

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Proteómica da Apneia Obstrutiva do Sono para a Descoberta de Biomarcadores

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Ana Rita dos Reis Silva

Dissertação orientada por:
Doutora Deborah Penque
Doutora Maria Teresa Rebelo

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Proteómica da Apneia Obstrutiva do Sono para a Descoberta de Biomarcadores

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Ana Rita dos Reis Silva

Dissertação orientada por:
Doutora Deborah Penque
Doutora Maria Teresa Rebelo

2015

*“We walk the halls of learning
And serve a proud tradition
The flame of truth is burning
To clarify our vision
Look at how the future gleams
Gold against the sky!*

We hope that your future in science will flash golden sparks against the sky.

Enjoy it!”

Egisto Boschetti
Pier Giorgio Righetti
Em “Low-Abundance Proteome Discovery” 2013

Nota: Nesta dissertação foram utilizados os critérios da revista *Sleep Medicine* para elaboração das referências bibliográficas.

Agradecimentos

À Doutora Deborah Penque, minha orientadora, por ter aceitado fazer parte da sua equipa, para participar num projecto inovador. Pela competência e sabedoria científica, partilha de conhecimentos, críticas, sugestões e ajuda em desenlaçar muitos nós nesta investigação. Obrigado por continuar a apostar na carreira científica e a motivar os que passam pela sua orientação.

À Doutora Fátima Vaz, minha co-orientadora, pela dedicação, paciência e compreensão dedicadas às “suas pombas”. Obrigado por todo o tempo disponibilizado, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo e pelo gigantesco bom humor que tanto acalmou e motivou a avançar. Obrigado pela força, pela amizade e protecção, neste mundo da investigação que a nós, mestrandos, tanto assusta. Foi uma estrela guia e um anjo da guarda nesta caminhada.

À Doutora Maria Teresa Rebelo, minha orientadora interna, pela paciência, disponibilidade e ajuda dada na correcção da tese. Obrigado não só por esta ajuda mas por todos os ensinamentos prestados durante todo o mestrado.

À Doutora Vukosava Torres, por me ter apoiado e mostrado o que é ser investigador. As tuas palavras e ajuda foram essenciais.

À Doutora Solange Pacheco por toda ajuda prestada na análise bioinformática, e leitura da tese. Por todo o carinho e compreensão. A tua força de vontade e sabedoria são uma motivação e um exemplo a seguir.

À minha mestranda Cristina Coelho, que tanto me aturou. Bela paciência que tiveste querida. Obrigada por toda a amizade, companheirismo, ajuda, compreensão. Continua com essa força e a crescer sempre neste mundo da ciência.

À minha família, que tanta paciência teve para aguentar as minhas variações de humor devidas ao *stress* e cansaço. Pela força que sempre me deram ao longo desta caminhada, pelas palavras de consolo, carinho e por me fazerem sempre acreditar que por mais que haja obstáculos e dificuldades na nossa vida temos sempre de enfrentá-los até ao fim.

Ao meu namorado, força da natureza com a paciência mais santa à face da terra. Obrigada por acalmares o meu coração todos os dias, por me dizeres que sou capaz, que sei e que posso. O teu amor e carinho foram o meu pilar, as tuas palavras a minha bateria. Seremos sempre a força um do outro.

Aos meus amigos, pela motivação e todo o interesse que demonstraram em conhecer o meu trabalho. Por tornarem momentos stressantes em momentos de calma e cheios de sorrisos. A vossa presença na minha vida é essencial.

Índice

Lista de abreviaturas	1
Resumo	2
Abstract.....	4
Introdução	6
Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS)	6
Epidemiologia	6
Fatores de Risco	6
Diagnóstico e Tratamento	8
SAOS e <i>stress</i> oxidativo	9
Consequências Moleculares da SAOS e a Proteómica	10
Proteómica em plasma	10
Candidatos a biomarcadores para a SAOS em validação	11
Monitorização do estado redox e oligomérico da peroxiredoxina	15
Material e métodos	18
Colheita, seleção e preparação de amostras	18
Depleção e <i>Desalting</i>	21
Quantificação de proteína	23
Análise de proteínas por eletroforese bidimensional (<i>2DE</i>) em mini gel.....	24
Avaliação do estado redox/oligomérico da PRX 2: estudo em plasma	26
Análise quantitativa/densitometria por <i>ImageJ</i>	28
Resultados e discussão	30
Análise de amostras de plasma por <i>2D-PAGE</i> em mini-géis	30
Teste à eficácia da depleção por meio de eletroforese unidimensional (<i>1DE SDS-PAGE</i> da amostra:.....	30
<i>2D-PAGE</i>	31
Estado redox/oligomérico da Prx2 plasmática na SAOS	31
- Optimização em <i>pools</i> de amostras	32
- Estudo em amostras individuais.....	34
Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40
Anexos.....	43

Índice de Anexos

Anexo 1 Tabela síntese com dados dos indivíduos que fizeram parte do estudo de optimização em pool.	44
Anexo 2 Tabela síntese com dados dos indivíduos que fizeram parte do estudo individual.	45

Índice de Figuras

Fig. 1 Ilustração esquemática sugestiva do papel central do stress oxidativo e inflamação na SAOS e desenvolvimento de condições e comorbidades associadas. Actividade simpática (AS), hipertensão arterial (HTA), diabetes tipo 2 (D2).	9
Fig. 2 Representação esquemática da proporção das proteínas menos abundantes (esquerda), no plasma, em relação ao proteoma total (direita). O gráfico ao centro engloba as proteínas que apresentam uma abundância intermédia.....	11
Fig. 3 Função peroxidática da Prx expondo como exemplo de peróxido a degradar, o peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂).....	13
Fig. 4 Processo simplificado da oligomerização das Prx com factores implicados e funções.	14
Fig. 5 Locais de actuação dos agentes alquilantes (A) e redutores (B) nos dímeros de Prx.....	15
Fig. 6 Avaliação do estado redox das Prx com actuação de NEM. Visualização esquemática das formas oligoméricas da Prx por separação por SDS-PAGE em condições não reduzidas.	16
Fig. 7 Procedimento para obtenção dos componentes do sangue	18
Fig. 8 Elaboração das pools de plasma em estudo.	20
Fig. 9 Amostras individuais em estudo.	21
Fig. 10 Esquema simplificado do que ocorre no processo de depleção de plasma.	22
Fig. 11 Esquema simplificado das reacções de incubação primária e secundária com posterior processo de detecção.	28
Fig. 12 Teste comparativo em triplicado de 3 aliquotas de plasma com 10µg de proteína. (P) plasma puro diluído 1:50; (F1) porção F1 e (E) porção eluída. (M) Marcador de massa molecular (kDa).	30
Fig. 13 Eletroforese em gel bidimensional de uma amostra de plasma depletada das 14 proteínas mais abundantes. Amostra - 40µg de proteína plasmática. IPG 4-7 em tira de 7cm. Gel corado com azul brilhante de coomassie coloidal. (M) Marcador de massa molecular (kDa).....	31
Fig. 14 Resultado da análise por WB em géis SDS-PAGE reduzidos, para as proteínas Prx2 e suas formas hiperoxidadas (PrxSO _{2/3}) em pools de amostras de plasma. Utilização de 25µg de proteína.....	32
Fig. 15 Expressão da Prx2 em plasma humano de dadores saudáveis, em condições redutoras (ditiotreitól - DTT).	33
Fig. 16 Resultado da análise por WB e densitometria de géis SDS-PAGE reduzidos, para as formas monoméricas da Prx2 em amostras individuais de plasma. Utilização de 25µg de proteína.....	34
Fig. 17 Resultado da análise por WB e densitometria de géis SDS-PAGE reduzidos, para as formas monoméricas hiperoxidadas da Prx2 (PrxSO _{2/3}) em amostras individuais de plasma. Utilização de 25µg de proteína.	35

Fig. 18 Resultado da análise por WB e densitometria de géis SDS-PAGE não-reduzidos, para as formas oligoméricas da Prx2 e suas formas hiperoxidadas (PrxSO _{2/3}) em amostras individuais de plasma. Utilização de 25µg de proteína.	36
Fig. 19 Expressão da Prx2 em plasma humano de dadores saudáveis em condições redutoras (ditiotreitól - DTT).	36
Fig. 20 Resultados da densitometria de WB a partir de géis SDS-PAGE não-reduzidos, para as formas oligoméricas da Prx2 e suas formas hiperoxidadas (PrxSO _{2/3}) em amostras individuais de plasma.	37
Fig. 21 Expressão da Prx2 em exosomas purificados, extraídos a partir do plasma (A) e em plasma humano (B), de dadores saudáveis. Representação do resultado da expressão na ausência (-)/presença (+) de agente redutor (ditiotreitól - DTT).	38

Lista de abreviaturas

- 1DE** – do inglês *one-dimensional eletrophoresis* (electroforese unidimensional)
- 2DE** – do inglês *two-dimensional eletrophoresis* (electroforese bidimensional)
- 2D-DIGE** – do inglês *two dimensional differential gel electrophoresis* (electroforese em gel diferencial bidimensional)
- AS** – actividade simpática
- AVC** – Acidente vascular cerebral
- CPAP** – do inglês *continuous positive airway pressure* (pressão positiva contínua das vias aéreas)
- D2** – diabetes tipo 2
- ECL** – do inglês *Enhanced Chemiluminescence* (quimioluminescência reforçada)
- HMW** – do inglês *high molecular weight* (alta massa molecular)
- HTA** – hipertensão arterial
- IDR** – índices de distúrbios respiratórios
- IEF** – do inglês *isoelectric focusing* (focagem isoeletrica)
- INSA** – Instituto Nacional de Saúde
- kDa** – kilodalton
- LMW** – do inglês *low molecular weight* (baixa massa molecular)
- LC** – do inglês *liquid chromatography* (cromatografia líquida)
- MARS** – do inglês *Multiple Affinity Removal System* (Sistema de remoção por afinidade múltipla)
- MS** – do inglês *mass spectrometry* (espectrometria de massa)
- NEM** – n-etilmaleimida
- Prx** – peroxiredoxina
- PSG** – polissonografia
- PVDF** – do inglês *Polyvinylidene fluoride* (fluoreto de polivinilideno)
- RNS** – do inglês *reactive nitrogen species* (espécies reactivas de nitrogénio)
- ROS** – do inglês *reactive oxygen species* (espécies reactivas de oxigénio)
- SAOS** – síndrome da apneia obstrutiva do sono
- SDS-PAGE** – do inglês *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis* (dodecil sulfato de sódio - electroforese em gel de poliacrilamida)
- SRX** – sulfiredoxina
- TRX** – tioredoxina
- TRXR** – tioredoxina redutase
- WB** – *western blotting*

Resumo

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é um importante problema de saúde pública, não só por comprometer o estilo de vida e bem-estar do doente, mas também por ser um factor de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, metabólicas e carcinogénicas. Apesar de grandes avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento da SAOS, permanecem ainda por esclarecer os mecanismos moleculares que levam ao seu desenvolvimento e às patologias associadas.

A avaliação do perfil proteómico do plasma sanguíneo que possa estar associado à SAOS, aos vários estadios da doença ou à resposta/eficácia do tratamento com pressão positiva contínua das vias aéreas (*CPAP*), foi o objectivo último deste estudo. As proteínas constituintes deste perfil, uma vez validadas, são potenciais biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e/ou de monitorização terapêutica da SAOS.

Numa primeira fase foi necessária a optimização da preparação de amostras de plasma e sua análise por electroforese bidimensional (*2DE*) em mini-géis, para futura identificação de proteínas diferencialmente expressas na doença/condição, por espectrometria de massa. Este objectivo do projecto foi concluído com sucesso, pois mostrou que a utilização de *2DE* em minigeis é possível em análises futuras com uma boa relação custo-eficácia.

Em paralelo, investigou-se se o estado *redox*-oligomérico da proteína peroxiredoxina 2 (Prx2) (um biomarcador de inflamação/*stress* oxidativo), encontrava-se alterado no plasma de doentes com SAOS e, se esta alteração, era parcialmente revertida após tratamento *CPAP*, tal como vem sendo observado nos eritrócitos destes doentes (dados preliminares do laboratório). A validação em plasma dos dados de proteómica obtidos em eritrócitos, poderá contribuir para uma melhor compreensão da relevância do papel da Prx2 na SAOS. Para isso, seleccionaram-se amostras de plasma 'noite', recolhidas na noite anterior ao diagnóstico polissonográfico e 'manhã', recolhidas na manhã seguinte para cada indivíduo roncadador (controlo) e doente SAOS (ligeira, moderada e grave). Para estes últimos, foram também recolhidas amostras matinais '*CPAP*', após seis meses de tratamento. As amostras de plasma foram analisadas por *1DE SDS-PAGE* reduzido e não-reduzido (com ou sem agente redutor), seguido de *western blotting* com anticorpo específico para a Prx2 ou PrxSO_{2/3} (formas hiperoxidadas da Prx2). Os resultados indicaram que as formas hiperoxidadas estavam aumentadas nos doentes

SAOS, mais significamente ($p \leq 0,05$) à noite, em relação aos indivíduos controlo. O tratamento *CPAP* pareceu reduzir esta hiperoxidação. Estes resultados corroboram os resultados obtidos nos eritrócitos destes doentes. No entanto, formas da Prx2, possivelmente com outras modificações pós-traducionais, que não a hiperoxidação, também mostraram uma tendência para um aumento matinal nos doentes SAOS. Esta tendência foi significativamente ($p \leq 0,05$) reduzida após tratamento. Estes resultados, embora preliminares, são interessantes dado que a presença desta proteína no meio extra celular ser reconhecida como uma sinalizadora de *stress*/inflamação.

Em suma, os dados obtidos são motivadores para se prosseguir com a investigação no plasma, no desenvolvimento futuro de novas ferramentas de diagnóstico, prognóstico e/ou monitorização terapêutica da SAOS.

Palavras-chave: Síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), Proteómica, Biomarcadores, Pressão Positiva Contínua das Vias Aéreas (*CPAP*), Plasma

Abstract

The obstructive sleep apnea (OSA) is a major public health problem, not only for compromising the lifestyle and the patient's well-being but also to be itself a risk factor for developing cardiovascular, metabolic and carcinogenic diseases. Despite great advances in diagnostic methods and treatment of OSA, still remain to be elucidated the molecular mechanisms that lead to its development and associated pathologies.

The assessment of blood plasma proteomic profile that may be specifically associated with OSA, OSA severity or the response/efficacy of continuous positive airway pressure (CPAP) treatment, was the ultimate goal of this study. The proteins that constitute this profile, once validated, are potential biomarkers of diagnostic, prognostic and/or therapeutic monitoring of OSA.

In a first phase, it was necessary to optimize the preparation of human plasma sample and its analysis by two-dimensional electrophoresis (2DE) on mini-gels, for future identification of differentially expressed proteins in the disease/condition by mass spectrometry. This objective was successfully completed, by showing that the use of 2DE minigels is possible in future cost-effective analysis.

