudo.

3.3. Extração de Proteínas

Foram testados vários métodos de forma a maximizar a quantidade de proteína extraída das amostras em questão, tais como o uso do microdesmembranador (Sartorius), extração com homogeneizador manual, extração simples com tampão, e finalmente, extração por sonicação. O método escolhido para extração das proteínas dos coelomócitos foi sonicação com sonda diretamente inserida na amostra (figura 12). O método de disrupção celular através de ultrassons é frequentemente usado para destruir as membranas celulares e libertar todos os componentes contidos no seu interior. Este método usa a energia dos ultrassons para provocar agitação das partículas da membrana celular de forma a quebrar as interações intermoleculares. A frequência adequada para a disrupção celular sem causar danos para as células é 25 kHz. O tempo de exposição das células aos ultrassons e a sua intensidade depende do tipo de células, da quantidade de amostra e da concentração celular ^(37,38).

Os coelomócitos foram suspensos em tampão (7M Ureia, 2M Tioreia, 30mM Tris, 4% (m/v) CHAPS, pH 8.5). O volume de tampão adicionado às amostras foi calculado de acordo com a massa celular presente em cada tubo, de forma a obterem-se as mesmas concentrações em todos os replicados biológicos e com isso maior reprodutibilidade durante o método de extração. A suspensão celular foi submetida a sonicação através da sonda Sonifier W-450D (Brason), com emissão ultrassónica de 10% de amplitude, emitida de forma cíclica com curtos pulsos de vibrações (Tempo ON de ultrassons: 5 segundos; Tempo OFF de ultrassons: 10 segundos; tempo total: 50 segundos).

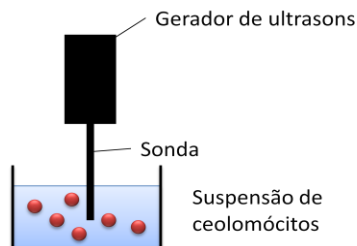


Figura 12 - Modelo de Sonicação utilizado para a extração de proteínas. Sonda ultrassónica inserida diretamente na suspensão de coelomócitos.

3.4. Quantificação de Proteínas

Em electroforese de proteínas é importante a quantificação reprodutível de proteína total, para se carregar em diferentes géis a mesma quantidade de proteína, principalmente se tivermos perante proteómica diferencial. Os métodos de quantificação utilizados usualmente incluem a determinação da absorvância a 280 nm, métodos colorimétricos e métodos de fluorescência⁽³⁹⁾.

A escolha de método de quantificação apropriado depende da preparação da amostra, especialmente da composição do seu tampão de extração/lise celular. É importante notar que o tampão frequentemente utilizado para solubilizar as proteínas em análise 2DE, contém substâncias que interferem com a maioria dos métodos de quantificação, tais como ureia e tioreia, e por isso, o mais utilizado são métodos baseados em reações de redução do cobre ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$). No entanto, esses métodos são dispendiosos e exigem grande quantidade de amostra para quantificação⁽⁴⁰⁾. Neste trabalho foi desenvolvido um método de quantificação de proteínas usando as capacidades do espectrofotómetro NanodropTM 2000c (ThermoScientific), através de um método modificado de absorção a 280 (A280). A utilização desta metodologia, apesar do seu baixo limite de deteção, (mínimo quantificável 3 µg/µl) permitiu quantificar amostras padrão (BSA e β-caseína) com 2 µl de volume com boa exatidão e reprodutibilidade, combinando as propriedades da tensão superficial dos líquidos com as propriedades da fibra ótica. (Anexo 1)

As amostras padrão foram preparadas em 3 replicados do mesmo volume, e seguidamente submetidas a um passo de precipitação (1h30 a 4°C) com uma solução de 22% (v/v) TCA e 0.14% (v/v) beta-mercaptoetanol. Seguiu-se um passo de centrifugação (20minuts; 21000 g a 4°C), remoção de sobrenadante e conservação do pellet. Procedeu-se à lavagem do pellet com acetona e à secagem das amostras no *speed vac* para remoção dos resíduos de acetona. No final foi adicionada uma solução de solubilização (1% (m/v) SDS e 1M NaOH). A absorvância das amostras foi determinada no espectrofotómetro Nanodrop, no comprimento de onda 280 nm, no modo *Protein A280*, padrão BSA. No entanto, o método mostrou ter uma fraca reprodutibilidade para esta amostra, eventualmente devido à presença de interferentes não proteicos para o comprimento de onda utilizado.

Devido à elevada sensibilidade da metodologia DIGE o método utilizado neste trabalho foi a quantificação com o 2D Quant kit (GE Healthcare). As quantificações foram avaliadas qualitativamente através de separação num gel de SDS-PAGE.

3.5. Separação de Proteínas

3.5.1. SDS-PAGE

Para a separação das proteínas foram usados géis de 7 cm de poliacrilamida em condições desnaturantes (12.5% (v/v) acrilamida, 1.5M Tris-HCl, 10% (m/v) SDS, 10% (m/v) persulfato de amónio, 0.5% (m/v) TEMED). Em cada poço do gel foi carregada a quantidade de amostra correspondente a 20µg de proteína total em tampão (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8; 20%(v/v) glicerol; azul bromofenol). Para estabelecimento do gradiente elétrico foi usado tampão (25mM Tris, 0.19M glicina, 0.1% (m/v) SDS, pH 8) a 50V durante 30minutos, e a 150V durante 1hora, numa tina de electroforese (Bio-rad) até o azul de bromofenol atingir a extremidade inferior do gel. O método utilizado para a coloração dos géis foi o *Colloidal Coomassie Brilliant Blue*, que consiste num passo de fixação das proteínas no gel através de incubação numa solução com 50% (v/v) etanol, 2,55% (v/v) ácido ortofosfórico, durante 18horas. Posteriormente uma pré-incubação em solução 24% (v/v) metanol, 17% (m/v) sulfato de amónio e 2.55% (v/v) ácido ortofostórico, durante 1hora. Por fim, as proteínas foram coradas com *Coomassie brilliant blue* (350g/l Coomassie G-250) aproximadamente 48horas. Subsequentemente procedeu-se à descoloração dos géis, lavados três a quatro vezes em água bidestilada para remover o fundo azul adquirido durante a coloração.

3.5.2. Electroforese bidimensional (2-DE)

Os extratos proteicos de coelomócitos foram submetidos a separação bidimensional (2-DE). A focagem isoeletrica das proteínas foi realizada num sistema IPGphor III (GE Healthcare). Para otimização dos parâmetros IEF, foram inicialmente utilizadas tiras de 7cm, pH 3-10 (Immobiline Dry Strips, GE Healthcare), carregadas com 60 µg de proteína, em tampão de rehidratação (8M ureia, 4% (m/v) CHAPS, 50mM DTE, tampão IPG 3-10) com um volume final de 125 µl. Nesta fase, foram testadas várias concentrações de anfólitos (0,5%; 0,75%; 1%) para otimização do processo de separação. As tiras foram cobertas com *DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare) para manter a tira hidratada. O processo de rehidratação adotado foi o de rehidratação ativa durante 18horas a 30V. (Tabela 1) Posteriormente, o programa de primeira dimensão atingiu os 18 kWh totais.

A preparação das proteínas para a segunda dimensão, foi realizada através do equilíbrio das tiras em 6M Ureia, 2% (m/v) SDS, 50mM Tris pH 8.8, 0.02% (m/v) azul bromofenol, 30% glicerol contendo 2%(m/v) DTE para redução dos pontes persulfureto (15 min, agitação suave, temperatura

ambiente) e posteriormente com 3% (m/v) iodocetaminda de forma a evitar restabelecimento dessas ligações através de conversão química irreversível dos grupos tiol na cadeia lateral das cisteínas (15 min, agitação suave, no escuro e à temperatura ambiente). A separação das proteínas em SDS-PAGE (2º dimensão) foi realizada nas mesmas condições que no ponto 3.5.1.

Passo	Modo	Voltagem (V)	Voltagem total (Vh)	Tempo (h)
1	Step “n” hold	100 V	600	-
2	Step “n” hold	150 V	300	-
3	Step “n” hold	300V	600	-
4	Step “n” hold	1000V	2000	-
5	Gradiente	3000V	-	1:00
6	Step “n” hold	3000V	12000	

Tabela 1 – Programa de focagem isoeleétrica utilizado para tiras 7cm, no sistema IPGphor.

Posteriormente foi realizada electroforese bidimensional com tiras de 24cm pH 3-10 (Immobiline Dry Strips, GE Healthcare) para se obter uma melhor resolução das proteínas nos géis, carregados com 600 µg de proteína, 0.5% (v/v) anfólitos (GE Healthcare) em tampão de rehidratação, num volume final 450µl. Neste ensaio foram executados três géis, utilizando tampão de rehidratação variando as concentrações de DTE (13mM DTE e outro com 50mM DTE) e outro gel com DeStreak (Ge Healthcare), com o objetivo otimizar a resolução das proteínas. As tiras foram cobertas por DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) nos sarcófagos.

Numa segunda fase, foram utilizadas tiras de 24cm pH 4-7 (Immobiline Dry Strips, GE Healthcare) devido à prevalência de spots na zona ácida dos géis obtidos nos ensaios preliminares. Foram carregados igualmente 600 µg de proteína em tampão de rehidratação (8 M Ureia, 4% (m/v) CHAPS, 50mM DTE, 0.5% (v/v) tampão IPG 4-7). O programa de focagem isoeleétrica utilizado para as tiras de 24 cm está apresentado na tabela 2. O programa atingiu os 90 kVh totais.

Passo	Modo	Voltagem (V)	Voltagem total (Vh)	Tempo (h)
1	Step "n" hold	150	600	-
2	Step "n" hold	500	1250	-
3	Gradiente	1000	-	1:30
4	Gradiente	3500	-	2:30
5	Step "n" hold	3500	5000	-
6	Gradiente	5000	-	1:00
7	Step "n" hold	5000	5000	-
8	Gradiente	8000	-	2:00
9	Step "n" hold	8000	48200	-

Tabela 2 - Protocolo IEF, para tira 24cm géis preparativos

Procedeu-se ao equilíbrio das tiras com solução de equilibração como descrito anteriormente para tiras de 7cm. A segunda dimensão para os géis de 24 cm foi realizada em géis de poliácridamida (12.5% (m/v) acrilamida, 1.5M Tris-HCl, 10% (m/v) SDS, 10% (m/v) APS, 10% (v/v) Temed) numa tina de electroforese Ettan Dalt SIX (GE Healthcare). Foi utilizada solução de agarose (25mM Tris, 19mM Glicina, 0.1% (m/v) SDS, azul bromofenol) para selar as tiras e mantê-las em contato com o gel. A segunda dimensão ocorreu nas seguintes condições: 10 mA/gel, 80V, 1W/gel durante 1hora; 38mA/gel, 500 V, 13W/gel durante 5horas. Para estabelecer um gradiente elétrico durante a corrida utilizou-se tampão (25mM Tris, 0.19M glicina, 0.1% (m/v) SDS, pH 8.0) na câmara externa e o tampão (50mM Tris, 0.38M glicina; 0.2% (m/v) SDS, pH 8.0) na câmara interna. A tina de electroforese foi mantida refrigerada de forma a manter constante a temperatura de 25°C durante a corrida. A coloração dos géis foi efetuada da mesma forma descrita no ponto 3.5.1.

3.5.3. Eletroforese diferencial (2-D DIGE)

Preparação das amostras para marcação

Antes de fazer a marcação das amostras foi verificado o seu pH, que deve estar ajustado entre pH 8.0 e 8.5. Para as amostras em estudo não houve necessidade de efetuar o respetivo ajuste porque todos os replicados compreendiam esse intervalo de pH. Fez-se a diluição das amostras à concentração mínima quantificada (8,0 µg/µl), uma vez que o valor de concentração máximo para o protocolo de marcação com DIGE é 10 µg/µl. As amostras foram manuseadas na camara fria (4°C) sempre mantidas em gelo, de forma a manter a integridade de todas as proteínas e reduzir o máximo a atividade das protéases.

