

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Giovanna Oliveira dos Santos

**PRODUÇÃO DE TROPONINA CARDÍACA RECOMBINANTE
NITRADA COMO INSUMO PARA SELEÇÃO DE APTÂMEROS
ESPECÍFICOS**

São Paulo

2020

Giovanna Oliveira dos Santos

**PRODUÇÃO DE TROPONINA CARDÍACA RECOMBINANTE
NITRADA COMO INSUMO PARA SELEÇÃO DE APTÂMEROS
ESPECÍFICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Radrizzani

Santos, Giovanna Oliveira dos

Produção de troponina cardíaca recombinante nitrada como insumo para seleção de aptâmeros específicos / Giovanna Oliveira dos Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2020.
49 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),
Centro Universitário São Camilo, 2020.

1. Aptâmeros de peptídeos 2. Isquemia 3. Nitração 4. Síndrome coronariana aguda 5. Técnica de seleção de aptâmeros 6.

Em primeiro lugar, dedico o meu trabalho a Deus, que, além de ter me conduzido e permitido que eu estivesse aqui, também me capacitou para trabalhar cuidando e fazendo a diferença na vida das pessoas.

Também a Dom Bosco, Madre Mazzarello e à Nossa Senhora Auxiliadora, que tanto ouviram minhas orações em todas as dificuldades que eu tive pelo caminho e que me acompanharam nos meus estudos durante toda a minha vida.

E a São Camilo, para que eu possa trabalhar com a mesma dedicação e amor que ele tinha.

Aos meus pais, Luciana e Ricardo, que fizeram o possível e o impossível para que eu pudesse ser feliz e me realizar com os meus estudos e com a profissão que eu escolhi e que sempre me apoiaram e tiveram orgulho de mim.

À minha irmã, Laura, que sempre dividiu comigo todas as emoções e, junto com os meus pais, nunca deixou de acreditar em mim.

E ao meu avô, Zuza, que tanto colocou meus estágios em suas orações.

Meu principal agradecimento não poderia deixar de ser ao, Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima, que além de ter sido meu professor de sala de aula, me deu a oportunidade de realizar este projeto e permitiu que eu tivesse essa experiência incrível de desenvolver um trabalho experimental em um dos principais e melhores laboratórios clínicos do país. Serei eternamente grata por tudo o que ele me ensinou neste período e pelo tanto que ele contribuiu para o meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

À equipe da Cromatografia do IPD do Fleury pela parceria para que este trabalho fosse desenvolvido e por toda a disponibilidade em dar espaço e nos auxiliar sempre que foi necessário.

A todos os meus professores, que contribuíram muito para que eu tivesse o conhecimento necessário e estivesse preparada para entender e desenvolver este trabalho.

Aos amigos que eu fiz durante esses anos de graduação, que tornaram o caminho mais leve, divertido e cheio de boas recordações e, também, aos que estão comigo muito antes disso, que acompanharam todo o meu crescimento e amadurecimento.

À minha família, mais uma vez, por terem me apoiado, acreditado e feito de tudo para que chegasse até aqui hoje e sempre cheios de orgulho de mim.

RESUMO

A Síndrome Coronariana Aguda (SCA), uma das principais causas das mortes relacionadas a problemas cardiovasculares no Brasil e no mundo, tem seus sinais e sintomas decorrentes do infarto do miocárdio, levando à necrose tecidual, ou da isquemia cardíaca devido ao bloqueio total ou parcial da perfusão sanguínea. O diagnóstico precoce é fundamental para aumentar a sobrevivência dos pacientes. Em 2012, a troponina nitrada foi identificada como biomarcador precoce de isquemia cardíaca sem necrose. Porém, ainda é necessário e urgente o desenvolvimento de testes moleculares de alta sensibilidade e especificidade. Os aptâmeros, oligonucleotídeos de cadeia simples capazes de adotar uma conformação tridimensional que pode encaixar perfeitamente em estruturas de proteínas e interagir fortemente com elas, são uma excelente opção de método para a captura da proteína no soro dos pacientes. Entretanto, antes da criação de um novo método diagnóstico utilizando os aptâmeros, é necessária a produção e nitração da troponina *in vitro* tanto na versão leve, quanto na versão pesada (contendo ^{15}N). Portanto, o objetivo deste estudo é produzir e caracterizar a troponina I cardíaca humana recombinante nitrada nas versões leve e pesada *in vitro* para ser utilizada como insumo na seleção da estrutura que melhor interage com a molécula de interesse, o processo chamado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), e posteriormente na validação de métodos quantitativos utilizando os aptâmeros. Para isso, a troponina foi expressa por bactérias BL21AI, contendo plasmídeo com gene de troponina I cardíaca humana, em meio rico LB e meio mínimo M9. O extrato proteico foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida e quantificado por meio de uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Então, a troponina foi purificada, dialisada, quantificada, nitrada com peroxinitrito, digerida com tripsina e analisada e caracterizada por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS). As bandas de 24 kDa correspondentes à troponina foram identificadas no gel já nas primeiras avaliações. A análise por LC-MS anterior à nitração foi capaz de sequenciar e identificar 20 peptídeos da troponina. A nitração apresentou eficiência, indicando a presença de grupo nitro (NO_2) nas tirosinas das posições 29 e 112, respectivamente nos peptídeos de sequência AYATEPHAK e VDKVDEERYDIEAK/VDEERYDIEAK, e com pelo menos 80% da intensidade total desses peptídeos apresentando a modificação da nitração. Diante do sucesso na produção da troponina cardíaca nitrada, já é possível a realização do SELEX e, depois que for verificada a eficiência da nitração da versão pesada, validação quantitativa do método.

Palavras-chave: troponina; nitração; SCA; isquemia; aptâmeros; SELEX.

ABSTRACT

Acute Coronary Syndrome (ACS), one of the main causes of death related to cardiovascular disease, not only in Brazil, but in the whole world, has its signs and symptoms due to myocardial infarction, leading to tissue necrosis, or cardiac ischemia owing to a total or partial block of the blood perfusion. The early diagnosis is essential to increase the patient's survival. In 2012, nitrated troponin has been identified as an early biomarker of cardiac ischemia without necrosis. However, it is still necessary and urgent to develop high sensitivity e specificity molecular tests. Aptamers, single-stranded oligonucleotides capable of adopting a three-dimensional conformation which can perfectly fit into protein structures and strongly interact with them, are an excellent choice of a method to capture this protein in patient's serum. Though, before creating a new diagnosis method by using aptamers, it is required the troponin *in vitro* production and nitration, both in the light and heavy versions (with ¹⁵N). Therefore, the purpose of this study is to produce and characterize nitrated recombinant cardiac troponin I in light and heavy versions *in vitro* to be used as an input to select the structure that best interacts with the molecule of interest, the process named SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), and later for the validation of quantitative methods by using aptamers. For this, troponin was expressed BL21AI bacteria, containing a plasmid with human cardiac troponin I gene, both in LB rich medium and M9 minimal medium. Protein extract was subject to polyacrilamde gel electrophoresis and quantified using a bovin serum albumin (BSA) standard curve. Then, troponin was purified, dialyzed, quantified, nitrated by peroxinitrite, digested with trypsin and analyzed and characterized by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). The 24 kDa bands corresponding to troponin were identified on gel electrophoresis already at the first evaluations. LC-MS analysis prior to nitration was able to sequence and identify 20 troponin peptides. Nitration showed to be efficient, denoting the nitro group (NO₂) presence in tyrosine at 29 and 112 positions, respectively in the AYATEPHAK and VDKVDEERYDIEAK/VDEERYDIEAK sequence peptides, with at least 80% of the total intensity of these peptides presenting the nitration modification. Given the success of nitrated cardiac troponin production, it is already possible to perform SELEX and, after nitration efficiency is verified, method quantitative validation.

Keywords: troponin; nitration; SCA; ischemia; aptamers; SELEX.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síndrome Coronariana Aguda

As doenças cardiovasculares são as principais causas de óbito no Brasil. Em 2017, foi estimado que 383.961 pessoas morreram por problemas cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017). De todas as doenças envolvidas no grupo, cerca de 25% devem ser decorrentes da Síndrome Coronariana Aguda (SCA) (TEICH et al., 2011).

A SCA é, na verdade, um termo genérico que abrange tanto a angina instável quanto o infarto agudo do miocárdio (LINDAHL, 2013) e, apesar de ser uma doença que apresenta etiologia complexa, ocorre principalmente pela ruptura de placas ateroscleróticas e formação de trombos nas artérias coronárias (LEE et al., 1997; FUSTER et al., 1992). Esse fenômeno causa obstrução no fluxo sanguíneo coronariano e leva à isquemia aguda do miocárdio, responsável pelas principais manifestações clínicas da doença (TEICH et al., 2011), que envolvem: dor torácica prolongada (de 20 a 30 minutos) recente e intensa, com sensação de aperto, constrição, queimação ou peso; além da irradiação da dor para outras partes do corpo, como braços, boca, ombro e axilas, relatada por alguns pacientes (SOCERJ, 2015).

A síndrome pode ser dividida em dois grupos, de acordo com as alterações apresentadas no eletrocardiograma (ECG): são chamados de STEMI aqueles que apresentam elevação do segmento ST e são diagnosticados com infarto agudo do miocárdio (BECKER et al., 2012); e os portadores de SCA sem elevação do segmento ST, ou seja, aqueles que não apresentam nenhum tipo de anormalidade no ECG, chamados de NSTEMI (SILVA, 2012). Dentro deste segundo grupo, ainda podem ser subdivididos em: NSTEMI, que são os pacientes com infarto agudo do miocárdio, sem elevação do segmento ST; e IS, pacientes com isquemia do miocárdio, porém sem apresentar necrose, também chamada de angina instável (LINDAHL, 2013).

O que determina a gravidade dos danos ao tecido, pela falta de perfusão e a possível disfunção cardíaca, é o tempo e a área isquêmica atingida (SILVA, 2012). Em apenas 30% dos casos o trombo causa obstrução total, com consequente aumento do segmento ST. Isso significa que a maioria dos pacientes tem uma obstrução parcial que leva à isquemia, mas sem necrose do miocárdio.

1.2. Biomarcadores de risco cardíaco

Marcadores de isquemia cardíaca são essenciais para abreviar o início do tratamento e diferenciar os pacientes com dor torácica não isquêmica (PARIKH et al., 2006). No infarto do miocárdio (IM), devido a necrose do tecido cardíaco, ocorre a liberação, em grandes quantidades, de proteínas intracelulares, como: mioglobina, isoformas de CK e CK-MB e as troponinas T e I, na corrente sanguínea. As troponinas são consideradas marcadores de escolha para o diagnóstico de infarto, uma vez que compõem o aparelho contrátil dos cardiomiócitos e são expressas quase que exclusivamente no tecido cardíaco, apresentando alta concentração sérica após a lesão do miocárdio, e, conseqüentemente, indicando alta especificidade e sensibilidade clínica (THYGESEN, 2012).

Dentre os pacientes diagnosticados com SCA, cerca de 40 a 60% apresentam seus níveis de troponina abaixo dos limites de decisão clínica para o ensaio, o que pode levar a uma certa confusão no diagnóstico mais específico. É possível que realmente o evento isquêmico não levou à necrose cardíaca e, por isso, não houve alta liberação de troponina no sangue, levando ao diagnóstico de IS. Entretanto, este não pode ser considerado um fator determinante para descartar a hipótese diagnóstica de IM, pois se os testes forem realizados muito precocemente, os níveis de troponina podem ser indetectáveis, mesmo naqueles pacientes que sofreram infarto (MORROW et al., 2007).

O maior desafio clínico tem sido não apenas estabelecer o diagnóstico diferencial entre IS e NSTEMI, mas encontrar um biomarcador exclusivo e considerado “padrão ouro” para a isquemia sem necrose. A determinação de um método diagnóstico laboratorial para este importante aspecto fisiopatológico da SCA é de extrema importância para a tomada de decisões clínicas, acompanhamento do prognóstico desses pacientes e, até mesmo, para encontrar outros pacientes em potencial, de risco cardiovascular, que ainda não foram diagnosticados com a síndrome (LINDAHL, 2013; MORROW et al., 2003).

1.3. Desequilíbrio oxidativo e nitroxidativo

Diversas doenças têm sua fisiopatologia associada a um desequilíbrio oxidativo e nitroxidativo, entre elas, especialmente, as doenças cardiovasculares, visto que o

óxido nítrico (NO) é um dos principais fatores que contribuem para a homeostase do sistema cardiovascular (PELUFFO et al., 2007; LEVRAND et al. 2006).

O óxido nítrico é formado a partir de uma oxidação da L-arginina pela ação da enzima chamada óxido nítrico sintase (NOS), que é expressa em 3 diferentes formas: neuronal (nNOS), endotelial ou constitutiva (eNOS) e induzível (iNOS). Fisiologicamente, o NO produzido pela eNOS, além de inibir a agregação plaquetária, expressão de moléculas de adesão e regular a proliferação e diferenciação da parede dos vasos, também tem um papel importante na regulação endotélio-dependente do tônus vascular. A diminuição nos níveis de NO está relacionada com doenças cardiovasculares como: falência cardíaca, infarto do miocárdio, doença coronariana, aterosclerose, em meio a outras doenças (PELUFFO e RADI, 2007).