In parallel, it was investigated whether the redox-oligomeric state of the protein peroxiredoxin 2 (Prx2) (a biomarker of inflammation/oxidative stress) was changed in plasma of OSA patients and whether this change was partially reverted by CPAP treatment as it has been observed in erythrocytes of these patients. The validation of erythrocyte data in plasma, may contribute to a better understanding of the importance of the role of Prx2 in OSA. For this, "night" and "morning" plasma samples were selected, taken in the night before polysomnographic diagnosis, and in the next morning, respectively, from snorers (control) and OSA patients (mild, moderate or severe). For these last ones, morning samples "CPAP" were also collected, after six months of treatment.

The samples were analyzed by reduced and non-reduced 1DE SDS-PAGE (with or without reducing agent), followed by western blotting with specific antibodies for Prx2 or PrxSO_{2/3} (hyperoxidized forms of Prx2). The results indicated that the hyperoxidized forms were increased in OSA patients plasma, most significantly ($p \leq 0.05$) at night compared to the control ones. The treatment seemed to reduce this hyperoxidation. These results corroborate with the study conducted in erythrocytes. However, forms of Prx2, probably

with other post-translational modifications, which do not hyperoxidation, also showed a trend towards an morning increase in OSA patients. This tendency was significantly ($p \leq 0.05$) reduced after treatment. These results, although preliminary, are interesting due to the presence of this protein in the extracellular medium and be recognized as a signal of stress/inflammation.

In summary, the data are motivating to proceed with the investigation in plasma, in the future development of new diagnostic, prognostic and/or therapeutic monitoring of OSA.

Keywords: Obstructive Sleep Apnea (OSA), Proteomics, Biomarkers, Continuous Positive Airway Pressure (CPAP), Plasma

Introdução

Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS)

A síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS) é classificada como uma das doenças respiratórias crônicas mais prevalentes a nível mundial. São múltiplos os fatores de risco que influenciam a expressão e a progressão da SAOS. (Prasad *et al.* 2014). No entanto, a SAOS é fator de risco para a ocorrência de outras doenças como a diabetes, obesidade, depressão, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, AVC e morte (Feliciano *et al.* 2015; Sakaguchi *et al.* 2011).

A SAOS caracteriza-se por episódios de obstrução parcial (hipopneia) ou total (apneia) das vias aéreas durante o sono, causando períodos de hipoxia e despertares frequentes (Feliciano *et al.* 2015; Vaessen *et al.* 2015). Esta doença do distúrbio do sono causa também problemas diurnos, tais como, dores de cabeça matinais, sonolência excessiva, fadiga, variações de humor, entre outros (Feliciano *et al.* 2015; Vaessen *et al.* 2015)

Epidemiologia

Esta síndrome continua a constituir um importante problema de saúde pública, desde há três décadas, afetando cerca de 2% a 4% da população adulta, exibindo todos os sintomas característicos (Eldahdouh *et al.* 2014). Já a prevalência de distúrbios respiratórios do sono, sem ocorrência de sonolência diurna, afecta cerca de 10% dos homens e 24% das mulheres, sendo portanto este síndrome muito mais frequente em indivíduos do sexo masculino do que no sexo feminino, como evidenciam a maioria dos estudos, mas não estando totalmente provado (Lam *et al.* 2010; Lavie 2015; Lee *et al.* 2009).

Fatores de Risco

O desenvolvimento de SAOS é influenciado por diversos fatores como a idade, sexo, obesidade, problemas respiratórios, historial familiar (genética), malformações craniofaciais e hábitos tabágicos/alcoólicos (Lam *et al.* 2010; Lee *et al.* 2009; Prasad *et al.* 2014).

Pensa-se que a idade está relacionada com o aparecimento de apneia, devido à maior acumulação de adiposidade no espaço parafaríngeo, alongamento do palato mole e mudanças nas estruturas em torno da faringe em idades mais avançadas (>65 anos) (Lam *et al.* 2010; Lee *et al.* 2009). Em relação ao sexo, embora não confirmado que seja mais frequente nos homens, esta doença pode estar mais fortemente associada às propriedades anatómicas e funcionais das vias aéreas superiores (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010), que apresentam diferenças em ambos os sexos. No homem existe uma maior acumulação de gordura no espaço parafaríngeo (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010), bem como diferenças a nível hormonal, que podem induzir anormalidade na respiração durante o sono (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010). A menopausa parece aumentar o risco para o desenvolvimento da SAOS na mulher (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010; Lee *et al.* 2009).

A obesidade é o factor de risco mais importante no desenvolvimento da SAOS pois causa diversas modificações anatómicas, como a quantidade excessiva de gordura junto à faringe e resto do corpo que são responsáveis pelo bloqueio das vias aéreas durante o sono (Lam *et al.* 2010; Prasad *et al.* 2014). A obesidade está também fortemente ligada a uma redução do volume pulmonar, reduzindo a quantidade de ar inspirado e consequentemente aumentando a obstrução faríngeo (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010).

O historial familiar e genético tem também um papel importante neste problema, nomeadamente parentes directos afetados aumentam o risco de desenvolver SAOS, assim como familiares com obesidade. Toda a genética pode associar-se ao desenvolvimento desta doença tendo por base tendências a formação de anomalias morfológicas, produção de proteínas específicas, obesidade, problemas respiratórios, etc (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010).

O tabagismo e o alcoolismo são factores de risco para a SAOS associando-se a uma maior ocorrência de roncos e perturbações respiratórias durante o sono. O primeiro contribui principalmente para a formação de inflamações e problemas que podem desencadear modificações estruturais e funcionais das vias aéreas superiores, enquanto que o segundo é responsável pelo relaxamento muscular, dilatando as vias aéreas superiores e aumentando a sua resistência, podendo assim gerar o desenvolvimento da SAOS e ampliar a sua gravidade (Al Lawati *et al.* 2009; Lam *et al.* 2010). Os problemas respiratórios são também um contributo directo para a ocorrência de obstrução aérea.

Na rinite, os doentes mostram ter uma maior incidência de roncopatia e alterações de fluxo de ar pelas vias aéreas superiores, o que aumenta a probabilidade de existência ou agravamento de SAOS (Al Lawati *et al.* 2009; Prasad *et al.* 2014).

Também a etnia poderá estar relacionada com a prevalência de SAOS, isto devido às diferenças de morfologias craniofaciais, frequência de obesidade ou hábitos que possam desencadear a doença (Al Lawati *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009).

Podemos então referenciar que todos estes fatores de risco mencionados anteriormente se relacionam e contribuem, separadamente ou em conjunto, com o desenvolvimento e/ou agravamento da SAOS.

Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico é feito por avaliação polissonográfica noturna (PSG-polissonografia) em local laboratorial ou hospitalar. Esta baseia-se em registos fisiológicos como eletroencefalogramas, eletroculogramas, eletrocardiogramas, eletromiografias, avaliação de pressão nasal, fluxo de ar, posição corporal, medidas de esforço respiratório torácicas e abdominais e medidas de roncopatia por utilização de microfone traqueal. Todas estas gravações irão permitir a identificação dos vários estadios de apneia durante o sono, tendo em conta os episódios verificados, obtendo-se índices de diagnóstico (índices de distúrbios respiratórios - IDR) e os vários tipos de sintomas apresentados (Feliciano *et al.* 2015; Lam *et al.* 2010; Lee *et al.* 2009). Outro método validado, utilizado para diagnóstico da SAOS, engloba medições através de um dispositivo portátil de monitorização, tornando-se mais prático. Esta estratégia baseia-se na gravação de movimentos torácicos e abdominais, medições da quantidade de oxigénio, fluxo de ar nasal e frequência cardíaca (Sakaguchi *et al.* 2011). Cada evento de apneia corresponde a uma paragem do fluxo de ar durante pelo menos 10 segundos, sendo esta doença definida como ligeira se o número de eventos documentados por hora se encontra entre 5 a 15 episódios, moderada quando ocorrem 15 a 30 episódios e grave quando apresenta mais de 30 episódios por hora. (Al Lawati *et al.* 2009; Feliciano *et al.* 2015).

Para tratamento da SAOS utiliza-se, a pressão positiva contínua das vias aéreas (do inglês *continuous positive airway pressure - CPAP*) (Feliciano *et al.* 2015; Kylstra *et al.* 2013; Sánchez *et al.* 2009).

O tratamento com *CPAP* permite melhorar vários sintomas que advêm da SAOS, corrigindo distúrbios respiratórios, funções cognitivas, possíveis depressões, estado

psicológico, entre outros. No entanto estes resultados não se observam na totalidade das análises, podendo dever-se esta desigualdade de resultados à diferença de técnicas utilizadas e adesão ao tratamento, visto que é uma terapia de longo prazo (Eldahdouh *et al.* 2014; Feliciano *et al.* 2015; Kylstra *et al.* 2013; Sánchez *et al.* 2009). Existem circunstâncias em que os pacientes não toleram este tratamento, neste caso são efetuados tratamentos comportamentais que irão permitir a redução ou eliminação de fatores de risco relacionados com a SAOS, como os mencionados anteriormente (Sánchez *et al.* 2009).

SAOS e *stress* oxidativo

Dado que a SAOS leva a períodos de hipóxia e fragmentação do sono, os processos biológicos podem sofrer grandes perturbações, provocando alterações na atividade simpática (AS), inflamação e *stress* oxidativo (Arnardottir *et al.* 2009). Segundo a literatura, estas alterações estão altamente associadas ao desenvolvimento de problemas cardiovasculares,

cerebrovasculares e outras doenças, dada toda a cascata de eventos que são promovidos (fig.1) (Lavie, 2015).

O *stress* oxidativo resulta da desregulação da homeostase que existe entre os níveis de radicais livres (por exemplo, espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio - ROS/RNS) resultantes do normal metabolismo celular e os níveis de defesa antioxidante do organismo.

Embora os radicais livres sejam essenciais para processos como a regulação de transdução de sinal e função celular, a sua produção excessiva, induzida por exemplo por processos patológicos, afecta mecanismos celulares e fisiológicos danificando lípidos, proteínas e até o próprio DNA (Badran *et al.* 2014; Badran *et al.* 2014).

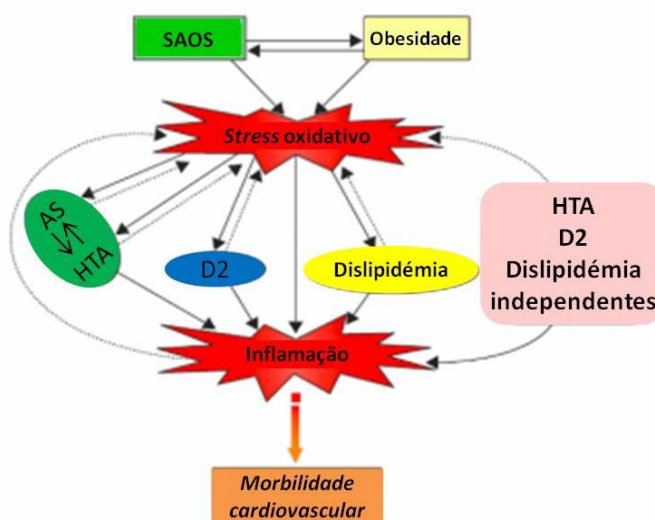


Fig. 1 Ilustração esquemática sugestiva do papel central do *stress* oxidativo e inflamação na SAOS e desenvolvimento de condições e comorbidades associadas. Actividade simpática (AS), hipertensão arterial (HTA), diabetes tipo 2 (D2). (Adaptado de Lavie, 2015)

Consequências Moleculares da SAOS e a Proteômica

Identificar as proteínas envolvidas nos processos moleculares alterados pela SAOS, poderá ser uma mais-valia para a clínica desta doença, uma vez que estas proteínas são potenciais biomarcadores associados à SAOS, assim como de patologias a ela associadas.

O aparecimento da proteômica, que examina um maior número de proteínas num dado tempo e condição, permite uma análise abrangente do proteoma, quer em estado saudável, quer em estado de doença. Por esta razão, a proteômica tem sido considerada uma abordagem fundamental na identificação de novos biomarcadores de diagnóstico/prognóstico ou como alvos terapêuticos para muitas doenças, incluindo a SAOS (Arnardottir *et al.* 2009; Feliciano *et al.* 2015).

Alguns estudos de proteômica têm vindo a ser realizados em amostras de plasma/urina de doentes adultos e crianças com SAOS. Contudo, os resultados até ao momento alcançados, embora promissores, são ainda considerados preliminares (Feliciano *et al.* 2015). Com o presente projeto, pretende-se, portanto, dar um contributo para os avanços da proteômica na identificação e validação de potenciais biomarcadores que tenham real impacto para o diagnóstico e prevenção da SAOS.

Proteômica em plasma

Neste projeto de investigação houve um grande interesse em utilizar o plasma como material biológico de estudo em proteômica com o objetivo de explorar as vias responsáveis pelo desenvolvimento e agravamento da SAOS bem como das suas consequências a nível metabólico e cardiovascular, incluindo o seu tratamento.

O plasma tem sido o material biológico mais utilizado na descoberta de biomarcadores por ser de colheita não-invasiva e ter na sua constituição proteínas/péptidos provenientes de todos os tecidos/órgãos do organismo. Contudo, investigar o plasma por proteômica tem sido um grande desafio visto ser fonte de um complexo proteoma. O plasma apresenta uma vasta gama de concentração de proteínas, desde proteínas muito abundantes (mg/mL - unidades SI) como o seu maior constituinte, a albumina, até às proteínas muito pouco abundantes (pg/mL - unidades SI), como as citocinas, o que dificulta grandemente a sua análise por proteômica (fig.2) (Anderson e Anderson 2002; Dayon e Kussmann 2013; Lathrop *et al.* 2003; Lee *et al.* 2006).

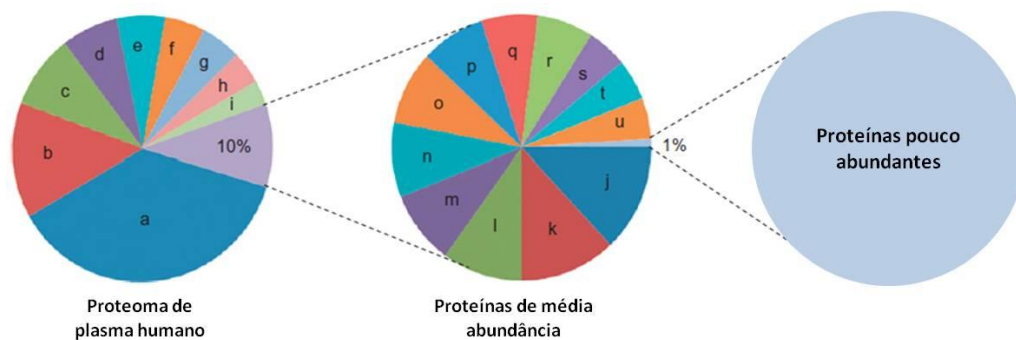


Fig. 2 Representação esquemática da proporção das proteínas menos abundantes (esquerda), no plasma, em relação ao proteoma total (direita). O gráfico ao centro engloba as proteínas que apresentam uma abundância intermédia. (Adaptado de Riggetti e Boschetti, 2013)

Técnicas de imunodepleção de proteínas mais abundantes no plasma são utilizadas com sucesso no enriquecimento das proteínas menos abundantes e subsequente análise por proteómica (Righetti *et al.* 2006; Righetti *et al.* 2011).