Controlos internos e desenho experimental

Preparam-se três controlos internos, com o pool de todos os replicados biológicos, cada um correspondente a uma fase de regeneração em estudo. Para o *pool* dos controlos internos foi utilizada quantidade de proteína igual de cada replicado biológico. As amostras (cada replicado biológico com 50 µg de proteína) foram marcadas com os *Fluor minimal Dyes* de acordo com a tabela 3. Utilizou-se os Cy3 e Cy5 para marcação das amostras individuais, e o Cy2 para marcação dos controlos internos, numa concentração de 400pmol por 50ug de proteína. Após adição dos CyDye, incubou-se no escuro durante 30 minutos em gelo. Posteriormente, adicionou-se de 1µl de 10mM de Lisina durante 10minutos, deixado em gelo no escuro.

N.ºgéis	Cy2	Cy3	Cy5
1	pool 1	H1	CNT2
2	Pool 1	CNT1	H3
3	pool 1	H2	H5
4	pool 1	CNT4	H6
5	pool 1	CNT3	CNT6
6	pool 1	H4	CNT5
7	pool 2	CNT12	D2
8	pool 2	D1	CNT9
9	pool 2	CNT10	CNT7
10	Pool 2	D3	D5
11	pool 2	CNT11	D4
12	pool 2	D6	CNT8
13	pool 3	S1	S6
14	pool 3	CNT14	S3
15	pool 3	S2	CNT18
16	pool 3	CNT13	CNT17
17	pool 3	CNT16	S7
18	pool 3	S4	CNT15

Tabela 3 - Desenho experimental análises 2-D DIGE das amostras de coelomócitos em regeneração (H1-H6; D1-D6, S1-S6) e controlo (CNT1-CNT18). A letra H corresponde as amostras recolhidas do fluido celómico 48H pós-amputação; Letra D corresponde as amostras recolhidas 13 dias pós-amputação; Letra S corresponde às amostras recolhidas 10 semanas pós-amputação. O *pool* 1, 2 e 3 corresponde aos controlos internos para as várias condições (48 horas, 13 dias e 10 semanas, respetivamente)

Multiplexing das amostras marcadas

Procedeu-se à mistura das amostras a correr em cada gel (150 µg total) marcadas com os três fluorocromos (Cy2, Cy3 e Cy5) de acordo com o desenho experimental da tabela 3. Adicionou-se às amostras o tampão (8M Ureia, 4% (m/v) CHAPS, 130mM DTE, 1% (v/v) tampão IPG 4-7) na razão de 1:1 amostra/tampão e, posteriormente adicionou-se o tampão de rehidratação (8 M Ureia, 4% (m/v) CHAPS, 50mM DTE, 0.5% (v/v) tampão IPG 4-7) até perfazer 450 µl. As amostras foram centrifugadas antes da aplicação nos sarcófagos (5 min; 10 000 x g). Usou-se *DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare) para cobrir as tiras nos sarcófagos. A focagem isoeétrica decorreu segundo o programa apresentado na tabela 4 perfazendo 85800 Vh totais. (Tabela 4)

Step	Modo	Voltagem (V)	Voltagem final (Vh)	Hora (h)
1	Step “n” hold	150	75	-
2	Step “n” hold	250	750	-
3	Gradiente	1000	-	3:00
4	Step “n” hold	1000	3000	-
5	Gradiente	4000	-	3:00
6	Step “n” hold	4000	12000	-
7	Gradiente	8000	-	2:00
8	Step “n” hold	8000	48200	-

Tabela 4 - Programa de focagem isoeétrica utilizado para o ensaio DIGE

Após a corrida da primeira dimensão as proteínas foram alquiladas e reduzidas da forma descrita no ponto 3.5.2.

A segunda dimensão foi realizada com vidros de baixa fluorescência de 1mm (GE Healthcare), em géis de poliacrilamida (12.5% acrilamida, 1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 10% TEMED, 10% Amónio Persulfato), e as tiras seladas com solução de agarose. A corrida decorreu durante 1hora a 80 V, 1 W/Gel, 12 mA/Gel e posteriormente durante 14 horas a 150 V, 12 mA/gel, 2 W/gel.

3.5.4. Aquisição de Imagem e Análise de géis

As imagens dos géis analíticos DIGE foram obtidas utilizando um scanner equipado com 3 lasers de comprimentos de onda distintos (FLA-5100; GE), com resolução 100 µm. A digitalização foi efetuada a 532 nm e 635 nm de excitação (duplo-filtro DGR1) para o Cy3 e Cy5, respetivamente

e 473 nm de excitação para o Cy2 (filtro LBP). A análise da expressão diferencial das proteínas nos géis foi realizada através do software Progenesis SameSpots versão 3.3.1 (NonLinear Dynamics). Todas as imagens foram alinhadas relativamente ao controlo interno de referência (correspondente à imagem mais representativa do conjunto de géis analisado). Fez-se a deteção e a avaliação dos spots selecionados, e posteriormente a separação das imagens por grupos de acordo com as duas condições em estudo, grupo controlo (CNT) e grupo regeneração (RGN). As alterações significativas na abundância das proteínas (a partir da área e intensidade dos spots) foram analisadas através de vários critérios estatísticos disponíveis no software. A análise da variância estatística (ANOVA), onde foi estabelecido um score *p-value* máximo de 0.05, a fim de comparar os spots agrupados nos vários replicados biológicos e detetar variações entre eles. O valor de Fold mínimo foi 1.5, que corresponde à razão das intensidades do mesmo spot em duas condições diferentes. O número de replicados biológicos necessários para excluir a variabilidade inter-individual foi dado pelo valor do *power analysis*, que para este caso foi estabelecido como 0,5. Por fim, foi realizada a análise PCA (*Principle Component Analysis*) que procurou analisar a distribuição dos replicados biológicos, controlo e regeneração, avaliando a sua correlação.

As imagens dos géis corados com coomassie foram adquiridas através do scanner-laser (FLA-5100; GE), ao comprimento de onda 532 nm (filtro LPFR) com uma resolução 100µm.

3.6. Análise por espectrometria de massa

Após análise das imagens dos géis DIGE, fez-se uma listagem dos spots de interesse e seguiu-se para a preparação dos géis com coloração de *coomassie colloidal* para a excisão dos spots diferencialmente expressos. Os spots selecionados foram excisados e descorados com 50% (v/v) acetonitrilo (ACN). Posteriormente, adicionou-se 100% (v/v) ACN para desidratação dos spots e procedeu-se à sua secagem em vácuo durante aproximadamente 20 minutos. A digestão de proteínas em gel foi realizada através da adição de 20 µl de 6.7 ng/ul tripsina (Promega) em 50mM NH₄CO₃. Os spots incubados em solução de tripsina absorveram a protease durante 30 minutos em gelo, para a ocorrência de infiltração no gel. Após 30 min de incubação foi removida a tripsina e em excesso adicionado o tampão de digestão 20-40 µl de 50mM NH₄CO₃ (de modo a cobrir os spots na totalidade) e manteve-se em incubação durante 16h-18h a 37°C, temperatura ideal de digestão. Para inibir a ação da tripsina e evitar proteólise, adicionou-se 5% (v/v) de ácido fórmico (AF). O digerido

foi concentrado e filtrado em microcolunas (GELoader tip, Eppendorf) com resina C18, indicadas para péptidos. As microcolunas foram lavadas com 5% (v/v) AF. Os péptidos foram eluídos sobre a placa MALDI com 0.6 µl de solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 5gL⁻¹ em 50% (v/v) acetonitrilo).

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos através do espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF 4800 *plus* (ABI SCIEX). Os dados MS foram adquiridos em modo reflexão positivo. A calibração do instrumento foi efetuada utilizando uma mistura de péptidos, *PepMix1* (LaserBio Labs) antes da aquisição dos espectros. Cada espectro MS foi recolhido no intervalo 850-4000Da com uma intensidade de laser fixa 3200V (720 shots laser por amostra). Os quinze iões mais intensos foram selecionados para fragmentação MS/MS, sendo a fragmentação de acordo com a intensidade dos percursos (iões mais intensos são fragmentados primeiro e assim sucessivamente). Os dados MS/MS foram adquiridos através da técnica de fragmentação CID, no qual os iões são fragmentados por colisão com ar atmosférico (energia de colisão 1kV) dentro de uma câmara de colisão a pressão de 1×10^6 torr. A intensidade laser fixa utilizada para MS/MS foi 4300V, onde foram obtidos 1400 espectros por amostra. Adicionalmente fez-se uma lista de exclusão de forma a impedir a fragmentação de *m/z* correspondentes aos péptidos resultantes de autólise^e da tripsina. O processamento dos espectros MS e MS/MS foram executados através software 4000 Series ExplorerTM (Applied Biosystems).

3.7. Identificação de Proteínas

Como o genoma da estrela-do-mar *M. glacialis* não está sequenciado, a identificação das proteínas dos coelomócitos foi realizada por homologia utilizando bases de dados de sequências de proteínas gerais e de ouriço-do-mar. A identificação de proteínas foi realizada usando três algoritmos de busca diferentes, MOWSE (através do MASCOT), o Paragon (através do ProteinPilot), o PEAKS DB (através do PEAKS para busca normal) e PEAKS denovo (através do PEAKS para busca *de Novo*), na tentativa de identificar todas as proteínas diferencialmente expressas. As buscas foram realizadas em diferentes bases de dados de proteínas: NCBIInr (atualizada: 2012-07; 18962629 sequências; 6499263859 resíduos), *S.purpuratus* (atualizada: 2012; 22709 sequências; 12419887 resíduos) e SwissProt concatenada com a *S.purpuratus* (atualizada: 2011-01; 566840 sequências;

^e Processo no qual a proteína se autodestrói espontaneamente

203332110 resíduos). Na figura 13 está representado o fluxograma com do procedimento adotado para a identificação das proteínas de interesse utilizando os vários algoritmos, e as várias bases de dados.

A busca no MASCOT foi efetuada de dois modos: 1) utilizando os dados de MS e MS/MS; 2) usando apenas os dados de MS/MS. A tolerância utilizada para MS (*peptide mass tolerance*) foi de 50 ppm, e a tolerância para MS/MS (*fragment mass tolerance*) foi de 0.3 Da. Consideraram-se modificações fixas e variáveis, a carbometilação das cisteínas e oxidação das metioninas, respetivamente. Os péptidos apenas foram considerados se o score obtido indicasse extensa homologia ($p < 0.05$).

O Paragon utiliza apenas os dados de MS/MS. A busca foi efetuada sem restrições e de acordo com os seguintes parâmetros: alquilação das cisteínas com iodocetamida; gel-based ID; desnaturação com ureia; modificações biológicas e substituição de aminoácidos. Os péptidos foram considerados quando o *p-value* < 0.05 .

O PEAKS foi utilizado principalmente para fazer busca *de novo*, mas também para busca convencional. Os parâmetros usados incluíram uma *peptide tolerance* de 30 ppm e *fragment tolerance* de 0.3Da; Tripsina como protéase; modificações: carbometilação e oxidação. A sequenciação *de novo* utiliza uma abordagem computacional para deduzir a sequência ou sequência parcial de um péptido diretamente a partir do espectro de fragmentação MS/MS. Este método é essencial na identificação de proteínas quando os genomas ainda não estão sequenciados nas bases de dados.

