



Duarte Domingos
Gouveia

Influência da Oxidação da BSA na sua Digestão
Proteolítica



Duarte Domingos
Gouveia

Influência da Oxidação da BSA na sua Digestão
Proteolítica

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialidade em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor André Moreira Neto Silva, Estagiário de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor André Moreira Neto Silva

Estagiário de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Cristina Esteves

Investigadora de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutor Pedro Domingues e Doutor André Silva, pela orientação, disponibilidade, ensinamentos e incentivo ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Rui Vitorino e à Doutora Rita Ferreira pela disponibilização de material essencial à realização deste trabalho, bem como pelo apoio e simpatia prestados.

A todos os meus amigos por todo o incentivo, companheirismo e apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo esforço que fizeram desde sempre para ter a melhor educação possível.

palavras-chave

Oxidação Proteica, Proteômica, Espectrometria de massa, Digestão Enzimática, Albumina do Soro Bovina

resumo

As modificações oxidativas em proteínas são processos comuns em organismos aeróbios. A compreensão dos processos envolvidos na iniciação e desenvolvimento destas modificações, assim como da sua natureza, poderá contribuir para a elucidação do processo de envelhecimento, assim como de algumas patologias a ele associadas. A análise de proteínas oxidadas é comumente feita com base em técnicas proteômicas de identificação e quantificação utilizando a espectrometria de massa. A identificação é feita normalmente utilizando a análise dos péptidos resultantes de digestões proteolíticas das proteínas. No entanto, existem muitas limitações impostas pelas modificações oxidativas na utilização destas técnicas. De entre elas, a digestão enzimática a que as proteínas são sujeitas antes da análise por MS, representa talvez a que necessita de mais atenção. A ocorrência de clivagens falhadas poderá levar à impossibilidade de efetuar identificações e quantificações eficazes. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a influência que a oxidação da albumina do soro bovina (BSA) teria na sua digestão proteolítica. Para tal procedeu-se à oxidação da BSA recorrendo-se à reação de Fenton durante vários tempos de incubação. Analisou-se posteriormente o grau de oxidação avaliando as concentrações de proteína por SDS-PAGE, os níveis de carbonilos em solução por espectrofotometria e na banda da BSA por Western Blot. A eficiência da digestão proteolítica foi avaliada por espectrometria de massa com base nas taxas de cobertura obtidas em pesquisas dos espectros em bases de dados. No final, concluiu-se que a proteína sofre uma fragmentação crescente ao longo do processo de oxidação, em consonância com um aumento crescente dos níveis de carbonilos. Pela análise da eficiência da digestão, não se verificaram diferenças entre as digestões de amostras não oxidadas e oxidadas, levando-nos a concluir que a oxidação da proteína não influencia a sua digestão com tripsina ou proteinase K.

keywords

Oxidized proteins, Proteomics, Mass Spectrometry, Enzymatic digestion, Bovine serum albumin

abstract

Protein oxidative modifications are a common process in aerobic organisms. The comprehension of the processes involved in the initiation and development of these modifications can give us better insights of some common pathologies associated with the aging process. The analysis of oxidized proteins is normally based on mass spectrometric proteomic methodologies. The identification is performed with a shotgun strategy, where the protein mixture is submitted to proteolysis and the resulting peptides are analysed on a mass spectrometer. However, caution should be taken in applying these techniques in the field of protein oxidation. Oxidative modifications impose several limitations to protein identification and quantification due to the several structural and chemical modifications that occur. The enzymatic proteolysis applied before MS analysis is probably the step where one has to be especially careful, due to the occurrence of missed cleavages that difficult an efficient quantification. In this work, it was evaluated the efficiency of the proteolytic digestion with trypsin and proteinase K on oxidized bovine serum albumin (BSA). The protein was submitted to a metal-catalysed oxidation system for several incubation periods and the extent of oxidation was analysed by determining its concentration on SDS-PAGE, and the carbonyl levels by spectrophotometry and Western blot. In order to evaluate the digestion efficiency a mass spectrometry analysis based on sequence coverage of the protein after database search was carried out. We concluded that the protein suffers fragmentation during the oxidative reaction along with a substantial raise of amino acid residues side chain carbonyl levels. The digestion efficiency of the control and oxidized sample was similar, leading us to conclude that the oxidative state of the protein wasn't an obstacle to the proteases.

CONTEÚDO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
1.	Stress Oxidativo	3
2.	Oxidação Proteica	7
2.1.	Tipos de Modificações Oxidativas.....	9
2.2.	Consequências da Oxidação Proteica.....	20
3.	Albumina	22
3.1.	Albumina do Soro Bovina	22
3.2.	Modificações Estruturais da Albumina	24
4.	Proteólise – clivagem de proteínas.....	25
5.	Análise de Proteínas por Espectrometria de Massa	29
5.1.	Digestão Enzimática das Proteínas – Digestão <i>in gel</i>	31
5.2.	Quantificação de Proteínas por Espectrometria de Massa.....	34
5.3.	Análise de Proteínas Oxidadas por Espectrometria de Massa.....	37
II.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
1.	Reagentes.....	42
2.	Oxidação da BSA.....	42
3.	Determinação da concentração de proteína por SDS-PAGE.....	43
4.	Determinação dos grupos carbonilo	43
4.1.	Método Espectrofotométrico	43
4.2.	Determinação por Western Blot.....	44
5.	Análise por Espectrometria de Massa	45
5.1.	Digestão “in gel”	45
5.2.	Análise das digestões com tripsina e proteinaseK por MALDI-TOF-MS	46

5.3. Separação e Análise dos digestos trípticos por nano-HPLC-ESI-ion trap-MS/MS	46
5.4. Pesquisa nas bases de dados	47
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
1. Determinação da concentração da proteína oxidada	48
2. Determinação de grupos carbonilo.....	52
2.1. Método Espectrofotométrico	52
2.2. Western Blot	53
3. Avaliação da eficiência da digestão com tripsina e proteinaseK por MALDI-TOF-MS	56
4. Avaliação da eficiência da digestão com tripsina por nano-HPLC-ESI-ion trap-MS/MS.....	60
5. Identificação dos péptidos resultantes da fragmentação da BSA oxidada por MALDI-TOF/TOF.....	65
IV. CONCLUSÃO.....	68
V. PERSPETIVAS FUTURAS.....	70
VI. REFERÊNCIAS	71
Anexo I – Tabelas das Pesquisas dos dados de MS	79
Anexo II – Espectros dos péptidos identificados a partir dos dados de MS/MS	89

Índice de Figuras

FIGURA 1 – ASSOCIAÇÃO ENTRE OS RADICAIS LIVRES SUPERÓXIDO E ÓXIDO NÍTRICO COM OS SEUS RESPETIVOS METABOLITOS. (RETIRADO DA REFERÊNCIA (9))	4
FIGURA 2 – POTENCIAIS DE REDUÇÃO PARA ESPÉCIES DE OXIGÉNIO (RETIRADO DA REFERÊNCIA (12))	4
FIGURA 3 – REAÇÃO DE FENTON.	6
FIGURA 4 - REAÇÕES DO ATAQUE OXIDATIVO À CADEIA PRINCIPAL PROTEICA. (RETIRADO DA REFERÊNCIA (1))	9
FIGURA 5 – MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS DE BIOMOLÉCULAS POR ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO IMPLICADAS NO PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E EM PATOLOGIAS ASSOCIADAS (RETIRADO DA REFERÊNCIA (39)). LEGENDA: ROS – REACTIVE OXYGEN SPECIES; RNS – REACTIVE NITROGEN SPECIES; CYT C – CITOCROMO C; SOD 1 – SUPERÓXIDO DISMUTASE 1; SOD 2 – SUPERÓXIDO DISMUTASE 2; NOS – NITRIC OXIDE SYNTHASE.	21
FIGURA 6 – SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DO PERCURSOR DA BSA COM 607 AMINOÁCIDOS. OS AMINOÁCIDOS A AZUL REPRESENTAM O PROPÉPTIDO (1-24), A VERMELHO O DOMÍNIO I (25-209), A AMARELO O DOMÍNIO II (210-402) E A VERDE O DOMÍNIO III (403-600) (CÓDIGO UNIPROT P02769).	23
FIGURA 7 – MECANISMO CATALÍTICO DAS PEPTIDASES DE SERINA. NA ACILAÇÃO, X SIGNIFICA GRUPOS OR, E OH NA DEACILAÇÃO. (RETIRADO DA REFERÊNCIA (67)).....	27
FIGURA 8 – ESTRATÉGIA BOTTOM-UP PARA A IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR MS. (RETIRADO DA REFERÊNCIA (86))	31
FIGURA 9 – OS DOIS TIPOS DE DIGESTÃO PROTEICA MAIS COMUNS EM ANÁLISES DE PROTEÍNAS POR MS (RETIRADO DA REFERÊNCIA (100)).....	32
FIGURA 10 – AS ETAPAS DE UM PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO <i>IN GEL</i> . (RETIRADO DA REFERÊNCIA (100)) ..	33
FIGURA 11 – DIAGRAMA COMPARATIVO DAS 3 ABORDAGENS UTILIZADAS NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS E DOS SÍTIOS DA CARBONILAÇÃO. (RETIRADO DA REFERÊNCIA (21)).....	38
FIGURA 12 – GÉIS SDS-PAGE DAS CORRIDAS DOS CONTROLOS (A E B) E OXIDAÇÕES (C E D). OS NÚMEROS 1 E 6 REPRESENTAM AS COLUNAS DOS PADRÕES DE BSA DE 0,1 G/L E 0,5 G/L, RESPETIVAMENTE. OS NÚMEROS DE 2-5 E 7-10 REPRESENTAM AS COLUNAS DAS AMOSTRAS COM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO. 2- 15MIN ; 3- 30MIN ; 4- 60MIN ; 5- 90MIN ; 7- 2H ; 8- 4H ; 9- 6H ; 10- 24H	49

FIGURA 13 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES (MG/ML) ± DESVIO PADRÃO DA BSA NÃO FRAGMENTADA AO LONGO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO. AS CONCENTRAÇÕES FORAM DETERMINADAS POR DENSIOMETRIA DAS BANDAS OBTIDAS EM GÉIS DE SDS-PAGE COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA QUANTITYONE.....	50
FIGURA 14 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES EM MG/ML ± DESVIO PADRÃO DOS PÉPTIDOS RESULTANTES DA FRAGMENTAÇÃO DA BSA AO LONGO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO. AS CONCENTRAÇÕES FORAM DETERMINADAS POR DENSIOMETRIA DAS BANDAS OBTIDAS EM GÉIS DE SDS-PAGE COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA QUANTITYONE.....	51
FIGURA 15 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES ± DESVIO PADRÃO DE PROTEÍNA TOTAL NAS AMOSTRAS CONTROLO E OXIDADAS AO LONGO DA REAÇÃO OXIDATIVA. AS CONCENTRAÇÕES FORAM DETERMINADAS A PARTIR DA MEDIÇÃO DA INTENSIDADE DE TODA A COLUNA NO GEL DE SDS-PAGE COM O AUXÍLIO DO PROGRAMA QUANTITYONE.....	52
FIGURA 16 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES ± DESVIO PADRÃO DOS CARBONILOS EM SOLUÇÃO PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO. AS CONCENTRAÇÕES FORAM DETERMINADAS PELA DIVISÃO ENTRE A ABSORVÂNCIA DAS AMOSTRAS A 370NM E O COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR PARA A HIDRAZONA ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{CM}^{-1}$) E NORMALIZADAS À CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NA AMOSTRA.	53
FIGURA 17 – FILME DO WESTERN BLOT OBTIDO APÓS A OBTENÇÃO DO SINAL DOS CARBONILOS DAS AMOSTRAS CONTROLO E OXIDADAS AO LONGO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0,5H E AS 4H. OS GRUPOS CARBONILO FORAM DETERMINADOS POR IMUNODETEÇÃO COM ANTICORPOS PRIMÁRIOS ANTI-DNP E ANTICORPOS SECUNDÁRIOS ANTI-RABBIT. LEGENDA: 1- CONTROLO 0,5H ; 2- OXIDAÇÃO 0,5H ; 3- CONTROLO 1H ; 4- OXIDAÇÃO 1H ; 5- CONTROLO 2H ; 6- OXIDAÇÃO 2H; 7- CONTROLO 4H ; 8- OXIDAÇÃO 4H	54
FIGURA 18 – INTENSIDADES RELATIVAS (NORMALIZADAS À AMOSTRA DE MAIOR INTENSIDADE - OXIDAÇÕES 4H), MEDIDAS NO QUANTITYONE DOS SINAIS OBTIDOS NA DETECÇÃO DOS CARBONILOS POR WESTERN BLOT, DAS AMOSTRAS CONTROLO E OXIDADAS AO LONGO DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0,5 E AS 4H.....	55
FIGURA 19 – TAXAS DE COBERTURA (%) OBTIDAS NAS PESQUISAS COM O MS-FIT DO SOFTWARE PROTEIN PROSPECTOR PARA AS AMOSTRAS DIGERIDAS COM TRIPSINA AO LONGO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0.5 – 4H. O GRÁFICO A REPRESENTA AS TAXAS OBTIDAS COM PESQUISAS SEM MODIFICAÇÕES. O GRÁFICO B REPRESENTA AS TAXAS OBTIDAS COM PESQUISAS COM AS SEGUINTE MODIFICAÇÕES: OXIDAÇÃO M, P, W, Y, TRP->HIDROXIQUINURENINA, TRP->QUINURENINA, DIOXIDAÇÃO C.	57