As técnicas de proteómica mais utilizadas na separação de proteínas são a eletroforese bidimensional (2DE ou 2D-DIGE) e a cromatografia líquida (LC), ambas seguidas de análise por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) para identificação proteica (Feliciano *et al.* 2015).

Candidatos a biomarcadores para a SAOS em validação

Segundo Shih e Malhotra (2011) um biomarcador, para o ser, deve preencher um dos seguintes requisitos: (1) apresentar sensibilidade e especificidade para a doença em causa, mostrando utilidade para diagnóstico, (2) correlacionar-se com a severidade da doença com utilidade no prognóstico, (3) responder a um determinado tratamento, prevendo a eficácia do mesmo e/ou (4) estar correlacionado com mecanismos patológicos que, uma vez alvos de terapias que modifiquem os seus níveis de expressão, traduzam-se em alterações no sentido do restabelecimento fisiológico destes mesmos mecanismos.

O Laboratório de Proteómica do INSA Dr. Ricardo Jorge tem vindo a realizar estudos de proteómica em eritrócitos de doentes com SAOS (Feliciano *et al.* 2014; Vaz *et al.* 2015). A peroxiredoxina 2 (Prx2) é uma das proteínas que tem sido identificada como diferencialmente expressa nos doentes com SAOS. Faz parte de uma família de seis tiol-peroxidases com função relevante na protecção antioxidante e sinalização *redox* que as tornam ideais sensores da homeostase-*redox* da célula. As Prx (também referenciado na

literatura como PRDX) catalisam a degradação de vários peróxidos orgânicos como por exemplo o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Milev *et al.* 2015). Nos eritrócitos, A Prx2 representa a terceira proteína mais abundante (Ishida *et al.* 2014; Manta *et al.* 2009). As Prx existem maioritariamente em forma de homodímeros, de ligação não-covalente. Nos eritrócitos, formas oligoméricas da Prx2 são muito abundantes (Poynton e Hampton, 2014). Estudos recentes mostram resultados interessantes acerca desta proteína no plasma, mostrando que se encontra maioritariamente em forma multimérica e que é secretada, associada a exosomas, na sua forma oxidada e sob condições de *stress*/inflamação (Mullen *et al.* 2015; Salzano *et al.* 2014).

A actividade peroxidática destas proteínas é despoletada a partir de resíduos de cisteína peroxidática, posição 51 (CYS_P-SH), presente num dos monómeros que ao reagir com o H_2O_2 forma um derivado do ácido sulfénico (CYS_P-SOH), que reage com o resíduo de cisteína conservado “resolving”, posição 172, (CYS_R-SH) do monómero adjacente, formando assim uma ligação dissulfídica (S-S) entre os dois monómeros, dando origem a formas dimericas dissulfídicas oxidadas. O dímero ligado por pontes dissulfídicas (S-S) pode regenerar-se à forma reduzida através do sistema da tioredoxina (TRX) e tioredoxina redutase (TRXR), que permite a reacção de redução usando *NADPH* (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* reduzida) como dador de electrões. Contudo, a reacção de redução pela TRX/TRXR é lenta e limitada a determinadas concentrações de TRX e Prx, o que leva com que o derivado do ácido sulfénico da CYS_P (CYS_P-SOH) possa reagir com uma nova molécula de H_2O_2 originando um derivado estável de ácido sulfínico (CYS_P-SO_2H), ou seja, uma forma hiperoxidada da Prx. Esta forma hiperoxidada pode ser ainda reciclada à sua forma reduzida (CYS_P-SOH) pela acção da suferedoxina (SRX), uma redutase-dependente de *ATP* (do inglês *adenosine triphosphate*). Esta reacção é limitada e lenta, dependendo da quantidade de SRX existente. Subsequente oxidação dos derivados sulfínico (CYS_P-SO_2H) podem ocasionalmente ocorrer, dando origem a derivados irreversíveis de ácido sulfónico da cisteína (CYS_P-SO_3H), que efectivamente remove a Prx do ciclo *redox* (fig.3) (Hoyle e O’Neill 2015; Milev *et al.* 2015; Poynton e Hampton 2014).

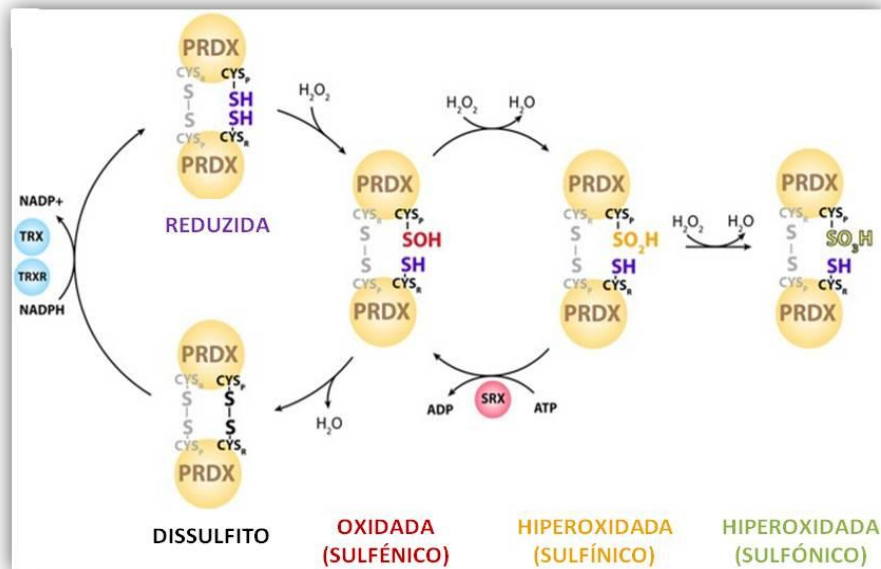


Fig. 3 Função peroxidática da Prx expondo como exemplo de peróxido a degradar, o peróxido de hidrogénio (H₂O₂)
(Adaptado de Hoyle e O'Neill 2015)

A acumulação de formas hiperoxidadas e inactivas da Prx pode aumentar a concentração local do H₂O₂, como explicada pela hipótese *Floodgate* de Wood *et al.* 2003).

Formas oxidadas da Prx tendem a favorecer o estado dimérico para reciclagem via TRX/TRXR. Formas reduzidas, oxidadas e hiperoxidadas podem adoptar formas decaméricas ou do-decaméricas sendo esta última fortemente associada à actividade *chaperone* e de sinalização celular da Prx (Barranco-Medina *et al.* 2009; Hoyle e O'Neill 2015; Milev *et al.* 2014; Wood *et al.* 2003).

A interconvenção entre esses estados oligoméricos está relacionado com alterações na função da Prx, isto é, actuando como uma peroxidase, *chaperone*, um parceiro de ligação, activador enzimático e/ou como sensor *redox* tal como proposto por Barranco-Medina e sua equipa (fig.4).

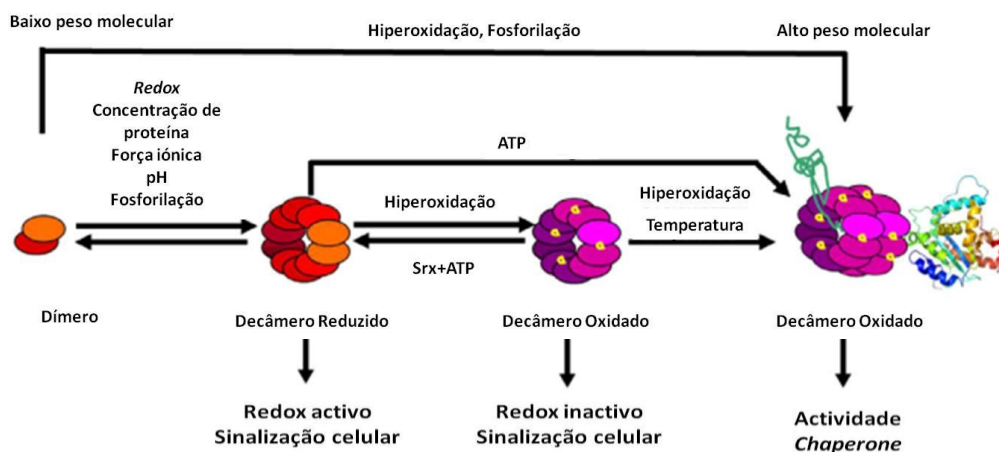


Fig. 4 Processo simplificado da oligomerização das Prx com factores implicados e funções. (Adaptado de Barranco-Medina *et al.* 2009)

Formas hiperoxidadas da Prx desempenham um papel na sobrevivência celular, outra que não a atividade *chaperone*. Recentemente, foram demonstradas variações circadianas, com um período de 24 horas, na abundância da Prx hiperoxidada nos eritrócitos humanos, como parte de um importante mecanismo *redox* na fisiologia celular. Tendo em atenção que os eritrócitos estão desprovidos de ‘maquinaria transcrição-tradução’, esta oscilação é principalmente consequência de oscilações nas modificações pós-traducionais da proteína (Cho *et al.* 2014; Hoyle e O’Neill 2015).

As Prxs têm sido alvo de atenção dos investigadores dada a sua aparente função de supressor/promotor de tumor e/ou como promotor da inflamação associada a lesões isquémicas cerebrais. A expressão elevada da Prx tem sido observada em várias doenças, tais como carcinoma do pulmão, doença de Alzheimer e síndrome de Down (Perkins *et al.* 2015). As múltiplas funções das Prxs e seu impacto no desenvolvimento das doenças motivam uma continuada investigação sobre o seu papel na fisiologia, bem como nos mecanismos associados ao desenvolvimento de doenças.

Dados recentes do laboratório sugerem que formas ácidas da Prx2 em géis 2DE, descritas como resultantes de hiperoxidação, estão aumentadas nos eritrócitos de doentes com SAOS. A avaliação do estado *redox* da Prx2 por *western blotting* (WB) e anticorpos específicos (ver abaixo ‘monitorização do estado redox/oligomérico da Prx’) confirmam que formas monoméricas/diméricas, oxidadas e/ou hiperoxidadas estão aumentadas nos eritrócitos de doentes com SAOS em comparação com os controlos. Após tratamento com CPAP, observou-se uma diminuição desta oxidação da Prx2. Contudo, formas decaméricas/multiméricas hiperoxidadas da Prx2 foram identificadas

quase que exclusivamente em doentes após tratamento (Feliciano *et al.* {artigo em preparação}; Vaz *et al.* 2015). A dinâmica de formação dos decâmeros é governada pelo estado *redox* dos monómeros, em que formas totalmente reduzidas ou totalmente hiperoxidadas estão associadas à estabilização dos oligómeros, enquanto que as formas oxidadas promovem a dissociação dos oligómeros para subsequente ciclo de redução/regeneração da actividade peroxidática (Milev *et al.* 2014).

Monitorização do estado redox e oligomérico da peroxiredoxina

A avaliação do estado redox e oligomérico da Prx tem sido útil na monitorização do *stress* oxidativo em células.

As formas monoméricas da Prx2 ($\approx 20\text{kDa}$) distinguem-se das suas formas diméricas da ($\approx 40\text{kDa}$) e das multiméricas ($\approx 200\text{kDa}$) através da técnica de *WB* com anticorpo específico para a Prx2, em que a amostra é analisada por electroforese em géis de poliacrilamida desnaturantes (*SDS-PAGE* - do inglês *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*), mas não-reduzidos. A não-redução implica a não utilização de agentes redutores (por exemplo ditioneitol [DTT], β -mercaptoetanol [βm]), que hidrolisam as pontes dissulfídicas (-S-S-). Para evitar (re)oxidações artefactuais exógenas ao sistema, derivadas do processamento das amostras, um agente alquilante (por exemplo, *n*-etilmaleimida (NEM)) deve ser adicionado à amostra. Este agente alquilante liga-se às cisteínas reduzidas impedindo que estas se (re)oxidem (fig. 5) (Cox *et al.* 2010).

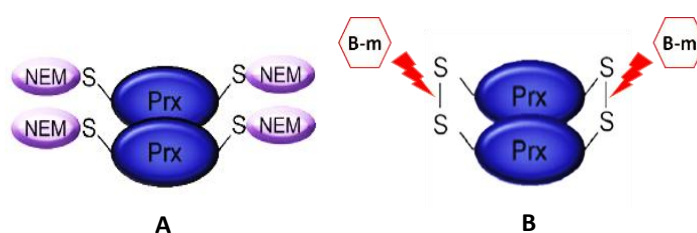


Fig. 5 Locais de actuação dos agentes alquilantes (A) e redutores (B) nos dímeros de Prx. (adaptada de Poynton e Hampton 2014)

No *WB* em géis *SDS-PAGE* não-reduzido, as formas diméricas ou multiméricas da Prx2 detectadas são formas dissulfídicas (-S-S-) oxidadas ou hiperoxidadas. As formas diméricas hiperoxidadas migram ligeiramente acima das formas oxidadas, enquanto que as formas monoméricas são formas reduzidas ou totalmente hiperoxidadas, provenientes de dímeros ou multímeros reduzidos/hiperoxidados da Prx2. Neste caso, as formas

monoméricas reduzidas migram acima das formas monoméricas hiperoxidadas (fig.6). Contudo, os monómeros reduzidos ou hiperoxidados da Prx2 de eritrócitos migram numa única banda de $\approx 20\text{kDa}$ em géis *SDS-PAGE* não-reduzido (Poynton & Hampton 2014).

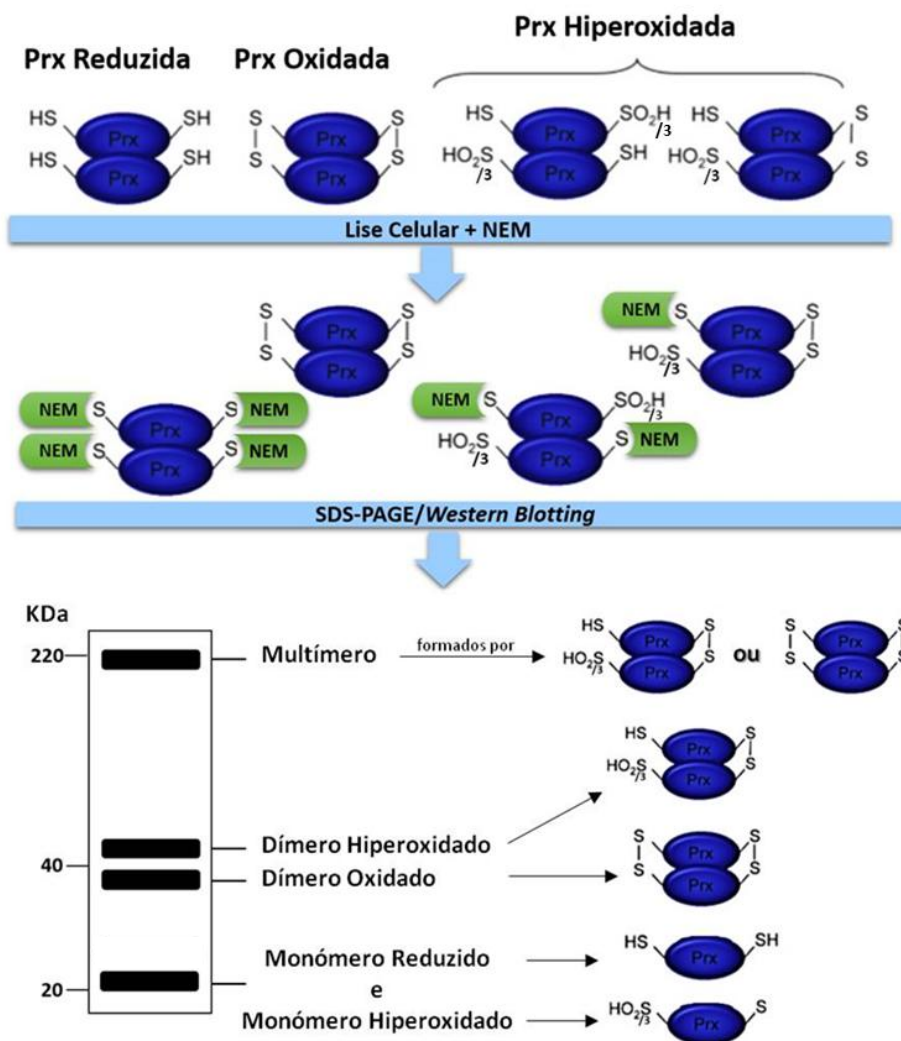


Fig. 6 Avaliação do estado redox das Prx com actuação de NEM. Visualização esquemática das formas oligoméricas da Prx por separação por *SDS-PAGE* em condições não reduzidas. (adaptado de Poynton e Hampton, 2014)

Uma maior abundância relativa das formas diméricas oxidadas em relação às formas monoméricas reduzidas, é indicativo de *stress* oxidativo celular (Poynton & Hampton 2014). Outro método mais específico para a avaliação do estado de oxi-redução das Prxs é através da utilização de um anticorpo para a Prx hiperoxidada (PrxSO_{2/3}). Níveis elevados de Prx hiperoxidada estão provavelmente associados a níveis elevados de *stress* oxidativo e/ou aumento da actividade *chaperone*/sinalização na protecção celular (Poynton & Hampton, 2014).