A busca das funções biológicas das proteínas identificadas foi realizada através do *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para facilitar a interpretação dos dados, no casos em que o motor de busca apresentou identificações “*PREDICTED*”, foi realizado um BLAST da sequência da proteína através da aplicação BLAST2GO (<http://www.blast2go.de>), para determinar o grau de homologia com outras proteínas, bem como a família de proteínas e domínios conversados para confirmar a identificação. Fez-se também inspeção visual dos padrões de fragmentação (MS/MS) dos spots cuja identificação da proteína tenha sido atribuída utilizando apenas um péptido com confiança superior a 95%.

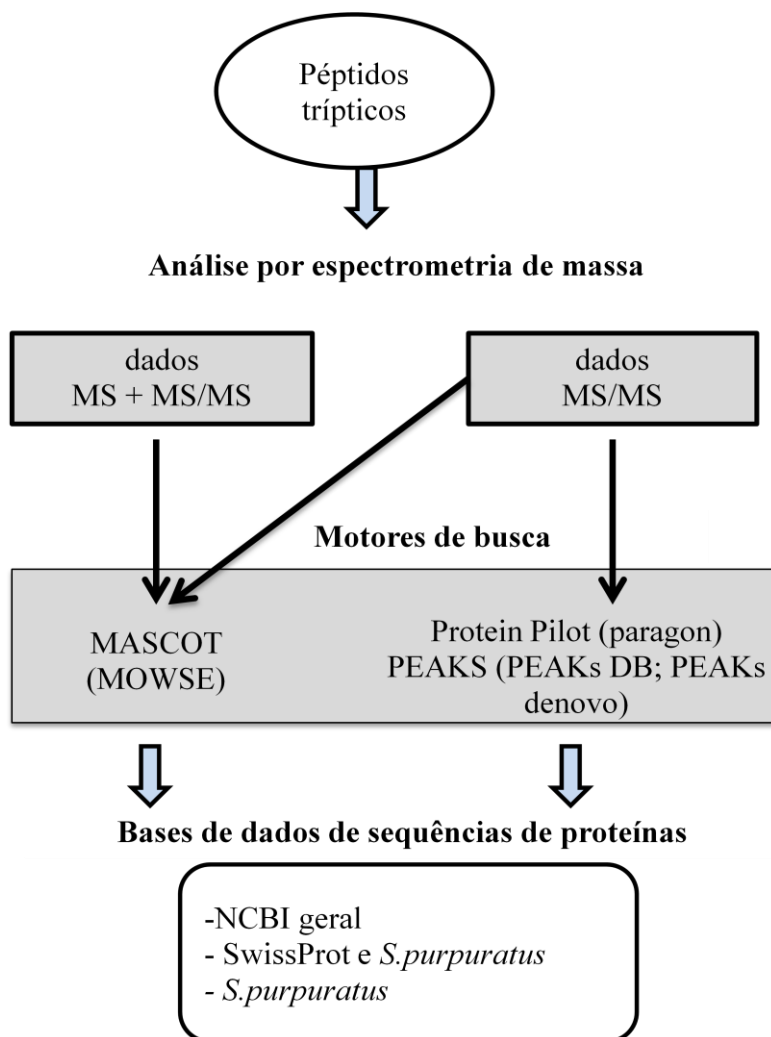


Figura 13 - O MASCOT foi o primeiro software a ser utilizado, no qual foi realizada uma busca utilizando os dados MS+MS/MS e posteriormente apenas os dados MS/MS. Utiliza as massas dos péptidos trípticos para identificar proteínas a partir da sobreposição de massas dos seus percursos iônicos (resultados da fragmentação dos péptidos) com as massas teóricas encontradas nas bases de dados de seqüências de proteínas; Posteriormente fez-se uma busca com o ProteinPilot para confirmar as identificações atribuídas pelo MASCOT e tentar identificar proteínas ainda sem identificação, este software utiliza apenas os dados de MS/MS para fazer a busca por homologia da seqüência de aminoácidos; Complementarmente fez-se identificação utilizando o software PEAKS, onde foi realizada essencialmente busca *De novo*, que deduz a seqüência de um péptido, ou parte dela, diretamente a partir do espectro de fragmentação MS/MS. (27,49)

4. Resultados

4.1. Otimização das condições de extração e quantificação de proteínas

Numa fase inicial, foram testados vários métodos de extração de proteína total. Inicialmente recorreu-se ao uso de extração simples, juntando tampão à massa celular, seguindo-se o uso do microdesmembranador, sonicação e homogeneização manual. Feita a electroforese bidimensional dos extratos proteicos obtidos pelos vários métodos, obtiveram-se os géis representados na figura 14. Não se realizou separação electroforética para as amostras extraídas com o microdesmembranador devido à perda de material biológico observado durante a extração. Observou-se uma maior intensidade e quantidade de spots nos géis com extração simples e por sonicação. Com o método de homogeneizador manual o gel apresentava menos spots, sugerindo alguma perda de material biológico ou má solubilização das proteínas.

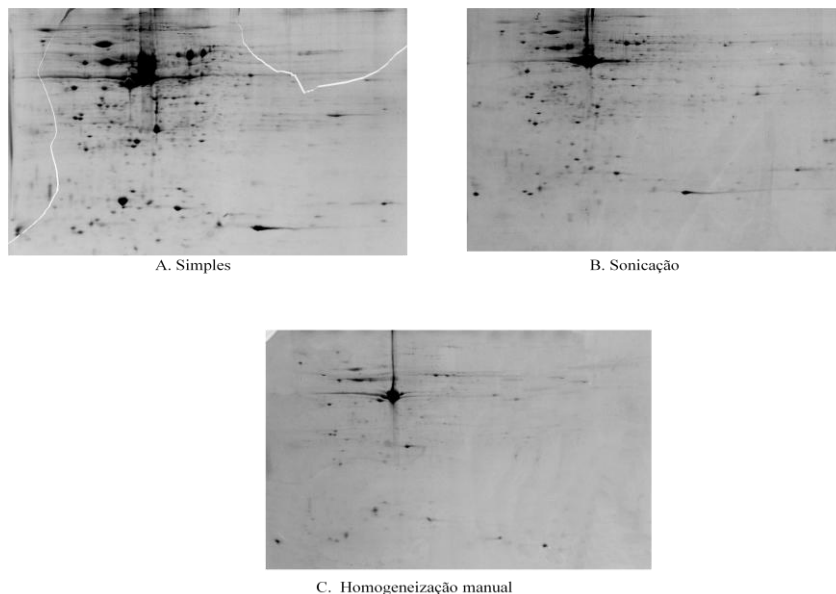


Figura 14 - Electroforese bidimensional de géis 24cm, pH 3-10 dos extratos proteicos obtidos pelos diferentes métodos de extração. A) Extratos proteicos obtidos a partir de extração simples; B) Extratos proteicos obtidos por sonicação; C) Extratos proteicos obtidos através do uso do homogeneizador manual;

Quando comparados o método de extração simples com o método de extração por sonicação através dos géis obtidos por 2-DE, foram observadas variações entre eles. No gel A, foram visíveis vários spots que não apareceram no gel B. Adicionalmente, no gel A foi também observado uma maior intensidade dos spots e arrastamento horizontal, o que não se verificou tão intenso no gel B. Dados estes resultados, fez-se a excisão de alguns spots e procedeu-se à sua identificação por MS (anexo 2). O resultado das identificações, mostrou a existência de eventos de proteólise ocorrida

durante a extração simples, pois a mesma proteína foi encontrada em várias zonas no gel A. No gel B, também se verificou esse efeito mas de forma mais reduzida. Dados estes resultados optou-se por fazer todas as extrações das amostras por sonicação, uma vez que o efeito proteolítico era reduzido e os géis apresentavam melhor resolução.

Posteriormente à otimização do método de extração procedeu-se à quantificação da proteína total nas amostras. O primeiro método de quantificação testado foi o de absorção a 280 (A280) modificado recorrendo ao Nanodrop. Os valores de quantificação obtidos foram avaliados qualitativamente através da separação dos extratos proteicos por SDS-PAGE, usando duas amostras diferentes (cada uma aplicada em triplicado). Cada poço foi carregado com 20 µg de proteína total. No gel resultante foram observadas variações notáveis na quantidade de proteína entre as duas amostras. Quando se comparou os replicados independentes da mesma amostras, as bandas mantinham a mesma intensidade. O método mostrou portanto ter baixa reprodutibilidade entre amostras diferentes. (Figura 15)

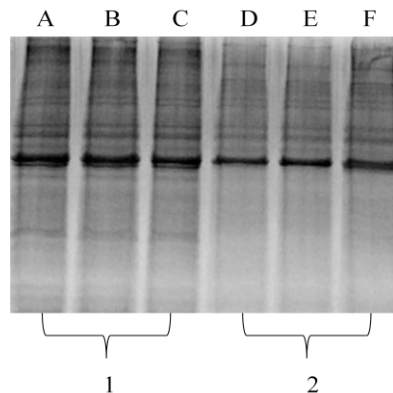


Figura 15 - SDS-PAGE de duas amostras de coelomócitos quantificadas pelo método A280 modificado. Amostra 1 (replicados A, B, C); Amostra 2 (replicados D, E, F). Os replicados de cada amostras foram preparados de forma independente. Cada poço foi carregado com 20µg de proteína total. A intensidade das bandas para as duas amostras é diferente. Concluiu-se então que o método apresenta baixa reprodutibilidade

Como o objetivo deste trabalho incidiu em proteómica diferencial optou-se pela quantificação usando o *kit* recomendado pela GE healthcare, 2D Quant kit. Para avaliar qualitativamente as quantificações de proteína total, realizou-se um gel SDS-PAGE, da mesma forma que no ensaio previamente descrito. Cada poço foi carregado com 20 µg de proteína total, e as intensidades das bandas observadas entre amostras foi similar. (Figura 16)

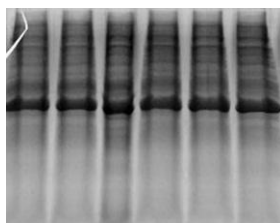


Figura 16 - SDS-PAGE das amostras de coelomócitos quantificadas pelo 2D Quant Kit. Cada poço corresponde a uma amostra independente carregado com 20 μg de proteína. Todas as bandas apresentaram intensidade semelhante.

Para o mesmo ensaio, após quantificação testou-se a estabilidade das amostras submetidas a várias descongelações, uma vez que eram muitos replicados biológicos, e as amostras não foram tratadas todas na mesma altura. Selecionaram-se duas amostras, amostra 1 (nunca congelada) e amostra 2 (descongelada uma vez), cada uma preparada com replicados independentes. Observou-se uma redução na intensidade das bandas na amostra previamente descongelada. Sugerindo a ocorrência de agregações ou proteólise em amostras que sofriam processo de descongelação. (Figura 17) Para evitar variabilidade na quantidade de proteína entre replicados, todas as amostras foram descongelados o mesmo número de vezes.

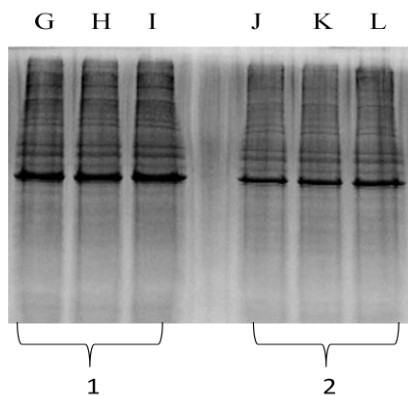


Figura 17 - SDS-PAGE de 2 amostras de coelomócitos independentes, cada poço foi carregado com 20 μg de proteína. Amostra 1 (replicados G, H, I) sem sofrer processos de descongelação; Amostra 2 (replicados J, K, L) descongelada 1 vez. As bandas da amostra 1 apresentam-se mais intensas que as bandas da amostra 2.