FIGURA 20 – TAXAS DE COBERTURA (%) OBTIDAS NAS PESQUISAS COM O MS-FIT DO SOFTWARE PROTEIN PROSPECTOR PARA AS AMOSTRAS DIGERIDAS COM PROTEINASE K AO LONGO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0.5 – 4H. O GRÁFICO A REPRESENTA AS TAXAS OBTIDAS COM PESQUISAS SEM MODIFICAÇÕES. O GRÁFICO B REPRESENTA AS TAXAS OBTIDAS COM PESQUISAS COM AS SEGUINTE MODIFICAÇÕES: OXIDAÇÃO M, P, W, Y, TRP->HIDROXIQUINURENINA,.....	58
TRP->QUINURENINA, DIOXIDAÇÃO C.	58
FIGURA 21 – NÚMERO DE PÉPTIDOS OBTIDOS NAS PESQUISAS COM O MS-FIT DO SOFTWARE PROTEIN PROSPECTOR PARA AS AMOSTRAS DIGERIDAS COM TRIPSINA AO LONGO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0.5 – 4H. AS BARRAS BRANCAS REPRESENTAM OS CONTROLOS E AS BARRAS PRETAS AS AMOSTRAS OXIDADAS. O GRÁFICO A REPRESENTA O Nº OBTIDO COM PESQUISAS SEM MODIFICAÇÕES. O GRÁFICO B REPRESENTA O Nº OBTIDO COM PESQUISAS COM AS SEGUINTE MODIFICAÇÕES: OXIDAÇÃO M, P, W, Y, TRP->HIDROXIQUINURENINA, TRP->QUINURENINA, DIOXIDAÇÃO C.....	59
FIGURA 22 – NÚMERO DE PÉPTIDOS OBTIDOS NAS PESQUISAS COM O MS-FIT DO SOFTWARE PROTEIN PROSPECTOR PARA AS AMOSTRAS DIGERIDAS COM PROK AO LONGO DAS REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ENTRE AS 0.5 – 4H. AS BARRAS BRANCAS REPRESENTAM OS CONTROLOS E AS BARRAS PRETAS AS AMOSTRAS OXIDADAS. O GRÁFICO A REPRESENTA O Nº OBTIDO COM PESQUISAS SEM MODIFICAÇÕES. O GRÁFICO B REPRESENTA O Nº OBTIDO COM PESQUISAS COM AS SEGUINTE MODIFICAÇÕES: OXIDAÇÃO M, P, W, Y, TRP->HIDROXIQUINURENINA, TRP->QUINURENINA, DIOXIDAÇÃO C.....	59
FIGURA 23 – MÉDIAS DAS TAXAS DE COBERTURA (%) ± DESVIO PADRÃO OBTIDAS NAS PESQUISAS EFETUADAS NO TURBOSEQUENT PARA AS AMOSTRAS DOS CONTROLOS E OXIDADAS DIGERIDAS COM TRIPSINA.	62
FIGURA 24 – MÉDIA DO NÚMERO DE PÉPTIDOS IDENTIFICADOS ± DESVIO PADRÃO NAS PESQUISAS EFETUADAS NO TURBOSEQUENT PARA AS AMOSTRAS CONTROLO E OXIDADAS DIGERIDAS COM TRIPSINA.	62
FIGURA 25 – NÚMERO TOTAL DE RESÍDUOS MODIFICADOS OBTIDOS NAS PESQUISAS POR MODIFICAÇÕES NO TURBOSEQUENT AO FIM DE 4H DE OXIDAÇÃO. FORAM EFETUADAS PESQUISAS INDIVIDUAIS PARA AS VÁRIAS MODIFICAÇÕES DE CADA AMINOÁCIDO DA TABELA NOS CONTROLOS E NAS AMOSTRAS OXIDADAS.	65
FIGURA 26 – MAPEAMENTO DOS PÉPTIDOS RESULTANTES DA FRAGMENTAÇÃO DA BSA (A AMARELO) NA SUA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA.	67

Índice de Esquemas

ESQUEMA 1 – CLIVAGEM DA LIGAÇÃO PEPTÍDICA PELA VIA DA DIAMIDA (A) E DA A-AMIDAÇÃO (B) (RETIRADO DA REFERÊNCIA (22)).....	10
ESQUEMA 2 – HIDROXILAÇÃO DE CADEIAS LATERAIS ALIFÁTICAS (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2)).	12
.....	13
ESQUEMA 3 – ESQUEMA DE OXIDAÇÃO DA CADEIA LATERAL DA PROLINA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2)) ...	13
ESQUEMA 4 - REAÇÃO DE HIDROXILAÇÃO DA CADEIA LATERAL DA FENILALANINA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2))	14
ESQUEMA 5 – HIDROXILAÇÃO DA TIROSINA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2)).....	14
ESQUEMA 6 – OXIDAÇÃO DO TRIPTOFANO (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2)).....	15
ESQUEMA 7 – REAÇÕES PROVÁVEIS DA OXIDAÇÃO DA CISTEÍNA PELO RADICAL HIDROXILO (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2))	16
ESQUEMA 8 – OXIDAÇÃO DA METIONINA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (23))	18
ESQUEMA 9 – OXIDAÇÃO DA LISINA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (23))	19
ESQUEMA 10 – OXIDAÇÃO DA ARGININA (RETIRADO DA REFERÊNCIA (2)).....	19

Abreviações

2-DE – electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

ACN - acetonitrilo

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina do soro bovina

CID – *collision induced dissociation*

Da – Dalton

DNA – ácido desoxiribonucleico

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DOPA - dihidroxifenilalanina

ECD – *electron capture dissociation*

ELISA – *enzyme-linked immunoabsorbent assay*

ESI – ionização por electrospray

ETD – *electron transfer dissociation*

FT-ICR – ressonância ciclotrão de íão com transformada de Fourier

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

ICAT – *isotope-coded affinity tag*

iTRAQ – *isobaric tag for relative and absolute quantitation*

IUBMB – *international union of biochemistry and molecular biology*

LC – cromatografia líquida

LFQP – *label free quantitative proteomics*

MALDI – laser de ionização/desorção assistido por matriz

MCO – oxidação catalisada por metais

MRM – multiple reaction monitoring

MS- espectrometria de massa

MS/MS – espectrometria de massa tandem

MudPIT – *multidimensional protein identification technology*

NCBI – *national center for biotechnology information*

PMF – *peptide mass fingerprinting*

PFF – *peptide fragmentation fingerprinting*

PTM – modificações pós-traducionais

PUFA – *polyunsaturated fatty acid* (ácidos gordos poli-insaturados)

ROS – espécies reativas de oxigénio

RNA – ácido ribonucleico

RNS – espécies reativas de azoto

SILAC – *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*

SISs – *stable isotope-labeled internal standards*

SOD – superóxido dismutase

SDS-PAGE –electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

I. INTRODUÇÃO

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) em sistemas biológicos é uma consequência inevitável do metabolismo em organismos aeróbios. Os ROS são responsáveis pela oxidação de diversas biomoléculas levando a mudanças reversíveis, que podem desempenhar um papel importante na regulação metabólica, ou irreversíveis, que levam a perdas de função e inativação das biomoléculas (1). As modificações oxidativas em proteínas são as mais comuns, e a sua compreensão poderá levar a um melhor entendimento de algumas patologias e do processo de envelhecimento. Estas modificações proteicas podem envolver clivagens da cadeia peptídica, formação de cross-links, ou mudanças e adições de novos grupos químicos nas cadeias laterais dos aminoácidos, originando biomarcadores de stress oxidativo (2, 3). Devido aos inúmeros tipos de modificações que podem ocorrer, têm vindo a ser desenvolvidas diversas técnicas para a sua identificação e quantificação. A espectrometria de massa tem ganho cada vez mais relevância nesta área, sendo a técnica de eleição para a identificação de modificações oxidativas (4). A grande vantagem da utilização da espectrometria de massa é a de permitir saber qual o tipo de modificação e o sítio da proteína onde ocorreu. Normalmente os estudos realizados focam-se apenas no estudo de um tipo de modificação ou de uma proteína em particular, visto ainda não ser possível determinar o estado oxidativo de um proteoma inteiro. Até à data, a modificação mais estudada é a carbonilação, por ser o biomarcador de oxidação proteica mais aceite (3). No entanto, a diversidade das modificações oxidativas que ocorrem em proteínas, os cross-links e fragmentações da cadeia principal proteica, e algumas dificuldades técnicas relacionadas com os métodos utilizados ainda representam dificuldades a ultrapassar (5).

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da oxidação da albumina do soro bovina (BSA) na sua digestão proteolítica com tripsina e proteinase K. Os mecanismos de oxidação proteica levam ao desenvolvimento de modificações nas cadeias laterais dos aminoácidos que poderão levar a que os sítios de clivagem estejam inacessíveis à peptidase. O objetivo deste trabalho consistiu em aferir a influência que a oxidação de proteínas poderá ter no passo da digestão enzimática de uma análise por espectrometria de massa. Foi colocada a hipótese de que quanto maior o estado oxidativo da proteína, menor seria a eficiência da digestão. Para tal a BSA foi submetida a um sistema de oxidação

catalisada por metais (MCO) durante oito tempos de incubação entre 15 minutos a 24h. Posteriormente foram analisadas as concentrações de proteína e os níveis de carbonilos ao longo das reações para avaliar o estado oxidativo da proteína. As amostras foram digeridas com tripsina e proteinase K em gel e analisadas por espectrometria de massa. Foi avaliada a eficiência de digestão com base nas taxas de cobertura e no número de péptidos identificados nas pesquisas em bases de dados dos espectros obtidos.

1. Stress Oxidativo

O stress oxidativo resulta de uma situação de desequilíbrio entre a produção fisiológica de espécies reativas de oxigénio, e a capacidade do organismo em removê-las ou reparar os seus danos (6). Nesta condição, as defesas antioxidantes do organismo são insuficientes para manter os ROS abaixo dos níveis tóxicos, permitindo que estes reajam com biomoléculas (3, 7). Como consequência, ocorrem danos a nível molecular e fisiológico, onde são destruídos os componentes celulares, podendo levar à morte celular via apoptose ou necrose (8). No entanto, a extensão do impacto que o stress oxidativo pode ter no organismo depende sempre do tipo de oxidante e da intensidade da sua produção, da atividade de diversos oxidantes, e da capacidade de reparação do organismo (9). O stress oxidativo em humanos está envolvido em múltiplas doenças, como a doença de Alzheimer ou de Parkinson, esclerose amiotrófica lateral (6), aterosclerose, diabetes *mellitus*, síndrome metabólico, e algumas patologias cardiovasculares (9).

A formação de ROS por processos endógenos resulta normalmente de perdas de eletrões na cadeia transportadora de eletrões. No entanto, pode também resultar de reações de oxidação-redução nos centros ativos de enzimas oxidoreduases (1) como a oxidase do NADPH, a mieloperoxidase, a xantina oxidase, a glucose oxidase, enzimas citocromo p450, e ciclo-oxigenases (7), ou por reações aleatórias em células e tecidos devido a uma exposição a radiação de alta energia (1). Uma vasta gama de agentes exógenos (radiação, drogas, químicos ou poluentes) é também responsável pela formação dos ROS (1, 10). No processo de produção energética da mitocôndria são adicionados quatro eletrões a cada molécula de oxigénio (O_2), resultando na formação de duas moléculas de água. No entanto, cerca de 1,5% do oxigénio que entra nas células é convertido a espécies de oxigénio parcialmente reduzidas (11). Estes radicais, como o ião superóxido ou o óxido nítrico, participam num conjunto de reações subseqüentes onde se formam metabolitos ainda mais reativos, como ilustrado na figura 1. Estes produtos incluem o radical hidroxilo ou outras espécies não radicais como o peróxido de hidrogénio, oxigénio singuleto, peroxinitrito, ou o ácido hipocloroso (9). O oxigénio molecular (O_2), por ser um aceitador univalente de eletrões fraco, não consegue oxidar eficientemente aminoácidos e ácidos nucleicos, mas os seus eletrões desemparelhados interagem com os eletrões desemparelhados de metais de transição e radicais orgânicos (12).

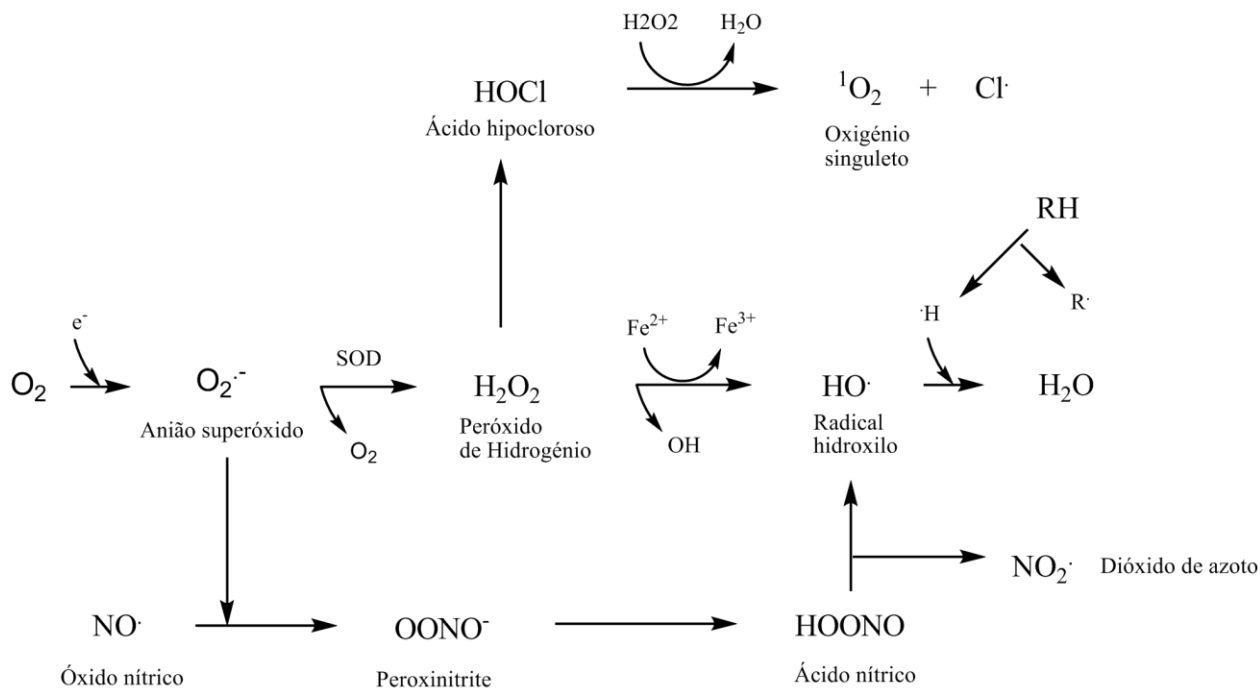


Figura 1 – Associação entre os radicais livres superóxido e óxido nítrico com os seus respectivos metabolitos. (Retirado da referência (9))

Em contraste, as espécies parcialmente reduzidas de oxigénio superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($HO \cdot$) são, em termos termodinâmicos e cinéticos, oxidantes mais fortes que o dióxigénio, apresentando potenciais de redução e constantes de reação com diversos substratos biológicos mais elevados (Figura 2) (12). De seguida encontram-se descritos alguns dos ROS mais comuns.