Objectivos

A avaliação do perfil proteómico do plasma sanguíneo que possa estar especificamente associado a SAOS, aos vários estadios da doença ou ainda, à resposta/eficácia do tratamento com pressão positiva contínua das vias aéreas (CPAP) é o objectivo último deste estudo. Uma vez validado, as proteínas que desenham este perfil proteómico podem constituir potenciais biomarcadores de diagnóstico/prognóstico e/ou de monitorização terapêutica.

Os sub-objectivos deste estudo foram, então, os seguintes:

- 1- Optimizar a preparação de amostras de plasma para sua futura análise por electroforese bidimensional diferencial (*2D-DIGE*, do inglês *two dimensional differencial gel electrophoresis*) em mini-géis. A utilização de mini-géis tem como objetivo aumentar a capacidade, reproducibilidade e significância da análise, pois permite um maior número de amostras por análise a custo e tempo reduzidos. Uma vez optimizada, esta metodologia será aplicada em futuros estudos de identificação de proteínas plasmáticas associadas aos diferentes estadios de gravidade da SAOS e/ou à resposta ao tratamento com *CPAP*.
- 2- Avaliação do estado *redox*/oligomérico da Prx2 no plasma de roncoadores, doentes com SAOS, antes e após *CPAP*. Correlacionar estes resultados com os dados previamente obtidos para esta proteína em eritrócitos destes doentes. O objectivo é confirmar e melhor compreender a relevância da Prx2 na SAOS.

Material e métodos

Colheita, seleção e preparação de amostras

Pacientes com suspeita de SAOS do Hospital Pulido Valente em Lisboa, foram clinicamente avaliados, obtendo-se um conjunto de registos clínicos com dados demográficos, estado nutricional, índice de massa corporal, pressão arterial, frequência cardíaca, estilo de vida, parâmetros de PSG o que permitiu o diagnóstico da SAOS e o perfil metabólico de cada paciente. Todos estes dados estão arquivados numa base de dados associada a um Biobanco (plasma e eritrócitos) sob consentimento informado, aprovado pela proteção nacional de dados e comissão ética do Centro Hospitalar Lisboa Norte e do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Nesta base de dados/Biobanco incluem-se apenas pacientes do sexo masculino com idades entre os 25 e 55 anos.

Membros do laboratório promoveram a separação do plasma, em que a amostra de sangue total obtida de cada paciente foi submetida a um procedimento de separação de componentes (fig.7). O sangue recolhido foi inserido num tubo contendo anticoagulante, e sujeito a uma centrifugação (1800g, 10 min, 5°C, em centrífuga *Centrifuge 5810R - Eppendorf*). Esta centrifugação é suficiente para a obtenção do plasma. Este foi recolhido e aliquoteado em *ependorfs* devidamente etiquetados (informações acerca do paciente e tipo de amostra), e posteriormente guardados a -80°C.

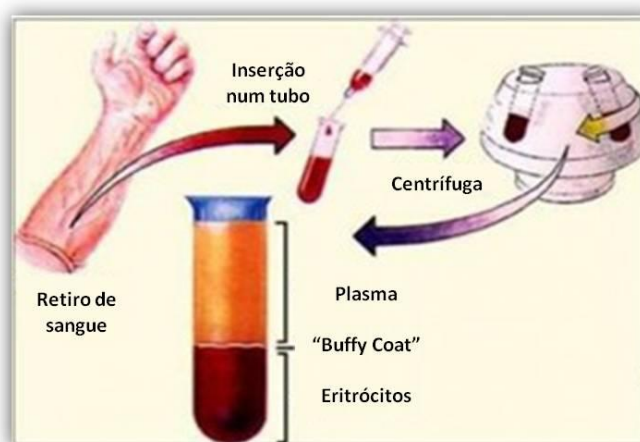


Fig. 7 Procedimento para obtenção dos componentes do sangue (adaptado de <http://www.clinicaitapura.com.br/dicasnoticias/190-prp.html>)

Para pesquisa de biomarcadores foram selecionadas, a partir deste Biobanco criado no âmbito do projeto HMSP-ICJ/0022/2011, amostras de plasma de pacientes diagnosticados com ausência de SAOS (grupo controlo - roncoadores), com presença de SAOS ligeira, moderada ou grave, antes e após tratamento com CPAP. Para além das

categorias de ausência/gravidade/tratamento, as amostras também foram recolhidas à noite (antes de dormir) e de manhã.

Foram efectuados dois estudos. Primeiramente, foi elaborada uma optimização em *pool*, e seguidamente procedeu-se ao estudo individual, para obtenção de resultados que pormenorizassem e distinguissem o estado e hábitos de cada doente, pois em *pool* muitas outras condições, que não a SAOS, podem estar implicadas (constituindo uma única amostra).

A preparação das amostras para cada um dos estudos está descrita abaixo.

- **Estudo 1: Optimização em *pools* de grupos individualizados de roncoadores (noite/manhã), doentes com SAOS (noite/manhã) e doentes após 6 meses de tratamento com CPAP (manhã). Os dados de cada sujeito encontram-se no anexo 1.**

Este estudo funcionou como uma primeira orientação a partir de resultados por *WB*, em *pools* de eritrócitos de pacientes do biobanco SAOS, tendo em conta a sua interpretação em relação à proteína de interesse (Prx2).

A *pool* referente ao grupo controlo é constituída por 7 doentes com colheita à noite e 7 doentes com colheita de manhã (os mesmos que efectuaram colheita à noite), ocorrendo o mesmo para os 3 doentes SAOS, e somente colheita mantinal para a *pool* CPAP. As *pools* foram elaboradas a partir de cada um dos indivíduos de cada categoria e, cada uma era constituída por uma quantidade igual de plasma de cada sujeito, formando uma mistura única para cada categoria em estudo (fig.8).

Algumas características conhecidas acerca dos hábitos tabágicos de cada indivíduo, assim como dados acerca de comorbidades para além da SAOS, podem ser consultadas no anexo 1.

O propósito da elaboração do estudo em *pool* é o de diminuir a variabilidade entre amostras numa dada categoria/condição e rentabilizar custos/consumíveis, para *screening* inicial do possível proteoma a obter.

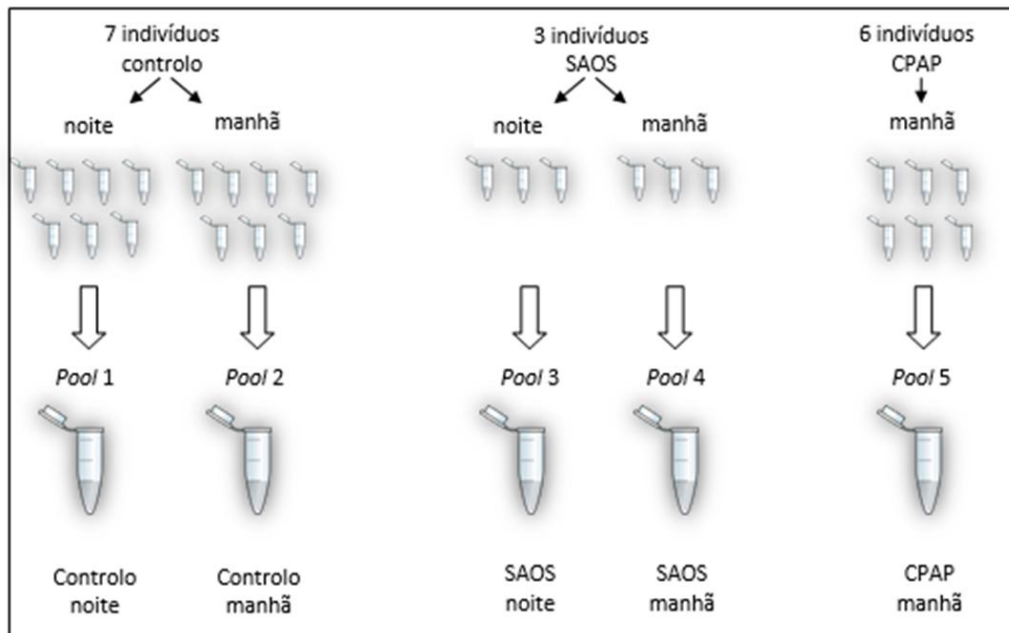


Fig. 8 Elaboração das *pools* de plasma em estudo.

Paralelamente foram também utilizadas amostras individuais de indivíduos do biobanco SAOS com as mesmas categorias/condição para posterior interpretação.

- **Estudo 2: Estudo individual de grupos individualizados de roncadores (noite/manhã), doentes com SAOS (noite/manhã) e os mesmos doentes após 6 meses de tratamento com CPAP (manhã). Os dados de cada sujeito encontram-se no anexo 2.**

O estudo individual é mais correcto, pois avaliamos o comportamento de cada indivíduo *per si*, analisando também hábitos ou comorbidades que o sujeito apresente e que possam interferir na interpretação dos resultados. Cada categoria tem igual número de pacientes (9) e foram também incluídos pacientes com os vários estadios da doença para avaliarmos alguma diferença de expressão (fig.9).

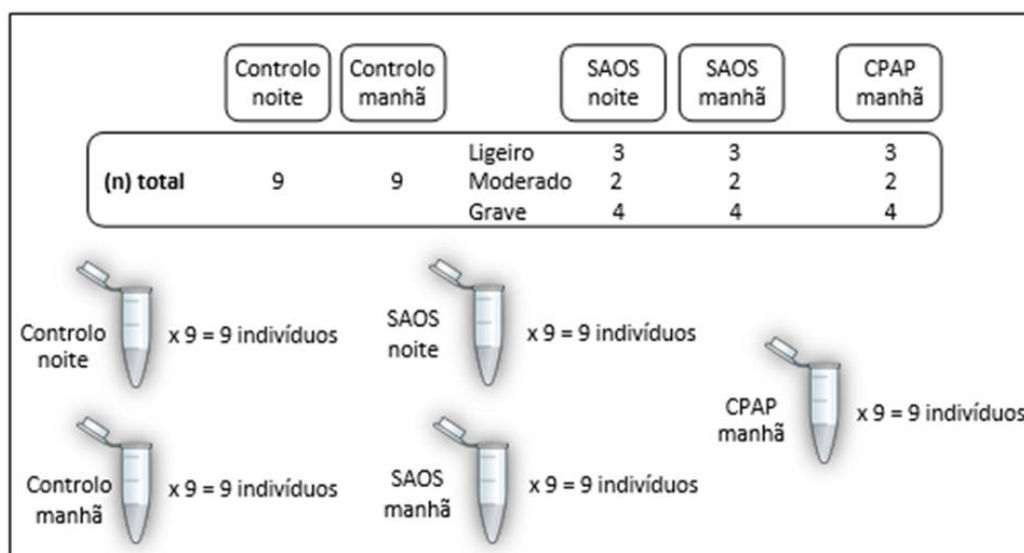


Fig. 9 Amostras individuais em estudo.

Nos anexos 1 e 2, nomeio as informações relativas a comorbidades adicionais e hábitos tabágicos pois pode haver interligação destas com a presença de SAOS e com a variedade de resultados obtidos entre pacientes da mesma categoria.

Depleção e *Desalting*

A depleção das catorze proteínas mais abundantes do plasma, foi feita através colunas de imunoafinidade (*MARS-Hu-14 column - Agilent human 14 multiple affinity removal system*) com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores para a SAOS, no grupo de proteínas menos abundantes, pois as que existem em maior quantidade mascaram qualquer possibilidade de discriminar as existentes em menor número, onde se pensa que uma molécula como um eventual biomarcador se encontre (Tu *et al.* 2010).

O processo de depleção foi realizado conforme instruções do fabricante. Foi usada uma amostra de plasma de um só paciente, com o objectivo de conhecer o padrão proteico do plasma. Esta tecnologia permite a remoção de albumina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina, haptoglobina, fibrinogénio, α -2-macroglobulina, α -1-glicoproteína ácida, IgM, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, complemento C3 e transtirretina (fig.10), através de uma combinação de anticorpos, presentes numa matriz assente numa coluna de depleção, que capta as proteínas muito abundantes, diminuindo assim a sua concentração total no plasma, resultando no enriquecimento de proteínas pouco abundantes (Yadav *et al.* 2011). Numa fase inicial, a amostra de plasma foi diluída numa

proporção de 1:20 em tampão A (tampão de equilíbrio e lavagem da coluna - Agilent Technologies) com adição de inibidores de proteases (Sigma P8340) (1:500), que impedem a degradação da amostra peptídica em análise, mantendo tudo em gelo para evitar o aumento da temperatura também nociva. A amostra diluída foi previamente filtrada para a sua purificação num tubo de filtro de rotação (0.22µm), depois centrifugada a 2320g, 2min a 4°C (em centrífuga *Centrifuge 5417R* - *Eppendorf*) com recolha total do filtrado limpo para utilização posterior. Em seguida efectuou-se o equilíbrio da coluna com 4ml de tampão A, utilizando uma seringa, permitindo a activação da matriz e remoção de ar retido na coluna, rejeitando o tampão utilizado. A coluna foi sujeita a centrifugação (100g, 1min), para que fosse eliminado o excesso de tampão. Procedeu-se então à aplicação da amostra diluída (200µL/ciclo) no topo da coluna, inserindo-a num tubo *ependorf* (F1) que, após centrifugação a 100g durante 1min, recolherá o primeiro filtrado. A coluna é incubada 5min, a temperatura ambiente, promovendo mais tempo de afinidade entre as proteínas e os anticorpos na matriz, após o qual se procederá a uma lavagem, com 400µL de tampão A e posterior recolha da fracção F1 após centrifugação (100g, 2min). Este passo é de novo repetido e, no final, todos os F1 (filtrados sem as 14 proteínas mais abundantes) são juntos num só tubo.