4.2. Otimização da separação de proteínas por IEF

Foi realizada electroforese bidimensional com tiras de 7cm utilizando diferentes percentagens de anfólitos na solução de rehidratação (0.50%, 0.75% e 1.00% anfólitos). Comparando as três condições observou-se que o gel com melhor resolução foi o que continha 0.50% anfólitos, tendo sido esta a concentração escolhida para os ensaios seguintes. Na figura 18 está representada a

imagem do gel com 0.50 % de anfólitos. As outras imagens não estão representadas devido à má qualidade de imagem que não permitiu uma boa visualização das diferenças entre os géis

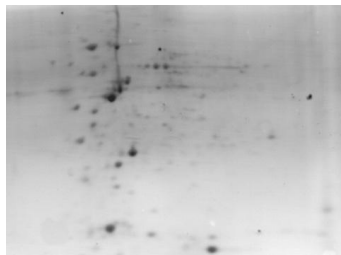
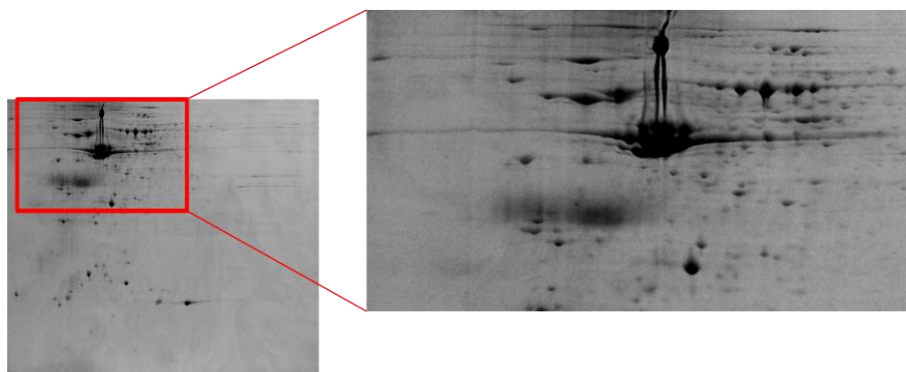
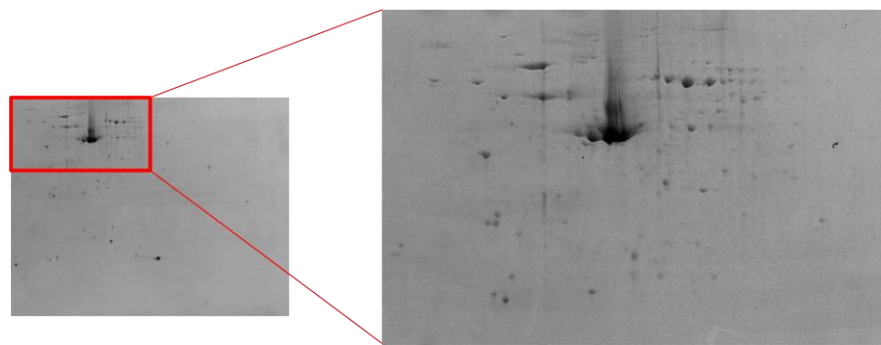


Figura 18 - Corrida 2DE, 7cm (pH 3-10), com 0.5% de anfólitos.

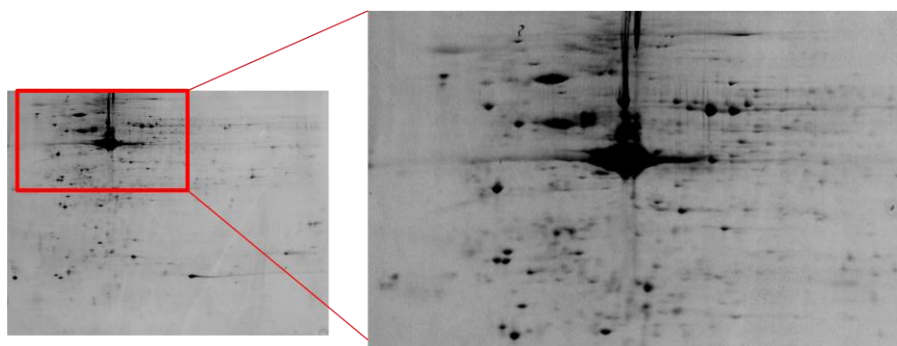
Para otimização da separação dos extratos proteicos em géis de 24 cm, foram testados vários programas de focagem isoeléctrica, variando a voltagem total e os gradientes, até chegar ao programa de IEF final mencionado no material e métodos. (anexo 3) Outro ponto que foi alvo de otimização foi a concentração de DTE na solução de rehidração. Além dos 50mM DTE utilizados para a preparação dos extratos proteicos, testou-se também a solução de rehidração com 13mM DTE e com DeStreak. (Figura 19)



A. DeStreak a substituir o DTE.



B. 13 mM DTE



C.

50mM DTE

Figura 19 - Electroferese bidimensional, géis de 24 cm, pH 3-10 com várias concentrações de DTE na solução da rehidração. A. Usou-se o DeStreak a substituir o DTE; B. Foi utilizada uma solução de rehidração com 13mM de DTE; C. foi utilizada uma solução de rehidração com 50mM DTE.

Na ausência de DTE, usando o DeStreak houve uma perda da resolução das proteínas, devido principalmente ao arrastamento horizontal verificado. Também se observou o desaparecimento de alguns spots em várias zonas do gel, quando comparado com a amostra contendo 50 mM DTE. No gel correspondente à amostra com 13mM de DTE foi observado a ausência da maioria dos spots, evidenciando perda de proteína, eventualmente devido a formação de agregados proteicos que não permitiu uma boa separação das proteínas durante a focagem isoelétrica. Dados os resultados obtidos, a concentração de DTE usada na solução de rehidração foi 50mM, onde os géis apresentaram mais spots, com melhor resolução e onde o arrastamento horizontal foi minimizado.

4.3. Proteínas diferencialmente expressas (2-D DIGE)

As condições utilizadas para a corrida dos géis DIGE foram baseadas nas otimizações do programa de focagem isoeétrica, mas como esta metodologia utiliza uma menor quantidade de proteína, fez-se alguns ajustes ao nível dos gradientes e na voltagem final do programa de focagem isoeétrica, e nas concentrações dos reagentes, de acordo com o protocolo já otimizado na referência 8. As alterações na expressão das proteínas nas duas condições, foram analisadas utilizando o software Progenesis SameSpots, e os critérios estatísticos calculados pelo mesmo. O que resultou, para cada fase de regeneração, numa lista de spots diferencialmente expressos.

Para as 48 horas após-amputação do braço, a análise estatística das intensidades detectou 55 spots com expressão diferencial entre o grupo de replicados CNT e o grupo de replicados RGN. Desta lista foi necessário fazer uma inspeção visual para discriminar os spots relevantes de eventuais impurezas e ruído de fundo, o que resultou apenas em 4 spots de interesse (458, 590, 940 e 1991). Através da tabela 5 (critérios mínimos considerados para avaliar as proteínas diferencialmente expressas) e do gráfico 1 (média dos volumes normalizada para cada spot), é possível observar que nesta primeira fase de regeneração, os spots 590, 940 e 1991 apresentaram uma expressão ligeiramente mais intensa no grupo RGN, já o spot 458 apresentou uma expressão mais intensa no grupo CNT. No entanto, a diferença entre a expressão de proteínas entre os dois grupos não foi muito significativa nesta fase da regeneração. A partir do gráfico 2, que representa a variação da expressão das proteínas para todos os replicados biológicos das 48 horas, foi notória a existência de variabilidade entre amostras na mesma condição, não sendo muito evidentes as diferenças entre o grupo CNT e o grupo RGN.

Tempos de estudo	Spot	Anova (p <0,05)	Fold > 1,5	power > 0,5	Volumes médios normalizados (VMN)	
					Grupo RGN	Grupo CNT
48 horas	458	0.037	1.7	0,582	0.962	1.621
	590	0.039	1.8	0,572	1.813	1.007
	940	0.025	1.6	0.662	1.295	0.792
	1991	0.030	1.7	0,625	1.258	0.729
13 dias	840	0.003	1.5	0.952	1.488	1.000
	894	0.016	1.6	0.757	1.617	1.041
	975	0.039	1.6	0.579	1.792	1.116

13 dias	991	0.047	1.7	0.540	1.974	1.181
	1137	8.821e-004	1.6	0.994	1.295	0.792
	1177	0.019	1.6	0.730	1.628	1.020
	2321	0.014	1.6	0.787	1.230	0.792
	2368	0.025	1.5	0.675	1.408	0.923
	3057	0.030	1.5	0.635	0.910	1.358
10 Semanas	621	0.024	1.9	0.680	0.785	1.473
	643	0.007	2	0.878	0.678	1.338
	668	0.004	2	0.934	0.553	1.110

Tabela 5 – Tabela contém os critérios estatísticos mínimos considerados para seleção dos spots diferencialmente expressos, e os respectivos volumes médios normalizados para todos os spots para cada condição do estudo, regeneração (RGN) e controlo (CNT), durante as três fases de regeneração.

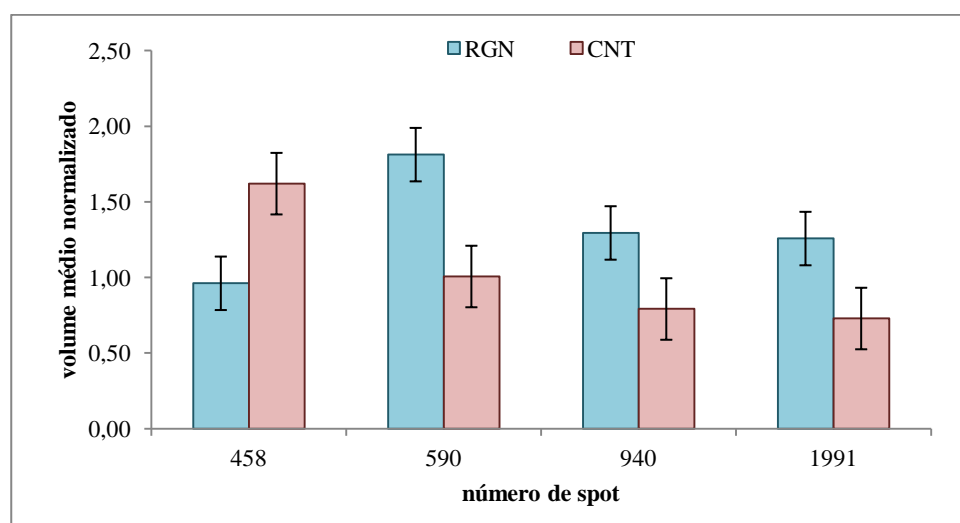


Gráfico 1 – O gráfico de barras mostra a expressão diferencial proteínas entre grupos controlo e regeneração na primeira fase de regeneração (48 horas após-amputação do braço) e respetivo erro-padrão associado.

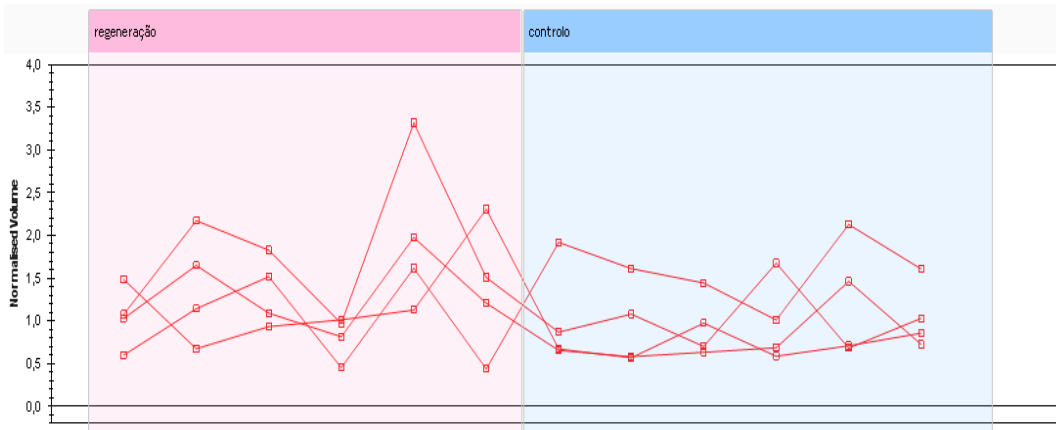


Gráfico 2 - Representação da variação da expressão das proteínas ao nível de todos os replicados biológicos das amostras recolhidas 48 horas pós-amputação do braço e respetivos controlos. Variabilidade entre indivíduos sujeitos à mesma condição é muito elevada. O gráfico nota-se, em alguns casos, uma expressão ligeiramente superior do grupo de regeneração.