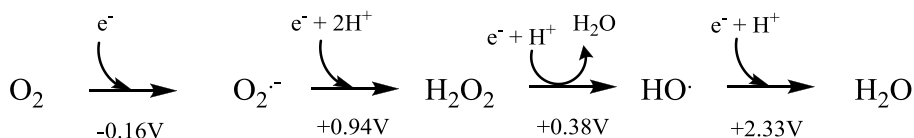


Figura 2 – Potenciais de redução para espécies de oxigénio (retirado da referência (12))

Radical Superóxido

A fonte principal de produção *in vivo* do anião superóxido é a cadeia transportadora de eletrões da mitocôndria (11). Este radical tem um potencial de redução normal relativo ao elétrodo do normal de hidrogénio de cerca de 0.94 V, não sendo muito reativo com biomoléculas. Isto deve-se ao facto de a sua reatividade com centros eletronicamente ricos ser limitada pela sua carga aniónica, e pela facilidade com que ocorre a sua dismutação a H₂O₂ (12, 13). Esta reação é catalisada principalmente pelas enzimas SOD (dismutase do superóxido), que constituem enzimas importantes nos mecanismos antioxidantes do organismo (11). O superóxido pode ainda ser reduzido a peroxinitrito, por reação com óxido nítrico, como ilustrado na figura 1.

Peróxido de Hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é uma espécie não radicalar pouco reativa com biomoléculas (potencial de redução 1.06 V (14)). A sua constante de reação **k** para a reação com a glutatona (constante cinética que determina a reatividade de oxidantes não radicalares) é de 0.9 M⁻¹s⁻¹. Os danos provocados por este oxidante devem-se essencialmente aos seus produtos secundários, muito mais reativos (13). O H₂O₂ pode reagir com metais de transição reduzidos, como o Fe²⁺ ou o Cu⁺, pela reação de Fenton, originando o radical hidroxilo ·OH, radical que possui um potencial de redução de 2.31 V (Figura 2) (3, 11, 13). Alternativamente, o peróxido de hidrogénio pode também originar ácido hipocloroso (HOCl k = 3x10⁷ M⁻¹s⁻¹), por reação com a mieloperoxidase (Figura 2), ou pode ser convertido a água pelas enzimas catalase e peroxidase da glutatona (3).

Radical Hidroxilo

Com um potencial de redução de 2.31 V, o radical hidroxilo é considerado o radical mais reativo com biomoléculas. As suas reações são quase instantâneas e limitadas por difusão, visto o HO· apresentar um tempo de meia-vida na ordem dos 10⁻⁹ s (15). *In vivo*, a sua produção é derivada principalmente da reação de Fenton (Figura 3), mas também

durante o metabolismo aeróbio e por exposição a radiações ionizantes que provoquem a radiólise da água (16).



Figura 3 – Reação de Fenton.

Óxido Nítrico e Anião Peroxinitrito

O óxido nítrico possui um potencial de redução de -0.80 V, sendo um oxidante muito fraco. No entanto, reage rapidamente com o anião superóxido ($k=6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ - 3 vezes maior que a reação com a SOD), originando o anião peroxinitrito, que apresenta uma constante k de $700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para com a glutatona (13). Este oxidante possui um tempo de meia vida de cerca de 1s, e pode difundir através de membranas, induzindo danos oxidativos longe do seu sítio de formação(17). Os efeitos mais relevantes do peroxinitrito residem na sua capacidade de oxidação direta de compostos tióis, e no aumento do número de reações em que participa pela presença de dióxido de carbono. Reações com dióxido de carbono formam o anião nitrosoperoxicarbonato $ONO_2CO_2^-$, que pode ser decomposto em dióxido de azoto ($\cdot NO_2$) e no radical carbonato ($CO_3^{\cdot -}$) (3, 13). A forma protonada do peroxinitrito, o composto instável ácido peroxinítrico (ONOOH), rapidamente liberta dióxido de azoto e o radical hidroxilo. Estes radicais associados a reações do peroxinitrito são fortes e reagem rapidamente com biomoléculas (17).

Funções Fisiológicas dos Radicais Livres

Em concentrações abaixo dos limites tóxicos, estes oxidantes têm um papel importante na regulação de alguns processos fisiológicos das células, a nível da expressão génica, sinalização celular, e na defesa contra agentes patogénicos (3, 9, 10). A nível da sinalização celular, os ROS podem estimular a transdução de sinais e induzir a ativação de vários processos biológicos relacionados com, por exemplo, proliferação celular, apoptose ou adesão celular (18). Destes, os mais importantes são os processos de transdução de sinais baseados na fosforilação proteica e no cálcio (Ca^{2+}), devido ao grande número de

vias ativadas por estes processos (19). A estimulação da atividade da tirosina cinase e da fosforilação da tirosina por oxidantes já foi demonstrada em vários trabalhos. O peróxido de hidrogénio, p.e., está envolvido na estimulação da atividade do recetor de insulina tirosina cinase, e na indução da fosforilação da tirosina em receptores EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) e PDGF (Fator de Crescimento derivado de Plaquetas - *Platelet-derived growth factor*), através da inibição da desfosforilação (19). Os ROS desempenham também um papel importante em processos de defesa do organismo, particularmente durante o “*burst*” oxidativo dos macrófagos, onde as concentrações de peróxido de hidrogénio podem atingir concentrações de 10-100 μM no local onde é produzido (20). Além do peróxido de hidrogénio, durante este processo podem também ser produzidos radicais superóxido, ácido hipocloroso ou ainda o oxigénio singuleto, através da ação de enzimas fagocíticas NADPH oxidase e mieloperoxidase (20).

Podemos então verificar que os ROS são necessários ao funcionamento de alguns processos metabólicos, não sendo benéfica uma supressão completa destes compostos (9). Para controlar a produção dos ROS, o organismo possui um sistema de proteção organizado a vários níveis:

- Sistemas de prevenção de radicais, como inibidores de enzimas que catalisam a sua formação;
- *Scavengers e trappers*, que eliminam a alta reatividade dos radicais através da sua transformação em metabolitos não radicais e não tóxicos. Estes compostos são antioxidantes como a vitamina E, a glutathiona reduzida, ou a melatonina, ou sistemas enzimáticos que degradam diretamente os ROS como as catalases, as SODs (dismutases do superóxido), ou as redutases e peroxidases da glutathiona;
- Sistemas enzimáticos de reparação e degradação de biomoléculas danificadas, como proteinases associadas ao proteasoma 20S, lipases que degradam lípidos modificados oxidativamente, ou sistemas de reparação de bases de DNA modificadas (9).

2. Oxidação Proteica

Os ROS reagem com a maioria das biomoléculas. Os danos aplicados a uma determinada espécie dependem sempre de fatores que determinam a taxa a que uma reação particular pode ocorrer (concentração do alvo, potencial de redução do oxidante e do alvo,

constante cinética k da reação), e outros fatores que modulam a extensão da reação (localização do oxidante e do alvo, a ocorrência de danos secundários, ou reações de reparação). As proteínas são os componentes principais das células, plasma e da maioria dos tecidos. Esta abundância, aliada às altas constantes de reação que a maioria dos ROS possuem para com estas, tornam as proteínas um dos alvos principais de oxidação (1).

Devido aos vários mecanismos existentes que levam à oxidação proteica, aliado ao facto de todas as cadeias laterais dos aminoácidos serem suscetíveis processos oxidativos, existem diversos tipos diferentes de modificações oxidativas nas proteínas (na tabela 2 estão exemplificadas algumas das modificações que ocorrem nas cadeias laterais de aminoácidos) (7).

Tabela 1 – Diferentes tipos de oxidação proteica (retirado da referência (21))

Aminoácido	Modificação Oxidativa	Aminoácido	Modificação Oxidativa
Treonina	Ácido 2-amino-3-oxo-butanóico	Metionina	Sulfóxido Sulfona
Arginina	Semialdeído glutâmico	Lisina	Semialdeído aminoadípico Aductos de Amadori Aductos de 3-desoxiglucosona Aductos de metilglioxal
Cisteína	Ácido sulfínico Ácido sulfénico		Asparagina
Triptofano	Formilquinurenina Quinurenina Hidroxiquinurenina Hidroxilações nas posições 2,4,5,6,7 oxolactona	Prolina	Semialdeído glutâmico Piroglutâmico Pirrolidinona
	Histidina	4-hidroxi glutamato	Leucina
Asparagina		Tirosina	Hidroxilação
Aspartato		Aspartato	Hidroxilação
2-oxohistidina		Fenilalanina	Dihidroxifenilalanina

2.1. Tipos de Modificações Oxidativas

2.1.1. Oxidação e Fragmentação da Cadeia Principal Proteica

O ataque oxidativo à cadeia principal proteica é iniciado pela abstração do átomo de hidrogénio do carbono- α , que resulta num radical centrado no carbono- α , como mostra a reação 1 da figura 4 (1, 22). Este radical pode combinar com outro radical e formar *cross-links* inter ou intra-proteicos ou reagir com o O_2 e originar um radical peróxido (reação 2 figura 4). O radical peróxido pode levar à formação de diversas espécies intermédias (alquilperóxido, radicais alquoxilo ou derivados hidroxilo – reações 3, 4, 5 da figura 4), em passos mediados por interações com HO_2^{\cdot} ou iões de metais de transição como o Fe^{2+} ou Cu^+ .

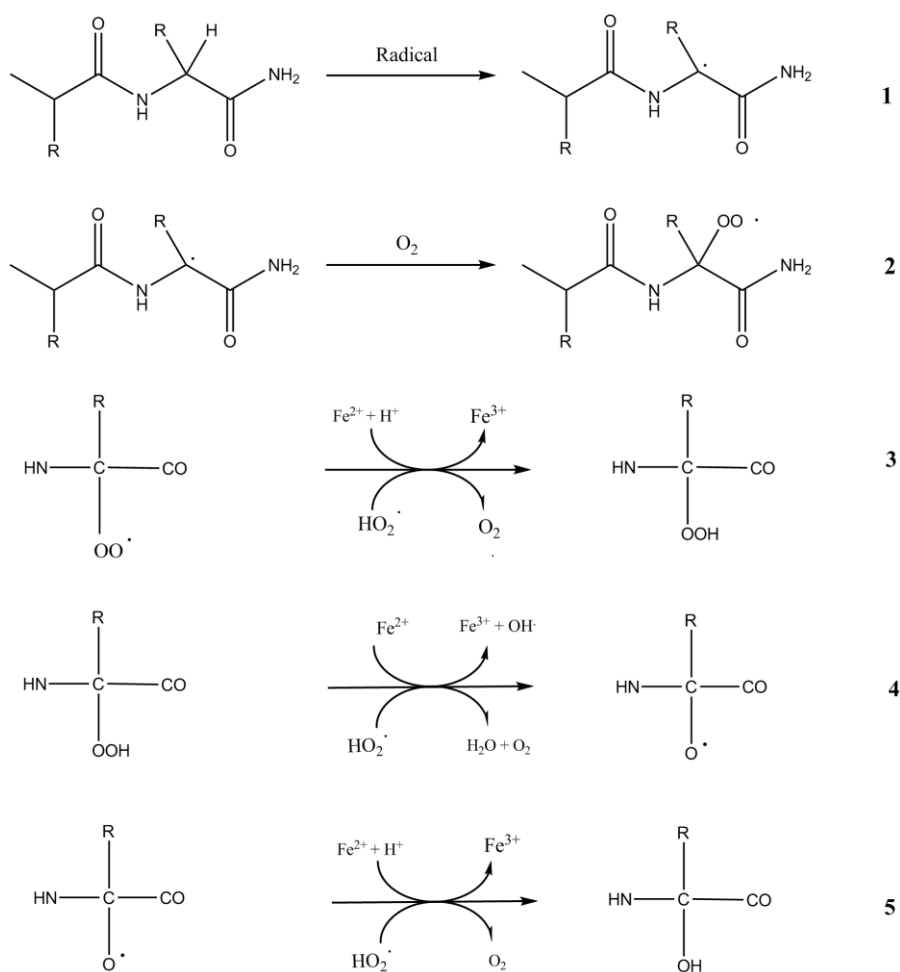
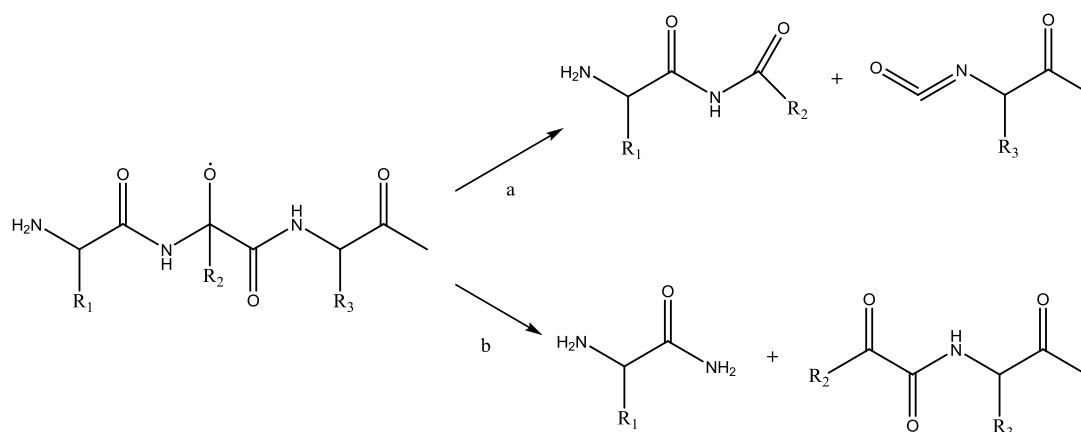


Figura 4- Reações do ataque oxidativo à cadeia principal proteica. (retirado da referência (1))

Estes radicais intermédios poderão ainda sofrer reações laterais com outros aminoácidos e originar radicais com novos centros (22). A formação dos radicais alquoxilo constitui o passo inicial da clivagem da ligação peptídica por duas vias: a via da diamida ou a via da α -amidação (Esquema 1) (22). O carbono- α hidroxilado pode induzir a clivagem da cadeia principal na ligação N-C através da via da α -amidação. Nesta reação, o fragmento contendo a porção N-terminal da proteína possuirá um grupo amida na extremidade C, enquanto o fragmento contendo a porção C-terminal possuirá um resíduo α -cetoacilo (22, 23). A clivagem pela via da diamida é efetuada na ligação C-C, e resulta de uma primeira clivagem que origina um derivado de diamida e um isocianato nos terminais da proteína (22, 23).



