Avaliação de diferentes métodos de preparo de amostras de soro sanguíneo por FPLC visando a descoberta de potenciais biomarcadores proteicos para o Transtorno Bipolar

Isabelle N I Santos*, Mariana S Marques, Profa. Dra. Alessandra Sussulini

Abstract

Os biomarcadores são definidos, atualmente, como quaisquer características biológicas que forneçam informações sobre processos normais, patogênicos ou respostas a intervenções terapêuticas, auxiliando no entendimento da causa, diagnóstico, predição, progressão ou regressão de uma doença. Essa pesquisa busca otimizar os protocolos laboratoriais de extração de espécies proteicas no soro sanguíneo a fim de identificar potenciais biomarcadores em pacientes que possuem Transtorno Afetivo Bipolar (TAB).

Key words: Proteômica, Fast Protein Liquid Chromatography, Transtorno Bipolar

Introdução

O Transtorno Afetivo Bipolar é uma doença psiquiátrica que acomete cerca de 60 milhões de pessoas no mundo. Além disso, a dificuldade de um diagnóstico acertado leva a uma média de 10 anos até que uma pessoa com bipolaridade seja adequadamente diagnosticada.

proteômica, foco da nossa pesquisa, busca encontrar indícios de alterações metabólicas por meio de biomarcadores proteicos e como podemos utilizar esses conhecimentos a fim de simplificar o processo de diagnóstico da doença em questão.

Para que as espécies de interesse sejam estudadas a fundo, é necessário um protocolo laboratorial que maximize os dados provenientes das amostras de soro sanguíneo.

Dessa forma, essa pesquisa busca otimizar as condições de separação, tratamento e análise das proteínas extraídas do soro sanguíneo utilizando três diferentes métodos de extração, quantificação com o Método Bradford, eletroforese para análise do perfil proteico e técnicas cromatográficas com o Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) para a purificação das proteínas, para que, por fim, elas possam ser identificadas por espectrometria de massas.

Cada um dos procedimentos foi realizado em triplicata com volumes de 20, 30 e 40µL de soro sanguíneo a fim de determinar qual teria um melhor resultado de separação e quantificação.

Após a extração, em vista de uma quantificação total de proteínas, foi realizada a reprecipitação utilizando acetona a frio. Posteriormente, é ainda necessária uma ressuspensão, a qual foi performada utilizando TEAB 0,2 mol/L, TEAB 0,02 mol/L e uma solução de Tris-HCl 0,1 mol/L (pH 8,8). Dentre as três técnicas, a única que não apresentou interferências na quantificação e permitiu uma solubilização satisfatória foi com o uso da solução de Tris-HCl 0,1 mol/L (pH 8,8).

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o método Bradford a fim de avaliar qual volume e qual método seria o mais adequado para a continuação da pesquisa visando o uso de FPLC com as colunas de purificação por afinidade (AC) e de troca iônica (IEX).

Para a conclusão da pesquisa e futura utilização como protocolo padrão, ainda são necessárias etapas de eletroforese em gel SDS-page, para uma análise do perfil proteico das amostras, e por fim, utilização do melhor método para depleção de proteínas em FPLC utilizando diferentes colunas de cromatografia.

Resultados e Discussão

Após a coleta das amostras de sangue e da extração do soro, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, alíquotas de 500µL são estocadas à -80°C até o início do procedimento de separação.

Os seguintes procedimentos de separação utilizados buscam otimizar a quantidade de proteínas pelo volume de soro sanguíneo por meio de uma extração líquido-líquido que permita separar adequadamente proteínas, fase aquosa e fase orgânica.

Conclusões

Apesar de ainda em fase inicial, a pesquisa demonstrou resultados promissores para uma possível otimização e padronização de procedimentos laboratoriais para a extração, separação, purificação e fracionamento de proteínas provenientes de soro sanguíneo.

Bligh&Dyer	MTBE	MTBE Simplex
Metanol	Metanol	Metanol
Clorofórmio	MTBE	MTBE
Água	Água	Acetato de amônio

Tabela 1: Métodos de extração líquido-líquido (LLE) utilizados para separação de fase aquosa, fase orgânica e proteínas em soro sanguíneo