Procedeu-se à fase de eluição (descolamento das proteínas mais abundantes agarradas à matriz) fazendo passar 2.5ml de tampão B (Agilent Technologies) pela coluna, com auxílio de uma seringa, gotejando o eluído para outro tubo *ependorf* (E), que se armazenou a -80°C para posterior estudo.

Com este passo ficou então finalizado um ciclo e para iniciar a depleção de nova amostra tem de se proceder novamente ao equilíbrio da coluna. No final de todos os ciclos efectuados para todas as amostras em estudo a coluna foi guardada a 4°C, humedecida com tampão A e com as duas extremidades seladas.

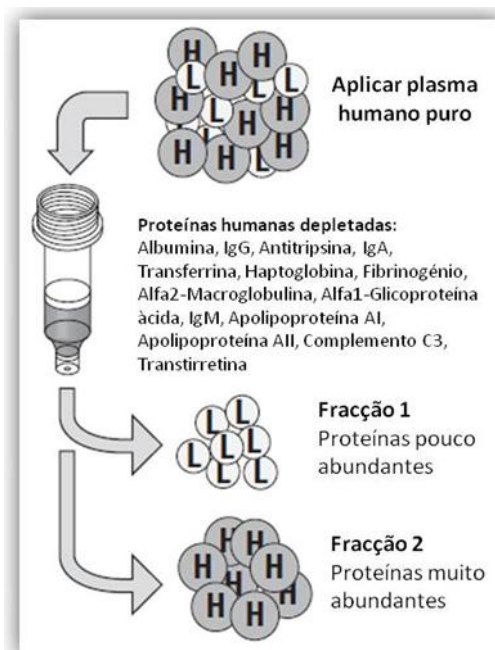


Fig. 10 Esquema simplificado do que ocorre no processo de depleção de plasma.
(Adaptado de Agilent Technologies, 2003)

Após depleção foi feita a extração de sais das amostras por um processo denominado *desalting* (dessalinização), uma vez que os tampões utilizados são ricos nestas substâncias que interferem com a posterior separação das proteínas.

O processo de *desalting* foi realizado conforme instruções do fabricante (*Amicon Ultra-4 centrifugal filter devices, Millipore*) com pequenas optimizações. O processo iniciou-se com a lavagem (activação) de uma membrana contida num tubo que funciona como filtro (com um *cut-off* de 3kDa, onde ficaram retidas as proteínas de interesse, sendo tudo o resto eliminado). Essa lavagem foi efectuada com 4ml de água purificada (tipo II) através de centrifugação (3300g, 30min, em centrífuga *Centrifuge 5810R - Eppendorf*). Este processo foi realizado três vezes. Após activação do filtro foram colocados 4ml de amostra (F1) proveniente da depleção por *MARS* (do inglês *Multiple Affinity Removal System*), para centrifugação a 3300g durante 45min, descartando o centrifugado. Como tínhamos mais amostra a dessalinizar, colocou-se a mesma e fez-se até 4ml com tampão de bicarbonato de amónio [25mM (m/v), pH: 8.4] centrifugando a 3300g, 45min. Descartou-se de novo o centrifugado e o processo é repetido por mais três vezes com tampão de bicarbonato de amónio [25mM (m/v), pH: 8.4], sendo o filtrado sempre descartado. No final, o que ficou retido no filtro recolheu-se com auxílio de uma micropipeta para um novo *eppendorf*, o filtro lavado por *up/down*, com 200µL de tampão bicarbonato de amónio [25mM (m/v), pH: 8.4] e este recolhido novamente para o *eppendorf*. O tubo foi identificado como plasma depletado pós-*desalting*. Retirou-se uma alíquota para quantificação e a amostra foi guardada a -80°C para posterior análise.

Verificou-se a eficácia da depleção por *1DE* (do inglês *one dimensional electrophoresis*), utilizando a amostra sem depleção a uma diluição 1:50, a fração F1 com as proteínas menos abundantes após *desalting*, e o eluído.

Quantificação de proteína

Para quantificar o teor de proteína presente na amostra, recorreu-se a um teste colorimétrico de quantificação de proteína total - *Thermo Scientific Pierce 660nm Protein Assay*, compatível com o uso de detergentes e substâncias redutoras. Este *kit* com *standards* pré-diluídos (de várias concentrações de albumina de soro de bovino - do inglês *bovine serum albumin - BSA*, de 125 a 2000µg/mL) e com um reagente de trabalho, foi adaptado para execução em microplaca. Neste processo as concentrações de proteína foram estimadas tendo em conta as absorvâncias dos *standards*/amostras obtidas a partir

da leitura a 660nm num espectrofotómetro (*Spectramax 340PC - Molecular Devices*). A leitura das absorvâncias dos *standards* nos eixos dos *y*, e a concentração de proteína correspondente no eixo dos *x*, permitiu-nos elaborar uma recta de calibração (absorvância/[proteína]) e obtermos a concentração de proteína das amostras em estudo.

Análise de proteínas por eletroforese bidimensional (2DE) em mini gel

Este processo foi utilizado para obtenção do proteoma por 2DE da amostra de plasma depletada. No Laboratório de Proteómica, onde desenvolvi o meu trabalho, era usual utilizar-se géis de médio ou grande formato para a separação e análise de proteínas em larga escala permitindo a separação reprodutível de milhares de proteínas simultaneamente. Por outro lado esta opção tem um grande custo em consumíveis, bem como um aumento do tempo de análise do gel. Por esta razão, para estudar o proteoma plasmático das minhas amostras foi feito um teste em mini-gel, com diferentes quantidades de proteína referentes à fracção F1 de depleção por MARS, utilizando tiras (*strips - immobilized pH gradient - IPG*) de pH 4-7, 7cm de comprimento (GE-Healthcare). Foram testadas 10µg, 20µg e 40µg de proteína plasmática. Segundo a literatura (Angelika Görg, 2004) para géis preparativos a partir de tiras de 7cm, deve usar-se uma quantidade equivalente a 40-60µg de proteína/*strip* e para géis analíticos $\geq 6\mu\text{g}$ de proteína/*strip* (2D-DIGE).

Por metodologia 2DE as proteínas foram inicialmente separadas por focagem isoelétrica (IEF do inglês *isoelectric focusing*), tendo em conta o seu ponto isoelétrico (pI) num gradiente de pH imobilizado numa tira. As tiras com intervalo de pH 4-7, de 7cm foram hidratadas *over-night* em 65µL de tampão IEF [7M (m/v) ureia, 2M (m/v) tiourea, 2% (m/v) CHAPS, 1,2% (v/v) deStreak e 0.5% (v/v) IPG 4-7 - anfólitos]). Após liofilização do volume das amostras correspondentes às quantidades de proteína plasmática acima referidas, procedeu-se à solubilização das mesmas com 60µL de tampão IEF (1h30 a 22°C com agitação) seguido de centrifugação durante 10 min, 22°C, 14000g, em centrífuga *Centrifuge 5417R - Eppendorf*, para eliminar partículas não solubilizadas. Em simultâneo, foi preparado o sistema de *Manifold (IEF-IPGphorUnit - GE HealthCare)* com aplicação das amostras através de *cup loading*, colocado no ânodo, mandatário para proteínas básicas mais difíceis de focar. As tiras de 7cm, com um volume total de 125µL aconselhado para este tamanho (Angelika Görg, 2004) foram focadas num programa de focagem isoelétrica

testado que incluiu: etapa1 - 200V, 1h *step n`hold*; etapa2 - 500V, 45min *step n`hold*; etapa3 - 1000V, 45min *step n`hold*; etapa4 - 6000V, 45min *gradient*; etapa5 - 8000V, 30min *step n`hold*. Após a corrida, a tira foi colocada a -80°C e no dia seguinte exposta à temperatura ambiente por 10min. Foi feito o equilíbrio 15min com DTT (ditiotreitól) a 1% (m/v) dissolvido em tampão de equilíbrio [6M (m/v) ureia, 75mM (m/v) tris-HCl pH 8.8, 29.3% (v/v) glicerol e 2% (m/v) SDS], para quebra de pontes dissulfido das proteínas, e de seguida o bloqueio 15min, com iodoacetamida a 4% (m/v), alquilante que evita a reoxidação das mesmas pontes, dissolvida no mesmo tampão com adição de 0.002% (m/v) de azul de bromofenol. Procedeu-se à separação das proteínas de acordo com a massa molecular (segunda dimensão), em géis de gradiente pré-preparados (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris ZOOMTM Gel de 1mm/IPG - NOVEX*) em tinas *XCell Sure LockTM NOVEX Mini-Cell - Invitrogen*. As tiras foram colocadas no topo do gel, ajustadas com auxílio de uma espátula permitindo a sua junção total ao gel e a remoção de qualquer bolha de ar existente. Depois de ter sido introduzido o marcador de massas moleculares (*Novex Sharp Proteins Standard - Invitrogen*) (5 $\mu\text{L}/\text{lane}$) foi inserida sobre as tiras uma solução selante constituída por 0.5% de agarose [25mM (m/v) tris base, 192mM (m/v) glicina, 0.1% (m/v) SDS, 0.5% (m/v) agarose, 0.002% (m/v) azul de bromofenol], aguardando-se até solidificar. A eletroforese, denominada *SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)*, que tal como o nome indica usa o SDS como detergente aniónico no tampão de eletroforese numa diluição de 1:20 (*NuPAGE MES SDS Running Buffer [20x] - NOVEX*), começou com uma intensidade de corrente de 50V durante 5min deixando as proteínas entrarem gentilmente no gel, alterando-se seguidamente para 200V durante aproximadamente 50min.

As proteínas dos géis, finda a corrida foram fixadas com uma solução [40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético, 50% água tipo II (destilada/filtrada/deionizada)] em agitação lenta, durante $\approx 1\text{h}$, para evitar a sua difusão, e posteriormente os géis foram corados com corante Flamingo (Biorad) (limite de sensibilidade - 0.5-2ng) e revelados num transiluminador a 300nm. O gel com maior quantidade de proteína (40 μg) foi ainda corado com azul brilhante de *coomassie* coloidal com um limite de detecção 1-100ng/spot (SigmaB0770) até ao dia seguinte. Após lavagem com água tipo II foi digitalizado para obtenção de imagem, utilizando um *scanner* da *Amersham Umax PowerLookIII*.

Avaliação do estado redox/oligomérico da PRX 2: estudo em plasma

A partir do estudo em eritrócitos, cuja interpretação nos questionou o comportamento e detecção ao nível do plasma da Prx2, foram utilizados anticorpos específicos (Prx2 e PrxSO_{2/3}) para a pesquisa das formas oxidadas e hiperoxidadas, numa análise comparativa entre cada categoria a estudar (controlo /doença /tratamento).

• Preparação da amostra:

① Solução de stock - Diluição: 1:10

- 20µL de amostra - plasma não depletado
- 10µL NEM em etanol a partir de solução stock 2M (m/v) [100mM (v/v) final]
- 2µL de inibidores de proteases - (10µL/1000µL)

Perfazer com soro fisiológico (NaCl a 0,9%) para **Volume final: 200µL**

② A partir de solução stock 1 - Diluição: 1:100

- 45µL H₂O tipo II
- 5µL amostra 1:10

Volume final: 50µL
Para quantificação

Procedeu-se, inicialmente, à optimização da quantidade de amostra a inserir nos géis para promover uma correcta visualização, impedindo a saturação do *load/lane*. Testaram-se três quantidades de proteína total de plasma por eletroforese 1DE: 10µg /25µg /40µg, a partir de uma amostra de plasma (1:10) escolhida ao acaso e, após a sua quantificação. Utilizando gel pré-feito (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel de 1.0mm/15 poços - NOVEX*), em tampão de eletroforese diluído 1:20 (*NuPAGE MES SDS Running Buffer [20x] - NOVEX*) em tinas *XCell Sure Lock™ NOVEX Mini-Cell - Invitrogen*, em condições reduzidas, (β -mercaptoetanol a 10% (v/v) final), e antioxidante para evitar reoxidação, segundo procedimento do fabricante. A corrida foi feita a 150V durante \approx 50 min (resultado não mostrado).

A partir da solução *stock* (1) para cada *pool*/amostra individual de cada categoria/condição, e após quantificação, o volume de amostra foi ajustado para 25µg de proteína plasmática (quantidade ideal evidenciada pela optimização anterior). Por metodologia 1DE SDS-PAGE (eletroforese unidimensional), em gel de poliácridamida (separação por massa molecular), com géis pré-feitos (*NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel de 1.0mm/15 poços - NOVEX*), em tampão de eletroforese diluído 1:20 (*NuPAGE MES SDS Running Buffer [20x] - NOVEX*) em tinas *XCell Sure Lock™ NOVEX Mini-Cell - Invitrogen*,

sob condições não reduzidas, para estudo das formas oligoméricas da proteína (Prx2). As corridas foram feitas a 150V durante ≈50 min. Paralelamente, para interpretação e análise comparativa, foram também testadas outras corridas por electroforese 1DE, com redução por β-mercaptoetanol, numa concentração final de 10% (v/v), com adição de antioxidante, segundo procedimento do fabricante. Foi utilizado o marcador de massa molecular *Magic Mark™ XP Western Protein Standard - Novex* (3μl/lane), por se tratar de uma técnica de WB.

A transferência das proteínas do gel para membranas, utiliza um tampão de transferência (TP) diferente do tampão de corrida de electroforese. Este é denominado TP completo (10% de TP incompleto 10x, 20% metanol, para 1L água tipo II) feito a partir de uma solução de TP incompleto 10x [25 mM (m/v) tris base e 192 mM (m/v) glicina para 1L de água tipo II]. As membranas escolhidas, de fluoreto de polivinilideno (*Immobilon-P Membrane, PVDF, 0.45μm, 26.5cmx3.75m roll - Millipore, Fisher Scientific*), são previamente incubadas em 100% (v/v) metanol, 15min e passadas por água tipo II para posterior incubação de 10min em TP completo. A transferência foi realizada num aparelho *TE Series Transphor Electrophoresis UNIT - Hoefer Scientific Instruments* ou num *TE 62 Tank Transfer UNIT - Amersham Biosciences*, durante 1h30min a 400mA.

As membranas foram coradas durante 5min em solução corante *Ponceau S* [0,1% (v/v) em ácido acético 5% (v/v) a partir de um stock de 1% (m/v) de Ponceau S em água], descorando de seguida o excesso com ácido acético 5% (v/v). As imagens foram obtidas por *scanner* das membranas ligeiramente descoradas para contraste, e posteriormente descoradas totalmente em tampão fosfato salino [*PBS 1x (v/v)*] com 0.1% (v/v) de *tween20*.

As membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio [5% (m/v) leite magro em pó em *PBST*], durante 1h sob agitação média, para prevenir ligações inespecíficas de anticorpos, pois a membrana possui grande afinidade a proteínas, logo a anticorpos. Após bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (Prx2 - *Anti-Peroxiredoxin 2 antibody ab15572 - abcam* ou PrxSO_{2/3} - *Anti-Peroxiredoxin-SO3 antibody ab16830 - abcam*) diluído em tampão de bloqueio (1:10000 e 1:2000 respectivamente), sob agitação lenta, a 4°C. Após ciclos de lavagem das membranas em *PBST* (2 breves, 1-15 minutos, 3-5 minutos), para que resíduos do anticorpo primário fossem removidos, foi efectuada a incubação com o anticorpo secundário conjugado (*ECL™ Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody - GE Healthcare*

UK), diluído também em tampão de bloqueio (1:10000 e 1:7500, para a Prx2 e PrxSO_{2/3} respectivamente) durante 1h em agitação lenta e à temperatura ambiente. Realizou-se um novo ciclo de lavagens, sendo a última em PBS e posterior detecção por quimioluminescência, utilizando o kit *ECLTM Western Blotting Detection Reagents - AmershamTM - GE Healthcare*. Este tipo de detecção, de anticorpos secundários marcados, que reagem com os respectivos anticorpos primários, é amplamente usada pela sua facilidade de manuseio e boa reprodutibilidade de resultados. Após incubação da membrana com a solução de detecção contida no kit, a revelação é obtida em chapas de raio-x, em contacto com a membrana incubada em tempos otimizados para esta proteína (≈15min), num processador de revelação (*Medical X-Ray Processor - Kodak*). Todo este processo está simplificado esquematizado na figura 11.

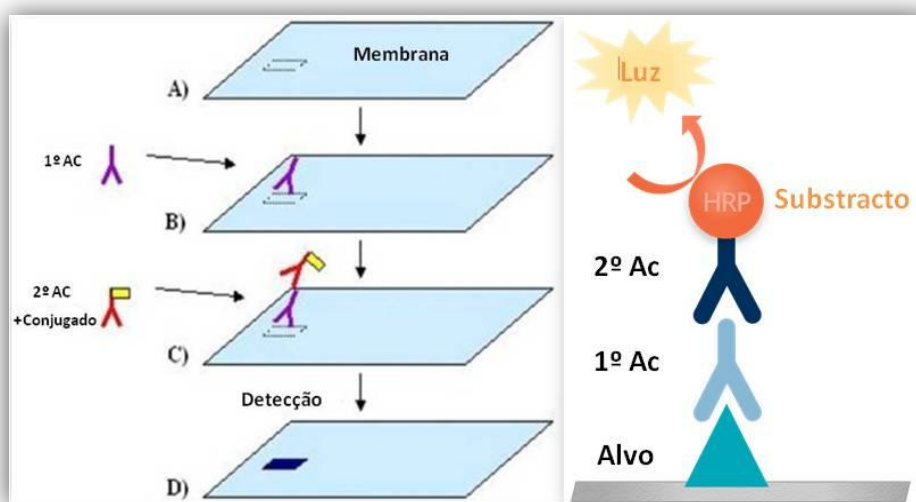


Fig. 11 Esquema simplificado das reacções de incubação primária e secundária com posterior processo de detecção.
(adaptado de http://www.licor.com/bio/applications/chemiluminescent_western_blot/)

Análise quantitativa/densitometria por *ImageJ*

A imagem das chapas impressionadas foi registada por *scanner* (referência atrás mencionada, em formato *TIFF - 16bits*), e a análise das imagens feita por densitometria utilizando um *software* de estudo de imagem, denominado *ImageJ*. Este *software* permite a avaliação da abundância de proteína, quantificando-a em termos de densidade óptica. Usou-se a banda da albumina como padrão de normalização visto esta proteína, manter o seu perfil e intensidade, pois a quantidade de proteína/*lane* era sobreponível para todas as amostras.

A selecção de cada área permitiu a obtenção de um gráfico com picos sendo os dados processados em *excel*, onde a razão entre o valor pertencente à banda em estudo e à banda da albumina do mesmo *load* no *ponceau* foi calculada, obtendo-se valores normalizados. O cálculo da média e desvio padrão foram utilizados para elaboração gráfica, fornecendo resultados de densidades da proteína em estudo referentes a cada uma das categorias (roncadores, SAOS, CPAP). A verificação de diferenças significativas ($p \leq 0.05$) foi promovida por análise estatística (*t-test*).

Resultados e discussão

Análise de amostras de plasma por 2D-PAGE em mini-géis

Teste à eficácia da depleção por meio de eletroforese unidimensional (1DE SDS-PAGE) da amostra:

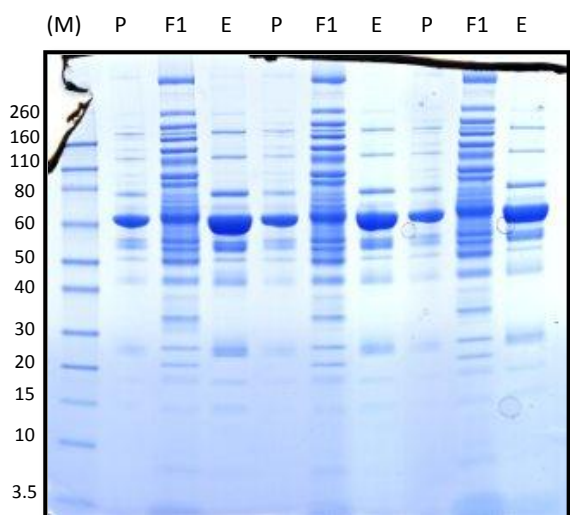


Fig. 12 Teste comparativo em triplicado de 3 aliquotas de plasma com 10 μ g de proteína. (P) plasma puro diluído 1:50; (F1) porção F1 e (E) porção eluída. (M) Marcador de massa molecular (kDa).

Este procedimento permitiu detectar as diferenças quantitativas nos perfis de cada variedade de plasma em estudo (plasma puro diluído 1:50 /porção F1 (com proteínas pouco abundantes /porção eluída (com proteínas muito abundantes). Pode observar-se na figura 12 a ausência de múltiplas bandas na *lane* correspondente ao plasma puro (P) em que a presença de albumina mascara as proteínas pouco abundantes observadas em F1. Na

lane (F1) está demonstrado o desenho proteico da mesma amostra de plasma após depleção e *desalting*. A *lane* (E) mostra a porção eluída, constituída pelas 14 proteínas mais abundantes no plasma.

Podemos por aqui concluir que o método de depleção das proteínas mais abundantes enriquece, quantitativamente e significativamente, a amostra de proteínas menos abundantes potenciais candidatas a biomarcadores.

2D-PAGE

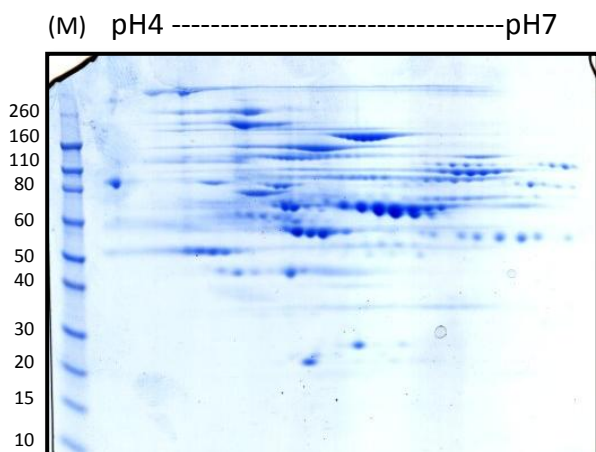


Fig. 13 Eletroforese em gel bidimensional de uma amostra de plasma depletada das 14 proteínas mais abundantes. Amostra - 40µg de proteína plasmática. IPG 4-7 em tira de 7cm. Gel corado com azul brilhante de *coomassie* coloidal. (M) Marcador de massa molecular (kDa).

O teste de otimização realizado com três diferentes quantidades de proteína plasmática total (10µg, 20µg e 40µg) foi realizado para objectivo futuro de interpretação de proteomas obtidos por diferentes métodos de visualização de proteínas em gel. Após coloração dos três géis com corante fluorescente Flamingo e revelação do seu padrão num transiluminador

(300nm) (imagem não mostrada), foi possível inferir que a quantidade de 10µg era ideal para futura marcação das proteínas com fluoróforos antes da electroforese bidimensional (2D-DIGE) em minigéis, permitindo a rentabilização da quantidade total de amostra. Por outro lado, a coloração com corante azul brilhante de *coomassie* coloidal, no gel bidimensional com 40µg (fig.13), mostrou ser a concentração mínima ideal para estudo de géis preparativos. Um dos objectivos será também testar a metodologia 2D-DIGE em mini-géis, com tiras de pH imobilizado 3-10 (*non linear*) (GE-Healthcare), para a identificação de proteínas plasmáticas associadas aos diferentes estadios de gravidade da SAOS e/ou à resposta ao tratamento com CPAP.

Estado redox/oligomérico da Prx2 plasmática na SAOS

Resultados de 2D-DIGE, obtidos previamente pelo laboratório indicavam que formas ácidas da proteína Prx2 estavam elevadas em amostras de eritrócitos de doentes SAOS, colectados de manhã. Estas formas ácidas da Prx2 estão descritas como formas oxidadas/hiperoxidadas da proteína em resposta ou em consequência a um *stress* oxidativo (Feliciano *et al.* 2015 {artigo em preparação}, Vaz *et al.* 2015). De facto, análises de extractos de eritrócitos por WB em SDS-PAGE não-reduzido, com anticorpos para a Prx2 ou para as suas formas hiperoxidadas (PrxSO_{2/3}), corroboraram com estes resultados. Ainda, após seis meses de tratamento com CPAP, observou-se uma

diminuição das formas Prx2 oxidadas nos eritrócitos destes doentes (Feliciano *et al.* {artigo em preparação}; Vaz *et al.* 2015). Com o objectivo de complementar estes dados e avaliar se formas oxidadas da Prx2 estariam também elevadas no plasma sanguíneo destes doentes e se estas formas diminuiriam também com o tratamento *CPAP*, analisámos por *WB* com anticorpos específicos para a Prx2 e PrxSO_{2/3}, plasma de doentes SAOS antes e após *CPAP* e de doentes roncadores simples, como controlo.

Contudo, e dada a complexidade do proteoma do plasma, foi necessário realizar algumas optimizações do método para que os resultados obtidos fossem consistentes e credíveis.

- Optimização em *pools* de amostras

Numa primeira abordagem, as amostras de plasma dos doentes em estudo, constituídas numa única *pool* de amostra por grupo de doentes (preparação de amostras esquematizada na fig.8), foram analisadas directamente (ou seja, sem passar por processo de depleção das proteínas mais abundantes) na presença de um alquilante (+NEM) por *SDS-PAGE* reduzido (+βm) seguido de *WB* com anticorpo específico para a Prx2. O *cohort* de doentes utilizado neste estudo está apresentado na tabela em anexo (anexo 1).

+ NEM + βm

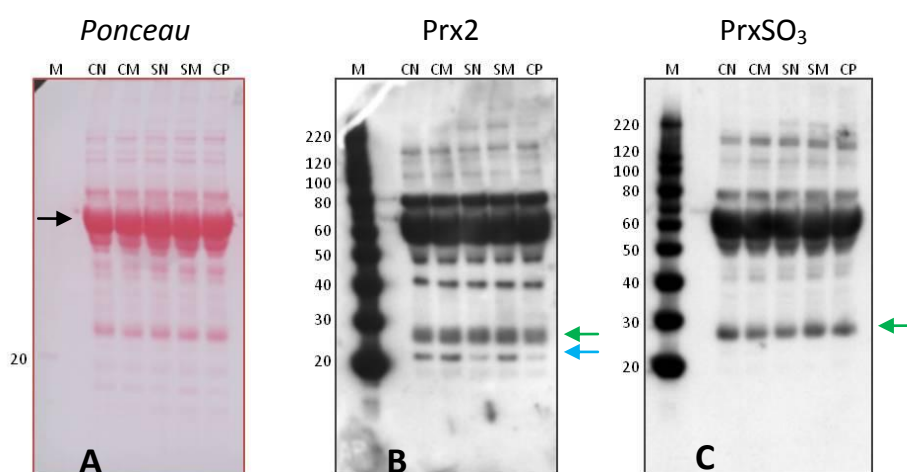


Fig. 14 Resultado da análise por *WB* em géis *SDS-PAGE* reduzidos, para as proteínas Prx2 e suas formas hiperoxidadas (PrxSO_{2/3}) em *pools* de amostras de plasma. Utilização de 25µg de proteína.

A: membrana com proteína total corada com *Ponceau S*; B: membrana com a expressão de Prx2; C: membrana com a expressão de PrxSO_{2/3}.

(CN) controlo noite; (CM) controlo manhã; (SN) SAOS grave noite; (SM) SAOS grave manhã; (CP) *CPAP*. (M) marcador de massa molecular (kDa).

→ Albumina

→ Monómero de alta massa molecular (*High molecular weight - HMW*) - forma hiperoxidada

→ Monómero de baixa massa molecular (*Low molecular weight - LMW*)

Na figura 14 A, podemos observar que de facto a proteína mais abundante do plasma no filtro *PVDF* corado com *Ponceau* é a albumina ($\approx 66\text{kDa}$), de acordo com (Dabkowska *et al.* 2013). Ao reagir este filtro com o anticorpo para a Prx2, identificámos, como esperado, as suas formas monoméricas ($\approx 20/25\text{kDa}$) (fig.14B, setas verde e azul), tal como descrito por Mullen *et al.* 2015 (fig.15). Contudo, e apesar de termos utilizado um agente redutor na quantidade recomendada, formas diméricas da Prx2 ($\approx 40\text{kDa}$) foram também identificadas. Mullen e seus colaboradores, não observaram formas diméricas da Prx2 ($\approx 40\text{kDa}$) no plasma (fig.15), provavelmente por utilizar diferentes concentrações/referência do agente redutor e/ou do anticorpo para a Prx2. Ao contrário destes autores, observámos ainda reacções inespecíficas na zona da albumina (fig.14B). Experimentámos aumentar (2x) a diluição do anticorpo para diminuir esta inespecificidade. Contudo, as reacções inespecíficas não só não diminuíram, como também, deixámos de visualizar as formas monoméricas da Prx2 (resultado não mostrado).

Em todas as formas oligoméricas da Prx2, incluindo as monoméricas, existem formas hiperoxidadas ($-\text{SO}_{2/3}$). Para avaliar estas formas hiperoxidadas no plasma dos vários grupos de doentes em estudo, procedeu-se à sua análise, pela mesma técnica, utilizando anticorpo específico para a PrxSO_{2/3}. O resultado mostrou que apenas uma das bandas monoméricas da Prx2 foi reconhecida por este anticorpo como estando hiperoxidada (fig.14C, seta verde). Tal como observado para o anticorpo anti-Prx2, o anticorpo anti-PrxSO_{2/3} parece reagir de forma inespecífica para a região da albumina. A utilização do anticorpo mais diluído também não melhorou esta inespecificidade.

Embora não nos tenha sido possível comparar estes nossos resultados com a literatura, dada os escassos ou inexistentes estudos de *WB* para a PrxSO_{2/3} em amostras de plasma humano, decidimos considerar como válido estes nossos resultados e prosseguir com o nosso estudo.

