

UTILIZAÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA VISUALIZAÇÃO ESPACIAL DE PROTEÍNAS

Aline Larissa Virginio da Silva¹; Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas-ICB-UPE; E-mail: alinelarissav@hotmail.com,

²Docente/Pesquisador do Departamento de Bioquímica-CCB-UFPE; E-mail: ebeltrao@hotmail.com.

Sumário: O câncer, no Brasil, é considerado um problema de saúde pública. O primeiro passo para o tratamento do câncer é a classificação correta do tumor, sendo o diagnóstico clínico, geralmente, baseado na histologia. O perfil metabólico do paciente reflete o estado do organismo e alterações nas distribuições de moléculas podem servir como diagnóstico para doenças, como o câncer. A proteômica, ciência que estuda o conjunto de proteínas, utiliza alguns métodos para visualizar distribuição destas moléculas, como a imunohistoquímica, porém este método ainda é muito limitado. O MALDI-IMS é uma técnica que utiliza a espectrometria de massa para gerar perfis e mapas de densidades biodimensionais de peptídeos e proteínas diretamente das secções de tecidos. Este trabalho utilizou o MALDI-TOF para analisar tecidos tumorais de mama e gerou espectros com potencial para descoberta de novos biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico.

Palavras-chave: câncer; espectrometria de massas; MALDI-TOF; proteômica.

INTRODUÇÃO

O câncer no Brasil é considerado um problema de saúde pública. No país, estimou-se para o ano de 2014, a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, dentre estes, 57 mil são de mama feminina. Em Pernambuco o câncer de mama se faz o mais incidente entre as mulheres com cerca de 2.000 casos novos por ano (INCA, 2014). O primeiro passo para o tratamento do câncer é a classificação correta do tumor. O diagnóstico clínico, geralmente, é baseado na histologia, e muitas vezes na análise imunohistoquímica de biópsias (PAVLIDIS, FIZAZI, 2009; MEDING, et al., 2012). As respostas aos medicamentos aplicados durante a terapia podem ser diferentes e para um tratamento personalizado é desejável o maior número de dados possível. Um deles é o perfil metabólico do paciente que reflete o estado do organismo (LEWANDOWSKI, ROSZKOWSKI, LEWANDOWSKA, 2011). A proteômica parece muito promissora, especialmente desde que os novos métodos baseados em tecidos foram desenvolvidos necessitando de menos material de amostra e demonstrando sua capacidade de classificação (BALLUFF, 2010). Para a visualização da distribuição espacial de proteínas, o método mais escolhido é a imunohistoquímica. No entanto, ela é limitada pela disponibilidade de anticorpos específicos e pela sua habilidade de visualizar somente um ou dois analitos em uma única amostra de tecido (BALLUFF et al., 2011). Novos métodos de classificação de perfil molecular surgiram ao longo da última década, um deles é a utilização da espectrometria de massa MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) para gerar perfis e mapas de densidades bidimensionais de íons de peptídeos e proteínas diretamente da superfície de secções de tecido (BALLUFF et al., 2011; BATESON et al., 2011; STOECKLI et al., 2001). Juntamente com (IMS - imaging mass spectrometry) é usada para avaliar o arranjo espacial e a concentração relativa de compostos em amostras biológicas, permitindo a obtenção específica de informações sobre suas composições locais, abundância relativa e distribuição espacial (BALLUFF et al., 2011; CHAURAND, SCHWARTZ, CAPRIOLI, 2002; BAKRY et al., 2011). Durante a técnica,