Esquema 1 – Clivagem da ligação peptídica pela via da diamida (a) e da α -amidação (b) (retirado da referência (22))

A clivagem da cadeia proteica principal pode também resultar de ataques oxidativos aos resíduos glutâmilo, prolilo e aspartilo. A abstração de um átomo de hidrogénio do carbono γ de um resíduo de glutâmilo, por exemplo, seguida de reações análogas às reações 4, 5 e 6 da figura 3, levará à clivagem da ligação peptídica por um mecanismo onde é formado ácido oxálico, resultando um resíduo de piruvilo na porção C-terminal (22, 23). Também é possível a ocorrência de um ataque oxidativo ao carbono- β , de onde resulta um radical no carbono- α e a libertação da cadeia lateral como um carbonilo. Este radical α está sujeito a clivagem por mecanismos semelhantes aos referidos acima (2, 23).

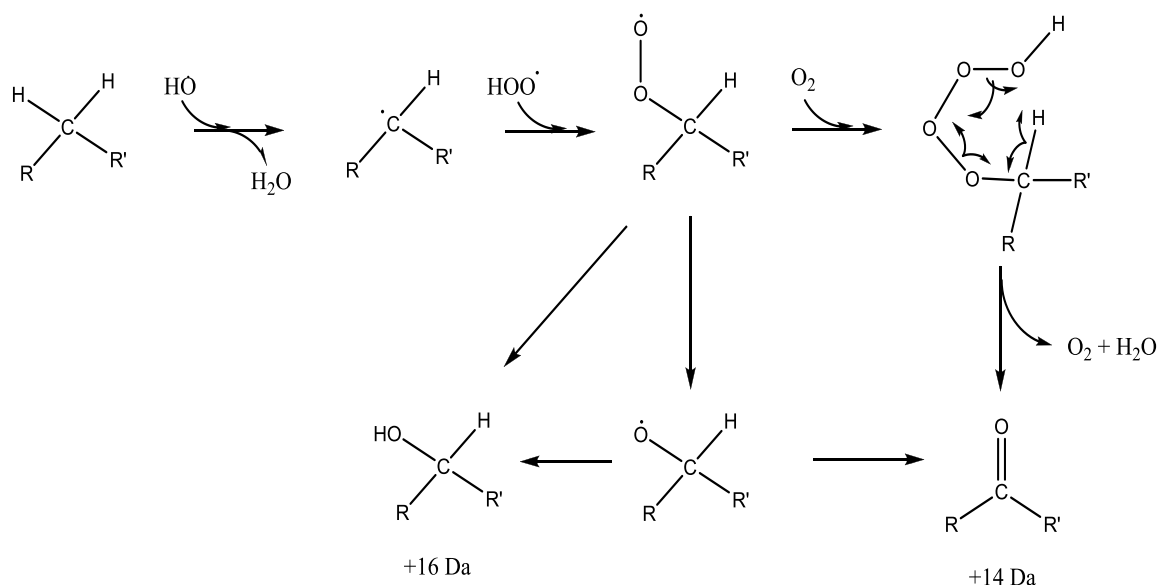
2.1.2. Oxidação das Cadeias Laterais

As diferentes cadeias laterais de aminoácidos representam potenciais locais de reação para os oxidantes. Como as estruturas e propriedades destas cadeias laterais são diferentes entre aminoácidos, são diversos os sítios de ataque e os produtos que se originam em ataques oxidativos. De seguida encontram-se descritos alguns destes mecanismos de reação e os seus produtos.

Resíduos Alifáticos

A maioria das reações com resíduos alifáticos de proteínas ocorre normalmente com os radicais mais reativos, por processos de abstração dos átomos de hidrogénio que originam radicais centrados no carbono. Uma das exceções onde o ataque não ocorre por radicais reativos é a reação de transferência de dois eletrões do HOCl com os resíduos de Lisina e Arginina, onde se formam produtos instáveis de cloraminas/cloramidas e bromoaminas/bromoamidas (1). No caso do radical hidroxilo, a reação pode ocorrer em todos os sítios disponíveis, isto é, com pouca seletividade, resultando na formação de produtos carbonilados e hidroxilados (1, 2). A via pela qual se dá a oxidação de resíduos alifáticos pelo radical hidroxilo está representada no esquema 2.

Após a abstração do hidrogénio forma-se um radical centrado no carbono, que, na ausência de O₂, pode dimerizar com outro semelhante, ser reparado (dependendo da natureza das espécies envolvidas), ou reagir rapidamente com o O₂ para formar um radical peroxilo (1, 2). O radical peroxilo pode então seguir várias reações, originando hidroperóxidos (+32 Da), hidróxidos (+16 Da) e carbonilos (+14 Da), ou radicais alquoxilo e O₂ (2). Os radicais peroxilo dimerizam com outros radicais peroxilo ou espécies semelhantes (O₂^{•-}, HOO[•]) e rearranjam-se, formando produtos carbonilos (2). Os radicais alquoxilo, através de rápidas abstrações de hidrogénio ou rearranjos/fragmentações, originam álcoois ou produtos carbonilo (1). Os hidroperóxidos normalmente degradam-se em outros radicais (alquoxilo, radicais de carbono, superóxidos, álcoois ou compostos carbonilo (1)), por serem pouco estáveis (2).

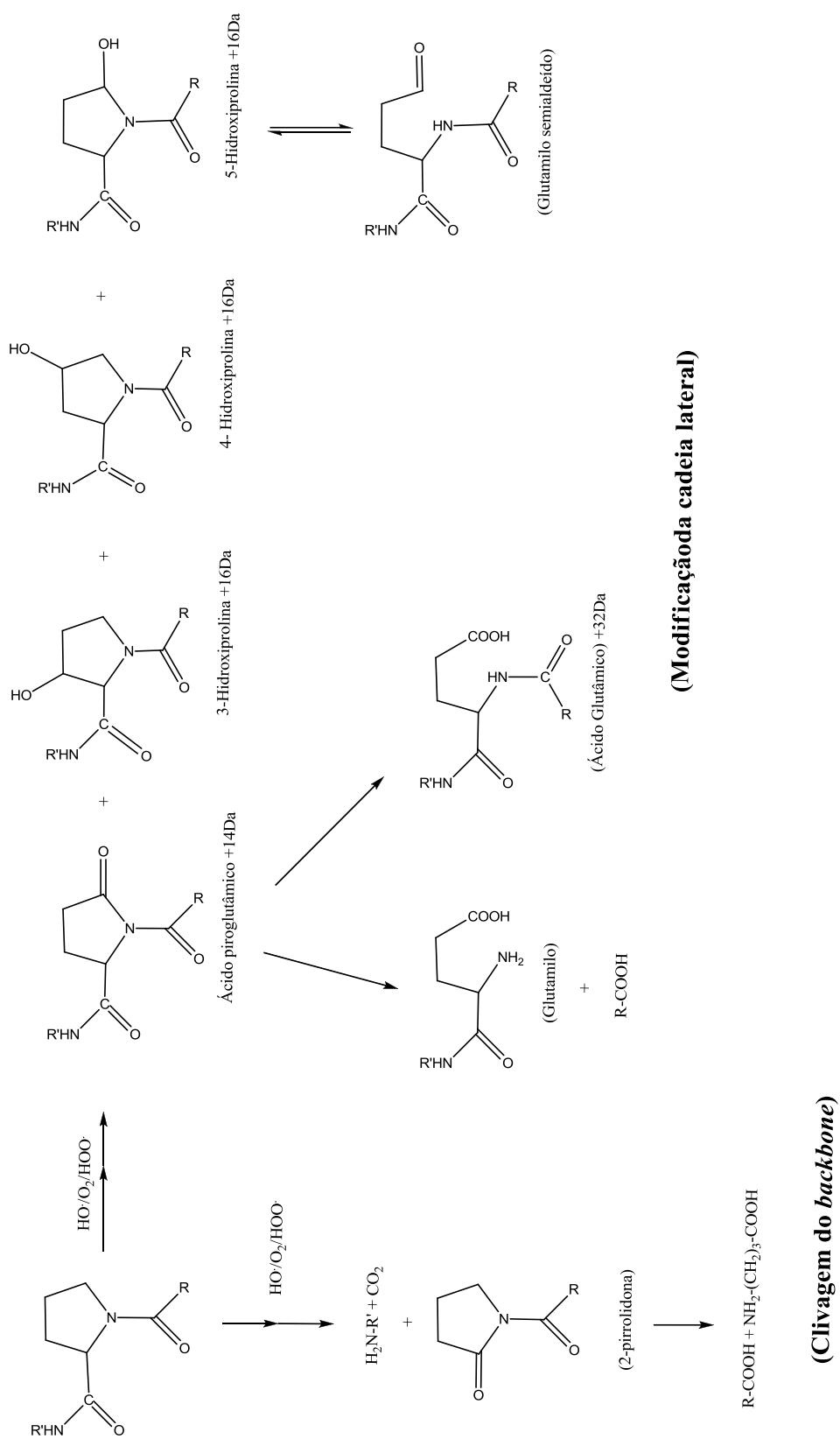


Esquema 2 – Hidroxilação de cadeias laterais alifáticas (retirado da referência (2)).

A prolina, devido ao facto de a sua cadeia lateral diferir dos outros resíduos alifáticos (ligada ao carbono- α e ao N), possui um comportamento oxidativo diferente dos restantes. O radical hidroxilo abstrai frequentemente um hidrogénio do carbono 5 da cadeia lateral da prolina, originando um radical secundário centrado no carbono, que, por reação com O_2 , forma o radical peróxido. As reações subsequentes do radical peróxido originam diversos compostos como o 5-hidroxiprolina (+16 Da), ácido piroglutâmico (+14 Da). A oxidação da cadeia lateral da prolina está representada no esquema 3 (2).

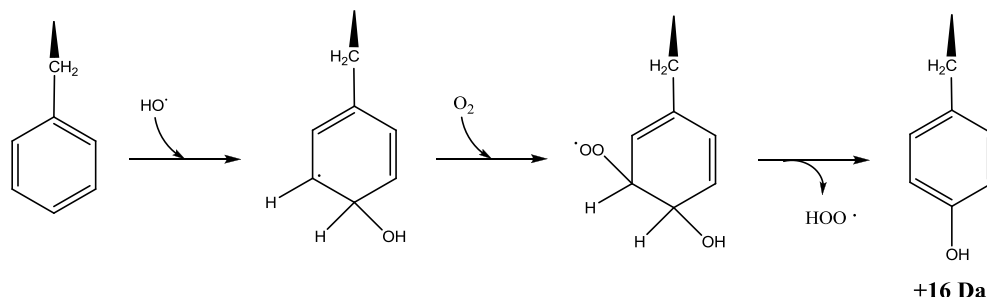
Resíduos Aromáticos

Os resíduos aromáticos dos aminoácidos (Phe, Tyr, Trp, His) são alvos comuns à oxidação por parte de vários ROS, e constituem marcadores muito sensíveis de oxidação (24, 25). O local em que ocorre o ataque oxidativo é, em todos os casos, o anel aromático, e resulta na oxigenação do anel (25), por reações de adição, de substituição (1), ou por oxidação direta, com um radical que possua um potencial de redução elevado (25).



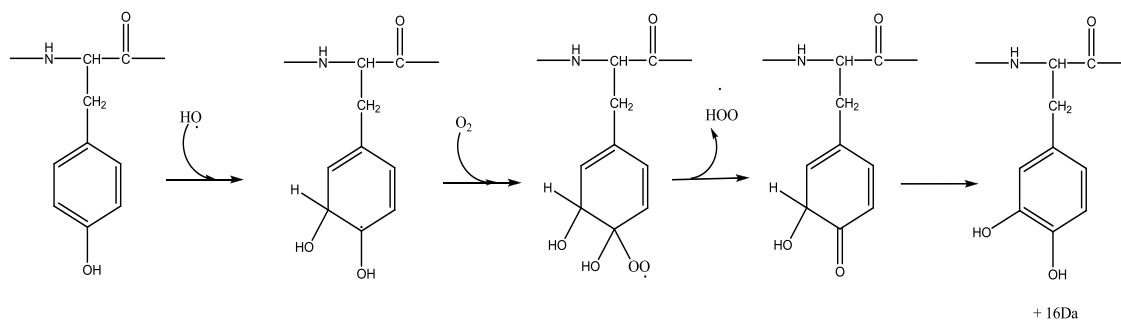
Esquema 3 – Esquema de oxidação da cadeia lateral da prolina (retirado da referência (2))

No caso da fenilalanina (Phe) (esquema 4), um radical forte como o hidroxilo oxida rapidamente o anel aromático por adição, com pouca seletividade, formando o radical hidroxiciclohexadienilo. Este radical, por reação com o O_2 e consequente eliminação de um $HOO\cdot$, origina uma mistura de dois estereoisômeros de tirosina (Tyr) o-Tyr e m-Tyr (2).