As alterações cardiovasculares causadas pelo desequilíbrio nitroxidativo também podem ser confirmadas por algumas proteínas plasmáticas, componentes dos vasos e/ou do miocárdio, por exemplo: apolipoproteínas A e B, plasmina, fibrinogênio, CK-MM, ciclooxigenase, prostaciclina sintase, superóxido dismutase (SOD), entre outras, que já foram identificadas nitradas (PELUFFO e RADI, 2007).

Sobre a influência do óxido nítrico na formação de placas ateroscleróticas, uma vez que sua ruptura é uma das principais causas relacionadas à fisiopatologia da SCA, já se sabe que a inibição crônica de NO acelera e contribui com o processo e que o aumento de sua concentração nos vasos está relacionado com a redução na formação de ateromas (QUIDIM, 2018). Pode até parecer contraditório o fato dessas proteínas do sistema cardiovascular se apresentarem nitradas em um cenário em que as concentrações de óxido nítrico estão diminuídas, porém esse fenômeno pode ser explicado por diferentes fatos.

O primeiro é que a inibição da produção NO e consequente diminuição da sua concentração acontece por meio de inibidores endógenos da enzima NOS na isoforma endotelial, porém há um aumento da atividade da iNOS devido ao ambiente inflamatório e atividade dos macrófagos e neutrófilos presentes na lesão aterosclerótica (PELUFFO e RADI, 2007; QUIDIM, 2018; RADI et al. 1991). O outro ponto é que a reperfusão após o evento isquêmico, mesmo tendo seus benefícios protetores contra períodos maiores de isquemia, pode resultar em danos significativos devido à formação de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como ROS (JESSE,

2001), especialmente do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que é capaz de reagir com o NO^{\cdot} e inativar suas vias de sinalização por meio de um mecanismo chamado difusão controlada (PELUFFO e RADI, 2007).

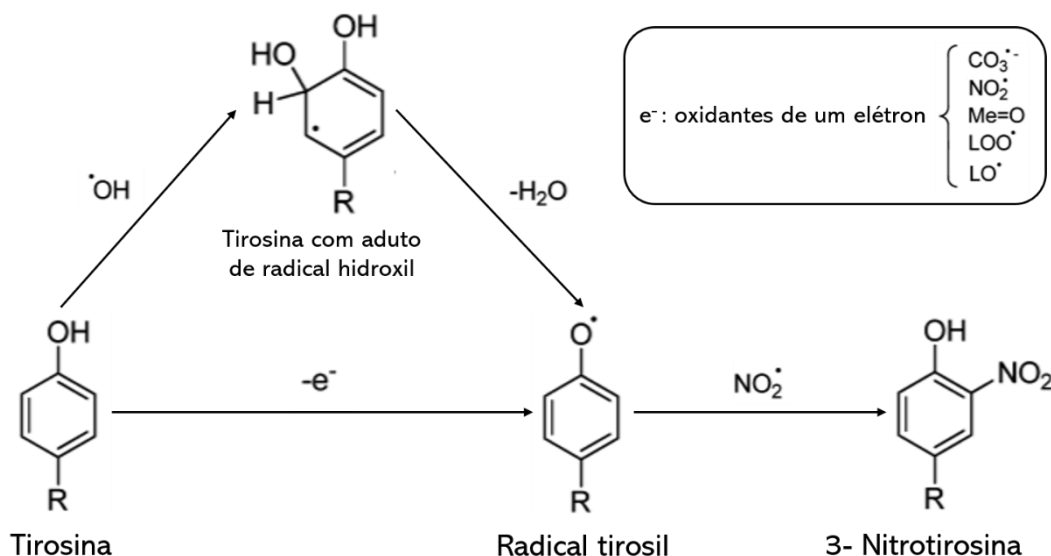
O produto da reação entre NO^{\cdot} e $O_2^{\cdot-}$, ambos gerados pelas células endoteliais, é o peroxinitrito ($ONOO^-$), um ânion de $pK_a = 6.8$, que em pH 7.4 encontra-se parcialmente protonado na forma de ácido peroxinitroso ($ONOOH$) e rapidamente se decompõe em radical hidroxil ($^{\cdot}OH$) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}) devido a sua instabilidade (DENICOLA et al., 1998; RADI et al., 1991). Era comum associar a nitração de proteínas *in vivo* apenas com a geração de $ONOO^-$, mas agora já foi visto que existem outras vias alternativas que podem estar envolvidas no processo, desde que envolvam a presença, ao mesmo tempo, de NO^{\cdot} e suas espécies derivadas, como: NO_2^{\cdot} , $ONOO^-$ e NO_2^- , e oxidantes, como: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $CO_3^{\cdot-}$ e metais de transição (PELUFFO e RADI, 2007).

A nitração proteica nada mais é do que uma modificação pós traducional que consiste na adição do radical nitro (NO_2^{\cdot}) ao anel fenólico de aminoácidos aromáticos como a tirosina e o triptofano, mas principalmente da tirosina, capaz de alterar a funcionalidade da proteína e interferir na sua disponibilidade, seja por torná-la imunogênica ou resistente à degradação (ABELLO et al., 2009), podendo modular a fisiopatologia do sistema cardiovascular (ASLAN, 2010).

1.4. Troponina I cardíaca nitrada

Sabendo-se que a troponina I cardíaca possui, em sua estrutura, 3 tirosinas, foi visto recentemente que esta proteína, que já era considerada um importante biomarcador no diagnóstico da SCA, também é capaz de sofrer nitração. Desse modo, a troponina cardíaca nitrada foi identificada como biomarcador em resposta à isquemia sem necrose (SILVA, 2012). Assim como nas outras proteínas, a nitração da tirosina na troponina acontece em duas etapas. No primeiro momento, ocorre a oxidação do anel aromático formando o radical tirosil (Tyr^{\cdot}) e, em seguida, a adição do NO_2^{\cdot} , para formar a 3 – NO_2 – Tyr (PELUFFO e RADI, 2007).

Figura 1 – Nitração da tirosina. Na primeira etapa, o anel aromático da tirosina é oxidado por oxidantes de um elétron formando o radical tirosil ou pelo radical hidroxil, formando um intermediário entre tirosina e tirosil. Na segunda etapa, por ação do radical nitro, é formada a 3-nitrotirosina.



A utilização de espectrometria de massas (MS), uma técnica altamente sofisticada que utiliza a razão massa-carga (m/z) de átomos ou moléculas ionizadas para identificar, separar, determinar e caracterizar sua composição e estrutura química, tem auxiliado na identificação e quantificação desta modificação pós-traducional, relacionando-a com o estado fisiopatológico do paciente. A MS pode ser utilizada para análise das troponinas cardíacas em amostras biológicas (LABUGGER et al., 2003); e, nos últimos tempos, tem se mostrado ser a melhor e mais eficaz técnica analítica para caracterizar toda a complexidade que constitui o proteoma (LILL, 2003).

Por outro lado, apesar de todas as vantagens na utilização do espectrômetro de massas, a altíssima sensibilidade deste equipamento torna-o capaz de detectar diversos contaminantes, especialmente quando se trata de uma amostra biológica. Dessa maneira, o desafio passou a ser a busca de métodos que sejam capazes de capturar a troponina com essa modificação pós-traducional gerada pelo evento isquêmico, sem necrose.

1.5. Aptâmeros

Entre os diversos métodos de captura a serem escolhidos para se desenvolver um teste, os aptâmeros, pequenas sequências de DNA ou RNA fita simples, capazes

de adotar uma conformação tridimensional por pareamento entre as bases nitrogenadas presentes em sua cadeia, apresentaram-se como uma excelente opção.

Essas pequenas sequências de ácidos nucleicos podem ter encaixe perfeito, com alta afinidade, a moléculas específicas, assim como os anticorpos monoclonais, porém ainda com algumas vantagens em relação a eles: produção *in vitro*, portanto, sintética; possibilidade de seleção de aptâmeros contra alvos de diferente natureza (moléculas orgânicas, metabólitos, DNA, proteína e lipídeo); não são sensíveis à temperatura; desnaturação reversível e o armazenamento por um período maior. Além disso, o custo para sua produção é, em geral, menor e não envolve o uso de animais como ocorre na imunização para obtenção dos anticorpos.

O SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), como é conhecido o processo de seleção dos aptâmeros (TUERK e GOLD, 1990), utiliza grandes bibliotecas combinatoriais de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente que são incubadas com proteínas purificadas ou células inteiras. Moléculas ligadas ao alvo são selecionadas e, posteriormente, amplificadas por PCR. Diversas rodadas de seleção são necessárias até se obter aptâmeros com alta afinidade e especificidade (ELLINGTON, 1990; OLIPHANT *et al.*, 1989).

1.6. Validação do método

Depois de realizada a seleção dos melhores aptâmeros e antes que eles sejam utilizados para capturar a troponina I cardíaca nitrada no soro dos pacientes, é preciso realizar uma avaliação quantitativa do método, a fim de verificar o quanto de troponina esses aptâmeros são capazes de capturar. Uma vez que também não se sabe a quantidade de troponina cardíaca nitrada que pode existir em cada amostra biológica, uma maneira de testar a eficiência do ensaio é a introdução de quantidades conhecidas de troponina recombinante marcada com ^{15}N e nitrada *in vitro* nas amostras biológicas.

As proteínas marcadas metabolicamente com ^{15}N são chamadas de proteínas pesadas por causa da presença de 1 nêutron a mais no átomo de nitrogênio, que leva ao aumento de sua massa atômica e, conseqüentemente, da massa molecular das proteínas sintetizadas a partir dele em relação às proteínas leves, que têm em sua composição o ^{14}N . A versão pesada do peptídeo apresenta as mesmas características

físico-químicas e o mesmo tempo de retenção na coluna cromatográfica, apenas com a diferença na massa das moléculas (KUHN, 2009).

A técnica de MS, justamente por identificar e caracterizar moléculas com base na m/z, é capaz de detectar essa diferença de massa entre as proteínas leves e pesadas. Desse modo, ao colocar uma certa quantidade de troponina cardíaca nitrada marcada com ^{15}N em uma amostra biológica, pode-se verificar o quanto dela os aptâmeros foram capazes de capturar, sem correr o risco de que essa troponina nitrada capturada eventualmente já estivesse presente nessa amostra antes que a versão pesada da proteína fosse inserida.

A marcação metabólica com ^{15}N envolve o crescimento paralelo de dois grupos celulares, um deles em meio de cultura rico em nutrientes, como ocorre normalmente, e o outro em meio mínimo, contendo ^{15}N ao invés do ^{14}N . Dessa forma, todas as proteínas formadas pelo microrganismo crescido em meio mínimo serão também marcadas, o que faz com que este tipo de marcação seja um dos procedimentos mais acurados para a quantificação de proteínas (LILL, 2003).

2. OBJETIVOS

Produzir a troponina I cardíaca humana recombinante nitrada nas versões leve e pesada e caracterizar por espectrometria de massas, a fim de ser utilizada como insumo para seleção de aptâmeros específicos e validação quantitativa do método.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Recuperação de clone bacteriano contendo gene que codifica troponina cardíaca.

Uma alíquota do clone 1 de BL21AI – TNNI3 (E. coli pDEST/TNNI3) previamente congelada a -70 °C foi estriada em placa de LB (100 µg/mL de ampicilina) e incubada por 16 horas em estufa a 37 °C. Em seguida, uma colônia foi incubada em 10 mL de meio LB, para posteriormente expressar a troponina leve, ou 10 mL de meio M9 1x completo (M9 5x, MgSO₄ 1 M, CaCl₂ 0,1 M, glicose 1 M, ampicilina 100 µg/mL e ¹⁵NH₄Cl), para a troponina pesada, por 17 horas a 37 °C, sob agitação em shaker orbital a 150 rpm. Outra colônia foi incubada sob as mesmas condições para ser utilizada com controle não induzido.

3.2. Expressão de troponina cardíaca recombinante (leve e pesada).

Após 16 horas de incubação, 10 mL da cultura foram transferidos para 200 mL de meio LB (100 µg/mL de ampicilina), para expressão da troponina leve, ou 90 mL de M9 completo 1x, para expressão da troponina pesada, e incubados a 37 °C, por cerca de 1h30min para a leve e 3h para a pesada, até atingir OD₆₀₀ esperada (de 0,4 a 0,6). Em seguida, foram adicionados 2 mL de L-arabinose aos 200 mL de cultura, para a troponina leve, ou 1 mL de L-arabinose aos 100 mL de cultura, para a troponina pesada, (concentração final de 0,2%) e mantidos a 37 °C, por 4 horas, sob agitação de 200 rpm.

Após a indução da expressão, a cultura de células foi distribuída em tubos Falcon de 50 mL e centrifugada por 15 minutos, 4000 rpm a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado com 5 mL de Tampão de Lise Proteômica (Lisozima 0,2 mg/mL; PMSF 1 mM; NaCl 0,5 M; imidazol 20 mM; uréia 7 M; Tris-HCl 100 mM; pH 7,4) em cada tubo.

Foi realizada incubação em gelo e 3 ciclos de sonicação das células com intervalos de 1 minuto. Por fim, o lisado foi centrifugado a 14000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Falcon de 50 mL, reservados e armazenados a 4 °C para posterior purificação e o pellet também foi armazenado à mesma temperatura.