Foi efetuada uma análise PCA (*Principal Component Analysis*) para determinar a existência de *outliers* (uma observação que é numericamente distante das outras) e a correlação entre os replicados biológicos dentro de cada grupo. (Gráfico 3) A análise PCA permitiu observar os dois grupos bastante diferenciados resultando de uma expressão diferencial entre amostras controlo e regeneração. Contudo, no grupo RGN foi visível muita variabilidade entre os replicados (pontos do gráfico muito dispersos entre si), já o grupo CNT apesar de apresentar maior homogeneidade quando comparado com o grupo RGN, ainda se pode observar variabilidade entre indivíduos.

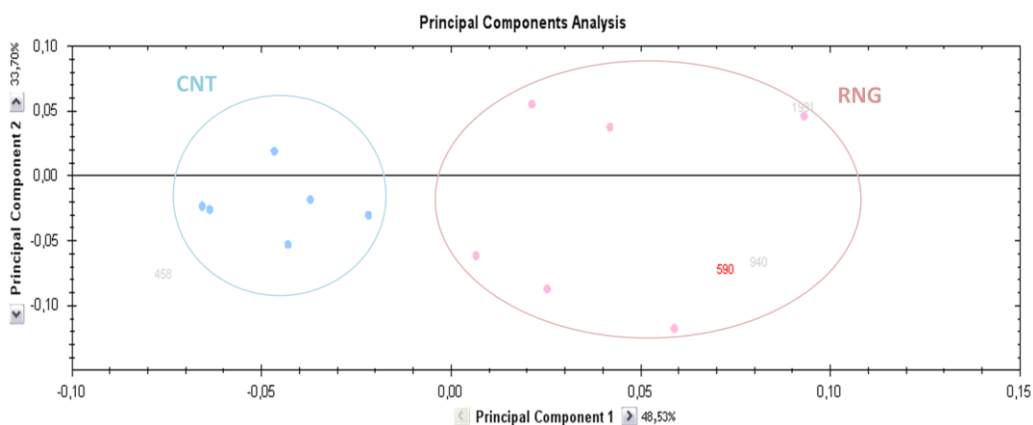


Gráfico 3 - Representação gráfica da PCA com os pontos estatisticamente relevantes (p -value inferior a 0,05), do primeiro tempo do estudo (48 horas pós-amputação). Pontos azuis correspondem aos indivíduos controlo e os pontos rosa correspondem a indivíduos em regeneração.

Nos 13 dias após amputação, foram detetados um total de 98 spots diferencialmente expressos. Após inspeção visual apenas 9 spots foram selecionados (840, 894, 975, 991, 1137, 1177, 2321, 3236, 3057). Segundo a tabela 5, e o gráfico 4, todos os spots apresentaram uma expressão superior no grupo RGN, exceto o spot 3075.

Ao analisar o gráfico 5, correspondente à expressão das proteínas em todos os replicados biológicos desta fase, não foi verificada variabilidade significativa entre amostras. Todos os replicados apresentaram uma expressão homogênea tanto no grupo de RGN como CNT. O que vai de acordo com o erro padrão associado às médias dos volumes normalizadas, que é muito reduzido, tanto no grupo CNT como no grupo RGN.

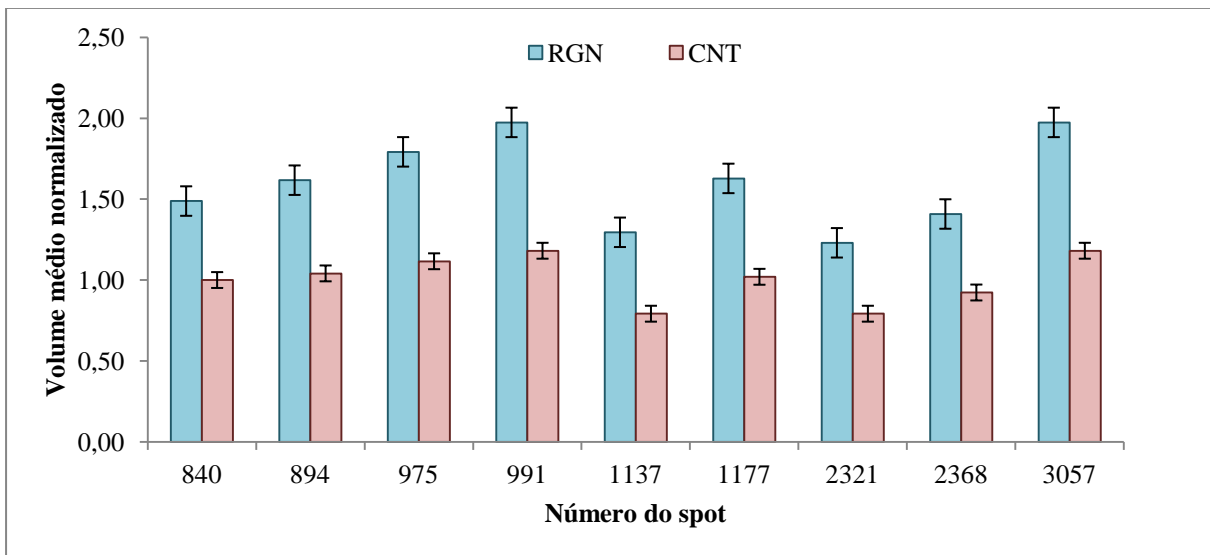


Gráfico 4 – O gráfico de barras mostra a expressão diferencial proteínas entre grupos controlo e regeneração na segunda fase de regeneração (13 dias após-amputação do braço) e barras do erro-padrão associado.

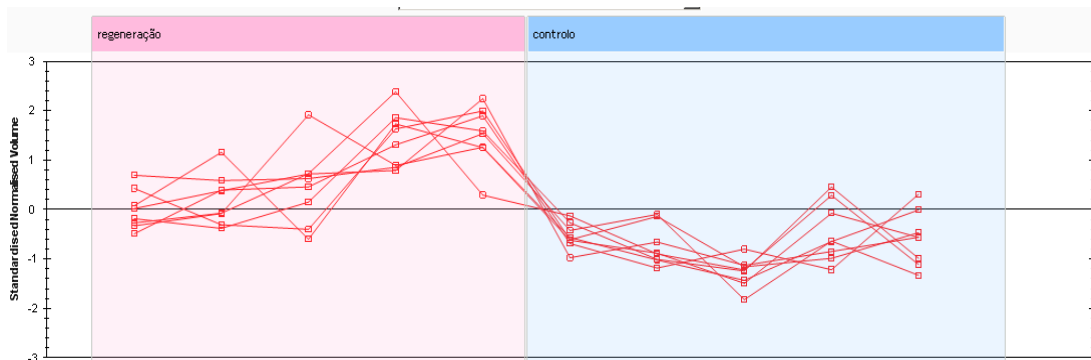


Gráfico 5 - Representação da variação da expressão das proteínas ao nível de todos os replicados biológicos das amostras recolhidas 13 dias pós-amputação do braço e respetivos controlos.

Finalmente a análise PCA para as amostras dos 13 dias, tal como para as 48 horas, apresentou dispersão nos replicados biológicos. No entanto observou-se que tanto o grupo controlo como o grupo regeneração estavam devidamente agrupados e separados entre si, evidenciando a expressão diferencial das proteínas em ambos os grupos. Não foram considerados *outliers* embora existisse alguma dispersão entre pontos na análise principalmente no grupo CNT.

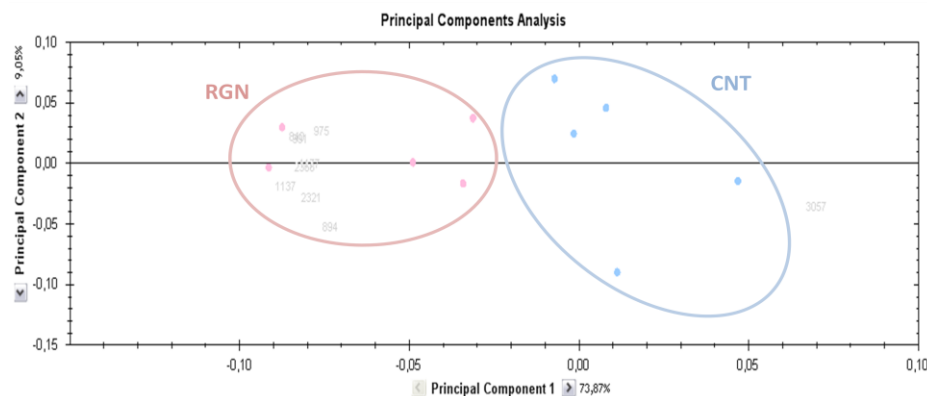


Gráfico 6 - Representação gráfica da PCA com os pontos estatisticamente relevantes (p -value inferior a 0,05), do segundo tempo do estudo (13 dias pós-amputação). Pontos a rosa correspondem ao grupo em regeneração; Pontos azuis correspondem ao grupo controlo.

O tempo de regeneração mais longo em estudo foram as 10 semanas após amputação, onde se fez igualmente a análise das imagens com os mesmos critérios estatísticos. Identificaram-se 7 proteínas diferencialmente expressas, mas só foram selecionados 3 spots (668, 664 e 621) após inspeção visual. A tabela 5 mostra o número atribuído pelo software a cada spot para esta condição, e os critérios estatísticos mínimos considerados. Contrariamente aos outros tempos estudados, nas 10 semanas pós-amputação, os spots de interesse apresentaram maior expressão no grupo CNT. Não

foram identificados spots com expressão aumentada no grupo RGN. O erro padrão associado também está reduzido tanto no grupo CNT como no grupo RGN. (Gráfico 7).

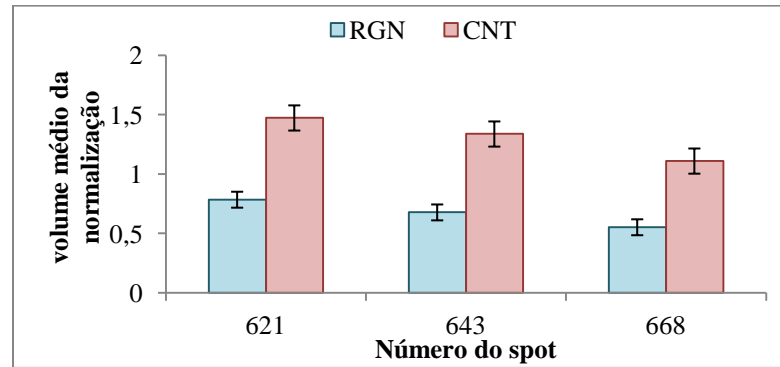


Gráfico 7 - O gráfico de barras mostra a expressão diferencial proteínas entre grupos controlo e regeneração na última fase de regeneração (10 semanas após-amputação do braço) e barras do erro-padrão associado.