Esquema 4 - Reação de hidroxilação da cadeia lateral da fenilalanina (retirado da referência (2))

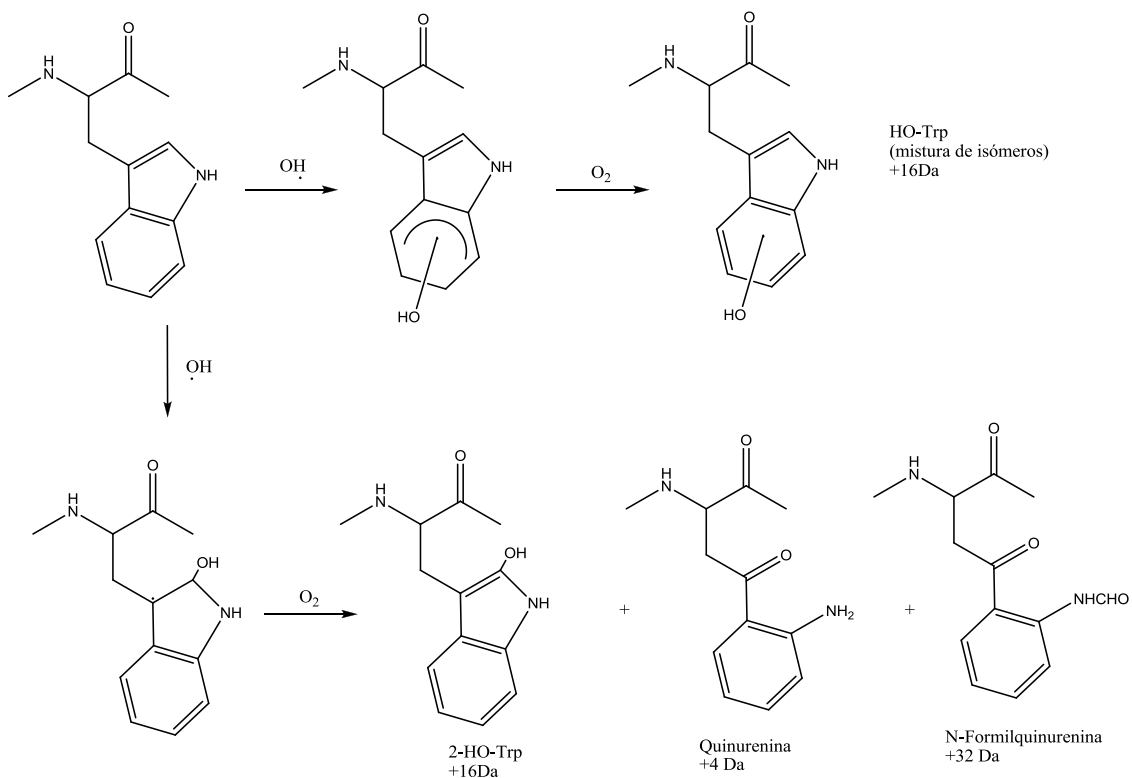
O processo de oxidação da tirosina (Tyr) é semelhante ao da Phe, mas muito mais seletivo, devido à presença do substituinte hidroxilo do anel (a adição é feita nos sítios adjacentes - esquema 5) (2). Esta oxidação origina principalmente resíduos de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e em alguns casos o seu isômero 2,4-DOPA, bem como resíduos diméricos de tirosina (di-Tyr) (25). Estes produtos podem ser formados na presença ou ausência de oxigênio (25), embora na reação onde o oxigênio não participa os seus níveis sejam significativamente mais baixos (2).



Esquema 5 – Hidroxilação da tirosina (retirado da referência (2))

A oxidação do triptofano dá-se por mecanismos relativamente mais complexos que não se encontram tão bem caracterizados (esquema 6) (2). O triptofano, por possuir um baixo potencial de redução, é rapidamente oxidado. O radical hidroxilo adiciona tanto ao benzeno, originando diversos compostos hidroxilados (nas posições 2-,4-,5-,6- e 7-), como

no anel pirrole, neste caso originando compostos de cadeia aberta como o N-formilquinurenina, 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, entre outros (2, 25).



Esquema 6 – Oxidação do triptofano (retirado da referência (2))

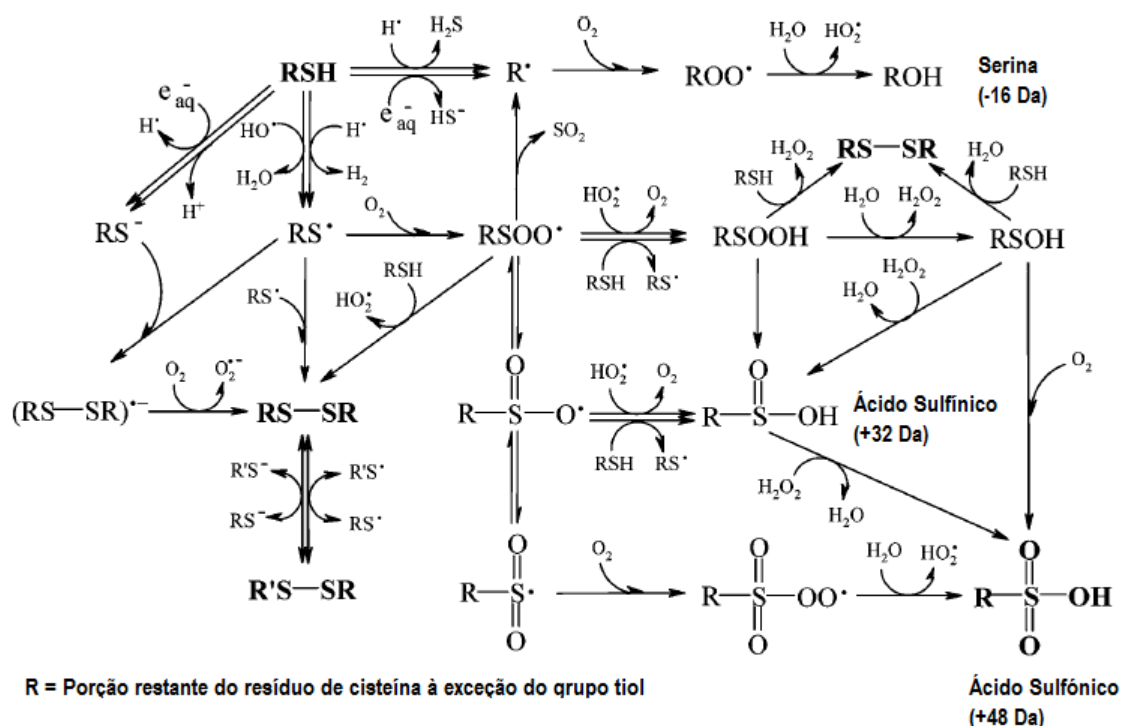
Resíduos contendo Enxofre

Os aminoácidos que contêm enxofre na sua cadeia lateral, cisteína e metionina (Cys e Met), são dos mais reativos com os radicais livres, sendo facilmente oxidados em muitas proteínas (1, 2, 22). A oxidação destes resíduos pode ocorrer por dois processos distintos: reação direta com o oxidante, ou por processos de transferência de radicais na proteína após oxidação em sítios remotos (1). As modificações induzidas podem ser reversíveis ou irreversíveis, e determinam o tipo de efeito fisiológico resultante (3).

A cisteína, através da formação de ligações dissulfídicas, contribui para a estrutura proteica, sendo o seu estado de oxidação importante para a função proteica (23). O seu processo de oxidação é bastante complexo e já foram propostos vários mecanismos

visando a explicação dos inúmeros produtos resultantes da oxidação (2). A reação de oxidação pode ocorrer por processos de transferência de um ou dois elétrons, resultando em vários produtos (cistinas, oxiácidos (RSO_2H , RSO_3H), sulfonamidas, cloreto de sulfenilo) (1, 4).

No esquema seguinte (esquema 7), retirado de (2), estão representadas as reações prováveis das espécies radicais geradas por radiólise da água, bem como alguns dos mecanismos de oxidação comumente aceites.



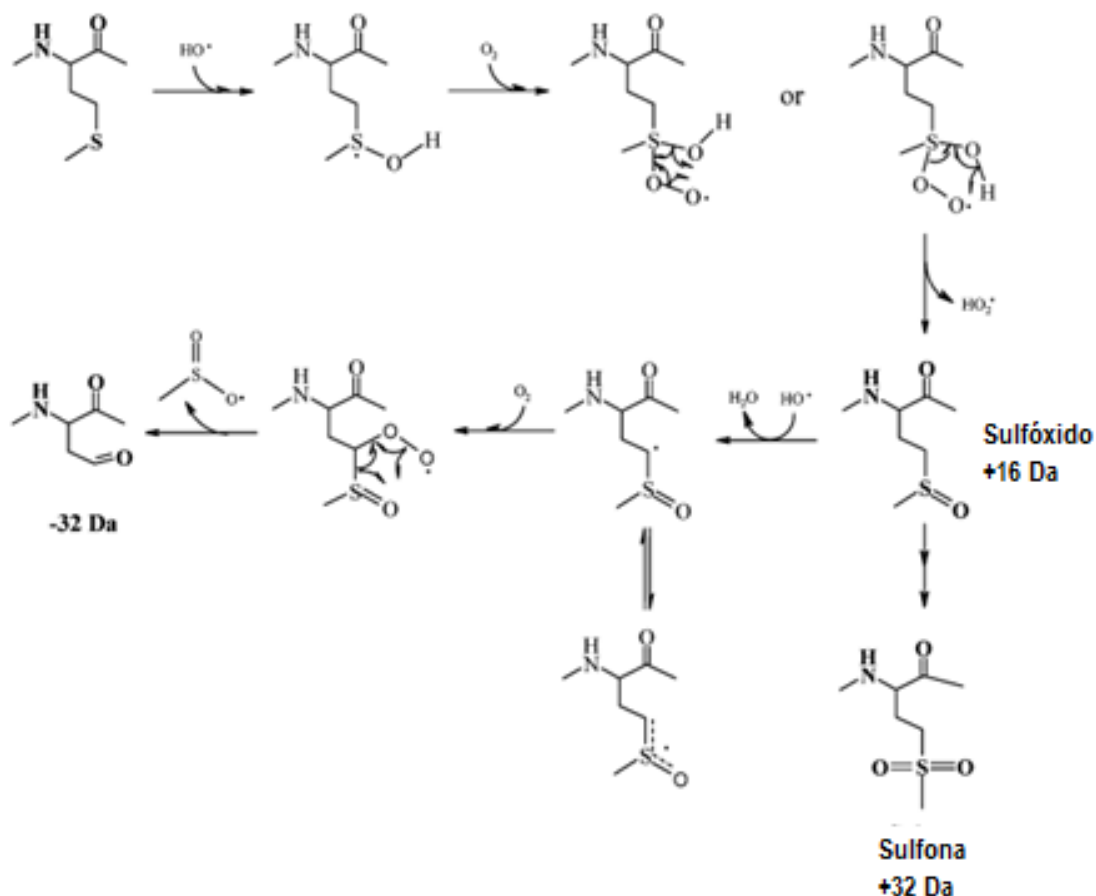
Esquema 7 – Reações prováveis da oxidação da cisteína pelo radical hidroxilo (retirado da referência (2))

O passo inicial envolve a formação de radicais sulfidrílo RS^\bullet (1), por abstração do átomo de hidrogénio (2). Estes radicais terão de seguir uma de duas reações competitivas: reação com o O_2 para formar um radical peroxilo RSOO^\bullet , ou com o tiolato RS^- para formar um anião radical dissulfido RSSR^\bullet (cistina) (1, 2). O RSOO^\bullet é normalmente o precursor dos ácidos sulfénico (RSOH), sulfínico (RSO_2H), e sulfónico (RSO_3H), do dissulfido, e de produtos de serina. O tio-hidroperóxido (RSOOH) representa um potencial intermediário na formação de RSOH (instável e altamente reativo), RSO_2H , e dissulfido (2).

A reação de oxidação da cisteína com alguns oxidantes resulta na formação de aductos com tempo de vida curto que poderão sofrer reações de hidrólise para originar oxiácidos, ou com outros grupos tiol, formando espécies diméricas (cistina, p.e.) (1). A oxidação que origina estes dissulfidos é reconhecida como uma das poucas oxidações em proteínas que são reversíveis, constituindo um mecanismo redox de manutenção do estado reduzido da cisteína, importante na estrutura e função de diversas proteínas (1, 22). As reações de oxidação que formam os ácidos sulfénico e sulfínico podem também ser reversíveis (4).

Tal como a cisteína, a metionina é um dos aminoácidos mais suscetíveis a processos de oxidação por parte de diversos ROS/RNS (*Reactive Nitrogen Species*) (23, 26), e, apesar de o seu processo de oxidação já ter sido estudado exaustivamente, permanecem algumas dúvidas quanto aos mecanismos envolvidos (2). A sua função nas proteínas não está totalmente elucidada, mas existe um consenso geral de que participará nos mecanismos das defesas antioxidantes do organismo (4). Como no caso da cisteína, o processo inicial de oxidação da metionina também é reversível, pelo facto dos organismos conterem reductases – tioredoxina dependente do NADPH que catalisam a redução de MetSox (sulfóxido de metionina) a metionina (3, 22, 26).