3.3. Quantificação de proteínas da amostra.

Foi feita uma diluição seriada de albumina de soro bovino (BSA) nas seguintes concentrações: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL. Em seguida, foram medidas as absorvâncias, em triplicata, de cada amostra por NanoDrop A₂₈₀ nm. A partir da média dos valores obtidos, foi feito um gráfico e obtida a equação da reta. As proteínas provenientes do clone BL21AI – TNNI3 também foram diluídas em proporção 1/10 e 1/100 e testadas em NanoDrop A₂₈₀ nm. Os valores de absorvância das amostras do clone bacteriano foram aplicados na equação da reta para estimar a quantidade de proteínas presente.

3.4. Avaliação por SDS-PAGE.

As amostras foram preparadas nas seguintes condições: 5 µL de amostra, 5 µL de NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), 2 µL de NuPAGE Reducing Agent (10x) e 5 µL de água ultrapura. Foi realizado spin para a sedimentação das partículas e as amostras foram incubadas no termomixer a 70°C e 500 rpm por 10 minutos. O gel NuPage foi encaixado na cuba Mini Gel Tank e esta foi preenchida com 400 mL de solução MES NuPage Running Buffer (1x). Foram pipetados no gel 10 µL de marcador SeePlus2 e 20 µL de cada amostra nos poços. O Mini Gel Tank foi fechado, os eletrodos ligados e a corrida iniciada em 100V.

Quando o marcador caiu até a última banda, indicando o fim da corrida, a cuba foi aberta e o suporte com o gel desencaixado. Depois, o suporte do gel foi aberto com uma espátula, o gel retirado do suporte e colocado em um recipiente, onde foi adicionado o corante Simply Blue SafeStain em volume suficiente para cobrir o gel. Foi deixado em agitador tipo gangorra e, após 1h, o corante foi descartado e foi adicionada água ultrapura, trocada duas vezes no período de 1h e deixada *overnight*.

3.5. Purificação troponina cardíaca recombinante.

A purificação de troponina cardíaca recombinante foi feita por cromatografia de afinidade a coluna de cobalto HisTrap HP Histidina. A coluna foi equilibrada passando-se 10 volumes de Tampão Tris 100 mM, NaCl 300 mM, Ureia 4 M, PMSF 1 mM, pH 7,4, sob fluxo de 1 mL/min. Em seguida, passou-se o extrato proteico sob mesmo fluxo, coletando a fração não retida na coluna (*flow through*) em dois tubos de 5 mL

para posterior avaliação. Após a etapa de ligação da troponina à coluna, segue-se a etapa de lavagem com 10 mL de tampão Tris 100 mM, NaCl 300 mM, Ureia 4 M, PMSF 1 mM, pH 7,4, sob fluxo de 1 mL/min.

Em seguida, foi feita eluição com 5 mL de tampão Tris 100 mM, NaCl 300 mM, Ureia 4 M, PMSF 1 mM, 50 mM Imidazol, pH 7,4 e coleta em 5 tubos com aproximadamente 1 mL cada, nomeados 50.1-5. Em seguida, eluição com 5 mL de tampão Tris 100 mM, NaCl 300 mM, Ureia 4 M, PMSF 1 mM, 100 mM Imidazol, pH 7,4 e coleta em 5 tubos com aproximadamente 1 mL cada, nomeados 100.1-5. E, por fim, eluição com 10 mL de tampão Tris 100 mM, NaCl 300 mM, Ureia 4 M, PMSF 1 mM, 250 mM Imidazol, pH 7,4 e coleta dos 5 primeiros mLs em 5 tubos com aproximadamente 1 mL cada e os 5 mL restantes em um único tubo de 5 mL. Tubos nomeados: 250.1, 250.2, 250.3, 250.4, 250.5 e 250.6-10 (5 mL). As alíquotas foram armazenadas a 4°C para avaliação e quantificação.

3.6. Diálise da troponina recombinante purificada.

As amostras obtidas da purificação 50.1-5 foram pipetadas em um único tubo para diálise (capacidade 6 mL) previamente lavado e a membrana hidratada com tampão PBS 1x pH 7,4. O tubo foi fechado, foi colocada a boia e o tubo foi introduzido num béquer contendo 1 L de tampão PBS 1x. O béquer com o tubo foi incubado a 4°C sob agitação branda em agitador magnético. Foram realizadas 3 trocas de tampão (1L) a cada 1h, mantendo sempre a incubação a 4°C e agitação branda. Em seguida foi realizada uma quarta troca de tampão PBS 1x (100 mL) + 100 µL de PMSF e mantendo a incubação a 4°C e agitação branda *overnight*. Também foi adicionado 50 µL de PMSF na própria amostra.

3.7. Preparação e digestão dos peptídeos para LC-MS.

3.7.1. Protocolo de digestão rápida.

Foram pipetados em tubos LoBind: 20 µL de RapiGest, 2 µL de proteína (cerca de 2 µg), 6 µL de TEAB e 10 µL de água. Depois de 15 minutos de incubação a 80°C, foram adicionados 0,6 µL de DTT 0,2 M e os tubos foram incubados por 30 minutos a 60°C. Em seguida, foram acrescentados 33 µL de acrilamida 50 mM e foi feita mais uma incubação por 30 minutos, desta vez em temperatura ambiente e no escuro. Então foram adicionados 10 µL de tripsina (1 mg/mL) e 1 µL de CaCl₂ 100 mM e os

tubos foram incubados novamente durante 1h a 37°C. Ao final, para hidrólise do RapiGest, foram colocados 5 µL de TFA 10%, as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas a 37°C por 10 minutos.

3.7.2. Protocolo de digestão lenta.

Foram pipetados em tubos LoBind: 20 µL de RapiGest, cerca de 2 µg de proteína + água em qsp 30 µL e 6 µL de TEAB. Depois de 15 minutos de incubação a 80°C sob agitação de 500 rpm, foram adicionados 0,6 µL de DTT 0,2 M e os tubos foram incubados por 30 minutos a 60°C, também a 500 rpm. Em seguida, foram acrescentados 2,5 µL de acrilamida 100 mM e foi feita mais uma incubação por 30 minutos, desta vez em temperatura ambiente e no escuro. Então foram adicionados 10 µL de tripsina (1 mg/mL) e os tubos foram incubados novamente a 37°C sob agitação de 300 rpm *overnight*. Após 17h, para hidrólise do RapiGest, foram colocados 5 µL de TFA 10%, as amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas a 37°C por 20 minutos. Por final, foi feita uma centrifugação a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C.

3.8. Clean-up de amostras para LC-MS.

A placa THERMO µSOLA foi preparada e ativada com 300 µL de ACN 100% e o material foi esgotado por pressão positiva; o filtro foi equilibrado com 300 µL de TFA 0,1% e o material foi esgotado por pressão positiva; e foi adicionado o conteúdo da digestão e, novamente, o material foi esgotado por pressão positiva. Em seguida, foram feitas 10 lavagens, cada uma com 500 µL de TFA 0,1%, também com o material sendo esgotado por pressão positiva no final de cada lavagem. Depois, os peptídeos foram eluídos em 100 µL de ACN 70%, em duas etapas de 50 µL cada.

As amostras foram secadas em speed-vac e depois ressuspendidas em 10 µL de ACN 15% e TFA 0,5%. Depois de serem homogeneizadas em vortex, foram adicionados 40 µL de água LC-MS, novamente homogeneização em vortex e spin para a sedimentação das partículas. Ao final, todo o conteúdo foi transferido para tubos de vidro (*vials*).

3.9. Análise por LC-MS.

Foi utilizado o padrão comercial PRTC para verificar a confiabilidade e sensibilidade do equipamento e então as amostras de troponina foram colocadas na

placa. Ao final, os dados gerados por MS/MS foram processados e analisados por MaxQuant.

3.10. Nitração da troponina.

Foram preparados 4 tubos, nomeados leve 2.1-2 NO₂ e pesada 3.1-2 NO₂, pois as amostras escolhidas para a nitração vieram dos tubos 2 e 3 de troponina leve e pesada, respectivamente. Foram então pipetados 50 µL de proteína (cerca de 0,3 µg/µL de troponina pesada e 1 µg/µL de troponina leve), 50 µL de NaHCO₃⁻ 125 mM (concentração final), 10 µL de ONOO⁻ (peroxinitrito) 100 mM, 140 µL de água e os tubos foram deixados sob agitação de 600 rpm em temperatura ambiente (21°C) por 10 minutos. Ao final, foram adicionados 27,8 µL de Tampão PBS 10x (100 mM) para diminuir o pH da solução, deixando-o mais próximo de 7. Depois de aproximadamente 1h, as amostras foram congeladas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Descongelamento do clone BL21AI-TNNI3, semeadura em placa e expressão da troponina.

O clone 1 de BL21AI-TNNI3, já com o plasmídeo pDEST contendo gene da troponina I cardíaca humana foi descongelado e uma pequena alíquota foi estriada em placa de ágar LB com ampicilina (conforme item 3.1). Após 16h de incubação em estufa a 37 °C, as colônias estavam visíveis.

Figura 2 – Placa de ágar LB com ampicilina com colônias de *E. coli* BL21AI-TNNI3.



Uma colônia isolada foi semeada em 10 mL de meio LB com ampicilina e, posteriormente, o volume foi transferido para 200 mL do mesmo meio. Em seguida foi feita a indução da expressão com 2 mL de L-arabinose (conforme item 3.2). Ao final do experimento, após as bactérias terem sido lisadas por sonicação, foi obtida um extrato total de proteínas da amostra.

4.2. Quantificação de proteínas totais na amostra após expressão de troponina leve.

A quantificação das proteínas totais da amostra, a fim de verificar se as proteínas foram liberadas e estavam solúveis no sobrenadante foi feita por meio de uma curva padrão utilizando quantidades conhecidas de BSA (conforme item 3.3).

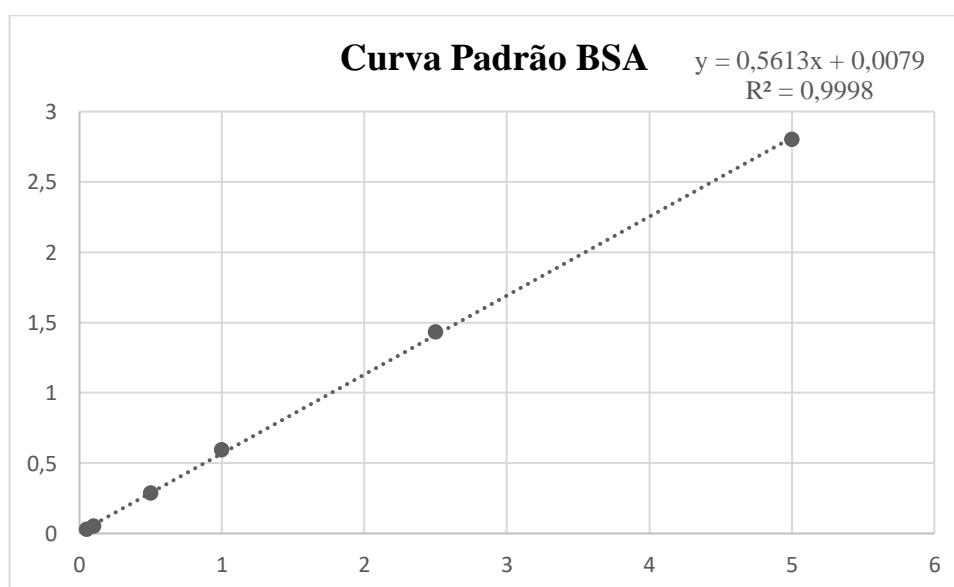
A absorbância de cada diluição foi testada em triplicada e os resultados apresentados foram os seguintes:

Tabela 1 – Absorbância de BSA, a 280 nm, em diferentes concentrações, para quantificação de troponina leve.

[] (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média
0,05	0,021	0,038	0,019	0,026
0,1	0,047	0,055	0,049	0,050
0,5	0,282	0,277	0,292	0,283
1,0	0,570	0,612	0,592	0,591
2,5	1,435	1,425	1,433	1,431
5,0	2,811	2,799	2,793	2,801

A partir dos valores obtidos, foi construído um gráfico, em que se obteve a equação da reta.

Gráfico 1 – Curva Padrão de BSA para quantificação de extrato proteico após expressão troponina leve.



O extrato proteico do clone bacteriano também foi diluído, testado e, aplicando a equação da reta sobre esses valores, foi possível estimar a quantidade de proteína presente na amostra.

Tabela 2 – Absorbância e concentração do extrato proteico bruto de BL21AI-TNNI3 na versão leve.

<i>Amostra</i>	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média	[] mg/mL
<i>Não induzido 1/100</i>	0,037	0,023	0,033	0,031	4,11
<i>Não induzido 1/10</i>	0,242	0,270	0,224	0,245	4,23
<i>Não induzido puro</i>	2,587	2,577	2,911	2,692	4,78
<i>Induzido 1/100</i>	0,056	0,053	0,045	0,051	7,73
<i>Induzido 1/10</i>	0,429	0,348	0,337	0,371	6,47
<i>Induzido puro</i>	2,653	2,622	2,631	2,801	4,68

O valor assumido para a quantidade de proteína na amostra de expressão foi 4,68 mg/mL, pois este foi o que apresentou menor variação entre os valores de absorbâncias medidas.