Através da variação da expressão das proteínas de todos os replicados biológicos (gráfico 8), foi observado que as amostras em regeneração apresentaram uma expressão com menor variabilidade. Por outro lado, no grupo CNT a variabilidade entre indivíduos foi mais evidente.

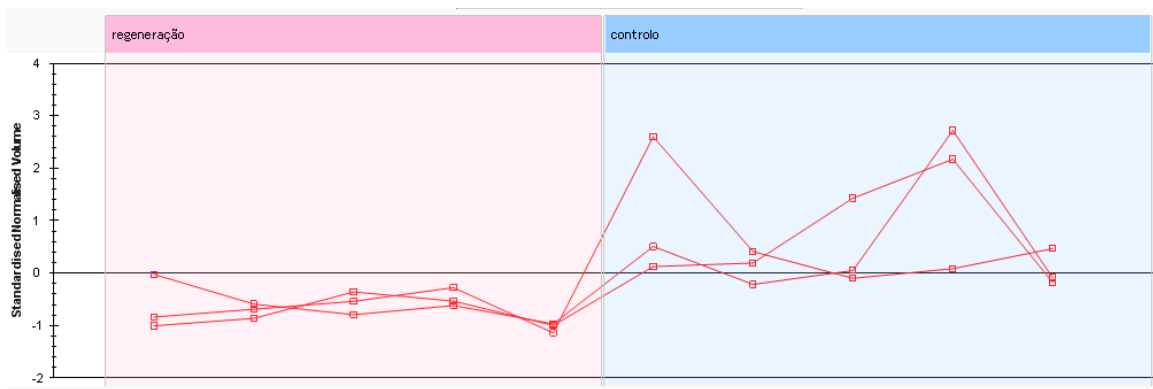


Gráfico 8 - Representação da variação da expressão das proteínas ao nível de todos os replicados biológicos das amostras recolhidas 10 semanas pós-amputação do braço e respetivos controlos

Através da análise PCA, observou-se que tanto o grupo controlo como o grupo regeneração estavam devidamente agrupados, separados entre si, evidenciando a expressão diferencial das proteínas em ambos os grupos. Salientando o grupo CNT como o grupo com maior expressão de proteínas.

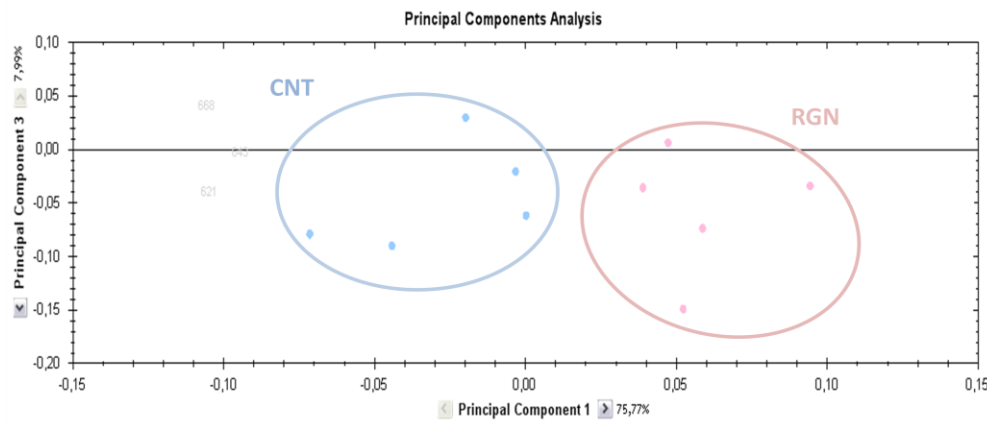


Gráfico 9 - Representação gráfica da PCA com os pontos estatisticamente relevantes (p -value inferior a 0,05), do primeiro tempo do estudo (10 semanas pós-amputação e controlos).

4.4. Identificação das Proteínas

Após a execução dos géis preparativos (géis carregados com maior quantidade de proteína e corados com coomassie) excisaram-se os spots previamente selecionados, seguidamente procedeu-se à sua digestão trípica e identificação das proteínas por espectrometria de massa. Não foram usados os géis de DIGE para identificação de proteínas, devido à pouca quantidade de proteína carregada por gel (150ug de proteína). Correram-se 5 géis preparativos de 24 cm, sendo as amostras selecionadas de acordo com os spots diferencialmente expressos segundo o ensaio DIGE. A busca foi efetuada usando os motores de busca MASCOT, Protein Pilot e PEAKS, nas bases de dados NCBI geral, swissProt+*S.purpuratus* (Sp_Sprot) e *S.purpuratus* (S.P) (parâmetros de aceitação das identificação descritos no ponto 3.7 da secção Material e Métodos). Os ficheiros correspondentes às identificações estão no anexo 7.

Spot	Código acesso	Proteína	Espécie	Massa	Pep.ID (MS)	Frag. ID (MS/MS)	Score proteína	Score min.	% Cobertura	Função	Base dados	Algoritmos
590	gi 120972524	A-enolase	Asterias rubens	40210	-	5	575	54	100	Proliferação celular;	NCBI	- MOWSE - Paragog
621*	gi 47551035 ref NP_999692.1	cytoskeletal actin CyIIIb	Strongylocentrotus purpuratu	42147	5	1	85	70	100	Mobilidade celular	Sp_SProt	- MOWSE - Paragog
643	gi 161376754	beta-actin	Rachycentron canadum	42121	-	4	521	54	100	Mobilidade celular	NCBI	- MOWSE - Paragog
668	sp Q11212 ACT_S POLI	Actin (Fragment)	Spodoptera littoralis	42108	5	4	536	70	100	Mobilidade celular	Sp_SProt	- MOWSE - Paragog
894*	gi 115712126 ref XP_782084	Familia das Plexin-A4	S. purpuratus	18089	-	1	33	28	98.765	Remodelação citoesqueleto	S.P	-MOWSE -PTM
991*	gi 83309330	TRAP-type transport system (permease)	Magnetospirillum magneticum AMB-1	46946	-	1	58	55	97.439	Receptor membranas	Ncbi	- MOWSE
1177*	gi 126697490	Gelsolina	Haliotis discus discus	23412	-	1	131	54	100	Agregação e desagregação dos filamentos de actina	ncbi	- MOWSE - Paragog
2368*	gi 115954769 ref XP_001195685.1	PREDICTED: similar to Plexin-A4	S. purpuratus	24242	-	1	18	18	98.536	Organização epitelial	S.P	-MOWSE

Tabela 6 – Resultados das identificações das proteínas diferencialmente expressas nos coelomócitos. Estes resultados são provenientes da busca realizada com os 3 algoritmos, em 3 bases de dados de proteínas diferentes (NCBI geral, SwissProt+S.purpuratus, S.purpuratus).

*padrões de fragmentação em anexo 8.

Legenda da tabela

Spot : número de identificação do spot

N.º acesso: numero de acesso na base de dados em q foi identificada a proteína

Nome da Proteína: Nome da proteína segundo a base de dados.

Espécie: A espécie de onde provém a proteína identificada

Massa: Massa da proteína identificada.

Score da Proteína: As identificações apenas foram consideradas para atribuições que tivessem acima do score mínimo (MASCOT).

Score mínimo: valor de score para qual a identificação tem uma significância superior a 0.05.

Péptidos Identificados: Número de sequências de péptidos identificados resultante da busca MS.

Fragmentos identificados: Número de sequências de péptidos identificados com confiança superior a 95% ($p < 0.05$). Resultante da busca MS/MS.

% de cobertura: Cobertura da sequência da proteína corresponde ao valor percentual onde a sequência analisada contém informação de confiança.

Descrição da proteína: Breve descrição da função da proteína identificada.

Algoritmo: algoritmo utilizado para fazer a busca nas bases de dados.

Dos 16 spots submetidos à busca através do MASCOT apenas se obtiveram 8 identificações válidas (tabela 6). Apesar da intensidade nos espectros MS serem boas para a maioria dos spots não identificados, não se obteve identificação possivelmente devido a contaminações com queratina ou mesmo pela ausência de informação nas bases de dados.

Fez-se uma busca com o Protein Pilot e com o PEAKS para confirmar as identificações do MASCOT, e tentar identificar mais spots. Na busca através do ProteinPilot todos os novos spots identificados estavam abaixo dos critérios mínimos de aceitação. Apenas se conseguiu obter algumas confirmações (tabela 6). A busca efetuada pelo PEAKS resultou na confirmação da identificação do spot 894, que embora não se encontrasse dentro dos limites estabelecidos, resultou na mesma identificação tanto no PEAKS como no MASCOT.

Complementarmente fez-se uma análise *De Novo* para os spots sem identificação, que resultou em valores inconclusivos, exceto para o spot 840, que análise *de novo* adquiriu 3 péptidos com informação razoável, embora o software não tenha feito atribuição a nenhuma proteína. (tabela 7)

Spot	Sequência de <i>De novo</i> prevista	m/z	PEAKS Score (%)
840	AHALVLNDPK	1077,6	72
	RADLVGESVLSKR	1429,747	68
	LSANTSLGVDDGALR	1488,77	59

Tabela 7 – Resultados obtidos da busca de sequências *de novo*, utilizando o PEAKS Studio 5.3, dos spots cujos os outros software não conseguiram uma boa identificação. Apenas o spot 840 conseguiu 3 sequências com um score superior a 50%. Não houve atribuição a nenhuma proteína.

5. Discussão dos resultados

Os coelomócitos são uma população de células presentes no fluido celômico de equinodermes, com tipologia e abundância variada, desempenhando várias funções importantes, nomeadamente ao nível da resposta imunitária. A maioria dos coelomócitos presentes na classe dos asteriídeos são do tipo fagócitos, que apresentam uma morfologia dinâmica e bastante diversa dependente do estado fisiológico do animal, variando de células ativas a células inativas. Estas células apresentam uma elevada homologia com os macrófagos em vertebrados, e conseguem distinguir-se a partir da morfologia do seu citoesqueleto e da organização dos padrões de mobilidade baseados em actina, que conferem a mudança de forma destas células. O aumento do número total de coelomócitos do tipo fagócito, e as suas alterações morfológicas são notados após a indução de ferimentos e em condições de hipóxia. O processo morfolático de regeneração é o tipo de regeneração presente em estrela-do-mar, que consiste no recrutamento de células pré-existentes proveniente de migração de células já diferenciadas para locais de ação, desdiferenciação, transdiferenciação como representado na figura 20.

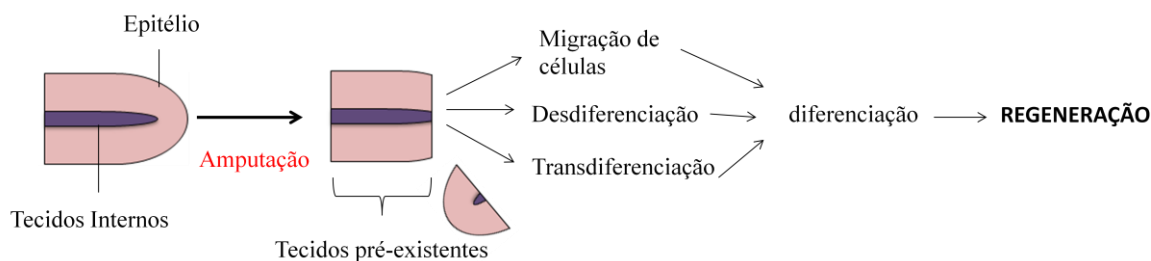


Figura 20 - Imagem do sistema biológico de regeneração em estrelas-do-mar. A primeira fase após amputação é fase de cicatrização, que é comum a todos os animais, mesmo aqueles que não têm capacidades regenerativas tão notáveis como os equinodermes. Posteriormente dá-se início ao processo de regeneração, desencadeado pela ativação de três processos essenciais que recrutam células pré-existentes para iniciar a remodelação da zona amputada. Estas células que respondem aos estímulos provenientes da amputação sofrem posteriormente uma determinação e diferenciação, resultando em novos tecidos que devem ser funcionalmente integrados nos tecidos existentes. (Imagem adaptada da referência 4)

Através da metodologia DIGE acoplada a espectrometria de massa, foi possível observar as alterações no proteoma dos coelomócitos em várias fases da regeneração, 48 horas, 13 dias e 10 semanas após a amputação da ponta do braço. Foram discriminadas 16 proteínas diferencialmente expressas, observadas entre controlos e regeneração nas três fases. Quatro spots foram selecionados nas 48 horas, nove spots foram selecionados nos 13 dias e três spots selecionados nas 10 semanas.