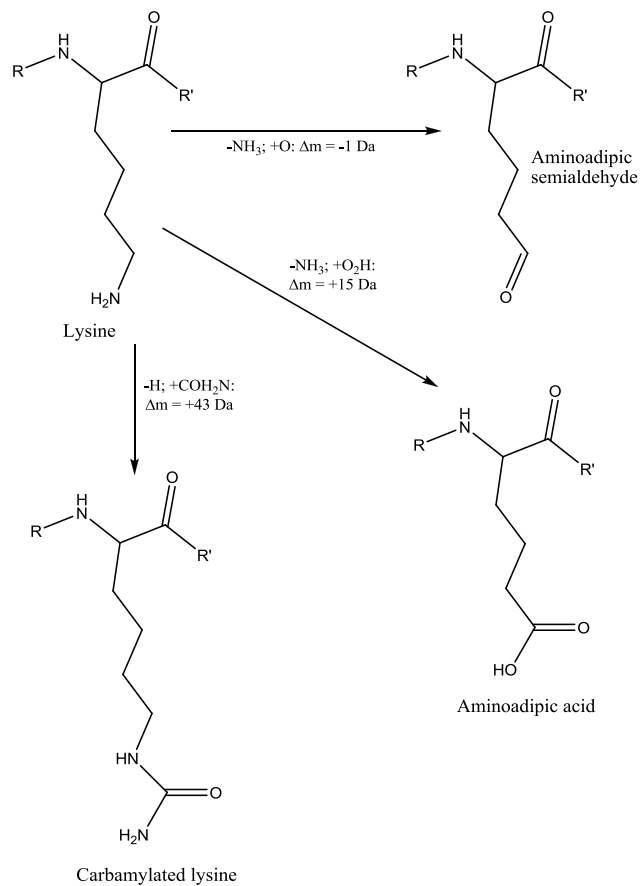
O esquema seguinte, retirado de Xu 2007, representa o consenso encontrado na literatura sobre o mecanismo de oxidação da metionina. Numa reação com o HO•, a primeira reação é de adição ao átomo de enxofre, originando um radical hidroxilo sulfuranilo (1). Este radical abstrai um O₂, perdendo um radical hidroperóxido HO•₂, e originando o sulfóxido de metionina MetSOX (+16 Da) (2). Sob condições oxidativas persistentes, o MetSOX poderá ser convertido a sulfona de metionina (+32Da), ou sofrer oxidação através de uma abstração de um hidrogénio, originando um radical centrado no carbono. Este radical, por incorporação de uma molécula de O₂ origina um aldeído (-32Da) (2).



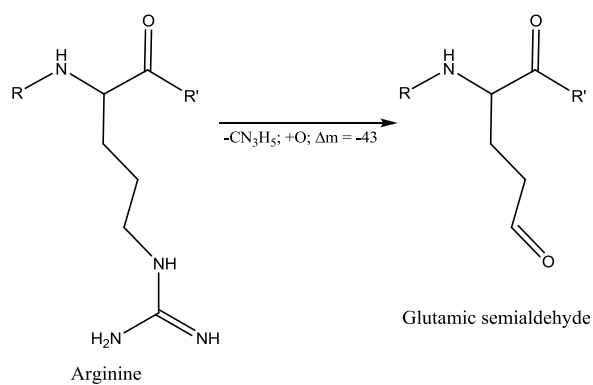
Esquema 8 – Oxidação da metionina (retirado da referência (23))

Resíduos Básicos

Os resíduos com caráter básico (Lys, Arg, His) também são muito suscetíveis a modificações oxidativas, principalmente à adição de grupos carbonilo nas suas cadeias laterais (23). No caso da lisina (esquema 9), os ataques por radicais hidroxilo poderão ser efetuados em qualquer um dos carbonos ou no grupo amina da cadeia lateral. Ataques aos carbonos originam lisinas hidroxiladas, e no caso de o ataque ser efetuado no carbono ϵ , o produto hidroxilado é muito instável e origina o semialdeído aminoadípico por perda de uma amónia (2). O produto mais característico da oxidação do resíduo de arginina é o γ -semialdeído glutâmico (esquema 10). O radical hidroxilo abstrai um hidrogénio do carbono δ da cadeia lateral e adiciona um O_2 para formar um radical peróxido intermédio. As reações subsequentes levam à perda do grupo guanidina e à formação do semialdeído glutâmico (2).



Esquema 9 – Oxidação da lisina (retirado da referência (23))



Esquema 10 – Oxidação da arginina (retirado da referência (2))

Carbonilação

A carbonilação proteica é dos processos de oxidação mais comuns e extensivamente estudados (27), que poderá levar a uma inativação parcial ou total da proteína (28). Trata-se de um processo irreversível de oxidação onde são introduzidos grupos carbonilos (cetonas e aldeídos reativos) nas cadeias laterais dos aminoácidos (27), em particular por MCO (oxidação catalisada por metais) de aminoácidos específicos (29). Nos esquemas 9 e 10 estão exemplificadas introduções de grupos carbonilo nos aminoácidos lisina e arginina. As proteínas carboniladas não são reparadas, sendo removidas por degradação proteolítica ou acumulando-se como proteínas danificadas no organismo (3). O processo de integração dos grupos carbonilos nas proteínas *in vivo* pode ocorrer por 2 formas diferentes: a) por oxidação direta das cadeias laterais ou por clivagem oxidativa do *backbone* proteico (oxidação da cadeia lateral do glutamilo pela via da α -amidação (22, 26)); b) pela introdução de aldeídos provenientes da peroxidação lipídica ou de produtos de glicação avançados a resíduos de Cisteína, Histidina, Lisina ou arginina (28).

O número de carbonilos presentes numa proteína indica a extensão dos danos oxidativos causado pelo stress oxidativo, sendo por isso utilizado como um marcador de oxidação proteica (3). Trata-se de um marcador fiável pelo facto de os grupos carbonilos estarem presentes em níveis muito baixos em condições normais (~1 grupo carbonilo a cada 3000 aminoácidos) (7), e, sob condições de stress oxidativo, sofrerem aumentos significativos (30, 31).

2.2. Consequências da Oxidação Proteica

A acumulação de proteínas oxidadas deve-se ao aumento dos níveis de ROS/RNS, a uma diminuição das capacidades antioxidantes ou a uma diminuição na habilidade das proteases em degradar as proteínas oxidadas (26). Vários trabalhos desenvolvidos sugerem que o envelhecimento e doenças degenerativas associadas se relacionam com condições de stress oxidativos elevadas, e um conseqüente nível elevado de proteínas oxidadas. A persistência de danos oxidativos prolongados em proteínas durante o processo de envelhecimento leva à formação de fragmentos e interligações proteicas que se tornam

progressivamente resistentes à digestão proteolítica, atuando como inibidores irreversíveis do proteasoma 20S (26, 32, 33). Já foi demonstrado, *in vivo*, que os cross-links proteicos provocam a inibição do proteasoma (34), e que proteínas modificadas por glicação ou produtos da peroxidação lipídica apresentam resistência à proteólise (35). As modificações oxidativas que ocorrem em enzimas também apresentam consequências a nível metabólico, através da inibição das suas atividades (36). Esta inibição da atividade enzimática tem consequências importantes ao nível do metabolismo sistémico ou celular, dependendo do número de moléculas modificadas e da cronicidade da modificação (7). A oxidação proteica também já foi associada a doenças de ordem cardiovascular (37), e à neurodegeneração (36, 38). Na figura 2 estão representadas as interligações entre a oxidação de biomoléculas, e as suas consequências em desordens associadas ao envelhecimento.

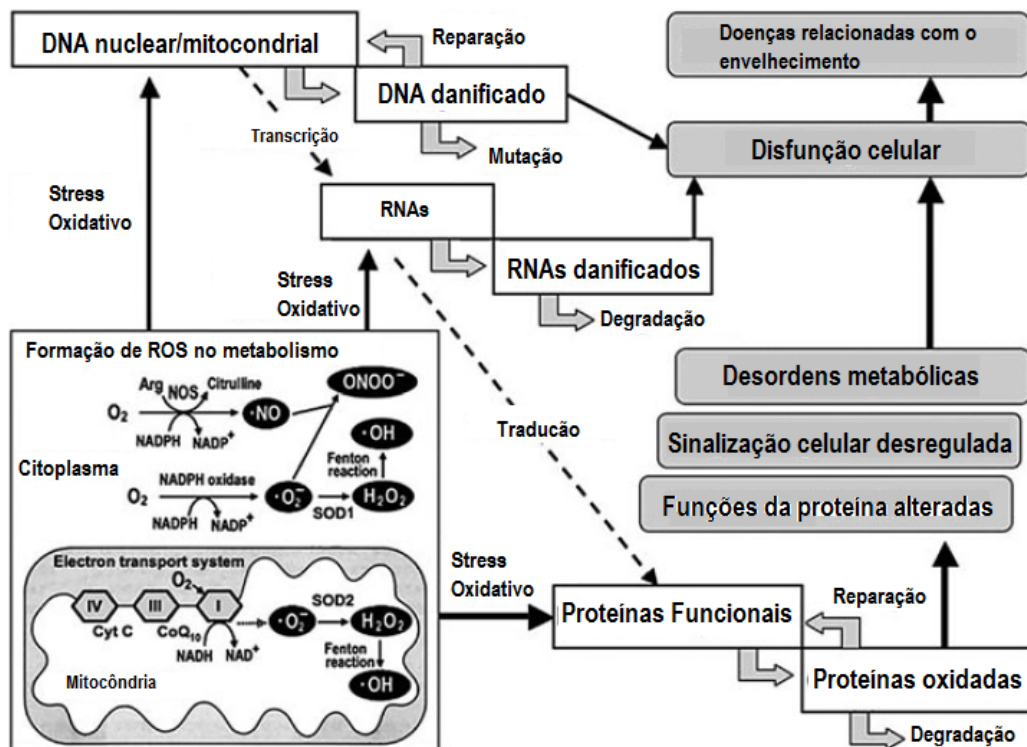


Figura 5 – Modificações oxidativas de biomoléculas por espécies reativas de oxigénio implicadas no processo de envelhecimento e em patologias associadas (retirado da referência (39)). Legenda: ROS – Reactive Oxygen Species; RNS – Reactive Nitrogen Species; Cyt C – citocromo c; SOD 1 – Superóxido Dismutase 1; SOD 2 – Superóxido Dismutase 2; NOS – Nitric Oxide Synthase.

3. Albumina

A albumina do soro, uma das proteínas mais abundantes em mamíferos, é uma proteína monomérica, sintetizada no fígado e exportada para o plasma na forma não glicosilada (40, 41). A sua concentração no plasma varia entre os 35-50g/L, contribuindo significativamente para a manutenção da pressão osmótica (40, 41) e para a distribuição de fluídos entre compartimentos corporais (41). Em condições normais, esta proteína possui um tempo de meia vida de 20 dias e a sua concentração no plasma é mantida através da regulação da sua síntese no fígado e do seu catabolismo (42). A sua grande capacidade de ligação a vários ligandos permite o armazenamento e/ou transporte de vários metabolitos, nutrientes e outras moléculas, como ácidos gordos, iões metálicos, colesterol e drogas (40, 41, 43, 44). Grande parte das propriedades antioxidantes do plasma deve-se à ação da albumina, um dos antioxidantes mais importantes a circular no plasma (42). As suas propriedades antioxidantes advêm principalmente da sua capacidade de ligação a iões metálicos como o Cu (II), impedindo-os de participar em reações com oxigénio ou peróxido de hidrogénio para formar ROS, e da sua capacidade de sequestrar radicais livres do soro (45). Estruturalmente, esta função da albumina deve-se a alguns resíduos com atividades antioxidantes. O seu resíduo de cisteína livre constitui um sítio altamente reativo, e na sua forma reduzida é capaz de sequestrar radicais hidroxilo (46). As suas seis metioninas, através dos ciclos de oxidação-redução, contribuem também para retirar ROS da circulação (47).

3.1. Albumina do Soro Bovina

As estruturas, funções e propriedades de diversas albuminas do soro já foram extensivamente estudadas, principalmente para compreender as suas interações com outras moléculas e ligandos (43, 48, 49). Entre as diferentes albuminas, a de origem bovina (BSA – *bovine serum albumin*) é a mais utilizada como proteína modelo devido ao seu baixo custo, alta acessibilidade e à grande homologia que apresenta relativamente à albumina humana (76%) (50). Em conjunto com a albumina humana, a BSA foi a primeira sequência primária determinada nos anos 70 por Brown (51). Esta proteína monomérica tem 66kDa e

583 aminoácidos na forma segregada (69kDa e 607 aa na forma precursora – Figura 6), contendo 34 cisteínas que formam 17 pontes dissulfídicas (41, 52).

A única cisteína livre encontra-se na posição 34, sítio reativo capaz de sofrer tiolação (BSA-S-S-R) e nitrosilação (BSA-S-NO) (41, 49). A albumina possui ainda um local de ligação ao Cu (II) no seu N-terminal ($K_a \sim 10^{12}M^{-1}$). A estrutura terciária da BSA (53) é globular e organizada em três domínios homólogos. A estrutura secundária é predominantemente em α -hélice (68%) e sem folhas β (41, 48). Os domínios são denominados por I, II e III a contar do terminal amina, e cada um divide-se ainda em subdomínios A e B (52).

10	20	30	40	50	60
MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	FSQYLQQC PF
70	80	90	100	110	120
DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCEKQEP
130	140	150	160	170	180
ERNECFLSHK	DDSPDLPLK	PDPNTLCDEF	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY
190	200	210	220	230	240
ANKYNGVFOE	CCQAEDKGAC	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA
250	260	270	280	290	300
RLSQKFPKAE	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350	360
CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL	GSFLYEYSRR
370	380	390	400	410	420
HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAKDDPH	ACYSTVFDKL	KHLVDEPQNL	IKQNCDOFEK
430	440	450	460	470	480
LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVVK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV

STQTALA

Figura 6 – Sequência primária do precursor da BSA com 607 aminoácidos. Os aminoácidos a azul representam o propéptido (1-24), a vermelho o domínio I (25-209), a amarelo o domínio II (210-402) e a verde o domínio III (403-600) (código uniprot P02769).

3.2. Modificações Estruturais da Albumina

Durante a sua existência no organismo, uma molécula de albumina atravessa a corrente sanguínea cerca de 15000 vezes, ficando suscetível a sofrer danos que afetem a sua estrutura e principalmente a sua atividade biológica (44). Como a albumina é a proteína mais abundante do plasma, é facilmente atacada e oxidada por parte dos ROS (42, 44). Pode também reagir com produtos resultantes da peroxidação lipídica com os seus resíduos de lisinas ou argininas, contribuindo para que ocorram alterações na sua estrutura (42). Ischiropoulos et. al, (54), por exemplo, estudou as reações da BSA com o peroxinitrito, verificando que estas levavam à oxidação dos resíduos de triptofano e cisteína, à nitração da tirosina, à formação de carbonilos reativos e à fragmentação da proteína. Hidalgo e Zamora (55) estudaram o efeito da reação de um produto de peroxidação lipídica com os resíduos de lisina da BSA, demonstrando que estas reações levam a modificações da proteína a nível da estrutura primária, secundária e terciária. Como a BSA é utilizada correntemente como proteína modelo neste tipo de estudos, a maior parte das alterações estruturais relacionadas com este tipo de reações já se encontram descritas na literatura (56-59).