4.3. Avaliação da troponina leve por SDS-PAGE após a expressão.

A partir do SDS-PAGE, foi possível visualizar a troponina I cardíaca presente nas amostras em diferentes etapas do processo. Como já é conhecido que a troponina I é um monômero de aproximadamente 23,5 KDa (MARTINS, 2009), é possível identificá-la por meio da comparação com marcadores comerciais que apresentam bandas conhecidas de diversos tamanhos.

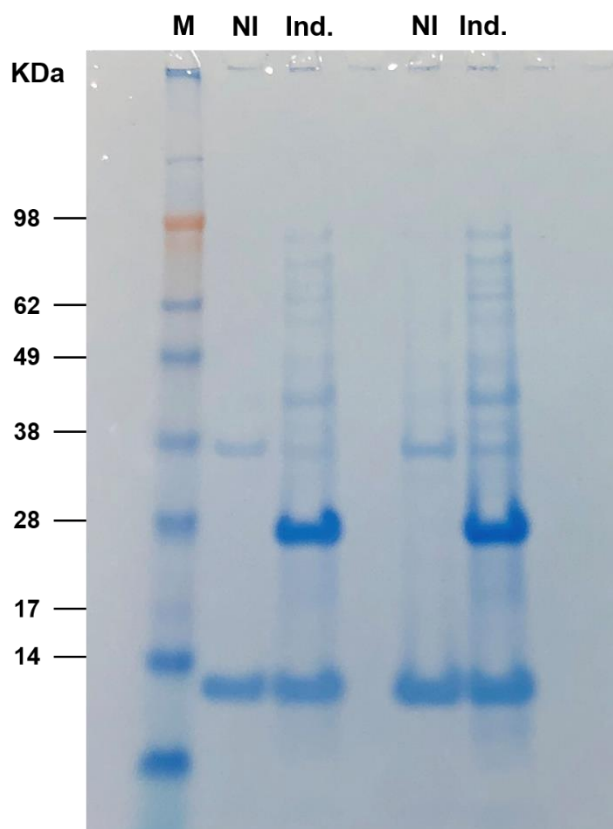
No primeiro SDS-PAGE as amostras foram preparadas em duas concentrações diferentes, tanto para induzido, quanto para o não induzido:

Tabela 3 – Preparação das amostras para SDS-PAGE pré purificação da troponina leve.

Reagente	Volume	Volume
Amostra	5 µL	10 µL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µL	5 µL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 µL	2 µL
Água ultrapura	5 µL	-
TOTAL	20 µL	20 µL

No primeiro poço do gel foram pipetados 10 µL do marcador SeePlus 2 e nos poços seguintes foram pipetadas as amostras não induzido (5 µL), induzido (5 µL), não induzido (10 µL) e induzido (10 µL), respectivamente.

Figura 3 – SDS-PAGE pré-purificação da troponina leve. M – marcador de tamanho molecular (SeePlus 2); NI – não induzido, Ind. – induzido. Bandas superexpressas nas amostras induzidas indicando uma proteína com peso molecular próxima de 28 KDa, sugerindo presença da troponina I cardíaca (23,5 KDa).



É possível observar que, em ambas as amostras de indução, há bandas superexpressas próximas à banda de 28 KDa do marcador. O clone bacteriano utilizado como vetor contém o gene da troponina I cardíaca humana inserido em um plasmídeo pDEST, que tem sua transcrição regulada por um fator chamado AraC. A L-arabinose, utilizada como indutor de expressão, tem afinidade por esse regulador, formando um complexo com ele e permitindo a transcrição dos genes presentes no plasmídeo e a tradução das proteínas codificadas por esses genes.

Levando em consideração todas essas informações, pode-se considerar, então, que as bandas superexpressas nas amostras induzidas indicam a troponina, com cerca de 23,5 KDa. Também é possível visualizar algumas outras bandas mais claras, que são proteínas constitutivas da bactéria, uma vez que esta avaliação por SDS-PAGE foi feita com o extrato proteico bruto, previamente à purificação. A pequena quantidade de proteínas bacterianas no extrato não induzido se deve pelo diminuto volume usado como controle negativo. Enquanto utilizou-se 200 mL meio de

cultura para a indução da expressão, apenas 10 mL foram utilizados para o controle. Assim, mantendo os volumes de extrato proteico aplicados ao gel, tem-se, proporcionalmente, menos proteínas no controle negativo.

4.4. Avaliação da troponina por SDS-PAGE após a purificação.

As amostras provenientes da purificação foram nomeadas de acordo com a concentração de imidazol presente na amostra, seguida do número correspondente (exemplo: 50.1, o primeiro mL da amostra com 50 mM imidazol) (conforme item 3.5).

Depois que foi feita a purificação da troponina leve, foi realizado novamente o SDS-PAGE para verificar quais amostras provenientes da purificação continham maior quantidade da proteína purificada.

As amostras novamente foram preparadas em concentrações diferentes:

Tabela 4 – Preparação das amostras dos tubos 50.1-3 e 100.1-3 para SDS-PAGE pós purificação da troponina leve.

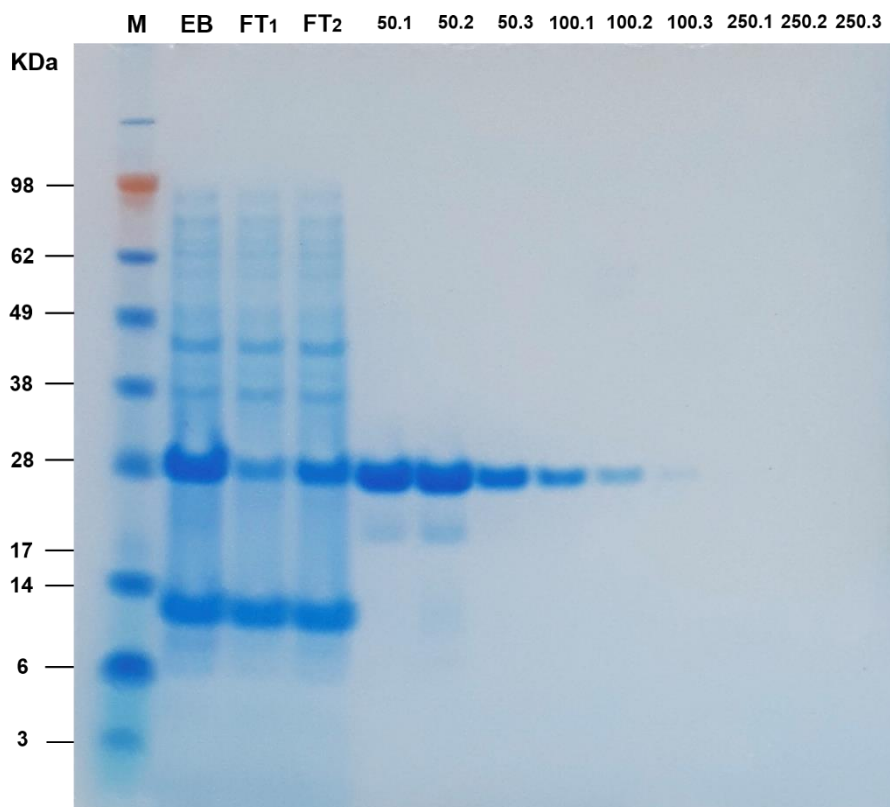
Reagente	Volume
Amostra	5 µL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 µL
Água ultrapura	5 µL
TOTAL	20 µL

Tabela 5 – Preparação das amostras de extrato bruto, *flow through* 1 e 2 e dos tubos 250.1-3 para SDS-PAGE pós purificação da troponina leve.

Reagente	Volume
Amostra	10 µL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 µL
Água ultrapura	-
TOTAL	20 µL

No primeiro poço do gel foram pipetados 10 µL do marcador SeePlus 2 e nos poços seguintes foram pipetadas as amostras: extrato bruto, *flow through* 1, *flow through* 2, 50.1, 50.2, 50.3, 100.1, 100.2, 100.3, 250.1, 250.2, 250.3, respectivamente.

Figura 4 – SDS-PAGE pós purificação da troponina leve. M – marcador; EB – extrato bruto, FT1 – *flow through* 1; FT2 – *flow through* 2; 50.1-3 – amostras de 1 a 3 provenientes da purificação (eluição) com 50 mM Imidazol; 100.1-3 – amostras de 1 a 3 provenientes da purificação (eluição) com 100 mM Imidazol; 250.1-3 – amostras de 1 a 3 provenientes da purificação (eluição) com 250 mM Imidazol.



O gel feito após a purificação indica a mesma banda superexpressa no extrato bruto, assim como no gel anterior. As amostras de *flow through*, aquelas que coletadas assim que a amostra foi injetada na coluna, apresentam diversas bandas, ou seja, diversas proteínas com tamanhos diferentes e a banda correspondente à troponina, o que sugere que parte da dela não ficou retida na coluna e saiu nesta etapa. Este resultado indica que a coluna pode ter saturado. Em seguida, após a eluição com 50 mM imidazol, as bandas correspondentes ao tamanho molecular da troponina começam a ficar mais fortes, mas nas amostras 50.1 e 50.2 ainda há um pouco de contaminação com uma outra proteína um pouco menor. A partir da amostra 50.3, aparentemente há menor quantidade de contaminantes e a troponina continua sendo eluída, já purificada. A concentração de troponina vai diminuindo, e o último poço em que é possível visualizá-la é o da amostra 100.3. Dessa forma, pode-se afirmar que a troponina está presente nas amostras 50.1-3 a 100.1-3, representadas na figura acima, além das amostras 50.4 e 50.5 que não foram submetidas à eletroforese mas são as amostras intermediárias entre 50.3 e 100.1 presentes no gel.

Diante disso, as amostras 50.1-5 foram escolhidas para a diálise e, futuramente, para serem submetidas à nitratação e utilizadas para o SELEX. A diálise é importante para remover todos os sais e agentes caotrópicos e deixá-la no estado mais propício para outras aplicações.

O mesmo processo foi realizado após a expressão e purificação da troponina pesada (marcada isotopicamente com ^{15}N). As amostras, novamente, foram preparadas em concentrações diferentes, como descrito na tabela abaixo.

Tabela 6 – Preparação das amostras dos tubos 50.1-3 e 100.1-3 para SDS-PAGE pós purificação da troponina pesada.

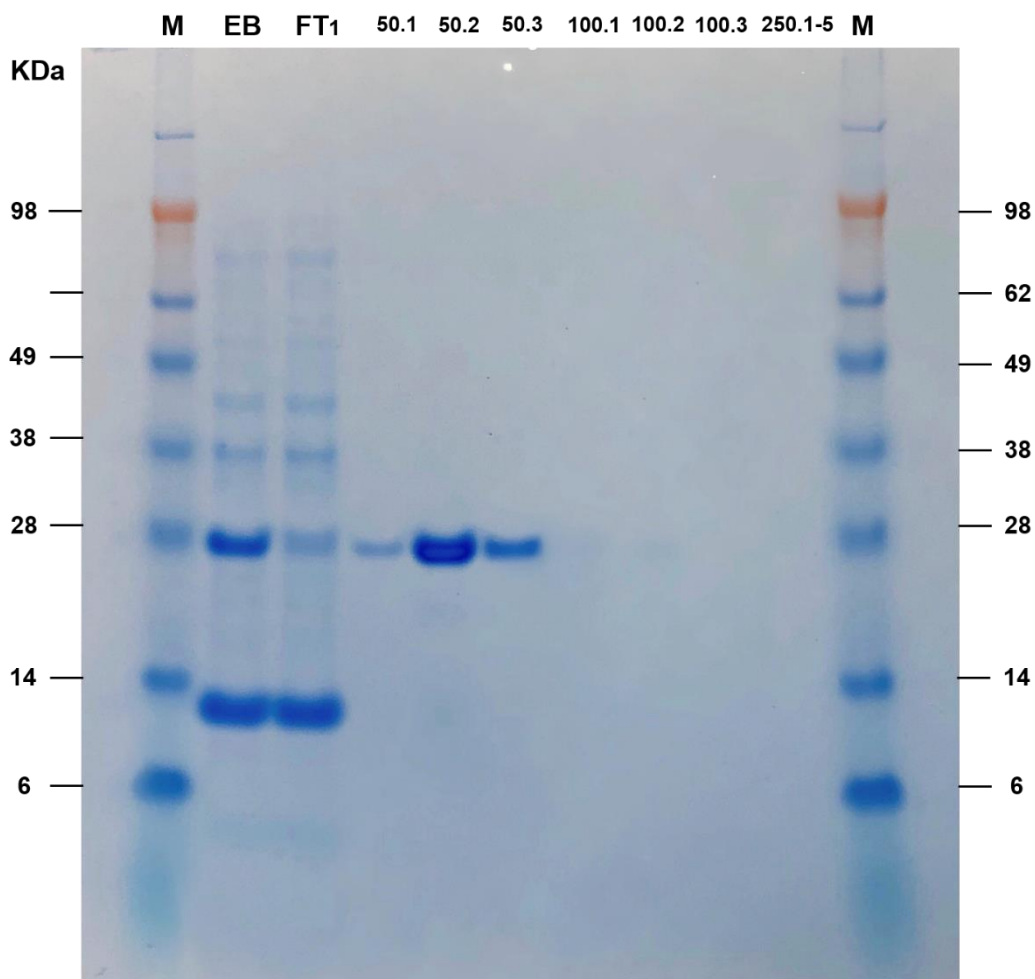
Reagente	Volume
Amostra	5 μL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 μL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 μL
Água ultrapura	5 μL
TOTAL	20 μL

Tabela 7 – Preparação das amostras de extrato bruto, *flow through* 1 e do tubo 250.1-5 para SDS-PAGE pós purificação da troponina pesada.