uma varredura do tecido é feita através de uma grade ou matriz bidimensional pré-determinada, gerando um espectro de massa total em cada coordenada da grade (CHAURAND, SCHWARTZ, CAPRIOLI, 2002). Essas imagens resultam em uma riqueza de informações, permitindo a medição e comparação de muitos dos principais componentes moleculares, de modo que se possa obter uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos (CHAURAND, SCHWARTZ, CAPRIOLI, 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de tecido tumoral mamário humano foram coletadas pós-cirurgia no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Os dados clínico-patológicos foram obtidos do SAME do mesmo hospital. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/CCS/UFPE (CAAE nº 06586612.9.0000.5208) e todos as pacientes deram autorização prévia através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a retirada da amostra pelo cirurgião-mastologista, o fragmento foi congelado e armazenado. Como controle foram utilizadas as áreas teciduais livres de tumor. As amostras congeladas foram crioseccionadas, depositadas em uma lâmina de vidro condutora de ITO (Óxido de Índio e Estanho) e secas à vácuo a 25°C. As lâminas foram pré-tratadas para análise de proteínas, e novamente secas à vácuo. Sob os tecidos foi aplicada uma matriz de ácido sinapínico (Sigma-Aldrich) e posteriormente analisados no espectrômetro de massas MALDI-TOF, onde foram definidos os parâmetros para a aquisição dos dados (potência do laser, número de disparos, espectro de detecção, distância entre análises). Os dados obtidos pelo MALDI-TOF, geraram imagens de distribuição 2D de espécies massa/carga de proteínas tumorais com interesse potencial para diagnóstico e/ou prognóstico, as quais serão posteriormente serem correlacionadas com a histologia convencional e com os dados clínico-patológicos dos pacientes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a coleta das amostras frescas pós-cirúrgicas foi estabelecido o congelamento imediato do fragmento em nitrogênio líquido (aproximadamente -195° C) e posterior armazenamento à -80° C. No total, foram coletadas 35 amostras de tumores mamários. Para serem utilizadas, foi determinada a espessura de 10 µm para o corte das amostras e à uma temperatura de -20° C em um criostato onde as secções foram depositadas em lâminas condutoras de corrente elétrica. Após isso, as lâminas são secas à vácuo, 25°C por 15 minutos, e então tratadas com etanol com concentrações crescentes (75%, 90% e 100%) por 1 minuto cada, de modo a terem o excesso de lipídeos removidos. Novamente as amostras são secas à vácuo, 25°C durante 15 minutos. Após secagem lâminas foram digitalizadas em um scanner de mesa para posterior uso da imagem como “mapa” durante análise no MALDI-TOF. Após digitalização as lâminas foram cobertas com uma matriz de ácido sinapínico (Sigma-Aldrich) para a visualização de proteínas. Foi otimizado a concentração da matriz para ser aplicada em 100 mg de ácido sinapínico diluídos em 15 mL de uma solução 60/40% de acetonitrila/água destilada adicionada de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (RAUSER et al., 2010). Os 15 mL da matriz foram aplicados utilizando um aerógrafo em ciclos de aplicação e secagem de 10 segundos cada, de modo a se obter uma cristalização da matriz-proteínas em pequenos cristais. Após a aplicação da matriz, as lâminas foram levadas ao MALDI-TOF para realização da varredura dos tecidos. O equipamento foi definido com os seguintes parâmetros: 200 disparos por ponto de análise, com 100 µm de distância entre os pontos, potência do laser variando de 50 a 85%, e faixa de detecção de 2000 a 25000 m/z. Inicialmente foram adquiridos espectros gerais das amostras congeladas (figura 1).

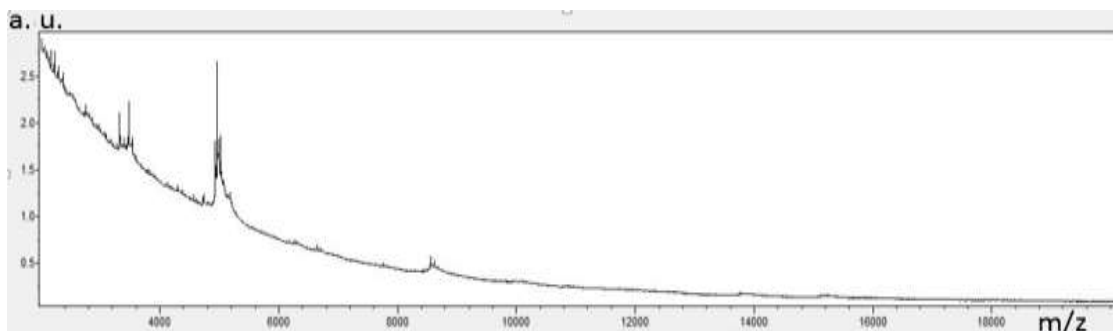


Figura 1: Espectros gerais das áreas selecionadas

A partir do espectro geral, as espécies massa/carga são observadas e selecionadas de acordo com o seu potencial de interesse e/ou especificidade espacial. Na faixa de detecção observadas, podemos observar o aparecimento de algumas espécies m/z (figura 1). Na figura 2, vemos que a espécie 4961 m/z , teve uma detecção mais central na amostra em relação ao resto do tecido. Em comparação com a histologia, a expressão dessa espécie se dá mais presente na área onde se encontram as células tumorais (área central da secção – figura 2). Assim, ela apresenta um potencial para ser um biomarcador desse tipo de lesão.