In vivo, as modificações mais recorrentes da albumina são verificadas em indivíduos com diabetes tipo II, onde os altos níveis de glucose promovem a ligação não enzimática de moléculas de glucose a grupos amina livres da albumina (glicação) (42, 44, 45, 60, 61). Associadas aos produtos da glicação encontram-se possíveis reações de oxidação que poderão ocorrer em simultâneo ou combinadas com a glicação (glicoxidação) (62). A proteína glicoxidada poderá sofrer rearranjos de Amadori, levando à acumulação de produtos de glicoxidação avançados (*Advanced Glycoxidation End products* – AGEs) (62). A ocorrência das ligações de glucose à albumina aumenta duas a três vezes numa situação de hiperglicemia (42). Os níveis de ferro e cobre em pacientes com diabetes são também elevados e, segundo Dean et. al, na presença de albumina glicada, poderão levar à formação de radicais livres, espécies que induzem a degradação oxidativa da proteína. Os níveis elevados de albumina glicada e de AGEs estão também associados a complicações vasculares como retinopatia, nefropatia, neuropatia ou doença coronária arterial (45).

Como descrito, as capacidades antioxidantes da albumina relacionam-se maioritariamente com a sua estrutura, abundância e com o seu resíduo de cisteína livre. No

entanto, com o desenvolvimento de patologias que levem à acumulação de alterações estruturais resultantes de modificações não enzimáticas pós-tradução, as suas funções antioxidantes ficam comprometidas (44).

4. Proteólise – clivagem de proteínas

A proteólise consiste na hidrólise enzimática de ligações peptídicas de proteínas e péptidos e, *in vivo*, representa um processo importante nos organismos, pois auxilia na regulação das concentrações de proteína nas células. As enzimas responsáveis por esta hidrólise são as peptidases (ou proteases). Devido à sua grande variedade e à alta seletividade que apresentam para zonas específicas das cadeias peptídicas, as peptidases são classificadas pela IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) de acordo com o tipo de reação que catalisam: endopeptidases, ómega-peptidases, exopeptidases, aminopeptidases, carboxipeptidases, dipeptidil-peptidases, tripeptidil-dipeptidases, peptidil-dipeptidases e dipeptidases. Esta classificação, apesar de útil, é trivial e não consegue detalhar as especificidades de cada peptidase (63). O método de classificação mais recente foi introduzido por Rawlings e Barrett (64) em 1994, onde as peptidases são classificadas de acordo com a sua homologia e estrutura molecular em famílias e clãs. A classificação baseia-se na homologia entre estruturas primárias e terciárias e encontra-se organizada hierarquicamente numa base de dados denominada por MEROPS (64-66). Cada família e clã são ainda divididos consoante o tipo catalítico (grupo funcional que confere a atividade catalítica) das peptidases que as constituem. A distinção é feita com a utilização dos marcadores “A” (ácido aspártico - carboxilo), “C” (cisteína – tiol), “M” (metal – grupo prostético), “S” (serina), “P” (tipo catalítico variado) e “U” (tipo desconhecido) (67), e foi baseada no trabalho de Hartley em 1960 (68). Uma família inclui peptidases com sequências de aminoácidos homólogas no domínio catalítico e a sua denominação é feita com a letra correspondente ao tipo catalítico, seguida de um número arbitrário. Um clã inclui grupos de famílias onde apenas as estruturas terciárias permitem afirmar que descenderam de um ancestral comum e a sua denominação é feita com duas letras: a primeira representa o tipo catalítico das famílias que o constituem (apenas a letra “P” é utilizada para um clã que contém famílias com diferentes tipos catalíticos – serina,

treonina e cisteína) (64, 65, 69). A tripsina, por exemplo, é uma peptidase de serina (SP), pertencendo à família S1 do clã PA. Os princípios catalíticos das diversas peptidases são semelhantes, sendo a hidrólise da ligação peptídica uma reação de adição-eliminação envolvendo um intermediário tetraédrico (67). No entanto, o mecanismo catalítico das peptidases de serina e treonina utiliza um resíduo do seu sítio catalítico como nucleófilo da reação, enquanto o mecanismo das peptidases aspárticas e das metalopeptidases utiliza uma molécula de água como nucleófilo (67, 70).

Cerca de um terço das peptidases conhecidas são peptidases de serina (família S1), cuja maioria são endopeptidases que hidrolisam as ligações no meio da cadeia polipeptídica. Este tipo de enzimas possui um mecanismo catalítico dependente do grupo hidroxilo do resíduo de serina do seu sítio catalítico, que atua como o nucleófilo responsável pelo ataque inicial à ligação (70). O sítio catalítico das SP é constituído por resíduos estruturalmente conservados e indispensáveis à sua atividade enzimática. Estes resíduos são a Histidina, Aspartato e Serina, e são denominados como tríade catalítica (71, 72). As proteases de serina que possuem esta tríade catalítica (tríade catalítica “clássica”) têm um mecanismo de ação semelhante. O mecanismo catalítico das peptidases de serina (Figura 7) inicia-se com um ataque nucleofílico do grupo OH da serina ao átomo de carbono do grupo carbonilo da ligação peptídica (67). Este ataque é mediado pela histidina do sítio catalítico, que atua como base aceitadora do protão do nucleófilo (73). O carbono atacado coordena-se, formando o intermediário tetraédrico e o íon imidazólio (reação de adição). O intermediário tetraédrico quebra-se e origina uma enzima acilada, uma base imidazol e um produto amina (reação de eliminação). Durante este passo de acilação, o grupo imidazol transfere o protão do grupo hidroxilo para o produto amina. A enzima acilada é então desacilada por uma reação reversa, com a exceção de o ataque nucleofílico ser efetuado por uma molécula de água em vez do resíduo de serina (67, 70, 74). Durante a hidrólise, os intermediários tetraédricos são estabilizados por ligações de hidrogénio entre um oxianião do intermediário e o oxigénio do grupo carbonilo (70).

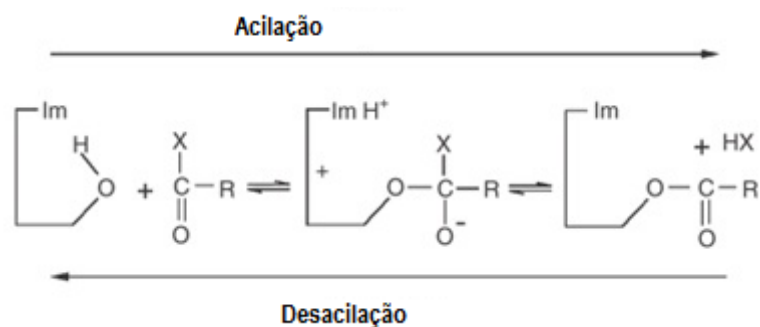


Figura 7 – Mecanismo catalítico das peptidases de serina. Na acilação, X significa grupos OR, e OH na desacilação. (retirado da referência (67))

De modo a definir as interações entre a enzima e o substrato, Schechter e Berger (75) desenvolveram um sistema de denominações no qual os sítios da ligação são divididos em sub-sítios a partir da ligação peptídica a hidrolisar. Os sub-sítios da enzima são numerados a partir do sítio ativo S_1 como S_1 - S_n na direção do terminal N, e S_1' - S_n' na direção do terminal C (70). Cada sub-sítio interage com os resíduos de aminoácidos do substrato peptídico correspondentes - P_1 - P_n e P_1' - P_n' . O sub-sítio S_1 e o resíduo P_1 são os principais determinantes da especificidade de uma peptidase de serina para com o substrato peptídico (especificidade primária). Os aminoácidos presentes no sub-sítio S_1 ditam a preferência por determinado resíduo P_1 com o qual estabelece interações mais eficientes (76). No caso da tripsina, a preferência estabelece-se por resíduos P_1 carregados positivamente como as argininas e lisinas.

Em proteômica, as peptidases são regularmente utilizadas na preparação de amostras para análises por espectrometria de massa. A clivagem enzimática das proteínas traz algumas vantagens como a alta especificidade, as poucas reações secundárias e a boa eficiência de clivagem que as enzimas promovem. No entanto, é sempre necessário otimizar os parâmetros de digestão utilizados, com especial atenção para o tampão utilizado, o rácio de enzima:substrato, o pH, temperatura e o tempo de digestão (77). O processo de digestão de proteínas a péptidos é útil quando se pretende efetuar mapeamentos, sequenciações, estudos de estruturas e funções, ou quantificação de proteínas. A peptidase mais utilizada em proteômica é a tripsina, uma peptidase de serina formada pela clivagem do seu precursor inativo tripsinogénio. A tripsina possui 231 aminoácidos, uma massa molecular com cerca de 24000Da e um pH ótimo de 7-9. Esta

enzima possui alta especificidade e cliva as ligações peptídicas depois do grupo carboxílico dos resíduos positivos de lisina e arginina, exceto se estes precederem um resíduo de prolina (78). Esta especificidade deve-se à ação dos resíduos de aspartato (Asp189), e de duas glicinas (Gly216 e Gly 226) que originam uma zona de carga negativa no sub-sítio S1. Esta zona atrai e estabiliza as cargas positivas dos resíduos de lisinas e argininas (76). Krieger, em 1974 (79), explicou detalhadamente as mudanças estruturais e as ligações específicas que a tripsina efetua com os seus substratos. Nesse trabalho foi utilizado um modelo de BA-tripsina (tripsina inibida por benzamidina) que revelou ser um modelo apropriado para mimetizar as interações com substratos reais (resíduos de lisina e arginina). Devido à distribuição biológica dos resíduos de lisina e arginina, especialmente em proteínas solúveis, os péptidos originados por digestão com a tripsina possuem tamanhos adequados a análises por MS (77, 80). Além da tripsina são utilizadas outras endopeptidases, sendo que a sua escolha depende do tipo de péptidos que se pretende obter (Tabela 2).

Tabela 2 – Vários tipos de endopeptidases utilizadas em análises de proteínas baseadas na espectrometria de massa (retirado da referência (80))

Endopeptidase	Tipo	Especificidade	Gama de pH
Tripsina	Serina	R, K	1.5 - 8.5
Quimotripsina	Serina	Y, F, W	7.5 - 9.0
Glu C	Serina	D, E	7.5 - 8.5
Lys C	Serina	K	7.5 - 8.5
Elastase	Serina	A, V, I, L, G	8.0 - 9.0
Subtilisina	Serina	Maioria dos aminoácidos	7.0 - 11.0
Proteinase K	Serina	Aminoácidos hidrofóbicos	7
Trombina	Serina	R	7.5
Fator X	Serina	I-E-G-R	8.3
Arg C	Cisteína	R	7.5 - 8.5
Papaína	Cisteína	R, K, G, H, Y	7.0 - 9.0
Asp N	Metal	D (Terminal N)	6.0 - 8.0
Termolisina	Metal	Aminoácidos hidrofóbicos	7.0 - 9.0
Pepsina	Aspártica	F, M, L, W	2.0 - 4.0

A proteinase K (proK) foi a outra enzima utilizada neste trabalho. Esta enzima é também uma peptidase de serina, produzida pelo fungo *Tritirachium album* Limber e descoberta em 1974 por Ebeling (81). Esta enzima pertence à família S8 do clã SB e, fazendo parte das peptidases semelhantes à subtilisina. A proK não é tão específica como a tripsina, tendo até uma ampla gama de ação, clivando ligações do terminal C de resíduos alifáticos e aromáticos (hidrofóbicos), especialmente a alanina. A enzima tem uma massa molecular de 28930 Da e um pH ótimo de 7-9 (78). A especificidade da proK é determinada em grande parte pela ação de duas cadeias peptídicas nas posições 99-104 e 132-136, que fornecem o caráter hidrofóbico aos sub-sítios de ligação ao polipéptido (82). A sua cavidade S1 é grande e alongada, minimizando possíveis restrições de tamanho das cadeias laterais que acomoda. Este facto é também responsável pela baixa especificidade da enzima (83). No entanto, a preferência dirige-se para grupos grandes e hidrofóbicos na posição P1 do péptido (84). O seu sítio ativo é constituído pela tríade catalítica “clássica” Asp38-His68-Ser221 (83).

5. Análise de Proteínas por Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS) é uma ferramenta versátil e indispensável no campo da proteómica. A sua alta sensibilidade e eficácia permitem a análise de proteínas ao nível dos nanogramas e com erros de massa relativamente pequenos (menos de 10 ppm) (85). Um espectrómetro de massa determina os rácios massa/carga (m/z) de iões em fase gasosa. O funcionamento básico de um espectrómetro de massa consiste na conversão das moléculas a iões gasosos numa fonte de ionização, na separação dos iões consoante os seus m/z no analisador e na deteção do número de iões a cada valor de m/z no detetor (86). Esta ferramenta começou a ser utilizada correntemente em análises proteómicas após o desenvolvimento das técnicas de ionização de electrospray (ESI – *Electrospray ionization*) (87, 88) e de MALDI (ionização/desorção laser assistida por matriz – *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (89), que permitiram uma ionização menos destrutiva de péptidos e proteínas. No entanto, o componente mais importante do espectrómetro é o analisador, pois permite a sua separação com base nos m/z . As trapas de iões, o Orbitrap, e os quadropolos (Q) separam os iões com base na estabilidade dos iões, o ICR (*ion cyclotron resonance* – ressonância ciclotrónica de iões) na ressonância ciclotrónica, e os analisadores TOF (*time*

of flight) pelo tempo de voo (90). Atualmente já foram desenvolvidos instrumentos híbridos que combinam as capacidades de vários analisadores. Estes instrumentos também permitem a realização de análises de espectrometria de massa *tandem*, isto é, a análise de iões previamente separados por MS. Assim é possível isolar o ião que se pretende analisar (ião precursor), fragmentá-lo e analisar os iões produzidos (91).