Uma razão para a escasso número de spots, pode ser a possibilidade de nem todos os coelomócitos estarem envolvidos do mesmo modo na regeneração. Como são células capazes de migrar e infiltrar os tecidos, os coelomócitos diretamente envolvidos nas primeiras fases de regeneração podiam já não estar livres no fluido celómico na altura em que feita a recolha da amostra. Outra razão para que as diferenças na expressão das proteínas não fossem muitos evidentes, pode ter sido devido à variabilidade genética observada entre os indivíduos utilizados no estudo. Através da análise da PCA foi comprovado a elevada variabilidade entre indivíduos, não só entre grupos mas também dentro do próprio grupo, o que pode ter mascarado eventuais diferenças na expressão de proteínas menos abundantes. Por outro lado, os tempos escolhidos para estudar o envolvimento dos coelomócitos na regeneração, podem não ter sido os mais adequados. Como os coelomócitos são células imunitárias, os primeiros momentos pós-amputação podem ser cruciais para encontrar as proteínas envolvidas no despoletar desde fenómeno biológico. Estudos realizados anteriormente observaram um pico de coelomócitos entre a primeira hora e as seis horas após amputação do braço em estrelas-do-mar ⁽²⁶⁾.

As proteínas de interesse foram submetidas a identificação usando o MASCOT como primeiro motor de busca, onde resultaram 8 identificações válidas. Posteriormente o Protein Pilot foi utilizado para obter algumas confirmações, e tentar identificar os outros spots que ainda não tinham sido identificados. Desta busca não resultaram novas identificações. Finalmente foi usado o PEAKS para fazer busca convencional e análise *de novo*. Não foi possível identificar nenhum dos spots em falta, apenas se conseguiu a confirmação do spot 894 através de busca convencional, e para o spot 840 onde a busca *De Novo* conseguiu identificar 3 péptidos, no entanto, o software não fez nenhuma atribuição a uma proteína.

5.1. Proteínas diferencialmente expressas

5.1.1. Proteínas relacionadas com a regulação do citosqueleto

A actina foi observada diferencialmente expressa nas 10 semanas após-amputação no grupo CNT. As actinas são um grupo de proteínas globulares altamente conservadas nos seres vivos eucariotas e são polimerizadas sob a forma de microfilamentos presentes na composição do citoesqueleto. Estão envolvidas essencialmente na mobilidade celular, divisão celular e citocinese, movimento de vesículas e organelos, sinalização celular e manutenção das alterações de forma das

células ⁽⁴¹⁾. Este grupo de proteínas são dependentes de ATP extramente importante em células que precisam continuamente alterar a sua forma na ativação celular. Os coelomócitos são células extramente dinâmicas que alteram a sua forma de petaloide a filopoidal, consoante a fisiologia do sistema imunitário do animal, justificando a presença deste grupo de proteínas nestas células ⁽⁴²⁾.

As plexinas foram outro grupo de proteínas encontrado diferencialmente expresso, surgindo com expressão mais acentuada no grupo em RGN, 13 dias após amputação. Esta família de proteínas atua como recetores das semaforinas e estão envolvidas na remodelação do citoesqueleto. As semaforinas são uma classe de proteínas secretadas que atuam na orientação axonal e no desenvolvimento do sistema nervoso. Contudo, existem evidências da existência de semaforinas imunitárias que estão envolvidas em várias fases da resposta imunitária, regulação da ativação, diferenciação e tráfego de células ⁽⁴³⁾.

A gelsolina também se apresentou mais expressa em indivíduos em regeneração nos 13 dias após amputação. Trata-se de uma proteína intracelular dependente de cálcio, que se liga à actina, e desempenha um papel importante na regulação da agregação e na desagregação dos microfilamentos de actina ⁽⁴⁴⁾. Apresenta também várias funções como proteína reguladora estrutural e no metabolismo celular. Dados recentes mostraram que a gelsolina está associada ao cancro, apoptose, infeção e inflamação ⁽⁴⁵⁾. Desta forma, estas proteínas podem estar a atuar nestas células no sentido de regular a mobilidade celular e as alterações de forma das mesmas, permitindo a sua migração até às regiões lesadas. Estas proteínas também poderão estar a participar na diferenciação celular e na resposta inflamatória após a amputação.

5.1.2. Proteínas envolvidas na regulação celular

Além de proteínas diretamente envolvidas na remodelação do citoesqueleto e diferenciação, também foram identificadas proteínas que atuam ao nível da regulação da proliferação e do crescimento celular. A α -enolase foi identificada com expressão aumentada no grupo RGN nas 48 horas após amputação. Trata-se de uma isoenzima do grupo das enolases, metaloenzimas dependentes de magnésio, responsáveis pela catálise da conversão do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, o penúltimo passo da glicólise. São enzimas multifuncionais que, além de terem um papel importante do metabolismo da glicólise, têm também funções em vários processos de controlo de crescimento celular, tolerância à hipoxia e resposta alérgica ⁽⁴⁶⁾. A sua expressão no grupo RGN evidenciou o seu papel ao nível da proliferação celular, que é um processo biológico que contribui para a regeneração em estrelas-do-mar. As enolases estão também envolvidas na

estimulação de imunoglobulinas, e em vertebrados especificamente, tem sido associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes e no desenvolvimento de cancro ⁽⁴⁷⁾. Foi observado em estudos anteriores que algumas isoformas nas enolases, nomeadamente as α -enolase, envolvidas na degeneração e regeneração do tecido muscular ⁽⁴⁸⁾.

5.1.3. Proteínas relacionadas com o transporte de moléculas

Foi identificada também um enzima do tipo permease (*TRAP-type transporter system*), enzimas transportadoras, integradas na membrana celular, que atuam no transporte de substâncias por difusão transmembranar, facilitando a passagem de, por exemplo, aminoácidos e iões. Ajudam a regular as concentrações iónicas intra e extracelulares ⁽⁴⁹⁾. Estas proteínas foram identificadas com expressão mais acentuada no grupo em RGN nos 13 dias após amputação.

5.2. Eventos de proteólise associados à regeneração

Em vários casos, observou-se que a mesma proteína foi identificada em múltiplos spots e em diferentes posições no gel 2-DE. Esta distribuição ubíqua das proteínas ao longo do gel foi observada para a actina e também para a plexina. Isto deve-se provavelmente, a eventos de clivagem, e em alguns casos devido a vias de proteólise. Esta observação da existência da mesma proteína com massas moleculares diferentes foi anteriormente observada em estudos similares em neurónios de moluscos e no estudo da regeneração do nervo em estrelas do mar *Mastasterias glacialis* ⁽⁸⁾. Este tipo de proteólise pode ser considerado uma alteração pós-tradução. A ocorrência de eventos de proteólise de certa forma sugere que a regeneração depende deste tipo de modificação em simultâneo com a síntese de proteínas. As proteases são hidrolases que quebram as ligações peptídicas, representando uma importante e irreversível modificação, responsável pela ativação ou inativação de outras proteínas ou mesmo alterando a sua localização e/ou função biológica. Devido às enzimas ubiquinadas, é postulado que todas as proteínas em algum ponto do seu ciclo de vida são afetadas por proteólise um processo simples de clivagem através de outras proteínas que conduzem à degradação das primeiras. Biologicamente, o processamento de proteólise pode ser altamente relevante: a remoção de dois ou quatro resíduos pode alterar a função de uma proteína, ou alterar os padrões de migração de células ⁽⁵⁰⁾.

5.3. Proteínas não identificadas

Das 16 proteínas selecionadas como diferencialmente expressas foram várias as proteínas que não se conseguiram identificar. Não foi possível identificação com score superior aos critérios pré-estabelecidos para 8 das proteínas de interesse. Apesar de 6 delas apresentarem bons espectros MS/MS. A possibilidade da presença de alterações pós-tradução destas proteínas pode ter levado ao insucesso das identificações por espectrometria de massa, uma vez que as modificações pós-tradução alteram o padrão de fragmentação dos péptidos, e a informação relativa a essas alterações, está muitas vezes, ausente ou incompleta nas bases de dados de sequências de proteína ⁽⁵¹⁾. Outra hipótese para o insucesso das identificações, pode ter sido a existência de proteínas não caracterizada nas bases de dados. A pouca quantidade de proteína para digestão trípica e algumas contaminações com queratina, podem estar na origem dos maus padrões de fragmentação verificados em dois casos, e no insucesso dessas mesmas identificações.

6. Conclusões e perspectivas futuras

O presente estudo contribuiu para um melhor conhecimento das proteínas existentes nos coelomócitos, células mediadoras da resposta imune celular em equinodermes. Na tentativa de elucidar o seu envolvimento na regeneração, explorando três fases distintas, 48 horas, 13 dias e 10 semanas, após amputação do braço em estrelas-do-mar *Marthasterias glacialis*.

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu a comparação entre o proteoma dos coelomócitos de animais em regeneração com o proteoma dos coelomócitos de animais controle, através da técnica DIGE. A comparação das diferenças da expressão das proteínas entre os dois proteomas não foram muito conclusivas, uma vez que foram encontradas apenas 16 proteínas diferencialmente expressas. Contudo, através de proteômica acoplada à espectrometria de massa, foi possível isolar e identificar 8 proteínas de interesse nesta população celular.

Na primeira fase de regeneração (48 horas) correspondente à fase inicial de cicatrização, a proteína com mais destaque foi a α -enolases, que apresentou maior expressão no grupo RGN.

Foi na segunda fase de regeneração, correspondente aos 13 dias após amputação, que os coelomócitos mostraram ter maior envolvimento, uma vez que foi onde surgiram a maioria das proteínas diferencialmente expressas. A gelsolina, plexinas, e transportadores TRAP foram proteínas encontradas mais expressas no grupo RGN. Na última fase de regeneração, 10 semanas, as actinas foram as únicas proteínas encontradas diferencialmente expressa, surgindo com maior expressão no grupo CNT.

Através das proteínas identificadas neste trabalho, conclui-se que os tipos de coelomócitos estudados neste trabalho experimental não têm uma função fulcral na fase inicial de cicatrização, mas parecem ter algum envolvimento na manutenção da regeneração numa fase mais avançada. Podendo estarem a atuar ao nível das células pré-existentes, na regulação das alterações de forma das células e na sua migração para outros locais.

As proteínas identificadas apresentam papéis importantes ao nível da resposta imunitária e desempenham funções principalmente ao nível da regulação celular, nomeadamente processos de desdiferenciação, proliferação e crescimento celular promovendo o recrutamento de mais células para os locais de regeneração, que vão ao encontro ao processo morfolático de regeneração que ocorre nestes animais.

Conclui-se também que associado à regeneração estão as modificações pós-tradução,

nomeadamente proteólise, pois tanto as actinas como as plexinas foram encontradas distribuídas ubiquamente ao longo dos géis. A exploração das modificações pós-tradução das proteínas endógenas e a validação dos eventos de proteólise nos coelomócitos seria um estudo futuro adequado para melhor se entender o papel deste tipo de modificação na regeneração.