Reagente	Volume
Amostra	10 μL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 μL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 μL
Água ultrapura	-
TOTAL	20 μL

No primeiro poço do gel foram pipetados 10 μL do marcador SeePlus 2; nos poços seguintes foram pipetadas as amostras: extrato bruto, *flow through* 1, 50.1, 50.2, 50.3, 100.1, 100.2, 100.3, 250.1-5 (única amostra) e novamente 10 μL do marcador SeePlus 2, respectivamente.

Figura 5 – SDS-PAGE pós purificação da troponina pesada. M – marcador; EB – extrato bruto, FT1 – *flow through* 1; FT2 – *flow through* 2; 50.1-3 – amostras de 1 a 3 provenientes da purificação (eluição) com 50 mM imidazol; 100.1-3 – amostras de 1 a 3 provenientes da purificação (eluição) com 100 mM imidazol; 250.1-5 – amostras proveniente da purificação (eluição) com 250 mM imidazol.



O gel feito após a purificação da troponina pesada se mostrou, em parte, semelhante ao da purificação da troponina leve. Também há superexpressão da banda correspondente à troponina no extrato bruto e, no *flow through*, parte da proteína não ficou retida na coluna. Por outro lado, a primeira amostra proveniente da purificação, chamada de 50.1 (^{15}N) apresentou uma quantidade pequena de proteína, o que muda muito para a amostra seguinte. Outra diferença notável é que a partir da amostra 100.1 (^{15}N) já quase não se pode mais enxergar a troponina, mostrando que foi necessária uma menor quantidade de imidazol para elui-la. Como foram utilizadas colunas diferentes, o resultado é factível.

4.5. Quantificação de proteínas na amostra após a purificação.

A quantificação das proteínas totais da amostra já havia sido feita a fim de verificar se as proteínas foram liberadas e estavam solúveis no sobrenadante. Porém, após a purificação, também é necessário quantificar o quanto de troponina efetivamente há na amostra. Por isso, novamente foi feita por meio de uma curva padrão utilizando quantidades conhecidas de BSA.

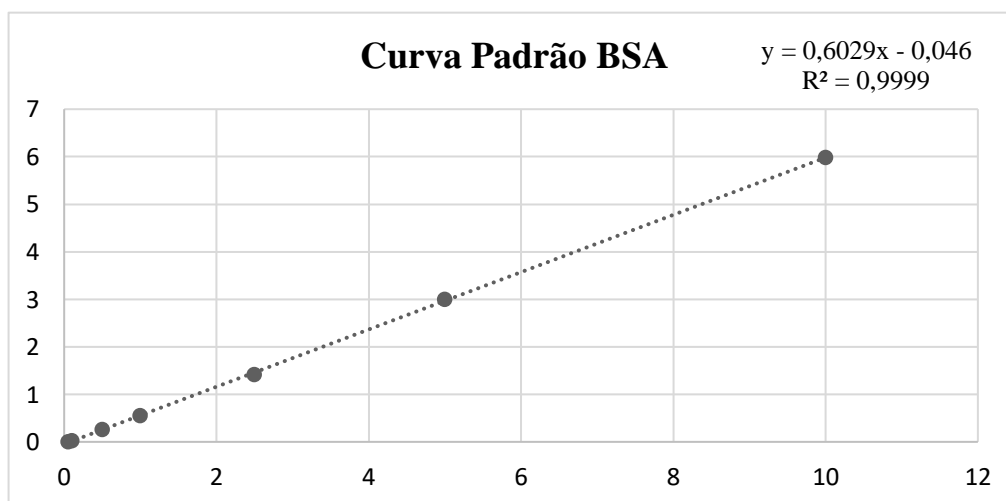
A absorbância de cada diluição foi testada em triplicada e os resultados apresentados foram os seguintes:

Tabela 8 – Absorbância de BSA em diferentes concentrações para quantificação de troponina pesada.

[] (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média
0,05	0	0,003	0	0,1
0,1	0,015	0,029	0,036	0,0267
0,5	0,254	0,243	0,267	0,254
1,0	0,560	0,535	0,552	0,549
2,5	1,406	1,386	1,433	1,411
5,0	2,970	3,075	2,961	3,002
10	5,988	5,920	6,029	5,979

A partir dos valores obtidos, foi construído um gráfico, em que se obteve a equação da reta.

Gráfico 2 – Curva Padrão de BSA para quantificação de troponina pesada.



O extrato proteico do clone bacteriano também foi diluído, testado e, aplicando a equação da reta sobre esses valores, foi possível estimar a quantidade de proteína purificada presente na amostra.

Tabela 9 – Absorbância e concentração em diluição seriada da troponina nas versões leve e pesada.

<i>Amostra</i>	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média	[] mg/mL
<i>Leve 1/100</i>	0	0	0	0	-
<i>Leve 1/10</i>	0	0,001	0,002	0,001	-
<i>Leve puro</i>	0,022	0,032	0,028	0,027	0,12
<i>Pesada 1/100</i>	0	0	0	0	-
<i>Pesada 1/10</i>	0	0	0	0	-
<i>Pesada puro</i>	0,010	0,027	0,032	0,023	0,11

Diante dos valores obtidos a partir da equação da reta, é possível dizer que ambas as amostras de troponina, leve e pesada, após a purificação estão na concentração aproximada de 0,1 mg/mL. As absorbâncias das primeiras amostras testadas de cada uma delas apresentou resultado zero (ou muito próximo de) devido à baixa concentração de troponina. Na verdade, as amostras originais já apresentam concentrações muito baixas e quando diluídas, encontram-se fora do limite de detecção do aparelho NanoDrop A_{280nm}.

4.6. Análise da troponina não nitrada por LC-MS.

4.6.1. Análises estatísticas, grau de pureza e contaminantes.

Foram colocadas no espectrômetro de massas as amostras de troponina purificada em suas versões leve e pesada em duplicata, somando 4 amostras no total. Estas foram registradas com a data do dia e de acordo com a versão e o número referente àquela amostra (20200219-tropo-leve1, 20200219-tropo-leve2, 20200219-tropo-pesada1, 20200219-tropo-pesada2). O método utilizado foi D:\ROTINA\AMILOIDPROT\Methods\20191119_METHOD_AMILOIDPROT.

Após o processamento e análise por MaxQuant, foram identificadas as proteínas presentes nas amostras e a intensidade de cada uma delas. A análise foi feita, em geral, somando as intensidades das duas amostras de troponina leve e as

duas amostras de troponina pesada. A intensidade total das amostras da versão leve foi de 186.970.000.000 e da versão pesada foi de 13.485.777.350.

A troponina I cardíaca humana, identificada como P19429 no banco de dados UniProt, nas amostras leves apresentou intensidade de 151.160.000.000, o que corresponde a 80% da intensidade total da amostra. Já nas amostras pesadas, foi de 157.530.000, ou seja, 1% da intensidade total da amostra.

Depois de fazer esta primeira análise bruta, foram identificados os principais contaminantes presentes na amostra.

Quadro 1 – Principais contaminantes na análise da troponina não nitrada por LC/MS de acordo com o UniProt.

Código	Identificação da proteína
P07477	Tripsina (humana)
P00761	Tripsina (suína)
P00766	Quimiotripsinogênio (bovino)
P04264	Queratina tipo I citoesqueleto 2 (humano)
P13645	Queratina tipo I citoesqueleto 10 (humano)
P35908	Queratina tipo II citoesqueleto 2 epiderme (humano)
P35527	Queratina tipo I citoesqueleto 9 (humano)
P13647	Queratina tipo II citoesqueleto 5 (humano)
P02768	Albumina (humana)
P02769	Albumina (bovina)

Sabendo que todas as versões de tripsina (e seus precursores) foram intencionalmente adicionadas à amostra para a digestão dos peptídeos, pode-se descontar esses valores e ajustar a intensidade de TNNI3 em relação ao total. Deste modo, descontando as tripsinas da análise, a somatória das intensidades na versão leve passa a ser 173.311.000.000 e na versão pesada 4.534.627.350. Consequentemente, a intensidade relativa da TNNI3 leve e pesada aumentam para 87% e 3,4%, respectivamente.

Também foram descontados os valores de intensidade de outras proteínas, em sua maioria proteínas da própria bactéria, que apresentaram cobertura, chamada de

“sequence coverage”, menor que 5%. Os principais peptídeos encontrados foram de proteínas ribossomais da *E. coli*, como S-formil glutationa hidrolase, proteína de ligação periplasmática/regulador da transcrição Lacl, proteínas ribossomais 50S e 30S. Ao descontar esses valores, o valor da TNNI3 leve em relação ao total (também após o desconto dos valores de tripsina) não é alterado significativamente, porém, a TNNI3 pesada passa a ser 5% do valor de intensidade total da sua amostra.

Além da tripsina, um outro tipo de contaminante que apresentou alta intensidade, em ambas as amostras analisadas, foi a queratina humana, de diferentes tipos, como descrito no quadro anterior. Mesmo tomando todos os cuidados com a manipulação durante os experimentos, utilizando luvas e respeitando as regras de biossegurança, houve contaminação que, mesmo sendo mínima, foi facilmente detectada pelo espectrômetro de massas, uma vez que a técnica utilizada é extremamente sensível.

A intensidade que as queratinas (somadas) apresentaram na análise MS da amostra leve foi de 6.294.100.000 e na amostra pesada 2.758.400.000. Apesar de o valor bruto na versão leve ser mais do que duas vezes maior que na versão pesada, os valores relativos não seguiram o mesmo padrão. A intensidade dos peptídeos de queratina nas amostras de troponina leve correspondem a apenas 3% da intensidade total, já nas amostras de troponina pesada o valor relativo é de 20%.

Por apresentar uma intensidade muito baixa em relação à da troponina leve e ao total nesta amostra, não foram feitos cálculos descontando os valores correspondentes à queratina nessa versão. No caso da versão pesada, removendo os contaminantes de queratina (depois de descontar a tripsina e os contaminantes com cobertura menor que 5%), a troponina passa a ser 52% do valor total. Entretanto, este é apenas um cálculo hipotético, pois não se pode descontar esses valores, uma vez que não se sabe em qual momento da manipulação esta contaminação ocorreu. Como todo o processo, desde a expressão da proteína até a análise por LC/MS, envolve diversas etapas manuais, os contaminantes podem ter entrado nas amostras em qualquer uma das etapas.

Um outro ponto importante que pode explicar esta enorme diferença de intensidade entre os diversos componentes das amostras, em relação ao total, são as condições de crescimento da bactéria. As proteínas leves foram obtidas da expressão

de uma *E. coli* em meio LB, um meio rico que dispunha de muitos nutrientes para que a bactéria pudesse crescer e expressar suas proteínas livremente. O contrário aconteceu na amostra de proteínas pesadas, onde a cultura bacteriana ocorreu num meio mínimo, o que limitou o crescimento e a expressão bacteriana, fazendo com que, mesmo superexpressa, a troponina pesada tivesse uma intensidade muito menor do que a troponina leve e até mesmo do que os contaminantes presentes na amostra, como a tripsina utilizada na digestão dos peptídeos para a análise por MS e a queratina humana. Outro ponto importante, que reforça a ideia do crescimento limitado, é a diferença do tempo até atingir a OD600 (conforme item 3.2), em que a colônia do meio mínimo levou o dobro do tempo.

4.6.2. Análise da troponina.

A troponina das amostras leve e pesada tiveram, respectivamente, 20 e 4 de seus peptídeos sequenciados. Os peptídeos foram organizados e numerados de acordo com a intensidade, decrescente, apresentada na amostra leve.

Quadro 2 – Sequenciamento dos peptídeos de troponina leve e pesada não nitradas.

Peptídeo	Nº	Leve	Pesada
ISADAMMQALLGAR	1	Presente	Presente
NITEIADLTQK	2	Presente	Presente
CQPLELAGLGFAELQDLCR	3	Presente	Presente
TLLLQIAK	4	Presente	Presente
VDKVDEERYDIEAK	5	Presente	Não encontrado
AYATEPHAK	6	Presente	Não encontrado
NIDALSGMEGR	7	Presente	Não encontrado
KNIDALSGMEGR	8	Presente	Não encontrado
AKESLDLR	9	Presente	Não encontrado
FKRPTLR	10	Presente	Não encontrado
VDEERYDIEAK	11	Presente	Não encontrado
NIDALSGMEGRK	12	Presente	Não encontrado
AYATEPHAKK	13	Presente	Não encontrado
EVGDWRK	14	Presente	Não encontrado
VTKNITEIADLTQK	15	Presente	Não encontrado

AYATEPHAKKK	16	Presente	Não encontrado
TLLLQIAKQELER	17	Presente	Não encontrado
EPRPAPAPIR	18	Presente	Não encontrado
VRISADAMMQALLGAR	19	Presente	Não encontrado
KLQLKTLLLQIAK	20	Presente	Não encontrado

A ordem de intensidade entre os 4 peptídeos presentes na amostra pesada só diferiu da leve nos números 2 e 3, o peptídeo 3 se mostrou mais intenso do que o 2.