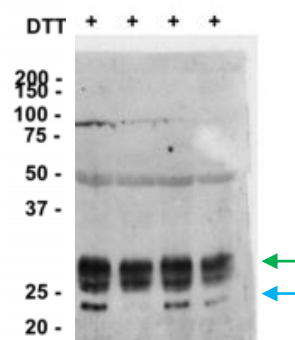


Fig. 15 Expressão da Prx2 em plasma humano de dadores saudáveis, em condições redutoras (ditiotreitól - DTT).

→ Monómero de alta massa molecular (*HMW*) - forma hiperoxidada
 → Monómero de baixa massa molecular (*LMW*)

(adaptado de Mullen *et al.* 2015)

Para o estudo subsequente do estado *redox*-oligomérico da Prx2 em amostras individuais de doentes (ver abaixo), decidimos pela metodologia *WB*, inicialmente otimizada para ambos os anticorpos anti-Prx2 e anti-PrxSO_{2/3}, considerar para a quantificação relativa, apenas as bandas com reações específicas para estes anticorpos. O processo foi elaborado nas condições de presença de alquilante (+NEM) por *SDS-PAGE* reduzido (+βm) e não-reduzido (-βm).

- Estudo em amostras individuais

O *cohort* de doentes utilizado neste estudo é apresentado na tabela em anexo (anexo 2).

1) + NEM / + βm

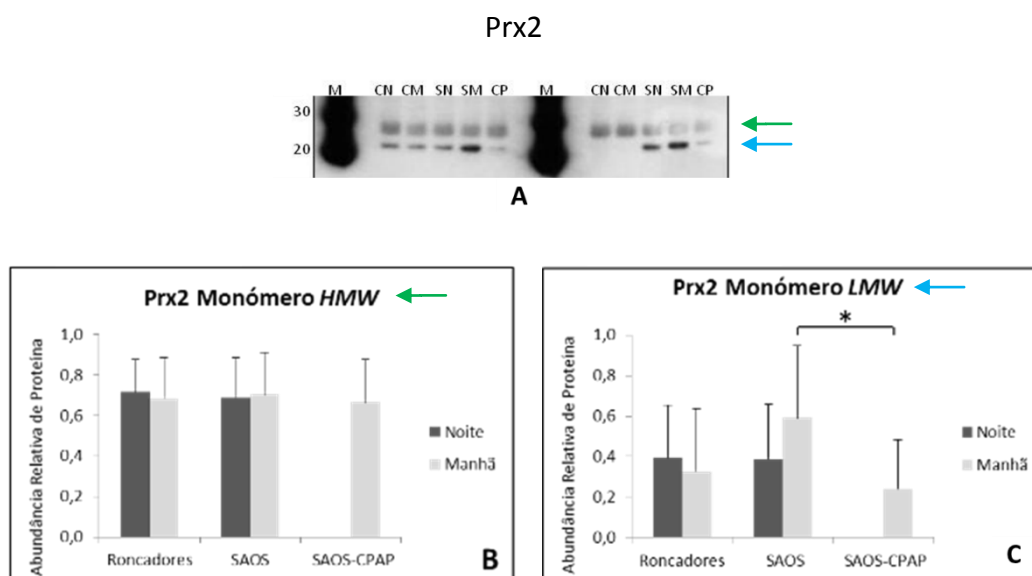


Fig. 16 Resultado da análise por *WB* e densitometria de géis *SDS-PAGE* reduzidos, para as formas monoméricas da Prx2 em amostras individuais de plasma. Utilização de 25µg de proteína.

A: zona da membrana com expressão monomérica de Prx2; B: densitometria relativa ao monómero de alta massa molecular da Prx2; C: Densitometria relativa ao monómero de baixa massa molecular da Prx2.

*p ≤ 0.05

CN) controlo noite; (CM) controlo manhã; (SN) SAOS grave noite; (SM) SAOS grave manhã; (CP) CPAP. (M) marcador de massa molecular (kDa).

→ Monómero de alta massa molecular (HMW) - forma hiperoxidada

→ Monómero de baixa massa molecular (LMW)

A figura 16 A mostra como ilustração, as imagens obtidas para amostras de plasma de quatro dos indivíduos após análise por *WB* em géis *SDS-PAGE* reduzidos, para as proteínas Prx2. A quantificação relativa para as formas monoméricas da Prx2 detectadas, uma de baixa massa molecular (LMW) e outra de alta massa molecular (HMW) (fig.16A,

setas azul e verde, respectivamente) indicaram não haver diferenças significativas para as formas monoméricas *HMW* da Prx2 entre os diferentes grupos/condições em estudo (fig.16B). Contudo, uma tendência para o aumento das formas *LMW* monoméricas da Prx2, embora não significativa, foi observada em amostras de plasma ‘manhã’ de doentes com SAOS quando comparadas com as amostras de plasma ‘manhã’ de doentes controlo (fig.16C). Interessante foi observar que após seis meses de tratamento *CPAP*, os níveis destas formas *LMW* monoméricas da Prx2 estavam significativamente diminuídas nos doentes. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada para as formas *LMW* monoméricas da Prx2 em plasma ‘noite’ de SAOS comparadas com controlos.

A análise por *WB* em géis reduzidos com anticorpo PrxSO_{2/3} revelou que apenas as formas *HMW* monoméricas da Prx2 e não as de *LMW* reagem com este anticorpo (fig.17A), sugerindo haver outros mecanismos ou modificações pós-traducionais (por exemplo, a glutationilação como referido por Salzano *et al.* 2014) envolvidos nas diferenças observadas nas formas monoméricas *LMW* identificadas (Prx2), entre doentes e controlo. Quanto à hiperoxidação identificada nas formas monoméricas *HMW*, esta estava significativamente aumentada ($p \leq 0,05$) nas amostras de plasma ‘noite’ de doentes com SAOS

em comparação com doentes controlos. Nas amostras ‘manhã’ de doentes SAOS observou-se uma tendência, embora não significativa, para o aumento da hiperoxidação das formas monoméricas *HMW* da Prx2. Seis meses de tratamento *CPAP* levou à redução significativa ($p \leq 0,05$) desta hiperoxidação das formas *HMW* da Prx2 presentes no plasma ‘manhã’ (fig.17B).

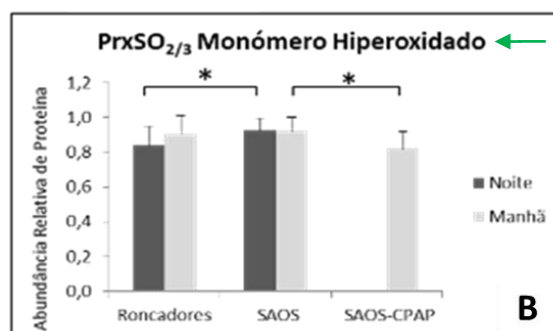
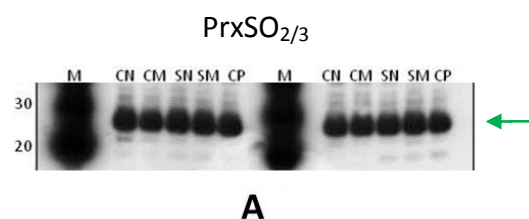


Fig. 17 Resultado da análise por *WB* e densitometria de géis *SDS-PAGE* reduzidos, para as formas monoméricas hiperoxidadas da Prx2 (PrxSO_{2/3}) em amostras individuais de plasma. Utilização de 25µg de proteína.

A: zona da membrana com expressão monomérica da forma hiperoxidada da Prx2 (PrxSO_{2/3}); B: densitometria relativa ao monómero hiperoxidado da Prx2 (PrxSO_{2/3}).

* $p \leq 0,05$

CN controlo noite; (CM) controlo manhã; (SN) SAOS grave noite; (SM) SAOS grave manhã; (CP) *CPAP*. (M) marcador de massa molecular (kDa).

→ Monómero de alta massa molecular (*HMW*) - forma hiperoxidada

2) + NEM / - β m

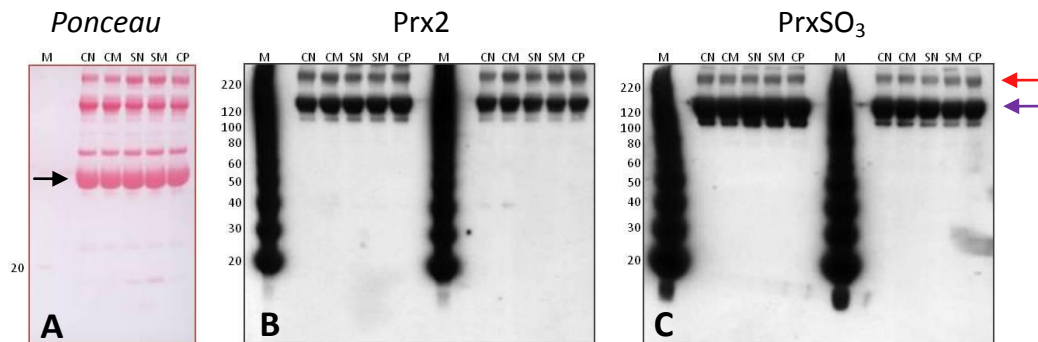


Fig. 18 Resultado da análise por WB e densitometria de géis *SDS-PAGE* não-reduzidos, para as formas oligoméricas da Prx2 e suas formas hiperoxidadas ($\text{PrxSO}_{2/3}$) em amostras individuais de plasma. Utilização de 25 μ g de proteína.

A: membrana com proteína total corada com Ponceau S; B: membrana com a expressão de Prx2; C: membrana com a expressão das formas hiperoxidadas da Prx2 ($\text{PrxSO}_{2/3}$).

(CN) controlo noite; (CM) controlo manhã; (SN) SAOS grave noite; (SM) SAOS grave manhã; (CP) CPAP. (M) marcador de massa molecular (kDa).

- Albumina
- Multímero de alta massa molecular (HMM)
- Multímero

Os resultados das análises das amostras por *SDS-PAGE* não-reduzido, seguido de WB com anticorpo para a Prx2 ou $\text{PrxSO}_{2/3}$, para avaliação do estado *redox* nas formas oligoméricas da Prx2, estão mostrados nas figuras 18B e 18C, respectivamente. Ambos os anticorpos reagiram para formas oligoméricas da Prx2 de alta massa molecular (multímeros) por volta de 200kDa a 250kDa. Nenhuma forma dimérica da Prx2 foi detectada com estes anticorpos nas nossas condições. Comparando o resultado para o anticorpo Prx2 (fig.18B) com o obtido por Mullen e sua equipa, também em condições não-reduzidas (fig.19), verificamos haver consideráveis semelhanças no padrão do *immunoblot* obtido, com excepção destes autores terem identificado formas diméricas da Prx2. Esta diferença nos resultados pode estar associada a diferenças na metodologia/anticorpo utilizado.

Procedendo à análise por densitometria das principais bandas imunoreactivas para estes anticorpos (200kDa e 250kDa), verificámos não haver diferenças estatisticamente significativas entre os grupos condições analisadas (fig.20A, B, C e D), provavelmente devido a detecção pelo *ECL* estar ao nível da saturação

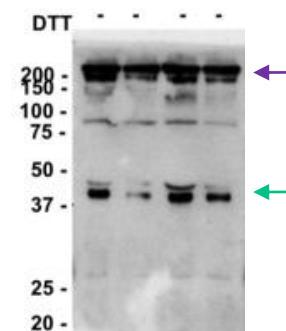


Fig. 19 Expressão da Prx2 em plasma humano de dadores saudáveis em condições redutoras (ditiotreitól - DTT).

- Multímero
 - Dímero
- (adaptado de Mullen *et al.* 2015)

da reacção, o que impede uma quantificação correcta dos dados. Novos ensaios são, portanto, ainda necessários para concluir estes resultados.

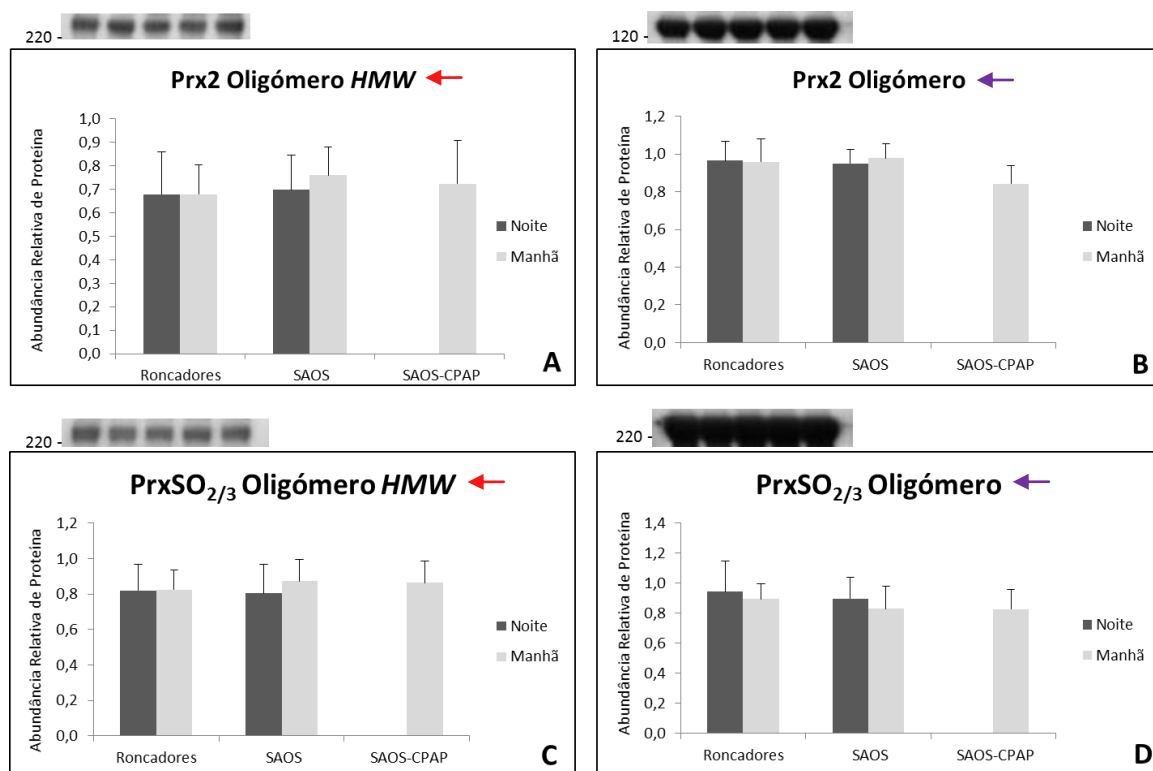


Fig. 20 Resultados da densitometria de WB a partir de géis SDS-PAGE não-reduzidos, para as formas oligoméricas da Prx2 e suas formas hiperoxidadas (PrxSO_{2/3}) em amostras individuais de plasma.

A: Densitometria relativa ao múltímero de alta massa molecular da Prx2. B: Densitometria relativa ao múltímero da Prx2. C: Densitometria relativa ao múltímero de alta massa molecular das formas hiperoxidadas da Prx2 (PrxSO_{2/3}). D: Densitometria relativa ao múltímero das formas hiperoxidadas da Prx2 (PrxSO_{2/3}).