Como outro trabalho posterior, uma abordagem alternativa seria fazer uma separação dos vários tipos de coelomócitos presentes no fluido celómico, na tentativa de perceber de que forma, as várias tipologias de células estão a atuar na regeneração, e quais os tipos que são responsáveis pelo despoletar da fase de cicatrização e da fase de regeneração.

É sabido que os coelomócitos em circulação têm a sua abundância máxima nas primeiras seis horas após amputação do membro, e o seu número decrescente a partir desse ponto. Seria de interesse como abordagem futura, a exploração dos primeiros momentos imediatamente após amputação do membro, através da recolha do fluido celómico e respetiva separação dos componentes celulares nas primeiras 24 horas após a lesão.

Futuramente outro avanço nesta área seria a sequenciação do genoma da estrela-do-mar *Mastasterias glacialis* para facilitar na identificação das proteínas.

A compreensão da regeneração em equinodermes, ou mesmo noutros animais cujas capacidades regenerativas são consideráveis, é um primeiro passo para perceber como este mecanismo de substituição do tecido lesado por tecido funcional, está a acontecer ao longo do reino animal ⁽⁵²⁾. O trabalho efetuado nesta tese permitiu uma pequena contribuição nestes estudos, na tentativa de identificar potenciais proteínas, presentes nas células do sistema imunitário de estrelas-do-mar, envolvidas na regeneração. Os modelos equinodermes têm um grande potencial para contribuir na compreensão dos processos bioquímicos envolvidos na regeneração, e o facto de terem uma ancestralidade comum com os cordados, permite que os resultados obtidos em estudos efetuados nestes modelos animais, sejam de impacto positivo para estudos futuros na regeneração em mamíferos.

7. Bibliografia

1. Kenneth, D. B.; Alvarado, A. S. "Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals" (2008). *Cell*. **4**. pp. 697-710.
2. Ortiz-Pineda, P. A.; Ramírez-Gómez, F.; Pérez-Ortiz, J.; González-Díaz, S.; Jesús, F.; Pasos-Hernandez, J.; Valle-Avila, C.; Rojas-Cartagena, C.; Suárez-Castillo, E.; Tossas, K.; Méndez-Merced, A.; Roig-López, J.; Ortiz-Zuazaga, H.; García-Arrarás, J. "Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber" (2009) *BMC Genomics*. **10**.262
3. Bely, A. E.; "Evolutionary Loss of Animal Regeneration: Pattern and Process" (2010) *Integrative and Comparative Biology*, **50**, pp. 515-527
4. Alvarado, A. S.; Tsonis, P. A. "Bridging the regeneration gap: genetics insight from diverse animal models" (2006) *Nature*. **7**. pp. 873-883.
5. Kumar, V.; Abras, A.; Fausto, N.; Aster, J.; (2008). *Tissue renewal, regeneration and repair" - Capítulo 3 - Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. (8.ªedição).Copyright. EUA.
6. Alvarado, A. S.; "Regeneration in the metazoans: Why does it happen?" (2000) *BioEssays*. **22**. pp. 578-590.
7. Bely, Alexandra E.; Nyberg, Kevin G. "Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field".(2009) *Cell*. **25(3)** pp. 161-170.
8. Franco, C. "Proteomics based approach to understand tissue regeneration".Tese de Doutoramento (2011). ITQB-UNL, Portugal
9. Tanaka, E. M.; Reddien, P. "The Cellular Basis for Animal Regeneration".(2011) *Developmental Cell*. **16**. pp. 172-185.
10. Loker, E. S.; " Macroevolutionary immunology: a role for immunity in the diversification of animal life" (2012) *Frontiers in Immunology*. **3**. pp.1-21
11. Eming, S. A.; Hammersmidt, M.; Krieg, T.; Roers, A. "Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration"(2009). *Seminars in Cell and Development Biology*. **20**, pp. 517-527.
12. King, M.W.; Neff, A.W.; Mescher, A. L.; "Proteomics analysis of regenerating amphilian limbs: change during the onset of regeneration." (2009) *Immunity, Invertebrate*. **53**, pp. 955-969.13.

13. L.C., Gosh, J., Buckley, K.M., Clow, L.A., Dheilly, N., Haug, T., Henson, J.H., Li, C., Man, L., Majeske, A, J., Matranga, V., Nair, S., Rast, J.P., Raftos, D.A., Roth, M., Sacchi, S., Schrankel, C.S., Stesvag, K. (2011) *Echinoderm immunity. In: Invertebrate Immunity*. Söderhall, K. (eds). Springer Verlag.
14. Tanaka, E. M.; Peter W. Reddien, P. W.; "The Cellular Basis for Animal Regeneration." (2011). *Developmental Cell*.**21**,pp.172-185.
15. Garcia-Arrarás, J. E.; Doimatov, I. Y.; "Echinoderms; potential model systems for studies on muscle regeneration" (2010) *Curr Pharm Des*. **16**. pp.942-95516.
16. Sea urchin genome sequencing consortium "The genome of sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*"(2006). *National Institute of Health*. **314**. pp.941-95216.
17. Dupont, S.; Thorndyke, M. "Bridging the regeneration gap: insights from echinoderms models"(2007). *Nature Reviews Genetics*. **8**.doi:10.1038/nrg1923-c1
18. Tuya, F.; Duarte, P. "Role of food availability in the bathymetric distribution of the starfish *Marthasterias glacialis* (Lamk.) on reefs of northern Portugal"(2012). *Scientia Marina*. **76**. pp.9-15
19. Mah, C. L.; Blake, D. B.M. "Global Diversity and Phylogeny of the Asteroidea (Echinodermata)" (2012). *PlosOne*, **7(4)**: e35644
20. Ramírez-Gómez, F.; Aponte-Rivera, F.; Méndez-Castaner, L.; García-Arrarás, J. "Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns."(2010) *Fish Shellfish Immunol*. **29**. pp. 175–185.
21. Buckley, K. M.; Rast, J. P. "Dynamic evolution of toll-like receptor multigene families in echinoderms".(2012). *Frontiers in Immunology*. **3**:136
22. Michel, L. "Evidence of Kappa genes in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata)" (2011) *Immunology Letters*. **Vol.138**. pp.197-198
23. Ramírez-Gómez, F.; García-Arrarás, JE. "Echinoderm immunity" (2010). ISJ 7: 211-22023
24. Franco, C. F.; Santos, R.; Coelho, A. V. "Exploring the proteome of an echinoderm nervous system: tiras of the sea star radial nerve cord and the synaptosomal." (2011).*Proteomics*.**11**,pp.1359-1364
25. Tahseen, Q.; "Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrate With Special Remarks on Nematodes." (2009). *International Journal of Zoology*.doi:10.1155/2009/218197

26. Pinsino, A., Thorndyke, M. C.; Matranga, V.; "Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*." (2007). *Cell Stress and Chaperones*. **12**.pp. 331-341.
27. Franco, C. F.; Santos, R.; Coelho, A.V.; "Proteome characterization of sea star coelomocytes – The innate immune effector cells of echinoderms." (2011). *Proteomics*. **11**.pp.1-6
28. Hernroth, B.; Farahani, F.; Brunborg, G.; Dupont, S.; Dejmek, A.; Sköld, H.N. "Possibility of Mixed Progenitor Cells in Sea Star Arm Regeneration." (2010). *Journal of Experimental Zoology*, **314B**, pp. 457-468
29. Lovrić, J., (2011). *Introducing proteomics, from concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis*, Wiley-Blackwell.
30. Banks, R. E.; Dunn, M. J.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J. C.; Blackstotck, W.; Pappin, D. L. "Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities." (2000). *The Lancet*, **356**, pp. 1749-1755.
31. Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. "Proteomics: The first decade and beyond." (2003). *Nature Genetics supplement*. **33**. pp. 311-319.
32. Timms, J. F. e Carmer, R. "Difference gel electrophoresis." (2008). *Proteomics*. **8**. pp. 4886-4897.
33. Tonge, R.; Shaw, J.; Middleton, B.; Rowlinson, R.; Rayner S.; Young, J.; Pogman, F.; Hawkins, E.; Currie, I.; Davison, M.; "Validation and Development of fluorescence two-dimensional diferencial gel electrofresis." *Proteomics*. (2001). **1**. pp. 377-39633.
34. Aebersold, R.; Mann, M. "Mass spectrometry - based proteomics." (2003). *Nature*. **422**. pp. 198-206.
35. Soares, R.; Franco, C.; Pires, E.; Ventosa, M.; Palhinhas, R.; Koci, K.; Almdeia, A. M.; Coelho, A. V. "Mass spectrometry and animal science: Protein Identification strategies and particularities of farm species". (2012). *Journal of Proteomics*.**75**. pp. 4191-4206.
36. Bakhtiar, R. e Tse, F.L.S. "Biological mass spectrometry: a primer." (2000). *Mutagenesis*.**15**. pp. 415-430.
37. Retamal, C. A.; Thiebaut, P.; Alves, E.W. "Protein purification from polyacrilamide gels by sonication extraction." (1999). *Analytical Biochemistry*. **268**, pp. 15-20.
38. Ericsson, C.; Nistér, M.; "Protein Extration from frozen brain samples." (2003). R8:05, 171 76
39. 2-D Electrophoresis - Principles and Methods. GE, Healthcare.
40. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer - V1.0 *User Manual*. ThermoScientific.

41. Thomas, C.; "Bundling actin filaments from membranes: some novel players." (2012) *Front Plant Sc.* **3**. doi: 10.3389/fpls.2012.00188
42. Porat-Shliom, N.; "Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis." (2012). *Cell Mol Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-012-1156-5
43. Takamatsu, H.; Kumanogoh, A. "Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system." *Trends Immunol.* **33**. pp. 127-135.
44. Silacci, P.; Mazzolai, L.; Gauci, C.; Stergiopoulos, N.; Yin, H. L.; Hayoz, D. "Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions."(2004). *Cell Mol Life Sci.* **61**.pp.2614-23
45. Li, G.H.; Arora, P.D.; Chen, Y.; McCulloch, C.A.; Liu, P. "Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases".(2012). *Med Res Rev.***32**. pp. 999-1025.
46. Oweson, C.; "Effects of manganese and hypoxia on coelomocyte renewal in the echinoderm, *Asterias rubens*" (2010). *Aquat Toxicol.* **100**, pp. 84-90.
47. Ko-Jiunn, L.; Neng-Yao, S. "The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells." (2007). *Journal of Cancer Molecules.* **3**. pp. 45-48.
48. Merkulova, T.; Dehaupas, M.; Nevers, M. C.; Alameddine, H.; Keller, A. "Differential modulation of alpha, beta and gamma enolase isoforms in regenerating mouse skeletal muscle" (2000). *Eur J Biochem.***267(12)**.pp.3735-3743
49. Quintero, M. J.; "Identification of genes encoding amino acid permeases by inactivation of selected ORFs from the *Synechocystis* genomic sequence." (2001). *Genome Re.* **11**. pp. 2034-2040.
50. Frottin, F.; Espagne, C.; Traverso, J.; Mauve, C.; Valot, B.; Lelarge-Trouverie, C.; Zivy, M.; Noctor, G.; Meinel, T.; Giglione, C. "Cotranslational Proteolysis Dominates Glutathione Homeostasis to Support Proper Growth and Development" (2009). *The Plant Cell.* **21**. pp. 3296–3314.
51. Han, X.; He, L.; Xin, L.; Shan, B.; Ma, B; Han, X., "PEAKS PTM: Mass Spectrometry Based Identification of Peptides with Unspecified Modifications" (2011). *Journal of Proteomics Research.* **10**. pp. 2930-293650.
52. Maginnis, T. L. "The cost of autotomy and regeneration in animals: a review and framework for future research" (2006). *Behavioral Ecology*.Doi:10.1093/beheco/ar1010

Anexos