Olhando o quadro é possível perceber que alguns dos peptídeos sequenciados se sobrepõem. Essas variações de alguns aminoácidos no início ou final das sequências são chamadas de *missed cleavages* e ocorrem sempre próximos a resíduos de arginina (R) e/ou lisina (K).

Por exemplo:

- o peptídeo 1 é parte do 19, com a diferença de 2 aminoácidos no início da sequência – (VR)ISADAMMQALLGAR;
- o peptídeo 2 é parte do 15, com a diferença dos 3 aminoácidos iniciais – (VTK)NITEIADLTQK;
- o peptídeo 4 é parte do 17, diferindo nos 4 aminoácidos finais – TLLLQIAKQ(ELER) – e do 20, diferindo nos 5 aminoácidos finais – (KLQLK)TLLLQIAK;
- o peptídeo 11 é parte do 5, com a diferença dos 3 primeiros aminoácidos – (VDK)VDEERYDIEAK;
- o peptídeo 6 é parte do 13, com a diferença de um K final – AYATEPHAK(K) – e ambos parte do 16, com a diferença dos 2 aminoácidos finais – AYATEPHAK[K(K)];
- o peptídeo 7 é parte do 8, com a única diferença de um K inicial – (K)NIDALSGMEGR – e também parte do 12, com a diferença de um K final – NIDALSGMEGR(K);

Isso acontece porque a tripsina, enzima utilizada para a digestão dos peptídeos, cliva ligações peptídicas próximas a resíduos de cadeia lateral com carga positiva, que é o caso desses dois aminoácidos, como se pode ver na figura a seguir.

4.7. Quantificação de proteínas da amostra após a secagem em speed-vac.

Antes de serem nitradas, as proteínas, que estavam muito diluídas, apresentando concentração em torno de 0,1 mg/mL ou 0,1 µg/µL (conforme item 4.5), foram secadas em speed-vac. A secagem foi realizada e as proteínas foram, novamente, quantificadas.

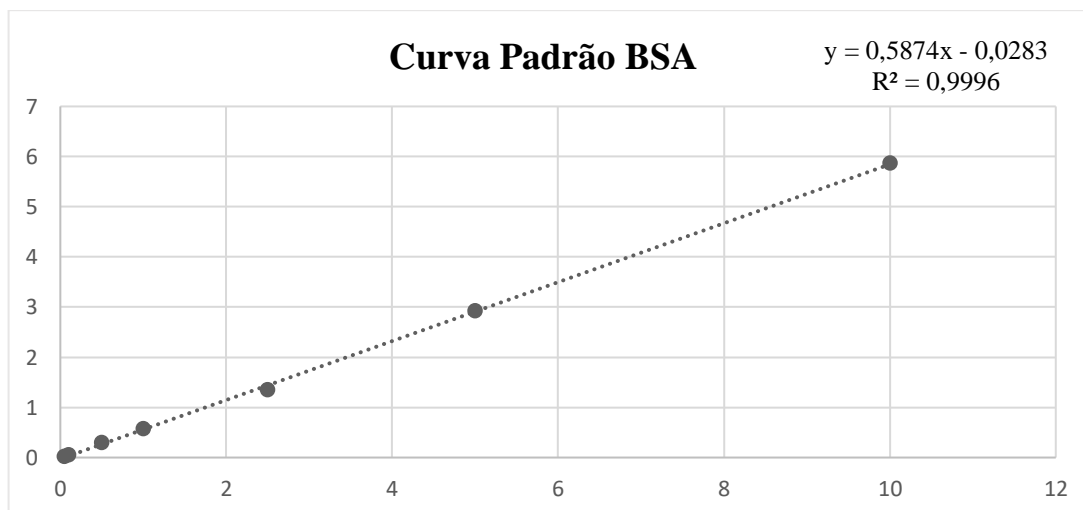
Mais uma vez, foi realizada uma curva padrão utilizando quantidades conhecidas de BSA e cada uma das diluições teve sua absorbância testada em triplicata, levando aos seguintes resultados:

Tabela 10 – Absorbância de BSA em diferentes concentrações para quantificação pós secagem em speed-vac.

[] (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média
0,05	0,021	0,013	0,018	0,017
0,1	0,049	0,046	0,051	0,049
0,5	0,290	0,278	0,298	0,289
1,0	0,571	0,573	0,571	0,572
2,5	1,442	1,463	1,443	1,344
5,0	2,952	2,888	2,914	2,918
10	5,914	5,847	5,826	5,862

A partir dos valores obtidos, foi construído um gráfico, em que se extraiu a equação da reta.

Gráfico 3 – Curva Padrão de BSA para quantificação pós secagem em speed-vac.



Em seguida, todas as amostras de troponina leve (1-3) e pesada (1-4) foram diluídas e testadas, também em triplicata, e, a partir a equação da reta obtida do gráfico anterior, foi possível estabelecer a nova concentração das amostras.

Tabela 11 – Absorbância e concentração das amostras de troponina leve e pesada após secagem em speed-vac.

<i>Amostra</i>	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs média	[] mg/mL
<i>Leve 1 - 1/100</i>	0,013	0,009	0,018	0,013	7,09
<i>Leve 1 - 1/10</i>	0,029	0,038	0,042	0,036	1,1
<i>Leve 1 – puro</i>	0,655	0,704	0,763	0,707	1,25
<i>Leve 2 - 1/100</i>	0,005	0,018	0,026	0,0163	7,6
<i>Leve 2 - 1/10</i>	0,056	0,04	0,053	0,0497	1,33
<i>Leve 2 – puro</i>	0,856	0,688	0,546	0,697	1,23
<i>Leve 3 - 1/100</i>	0,017	0,022	0,024	0,021	8,4
<i>Leve 3 - 1/10</i>	0,067	0,044	0,048	0,053	1,38
<i>Leve 3 – puro</i>	0,621	0,514	0,565	0,567	1,01
<i>Pesada 1 - 1/100</i>	0,009	0,007	0,025	0,014	7,14
<i>Pesada 1 - 1/10</i>	0,038	0,025	0,051	0,038	1,13
<i>Pesada 1 - puro</i>	0,139	0,155	0,147	0,147	0,3
<i>Pesada 2 - 1/100</i>	0,015	0,011	0,029	0,018	7,94
<i>Pesada 2 - 1/10</i>	0,021	0,041	0,028	0,03	0,99
<i>Pesada 2 - puro</i>	0,243	0,126	0,162	0,177	0,35
<i>Pesada 3 - 1/100</i>	0,005	0,021	0,007	0,011	6,69
<i>Pesada 3 - 1/10</i>	0,054	0,035	0,037	0,042	1,2
<i>Pesada 3 - puro</i>	0,18	0,172	0,156	0,169	0,34
<i>Pesada 4 - 1/100</i>	0,01	0,021	0,014	0,015	7,37
<i>Pesada 4 - 1/10</i>	0,014	0,015	0,1	0,043	1,21
<i>Pesada 4 - puro</i>	0,03	0,036	0,024	0,03	0,1

Os valores destacados em negrito, na tabela, são os valores assumidos para a concentração das proteínas testadas, todos provenientes das amostras puras, sem diluição alguma. Pode-se, então, dizer que após a secagem em speed-vac, as amostras de troponina passaram a ter uma concentração em torno de 1,0-1,25 mg/mL, na versão leve, e 0,1-0,35 mg/mL, na versão pesada.

4.8. Avaliação por SDS-PAGE após a secagem em *speed-vac*.

Antes de finalmente chegar à etapa de nitrção, foi feito mais um SDS para conferir a integridade das proteínas, após a manipulação. As amostras novamente foram preparadas em concentrações diferentes:

Tabela 12 – Preparação das amostras de troponina leve para SDS-PAGE pós secagem em *speed-vac*.

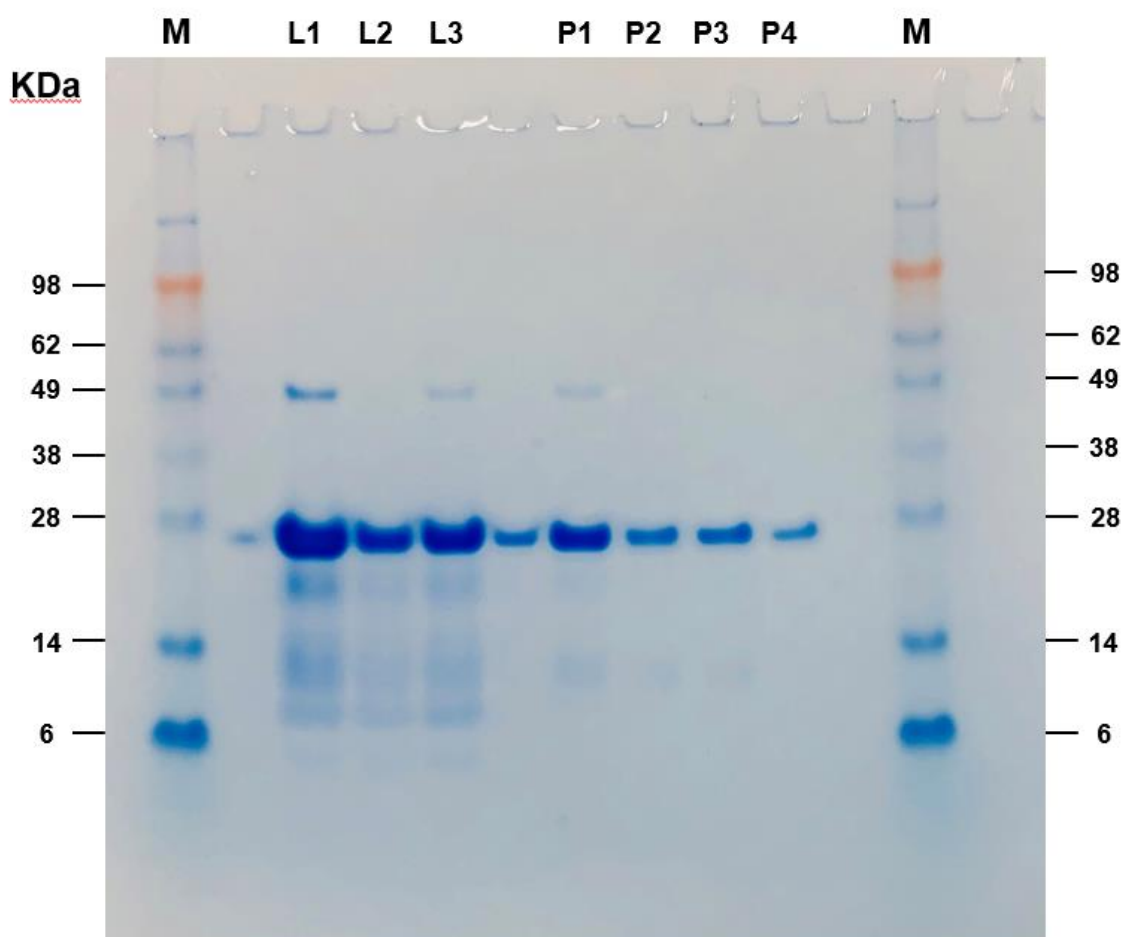
Reagente	Volume
Amostra	3 µL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 µL
Água ultrapura	7 µL
TOTAL	20 µL

Tabela 13 – Preparação das amostras de troponina pesada para SDS-PAGE pós secagem em *speed-vac*.

Reagente	Volume
Amostra	5 µL
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	5 µL
NuPAGE Reducing Agent (10x)	2 µL
Água ultrapura	5 µL
TOTAL	20 µL

No primeiro poço do gel foram pipetados 10 µL do marcador SeePlus 2 e nos poços seguintes foram pipetadas as amostras: leve 1, leve 2, leve 3, pesada 1, pesada 2, pesada 3, pesada 4 e mais uma vez o marcador no último poço.

Figura 8 – SDS-PAGE pós secagem em *speed-vac*. M – marcador; L1-3 – troponina leve, proveniente dos tubos numerados de 1 a 3. P1-4 – troponina pesada, proveniente dos tubos numerados de 1 a 4.



É possível facilmente identificar as bandas superexpressas correspondentes à troponina, que indica que a proteína continuou intacta depois de todas as etapas de manipulação e estava pronta para ser nitrada.

A diferença do tamanho das bandas entre leve e pesada é sugestiva de uma maior concentração nas amostras da versão leve do que na versão pesada, como já foi visto anteriormente por meio da quantificação. A menor banda (P4) é aquela que tem a menor concentração, de aproximadamente 0,1 mg/mL (conforme item 4.7).

4.9. Análise da troponina nitrada por LC-MS.

Foram colocadas no espectrômetro de massas as amostras de troponina leve e pesada ambas em suas versões nitrada (em duplicata) e não nitrada, somando 6 amostras no total. Estas foram registradas com a data do dia e de acordo com a versão e o número referente àquela amostra (20200721-leve-não-nitrada, 20200721-leve-NO2-1 e 20200721-leve-NO2-2; e 20200721-pesada-não-nitrada, 20200721-pesada-NO2-1 e 20200721-pesada-NO2-2).