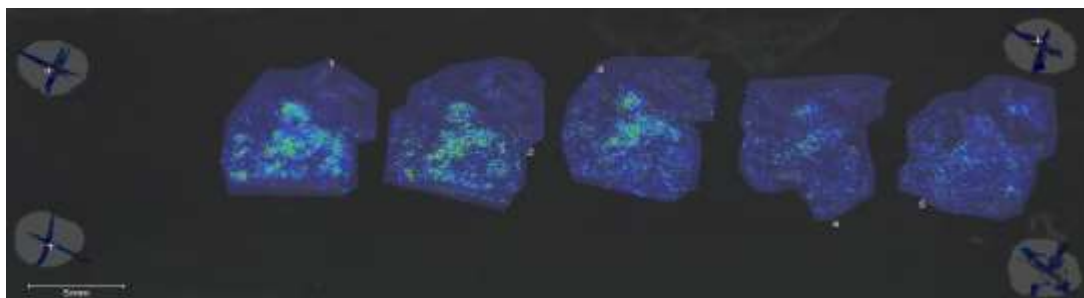


Figura 2: Distribuição da espécie 4961 m/z nas áreas analisadas

Também foi observado outra espécie, 3324 m/z , que teve uma distribuição homogênea por toda a extensão da secção. Assim, essa espécie não seria uma boa candidata a um futuro biomarcador para esse tipo de lesão.

CONCLUSÕES

Como podemos ver, o MALDI-IMS mostra ser uma técnica com grande potencial para a investigação/descoberta de possíveis biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico para tumores mamários e também a possibilidade de gerar uma assinatura proteica, onde o perfil do espectro auxiliará a classificação de tumores. Os parâmetros experimentais estão em constante refinamento desde a escolha e aplicação da matriz até a configuração de análise. Estas determinações são laboriosas e se fazem necessárias de forma particular para cada tipo de amostra (tecido) utilizada, visto ser uma metodologia, para esta aplicação, recente e com múltiplas variáveis a serem ajustadas. Contudo, já podemos utilizar a técnica de modo a poder extrair informações das amostras quanto a expressão proteicas (aumentada ou diminuída) nos tecidos de mama transformados buscando potenciais moléculas alvos para diagnóstico e/ou prognóstico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FACEPE e ao CNPq pelo suporte financeiro, à Propesq/CNPq (UFPE) pela Bolsa de Iniciação Científica, ao CETENE por ceder o equipamento, ao LIKA pelo suporte físico.

REFERÊNCIAS

- BAKRY, R.; et al. Protein profiling for cancer biomarker discovery using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and infrared imaging: a review. **Analytica chimica acta**. 2011 Mar 25;690(1):26-34. PubMed PMID: 21414433. Epub 2011/03/19.
- BALLUFF, B.; et al. Classification of HER2/neu status in gastric cancer using a breast-cancer derived proteome classifier. **J. Proteome Res.** 2010, 9 (12), 6317–22.
- BALLUFF, B.; et al. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications. **Histochemistry and cell biology**. 2011 Sep;136(3):227-44. PubMed PMID: 21805154. Epub 2011/08/02.
- BATESON, H.; et al. Use of matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry in cancer research. **Journal of pharmacological and toxicological methods**. 2011 Nov-Dec;64(3):197-206. PubMed PMID: 21549846. Epub 2011/05/10.
- MEDING, S.; NITSCHKE, U.; BALLUFF, B.; ELSNER, M.; RAUSER, S.; SCHÖNE, C.; NIPP, M.; MAAK, M.; FEITH, M.; EBERT, M.P., et al. Tumor classification of six common cancer types based on proteomic profiling by MALDI imaging. **J Proteome Res.** 2012;11:1996–2003
- CHAURAND, P.; SCHWARTZ, S.A.; CAPRIOLI, R.M. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. **Current opinion in chemical biology**. 2002 Oct;6(5):676-81. PubMed PMID: 12413553. Epub 2002/11/05.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**. p. 26-76, 2014
- LEWANDOWSKI, R.; ROSZKOWSKI K; LEWANDOWSKA, M.A. Medycyna personalizowana w onkologii – wizja czy realna koncepcja? **Wspolczesna Onkol** 2011; 15: 1-6.
- PAVLIDIS, N.; FIZAZI, K. Carcinoma of unknown primary (CUP). **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 2009, 69 (3), 271–8.
- RAUSER, S.; et al. Classification of *HER2* receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. **J Proteome Res.** 2010. April 5;9(4):1854–63.
- REYZER, M. L.; et al. Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics. **Cancer Res.** 2004, 64, 9093–9100.
- STOECKLI, M.; et al. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. **Nature medicine**. 2001 Apr;7(4):493-6. PubMed PMID: 11283679. Epub 2001/04/03.