Estudos recentes mostraram que, sob condições de *stress*/inflamação, a Prx2 oxidada é secretada para actuar como um mediador *redox*-dependente da inflamação, activando a produção de citocinas inflamatórias (Mullen *et al.* 2015; Salzano *et al.* 2014). A Prx2 tem sido, por esta razão considerada como um clássico sinalizador inflamatório de perigo (Salzano *et al.* 2014).

A análise de exomas purificados a partir do plasma de indivíduos saudáveis mostrou que a Prx2 secretada se encontra maioritariamente associada a estes organelos (fig.21A) (Mullen *et al.* 2015). Contudo, o estudo da Prx2 presente no plasma não necessita de purificação prévia de exomas, visto que a análise do plasma total por WB apresentou resultados semelhantes aos obtidos com essa purificação (fig.21B).

Tal como Mullen *et al.* 2015, não observámos no plasma formas monoméricas da Prx2 em condições de não-redução (fig.18A), que seriam provenientes de oligómeros reduzidos ou totalmente hiperoxidados, após a desnaturação pelo SDS (ver formas demonstradas na fig.6). As formas monoméricas da Prx2 detectadas após redução e identificadas pelo anticorpo PrxSO_{2/3} (fig.17A, seta verde), significa que advém de formas oligoméricas (dissulfídicas)

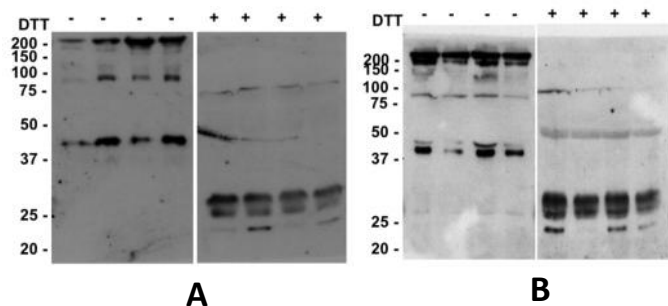


Fig. 21 Expressão da Prx2 em exosomas purificados, extraídos a partir do plasma (A) e em plasma humano (B), de dadores saudáveis. Representação do resultado da expressão na ausência (-)/presença (+) de agente redutor (ditiotreitól - DTT). (adaptado de Mullen *et al.* 2015)

hiperoxidadas, pela ação do agente redutor (β m) (ver formas demonstradas na fig.6). As formas monoméricas da Prx2 não identificadas pelo anticorpo PrxSO_{2/3} (fig.16A, seta azul), significa que advém de formas oligoméricas (dissulfídicas) oxidadas, por exemplo pela glutationilação (Salzano *et al.* 2014). Estes resultados mostraram haver, de facto, poucas ou nenhuma formas reduzidas da Prx2, ou seja, com função peroxidática no plasma de doentes ou controlos, o que corrobora com os dados de Mullen *et al.* 2015 e Salzano *et al.* 2014, que mostraram que a Prx2 secretada se encontra essencialmente na forma oxidada, ou seja inactiva da sua função peroxidática.

Contudo, mais estudos de optimização da técnica de WB terão de ser realizados para verificar se os níveis da Prx2 presentes no plasma, nos doentes SAOS, estão aumentados devido a estados inflamatórios induzidos pela SAOS e, ainda, se estes níveis diminuem após tratamento CPAP, como parece estar a acontecer nos nossos resultados, embora sem significado estatístico.

Conclusão

A pesquisa de biomarcadores é uma via promissora na compreensão dos mecanismos moleculares associados a estados patológicos e, um instrumento útil no diagnóstico, prognóstico e monitorização terapêutica de doenças, como a SAOS.

A procura de possíveis biomarcadores plasmáticos, associados à SAOS, tendo em conta a investigação nos eritrócitos, foi, portanto, o principal objectivo deste estudo. Os resultados obtidos, embora preliminares, mostraram-se interessantes e motivadores para continuação de uma investigação mais aprofundada.

As optimizações em mini-gel por eletroforese bidimensional permitiram confirmar parâmetros essenciais para estudos futuros de avaliação do perfil proteómico do plasma sanguíneo por técnicas de proteómica (2DE e 2D-DIGE) e posterior identificação proteica por espectrometria de massa.

O estudo do estado *redox*/oligomérico da Prx2 plasmática mostrou também resultados relevantes. Apesar de não nos ter sido possível quantificar os níveis de formas multiméricas oxidadas/hiperoxidadas da Prx2 por WB em SDS-PAGE sem redução ($- \beta m$), devido à grande saturação das reacções, verificámos, contudo, por WB em SDS-PAGE reduzido ($+ \beta m$), que formas monoméricas hiperoxidadas da Prx2 estavam aumentadas nos doentes com SAOS e que após seis meses de tratamento CPAP, esta hiperoxidação diminuiu. Uma vez que os níveis de Prx2 no plasma, estão maioritariamente oxidados e associados a estados inflamatórios/*stress* oxidativo, estes resultados confirmam que a SAOS é uma doença associada a estes estados e que o CPAP parece ter um efeito benéfico na sua diminuição.

Mais estudos são ainda necessárias para confirmar estes resultados e validar a Prx2 como potencial biomarcador da SAOS e de monitorização dos efeitos terapêuticos do CPAP.

Referências Bibliográficas

- Al Lawati NM, Patel SR, Ayas NT. Epidemiology, Risk Factors, and Consequences of Obstructive Sleep Apnea and Short Sleep Duration. *Prog Cardiovasc Dis* 2009;51:285-93.
- Anderson NL, Anderson NG. The human proteome. History, Character and Diagnostic Prospects. *Mol Cell Proteomic* 2002;1:845-67.
- Angelika Görg. 2-D Eletrophoresis Principles and Methods. GE Healthcare, 2004.
- Arnardottir ES, Mackiewicz M, Gislason T, *et al.* Molecular Signatures of Obstructive Sleep Apnea in Adults: A Review and Perspective. *Sleep* 2009;32:447-70.
- Badran M, Ayas N, Laher I. Cardiovascular complications of sleep apnea: role of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2014;Article ID 985258:10 pages.
- Badran M, Ayas N, Laher I. Insights into obstructive sleep apnea research. *Sleep Med* 2014; 15:485-95.
- Barranco-Medina S, Lázaro JJ, Dietz KJ. The oligomeric conformation of peroxiredoxinas links redox state to function. *FEBS Lett* 2009;583:1809-16.
- Cho C, Yoon HJ, Kim JY, *et al.* Circadian rhythm of hyperoxidized peroxiredoxin II is determined by hemoglobina autoxidation and the 20S proteasome in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12043-8.
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Measuring the redox state of celular peroxiredoxinas by immunoblotting. *Methods Enzymol* 2010;474:51-66.
- Dabkowska M, Adamczyk Z, Kujda M. Mechanism of HSA adsorption on mica determined by streaming potential, AFM and XPS measurements. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;101:442-9.
- Dayon L, Kussmann M. Proteomics of human plasma: a critical comparision os analytical workflows in terms of effort, throughput and outcome. *EuPA Open Proteomics* 2013;1:8-16.
- Eldahdouh SS, El-Habashy MM, ELbahy MS. Effect of CPAP on depressive symptoms in OSA. *Egypt J Chest Dis Tuberc* 2014;63:389-93.
- Feliciano A, Bozanic V, Torres VM, *et al.* Proteomics of red blood cell from patients with obstructive sleep apnea. HUPO Madrid e European Respiratory Society Annual Congress, Munich. 2014
- Feliciano A, Torres VM, Matthiesen R, *et al.* Overview of proteomics studies in obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2015;16:437-45.
- Feliciano A, Vaz F, Torres VM, *et al.* Day-night variation in obstructive sleep apnea erythrocyte proteome (artigo em preparação)
- Hoyle NP, O'Neill JS. Oxidation-reduction cycles of peroxiredoxin proteins and nontranscriptional aspects of timekeeping. *Biochemistry* 2015;54:184-93.
- Ishida YI, Takikawa M, Suzuki T, *et al.* Irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin 2 is caused by *tert*-butyl hydroperoxide in human red blood cells. *FEBS Open Bio* 2014;4:848-52.

- Kylastra WA, Justine A, Aaronson JA, *et al.* Neuropsychological functioning after CPAP treatment in obstructive sleep apnea: A meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2013;17:341-7.
- Lam JCM, Sharma SK, Lam B. Obstructive sleep apnoea: Definitions, epidemiology & natural history. *Indian J Med Res* 2010;131:165-70.
- Lathrop JT, Anderson NL, Anderson NG, *et al.* Therapeutic potential of the plasma proteome. *Curr Opin Mol Ther* 2003;5:250-7.
- Lavie L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermitente hypoxia - Revisited - The bad hugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* 2015;20:27-45.
- Lee H, Lee E, Kwon M, *et al.* Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 2006;10:42-9.
- Lee W, Nagubadi S, Kryger MH, *et al.* Epidemiology of Obstructive Sleep Apnea: a Population-based Perspective. *Expert Rev Respir Med* 2008;2:349-64.
- Manta B, Hugo M, Ortiz C, *et al.* The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch Biochem and Biophys* 2009;484:146-54.
- Milev NB, Rey G, Valekunja UK, *et al.* Analysis of the redox oscillations in the circadian clockwork. *Methods Enzymol* 2015;552:185-210.
- Mullen L, Hanschmann E, *et al.* Cysteine oxidation targets peroxiredoxins 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of redox-dependent secretion. *Mol Med* 2015;21:98-108.
- Prasad B, Nyenhuis SM, Weaver, *et al.* Obstructive sleep apnea and asthma: Associations and treatment Implications. *Sleep Med Rev* 2014;18:165-71.
- Poynton RA, Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840:906-12.
- Perkins A, Nelson KJ, Personage D, *et al.* Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators od peroxide signaling. *Trends Biovhem Sci* 2015;40:545-622.
- Righetti PG, Boschetti E. Intruducing Low-Abundance Spieces in Proteome Analysis. In: *Low Abundance Proteome Discovery State of Art and Protocols*. USA: Elsevier; 2013. (disponível em [http//:books.google.pt](http://books.google.pt))
- Righetti PG, Boschetti E, Lomas L, *et al.* Protein Equalizer™ Technology: the quest for a “democratic proteome”. *Proteomics* 2006;6:3980-92.
- Righetti PG, Fasoli E, Bochetti E. Combinatorial peptide ligand libraries: the conquest of the “hidden proteome” advances at great strides. *Electrophoresis* 2011; 32:960-6.
- Sakaguchi Y, Shoji T, Kawabata H, *et al.* High Prevalence of Obstructive Sleep Apnea and Its Association with Renal Function among Nondialysis Chronic Kidney Disease Patients in Japan: A Cross-Sectional Study. *Clin J Am Soc of Nephrol* 2011;6:995-1000.
- Sánchez AI, Martínez P, Miró E, *et al.* CPAP and behavioral therapies in patients with obstructive sleep apnea: Effects on daytime sleepiness, mood, and cognitive function. *Sleep Med Rev* 2009;13:223-33.

- Shih JL, Malhotra A. Could vitamins be helpful to patients with sleep apnea. *Chest* 2011;139:237-8.
- Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, *et al.* Linkage of inflammation and oxidative stress via release glutathionylated peroxiredoxin-2, wich acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12157-62.
- Tu C, Rudnick PA, Martinez MY, *et al.* Depletion of abundant plasma and limitations of plasma proteomics. *J Proteome Res* 2010;9:4982-91.
- Vaessen TJA, Overeem S, Sitskoorn MM. Cognitive complaints in obstructive sleep apnea. *Sleep Med Rev* 2015;19:51-8.
- Vaz F, Feliciano A, Silva AR, *et al.* Obstructive spleep apnea: New insights into antioxidante activity and celular response to stress. II International Symposium on Profiling, Lisbon-Portugal 2015.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 2003;300:650-3.
- Yadav AK, Bhardwaj G, Basak T, *et al.* A Systematic Analysis of Eluted Fraction of Plasma Post Immunoaffinity Depletion: Implications in Biomarker Discovery. *PLoS One* 2011;6:e24442.

Sites:

- <http://www.clinicaitapura.com.br/dicasnoticias/190-prp.html> - consultado em Agosto 2015
- http://www.licor.com/bio/applications/chemiluminescent_western_blot/ - consultado em Agosto de 2015

Anexos

Anexo 1 Tabela síntese com dados dos indivíduos que fizeram parte do estudo de otimização em *pool*.

Estudo em Pools - Plasma			
Indivíduo	Controlo/SAOS	Patologias adicionais	Hábitos tabágicos - quantidade
A	Controlo	–	EF - 30
B	Controlo	–	NF
C	Controlo	Dislipidémia	F - 20
D	Controlo	Obstrução nasal	NF
E	Controlo	Dislipidémia, HTA, rinite, anemia	F - 15
F	Controlo	Dislipidémia, HTA, hiperuricémia	EF - 40
G	Controlo	Dislipidémia, HTA, hipertrofia dos cornetos	NF
H	SAOS grave	Dislipidémia, HTA, esteatose hepática	NF
I	SAOS grave	Dislipidémia	EF - 56
J	SAOS grave	Dislipidémia, hiperuricemia, RGE	EF – 10
K	SAOS grave	Dislipidémia, RGE	NF
L	SAOS grave	Dislipidémia, HTA	EF - 10
M	SAOS grave	HTA, esteatose hepática, arritmia	NF

Legenda:

HTA – Hipertensão arterial

RGE – Refluxo gastroesofágico

F – Fumador

EF – Ex-fumador

NF – Não fumador

Anexo 2 Tabela síntese com dados dos indivíduos que fizeram parte do estudo individual.

Estudo individual - Plasma				
Série	Indivíduo	Controlo/SAOS	Patologias adicionais	Hábitos tabágicos - quantidade
1	A	Controlo	–	EF - 30
	B	SAOS ligeiro	–	EF - esporádico
2	C	Controlo	–	NF
	D	SAOS ligeiro	Dislipidémia, sinusite	EF - 3
3	E	Controlo	Dislipidémia	F - 20
	F	SAOS ligeiro	–	NF
4	G	Controlo	Obstrução nasal	NF
	H	SAOS moderado	Dislipidémia, sinusite	F - 20
5	I	Controlo	Dislipidémia, espirometria: obstrução vp	F - 18
	J	SAOS moderado	Hemorroidas	NF
6	K	Controlo	Dislipidémia, HTA, rinite, anemia	F - 15
	L	SAOS grave	Dislipidémia, hiperuricémia, espirometria: obstrução vp	F - 5
7	M	Controlo	Dislipidémia, HTA, hiperuricémia	EF - 40
	N	SAOS grave	Dislipidémia, HTA, esteatose hepática	NF
8	O	Controlo	Dislipidémia, HTA, hipertrofia dos cornetos	NF
	P	SAOS grave	Dislipidémia	EF - 56
9	Q	Controlo	Dislipidémia, HTA, RGE, tremor essencial, espirometria: obstrução vp volume externo	F - 20
	R	SAOS grave	Dislipidémia, HTA, depressão, espirometria: obstrução vp	NF

Legenda:

HTA – Hipertensão arterial

RGE – Refluxo gastroesofágico

F – Fumador

EF – Ex-fumador

NF – Não fumador