4.9.1. Análises estatísticas, grau de pureza e contaminantes da amostras de troponina leve.

Após o processamento e análise por MaxQuant, foram identificadas as proteínas presentes nas amostras e a intensidade de cada uma delas. A análise foi feita, tanto somando as intensidades de todas as amostras, mas em alguns momentos apenas somando as intensidades das duplicatas da amostra que sofreu nitrção.

Pela tabela "ProteinGroups" intensidade total e bruta, somando as 3 amostras, foi de 242.627.000.000, sendo que a troponina correspondeu a 62%, apresentando a intensidade total de 151.610.000.000. Analisando e somando apenas as amostras que sofreram nitrção, a intensidade total das 2 amostras foi de 123.282.000.000, com 54% de troponina, que apresentou intensidade absoluta de 66.841.000.000.

Depois de fazer esta primeira análise bruta, foram identificados os principais contaminantes presentes na amostra.

Quadro 4 – Principais contaminantes na análise da troponina leve nitrada por LC/MS de acordo com o UniProt.

Código	Identificação da proteína
P07477	Tripsina (humana)
P00760	Tripsina catiônica (bovina)
P00766	Quimiotripsinogênio (bovino)
P04264	Queratina tipo I citoesqueleto 2 (humano)
P13645	Queratina tipo I citoesqueleto 10 (humano)
P35908	Queratina tipo II citoesqueleto 2 epiderme (humano)
P35527	Queratina tipo I citoesqueleto 9 (humano)

Assim como foi feito na primeira análise da troponina por espectrometria de massas (item 4.6.1), antes da nitrção, foram descontados os valores relacionados à tripsina, já que esta foi adicionada apenas em uma das últimas etapas anteriores à análise MS, para a digestão dos peptídeos. Então, depois de excluir os valores de tripsina e seus precursores, a intensidade total passou a ser 175.997.000.000 e apenas das duplicatas com nitrção 80.646.071.200 e ajustando com os valores de troponina, ela passa a representar 86% da intensidade total das 3 amostras e 83% da

intensidade das amostras “NO₂”. Já a queratina humana não foi desconsiderada, pois não se sabe em que momento da manipulação essa contaminação ocorreu.

4.9.2. Análise por LC-MS de troponina leve nitrada *versus* não nitrada.

A troponina das amostras nitradas e não nitrada tiveram 14 de seus peptídeos sequenciados, sendo que em sua maioria já haviam aparecido na primeira análise da troponina leve feita por MS/MS. Como as proteínas de ambas as versões (nitrada e não nitrada) vieram do mesmo clone e colônia bacteriana (leve, cultivada em LB), conseqüentemente, foram produzidas nas mesmas condições (e até no mesmo tempo), por isso os peptídeos encontrados nas 3 amostras foram os mesmos.

Quadro 4 – Sequenciamento dos peptídeos de troponina leve nitrada e não nitrada.

Sequenciamento dos peptídeos das amostras de troponina leve com e sem nitração, as letras destacadas em vermelho identificam os aminoácidos que sofreram nitração.

Peptídeo	Nitrada	Não Nitrada
CQPLELAGLGFAELQDLCR	Presente	Presente
NITEIADLTQK	Presente	Presente
VDKVDEERYDIEAK	Presente	Presente
NIDALSGMEGR	Presente	Presente
TLLLQIAK	Presente	Presente
ISADAMMQALLGAR	Presente	Presente
KNIDALSGMEGR	Presente	Presente
VDEERYDIEAK	Presente	Presente
AYATEPHAK	Presente	Presente
NIDALSGMEGRK	Presente	Presente
VTKNITEIADLTQK	Presente	Presente
TLLLQIAKQELER	Presente	Presente
NITEIADLTQKIFDLR	Presente	Presente
KLQLKTLLLQIAK	Presente	Presente

4.9.3. Nitração da troponina leve.

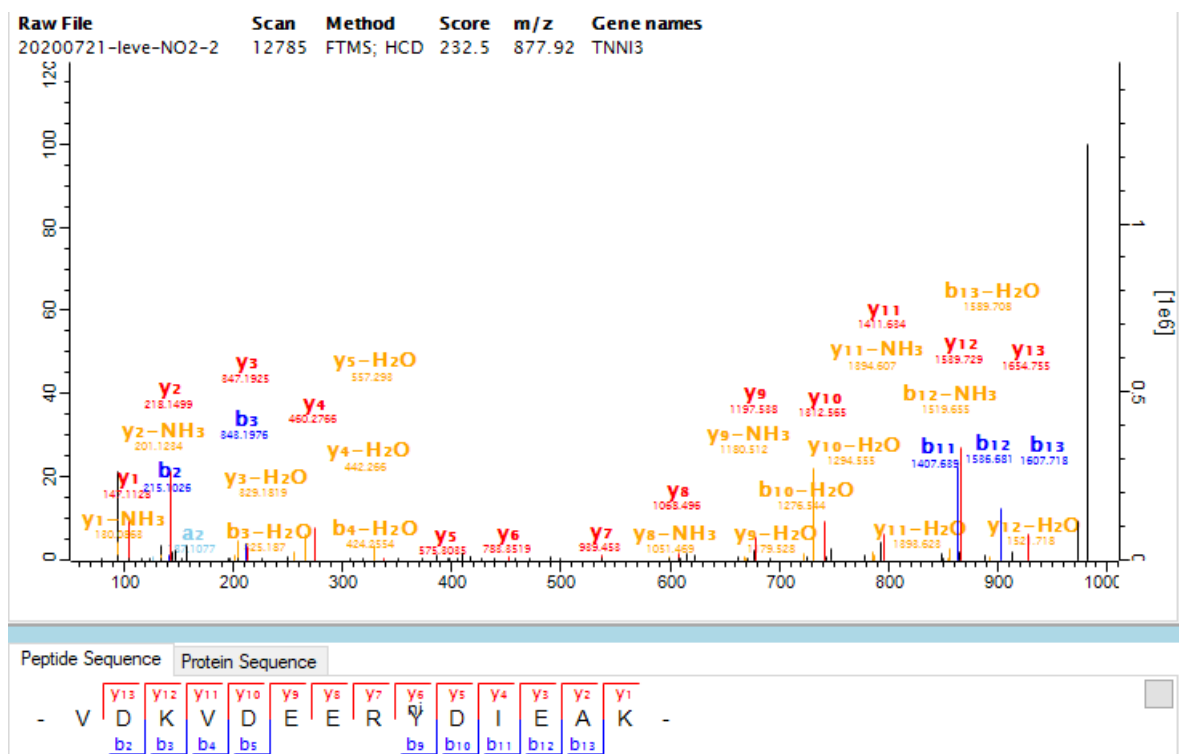
Entre os 3 resíduos de tirosina presentes na sequência da TNN, mais uma vez a cobertura abrangeu as mesmas que já haviam sido sequenciadas na primeira

análise por MS, as tirosinas na posição 29 e 112. A nitração foi eficiente e ambas as tirosinas apareceram nitradas nos seguintes peptídeos: VDKVDEERYDIEAK, VDEERYDIEAK e AYATEPHAK, sendo que os 2 primeiros incluem o mesmo resíduo/posição de Y, de número 112, pois são mais um caso de *missed cleavage* e no último a tirosina de posição 29.

Diante disso, foi analisado qual a intensidade e porcentagem de peptídeos nitrados em relação ao total do mesmo peptídeo com e sem a nitração. Os cálculos para verificar a eficiência do processo de nitração foram feitos usando apenas as intensidades provenientes das amostras chamadas leve NO₂-1 e 2, pois somente elas foram colocadas em contato com peroxinitrito a fim de sofrer nitração. Além disso, tudo foi calculado já com os devidos ajustes em relação à contaminação com tripsina.

O peptídeo VDKVDEERYDIEAK nitrado apresentou intensidade de 10.667.000.000, a maior entre os 3. Esse valor corresponde a 81% da intensidade total do peptídeo, isto é, com e sem o grupo nitro, e 13% de todos os peptídeos presentes duas nas amostras.

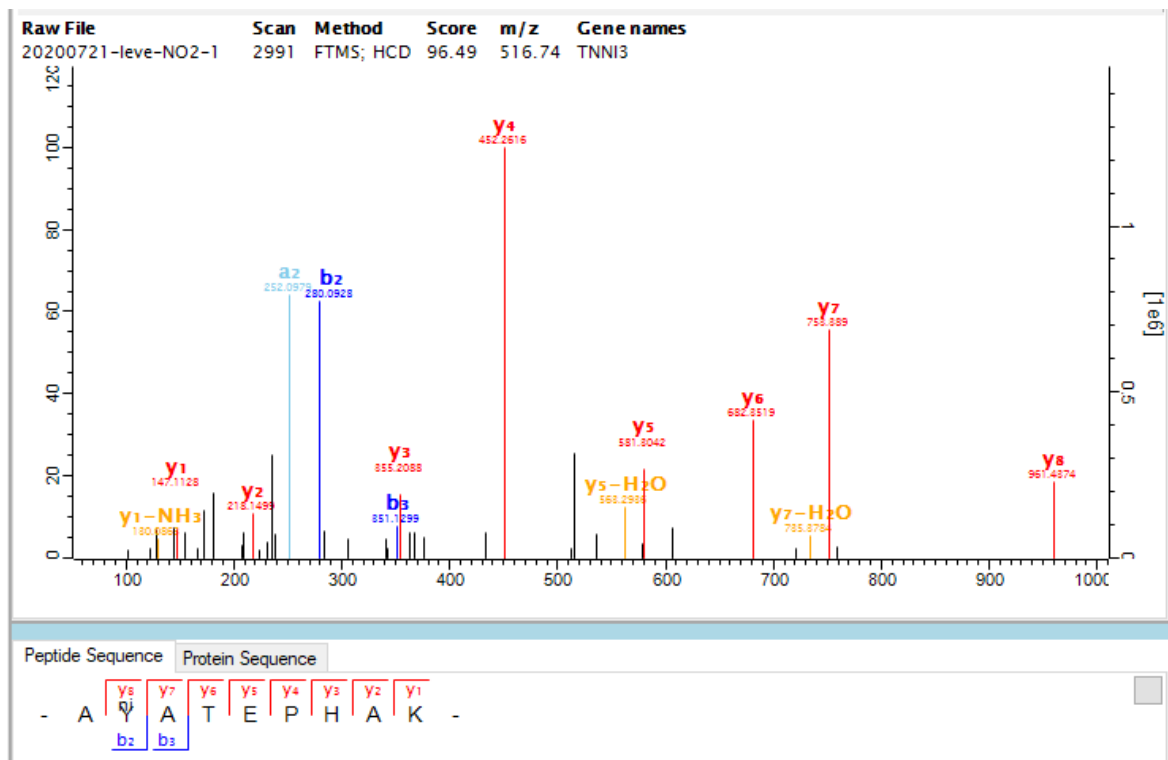
Figura 9 – Espectro de massas do peptídeo VDKVDEERYDIEAK. Tela do software MaxQuant mostrando o espectro de massas do peptídeo de sequência VDKVDEERYDIEAK. Na parte inferior da figura, é possível visualizar os aminoácidos que foram cobertos pelo sequenciamento e em cima do Y, que corresponde à tirosina de posição 112, o “ni” indica a nitração.



Enquanto isso, o VDEERYDIEAK nitrado teve uma intensidade de 376.060.000 e a eficiência de sua nitração foi de 92%, pois a intensidade total do peptídeo nas amostras analisadas foi de 409.411.000. Por outro, mesmo tendo quase todo o peptídeo nitrado, sua quantidade em relação ao total das amostras é muito baixa, de apenas 0,4%

Já o AYATEPHAK teve 100% de nitração, pois não foi encontrada a mesma sequência sem a modificação específica de nitrosina. A intensidade apresentada foi 1.383.800.000, que corresponde a cerca de 1% dos peptídeos totais de leve NO -1 e 2.

Figura 10 – Espectro de massas do peptídeo AYATEPHAK. Tela do software MaxQuant mostrando o espectro de massas do peptídeo de sequência AYATEPHAK. Na parte inferior da figura, é possível visualizar os aminoácidos que foram cobertos pelo sequenciamento e em cima do Y, que corresponde à tirosina de posição 29, o “ni” indica a nitração.

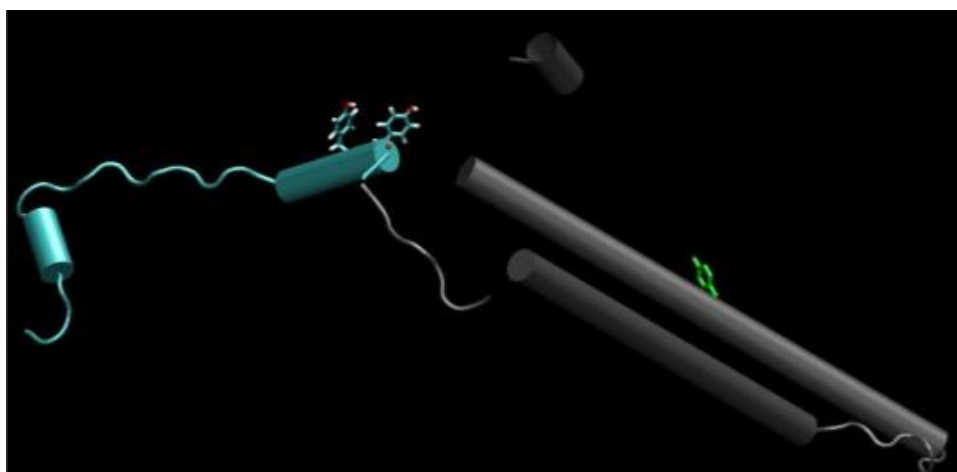


Após essa análise, o peptídeo de escolha ou principal a ser utilizado para a realização do SELEX seria o VDKVDEERYDIEAK, pois, além de apresentar a maior porcentagem dentro da amostra, também engloba o VDEERYDIEAK em sua sequência, mesmo que a intensidade do segundo seja muito baixa.

Os 3 peptídeos da troponina nitrados apresentaram intensidade zero na amostra leve não nitrada, o que já era esperado, e serviu como controle negativo nas amostras que não passaram por nitração;

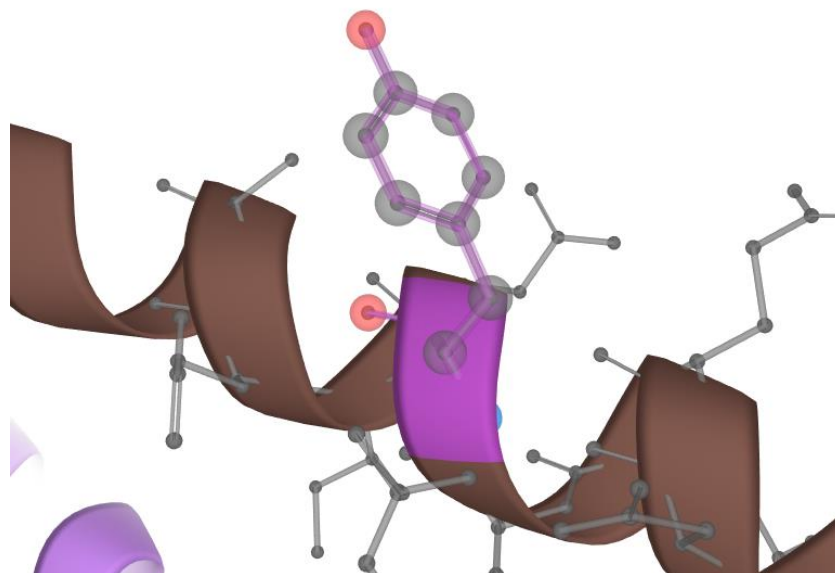
Outro ponto importante a ser discutido é que a tirosina da posição 26 não foi identificada com a modificação de nitração, mas também não entrou na área coberta pelo sequenciamento. Isso significa que ainda há a possibilidade dessa Y também ter sido nitrada. O estudo de Silva (2012) identificou a Y 29 como principal sítio de nitração e demonstrou que a da posição 26 não é a mais comum de ocorrer, mas também é passível de nitração, normalmente associada com a nitração também da tirosina 29 (Figura 10). Por outro lado, o artigo descreve que a nitração da tirosina 111 foi identificada apenas 1 vez, mas na verdade a tirosina dessa região está localizada na posição 112 e no experimento realizado no presente estudo ela apareceu em maior intensidade entre as 3 (Figura 11).

Figura 10 – Estrutura tridimensional da Troponina I cardíaca. Estrutura tridimensional esquemática da TNNI 3, com as 3 tirosinas em evidência.



Fonte: Silva, 2012.

Figura 11 – Tirosina de posição 112 da troponina. A estrutura marcada com o anel aromático em evidência é a tirosina, que corresponde ao aminoácido de número 112 da sequência.



Aparentemente, há algum problema na digestão que não permite que essa parte da proteína seja enxergada pelo massas. Talvez uma alternativa para tentar visualizar essa região da proteína seria trocar a enzima da digestão, pois isso mudaria o sítio de clivagem e a quebra dos peptídeos aconteceria em locais diferentes e gerando peptídeos diferentes. Por outro lado, Silva (2012) realizou testes tanto de digestão *in silico* quanto de digestão *in vitro* com diferentes enzimas, e a tripsina foi a que apresentou melhor resultado, permitindo a identificação dos sítios de nitração da troponina.

Além disso, também é válido verificar quais contaminantes presentes na amostra de proteínas *in vitro* poderiam ser nitrados e eventualmente camuflados no SELEX. Porém, o principal contaminante que apresentou nitração foi a tripsina, que não apresenta nenhum risco, pois foi colocada apenas para a análise por LC-MS. Outro ponto também importante é avaliar uma possível reação cruzada com as outras proteínas do sistema cardiovascular, citadas anteriormente, que podem ter suas tirosinas nitradas nas amostras biológicas dos pacientes, para que elas não sejam capturadas pelos aptâmeros, ao invés da troponina.

4.9.4. Processamento por MaxQuant e análise da troponina pesada nitrada.

A versão pesada da troponina cardíaca passou pelo processo de nitração no mesmo momento, em paralelo, com a nitração da versão leve e foi digerida e analisada por espectrometria de massas também ao mesmo tempo e sob as mesmas

condições. Porém, por algum problema no processamento dos dados gerados por MS não foi possível identificar os peptídeos de troponina pesada que se encontravam nitrados e nem verificar os contaminantes e a eficiência deste processo.

Aparentemente, o problema está na programação, ao adicionar a modificação fixa do nitrogênio pesado, pois esta marcação metabólica não está inclusa entre opções de modificações originais, já programadas pelo próprio software. Apesar disso, foram seguidas as instruções e o passo a passo estabelecidos pelo próprio MaxQuant ("*MaxQuant Documentation*"), por meio do site que contém todas informações sobre o uso do software, e pelo Unimod, também uma página online que serve como guia para adicionar novas modificações na análise de proteínas por espectrometria de massas.

A modificação foi criada, porém não foi possível programá-la como marcação metabólica e isotópica ("*isotopic label*"), a maneira como foi indicado pelo Unimod, mas como "*standard*". As configurações foram estabelecidas para que o software reconheça a modificação fixa do ^{15}N em todas as proteínas, o processamento foi iniciado, os arquivos foram reconhecidos, mas quando foi feita a digestão *in silico*, o MaxQuant paralisa o processo e notifica como erro. O processo foi repetido diversas vezes, porém em nenhuma delas foi possível avançar da etapa de digestão.

No início, pareceu sem sentido o erro acontecer no momento da digestão, se o problema supostamente estaria na identificação do nitrogênio pesado nas proteínas. Porém, a hipótese levantada foi que, se todas as proteínas presentes na amostra tiveram sua massa alterada devido a 1 nêutron a mais em todos os nitrogênios que compõem sua estrutura e esse aumento não foi devidamente programado para ser reconhecido pelo MS, a massa apresentada pelas proteínas pesadas, na verdade, irá corresponder à massa de outras moléculas. Sendo assim, até o reconhecimento do sítio de clivagem da enzima é dificultado e talvez por isso não seja possível nem completar a etapa de digestão.

Apesar dessa intercorrência no processamento do MaxQuant, com base na análise da nitração da versão leve, é muito provável que o processo de nitração tenha ocorrido da maneira como deveria, sem comprometimento na produção do insumo para a validação do SELEX, deixando pendente apenas a sua verificação de grau de pureza e eficiência, que pode ser feita em um futuro próximo.

5. CONCLUSÃO

A troponina I cardíaca humana recombinante nitrada foi produzida *in vitro* nas versões leve e pesada. A troponina leve nitrada foi caracterizada por espectrometria de massas e os peptídeos VDKVDEERYDIEAK, VDEERYDIEAK e AYATEPHAK foram identificados com o grupo nitro na tirosina. O peptídeo VDKVDEERYDIEAK foi o escolhido para a realização do SELEX, pois, apesar de ter apresentado eficiência de 81%, a menor entre os 3, foi o que apresentou maior intensidade entre todos os peptídeos presentes na amostra.

Sendo assim, diante do sucesso na produção do principal insumo, já é possível que seja realizada a seleção de aptâmeros específicos e assim que for verificada a eficiência da nitração da versão pesada da proteína também validação quantitativa do método.

REFERÊNCIAS

ABELLO, Nicolas *et al.* Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. **Journal of Proteome Research**, Groningen, vol. 8, n.7, p. 3222-38, jul. 2009.

ANDERSON, Jeffrey L; MORROW, David A. Acute myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 376, n. 21, p. 2053-64. mai. 2017.

ASLAN, Muthay. Functional consequences of actin nitration: in vitro and in disease states. **Amino Acids**, Antália, v. 42, p. 65-74, jan. 2012.

BECKER, Dávid; MERKELY, Béla. Acute coronary syndrome. **Orvosi Hetilap**, Budapeste, v. 153, n. 51, p. 2009-15, dez. 2012.

ELLINGTON, Andrew D; SZOSTAK, Jack W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. **Nature**, Boston, v. 346, p. 818-22, ago. 1990.

FUSTER, Valentin *et al.* The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 326, n. 4, p. 242-50, jan. 1992.

JESSE, Robert L.; KUKREJA, Rakesh. Rationale for the Early Clinical Application of Markers of Ischemia in Patients with Suspected Acute Coronary Syndromes. **Cardiovascular Toxicology**, Richmond, vol. 1, no. 2, 125–133, jun. 2001.

KUMAR, Amit; CANNON, Christopher P. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. **Mayo Clin Proceedings**, Worcester, v. 84, n.10, p. 917-38, out. 2009.

KUHN, Erich *et al.* Developing Multiplexed Assays for Troponin I and Interleukin-33 in Plasma by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, Cambridge, v. 55, n. 6, p. 1108-17, jun. 2009.

LABUGGER, Ralf *et al.* Strategy for Analysis of Cardiac Troponins in Biological Samples with a Combination of Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. **Clinical Chemistry**, Kingston, v. 49, n. 6, p. 873-9, jun. 2003.

LEE, Richard T; LIBBY, Peter. The unstable atheroma. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**, Boston, v. 17, n.10, p. 1859-67, out. 1997.

LEVRAND, Sandra *et al.* Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, Lausanne, v. 41, n. 6, p. 886–95, set. 2006.

LILL, Jennie. Proteomic tools for quantification by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, La Jolla, v. 22, n. 3, p. 182-194, mai/jun. 2003.

LINDAHL, Bertil. Acute coronary syndrome – the present and future role of biomarkers. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Uppsala, v. 51, n. 9, p. 1699-1706, mai. 2013.

MARTINS, Carla Sofia. Troponina: Estrutura, Fisiopatologia e Importância Clínica para Além da Isquemia Miocárdica. **Arquivos de Medicina**, Porto, v. 23, n. 6, p. 221-40, nov. 2009.

MORROW, David A. *et al.* National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical Characteristics and Utilization of Biochemical Markers in Acute Coronary Syndromes. **Clinical Chemistry**, Boston, v. 53, n. 4, p. 552-74, abr. 2007.

OLIPHANT, Arnold R; BRANDL, Christopher J; STRUHL, Kevin. Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 protein. **Molecular and Cellular Biology**, Boston, v. 9, n. 7, p. 2944-9, jul. 1989.

PARIKH, Shailja V; DE LEMOS, James A. Biomarkers in cardiovascular disease: integrating pathophysiology into clinical practice. **The American Journal of Medical Sciences**, Dallas, v. 332, n. 4, p.186-97, out. 2006.

PELUFFO, Gonzalo; RADI, Rafael. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovascular Research**, Montevideo, v. 75, n. 2, p. 291-302, mai. 2007.

QUIDIM, Alessandra Vanessa Lopes. **Avaliação de marcadores relacionado à nitração da placa aterosclerótica e seu papel como preditores de prognóstico**

na síndrome coronariana aguda em curto e longo prazo no estudo **Estratégia de Registro de Insuficiência Coronariana (ERICO)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas, Área de concentração: Educação e Saúde) – Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, São Paulo, 2018.

RADI, Rafael *et al.* Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, Birmingham, v. 266, n. 7, p. 4244–50, mar. 1991.

RADI, Rafael. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of its Functional Effects. **Accounts of Chemical Research**, Montevideo, v. 46, n. 2, p. 550-9, fev. 2013.

SILVA, Gabriela Venturini. **Identificação de alvos protéicos com potencial diagnóstico e prognóstico em doença arterial coronária**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas, Área de concentração: Distúrbios genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo) – Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo, São Paulo, 2012.

SOCERJ. **Manual de Atualização e Conduta – Síndrome Coronariana Aguda**. Disponível em: <<https://socerj.org.br/wp-content/uploads/2015/11/manual-de-conduta.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Cardiometro**. 2017. Disponível em: <<http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>>. Acesso em: 04 dez. 2019.

TEICH, Vanessa; ARAUJO, Denizar Vianna. Estimativa de Custo da Síndrome Coronariana Aguda no Brasil. **Revista Brasileira de Cardiologia**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 85-94, mar/abr. 2011.

THYGESEN, Kristian *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. **European Heart Journal**, Aarhus, v. 33, p. 2551–2567, out. 2012.

TUERK, Craig; GOLD, Larry. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science**, Boulder, v. 249, p. 505-10, ago. 1990.

WILHELM, Mathias *et al.* Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. **Nature**, Walldorf, v. 509, p. 582–7, mai. 2014.