A eficácia de uma análise proteómica por MS é altamente dependente de tecnologias de separação que permitam separar as proteínas de amostras muito complexas. As abordagens mais comuns baseiam-se na separação das proteínas/péptidos por eletroforese bidimensional ou cromatografia em fase líquida, antes da análise espectrométrica (92). Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com os seus pontos isoelétricos e peso molecular, sendo posteriormente coradas e digeridas no gel. Os péptidos resultantes são extraídos do gel e são analisados por MS (93). No entanto, as separações em gel apresentam algumas limitações relacionadas com baixa sensibilidade, linearidade de deteção e reprodutibilidade de géis (94). A separação por LC perfila-se como uma boa alternativa, pois permite a separação ao nível dos péptidos resultantes da digestão proteolítica, com base em outras propriedades como a carga ou a hidrofobicidade (95), aumentando a sensibilidade e seletividade da separação (96). Existem duas estratégias principais na análise de proteínas por MS: a abordagem *bottom-up* (Figura 8) e a *top-down* (86).

A abordagem *bottom-up* é a mais utilizada e consiste na digestão das proteínas com peptidases específicas (tripsina, pepsina, proteinase K, endopeptidase Asp-N, por exemplo), seguindo-se uma separação e sequenciação de péptidos por LC-MS/MS utilizando a dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*) (4). Os espectros obtidos são depois comparados com espectros criados *in silico* de proteínas em bases de dados bioinformáticas (27) como a Swiss-Prot ou as bases disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), interpretados automaticamente utilizando *software* apropriado, ou analisados manualmente (4). O desenvolvimento de métodos de fragmentação em fase gasosa ECD (97) (*Electron Capture Dissociation*) para a espectrometria de massa FT-ICR (*Fourier-Transform-ion Cyclotron Resonance*), e ETD (98) (*Electron Transfer Dissociation*) para a espectrometria de massa com trapa quadropolar constituem importantes métodos complementares ao CID. Com este tipo de métodos de fragmentação são ultrapassadas as limitações inerentes à utilização do CID,

como altas abundâncias de picos resultantes de perdas neutras, ou os diferentes padrões de dissociação causados por modificações de cadeias laterais. No entanto estes métodos de fragmentação também apresentam as suas limitações e a sua aplicação é vantajosa em relação ao CID apenas para péptidos longos e carregados ($z > +2$) (4).

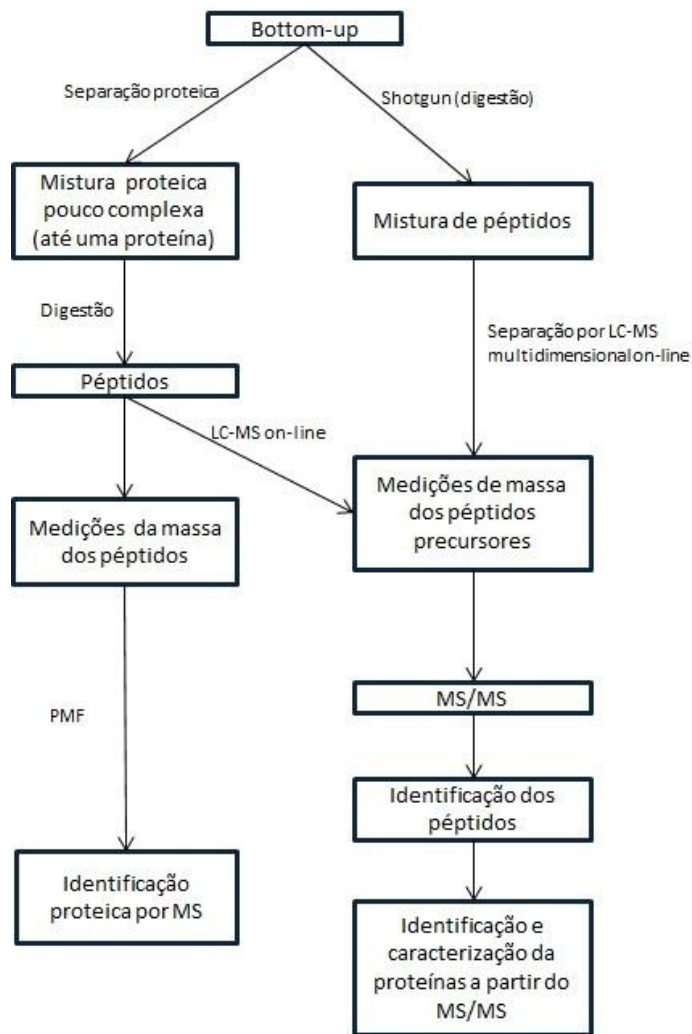


Figura 8 – Estratégia bottom-up para a identificação e caracterização de proteínas por MS. (retirado da referência (86))

5.1. Digestão Enzimática das Proteínas – Digestão *in gel*

A maior parte dos estudos proteómicos utilizam passos de separação das proteínas por electroforese em gel, especialmente quando as amostras são misturas complexas de proteínas (80). A utilização de géis tem várias vantagens em relação às restantes

abordagens, principalmente porque permite uma maior gama de análise do proteoma/mistura proteica, remove impurezas de baixo peso molecular presentes na amostra e pelo facto de a matriz de poliacrilamida permitir o armazenamento de quantidades de proteína ao nível dos femtomoles (99). Para submeter as proteínas separadas a uma análise por espectrometria de massa é necessário efetuar a sua clivagem através de digestão enzimática ou de clivagem química (80), sendo que a clivagem com peptidases é a mais utilizada (77). Neste sentido as proteínas terão de ser digeridas quer no próprio gel (*in gel*) e os péptidos resultantes extraídos do gel, ou em solução, separando as proteínas previamente com a utilização da cromatografia líquida (Figura 9) (100).

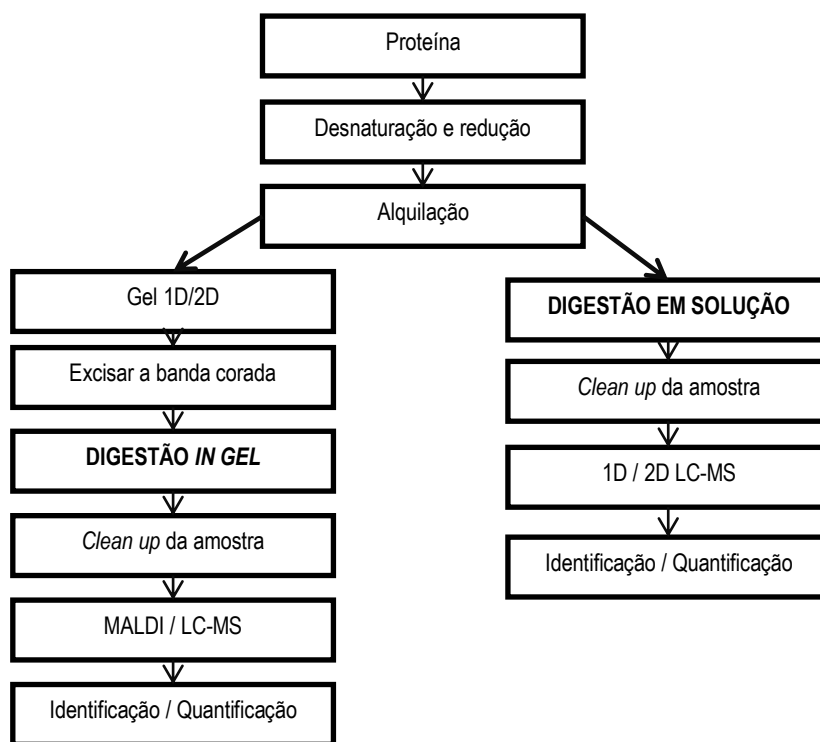


Figura 9 – Os dois tipos de digestão proteica mais comuns em análises de proteínas por MS (retirado da referência (100)).

A digestão em gel permite que as proteínas sejam degradadas em fragmentos específicos que se ajustam à gama de pesos moleculares mais adequada nos analisadores de massa (80), sendo uma metodologia de rotina quando se separam proteínas por gel. O procedimento implica várias etapas (80) (Figura 10), sendo que a primeira é a excisão das bandas do gel, manualmente ou com a utilização de kit's comerciais de “*gel spot pickers*” (77).

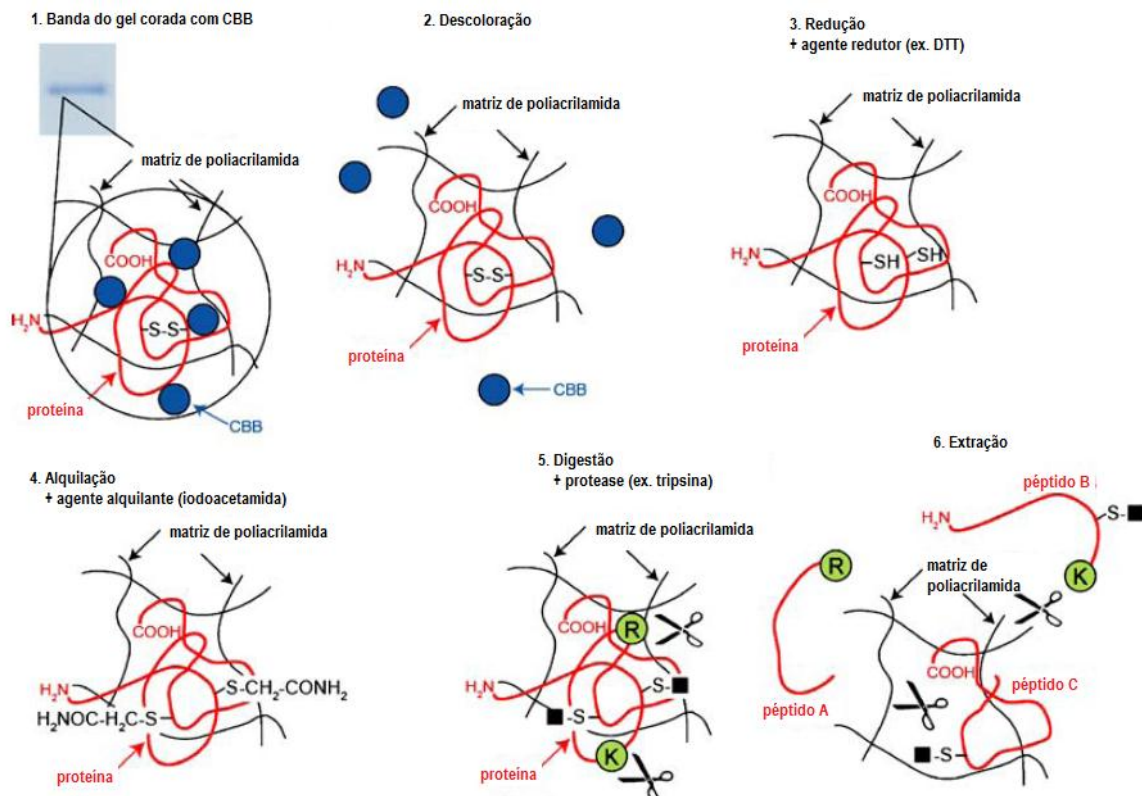


Figura 10 – As etapas de um procedimento de digestão *in gel*. (retirado da referência (100))

Posteriormente as bandas são submetidas a um procedimento de descoloração, normalmente por incubação com misturas de solventes orgânicos e tampões (80). Aqui as moléculas do corante, bem como os excessos de detergente indesejáveis são removidos. Este passo é muito importante, pois as ligações entre o grupo de ácido sulfônico de corantes como o Coomassie aos resíduos básicos da proteína poderão influenciar a eficiência da digestão enzimática. Após a descoloração do gel, também pode ser efetuada a redução das ligações dissulfídicas e a alquilação dos resíduos de cisteína, de modo a melhorar a detecção de péptidos com cisteínas, aumentando as taxas de cobertura obtidas. Ainda antes da adição da enzima às bandas, estas terão de ser desidratadas através de várias lavagens com acetonitrilo (ACN) para promover o máximo *uptake* de enzima por parte do gel quando for re-hidratado com a solução de enzima (77). Após o período de incubação com a enzima, é necessário extrair os péptidos do gel através de difusão passiva, utilizando solventes orgânicos e ácidos, normalmente ACN/ácido trifluoroacético ou ACN/ácido fórmico (77).

Durante este procedimento, existem vários fatores decisivos que irão influenciar a qualidade dos espectros obtidos, como a eficiência da digestão, a eficiência da extração dos péptidos do gel, o manuseamento da amostra, as possíveis perdas durante o procedimento da digestão, ou contaminações com outras proteínas (77, 80).

5.2. Quantificação de Proteínas por Espectrometria de Massa

A proteômica quantitativa pode ser dividida em duas abordagens principais: utilização de marcação com isótopos estáveis ou técnicas sem marcação (*label-free*) (101). A abordagem de marcação com isótopos estáveis é a mais utilizada na quantificação e baseia-se na introdução de isótopos não radioativos (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) em péptidos e proteínas (93). A marcação pode ser efetuada quimicamente com reagentes específicos, (iTRAQ- *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation* (102); ICAT - *Isotope-Coded Affinity Tag* (103)), enzimaticamente (marcação com $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$), ou metabolicamente (SILAC - *Stable isotope labeling with amino acids in cell culture* (104)). Aqui, o iTRAQ tem a vantagem de permitir a análise simultânea de várias amostras. Este método utiliza reagentes isobáricos que marcam as aminas primárias de péptidos até oito amostras diferentes (92, 93, 105). Os péptidos marcados são então separados e analisados por LC-MS/MS (105). A particularidade deste método baseia-se no facto de o reagente iTRAQ, após a fragmentação no CID, libertar um ião repórter. As combinações de isótopos pesados introduzidos no grupo marcador têm a finalidade de a massa do ião precursor ser a mesma para todos os reagentes, mas cada um originar um ião repórter de massa diferente (93). As intensidades dos picos destes iões repórter são utilizadas para quantificar a abundância relativa dos péptidos e proteínas que os originaram (105). Na técnica de marcação ICAT, o reagente utilizado consiste de 3 partes diferentes: um composto reativo com tióis, um *linker* com isótopos leves ou pesados e um *tag* de biotina (106). Para uma comparação quantitativa de dois proteomas, os grupos tióis de uma amostra são marcados com a versão leve do reagente e os tióis da outra amostra com a versão pesada, sendo as proteínas misturadas e digeridas posteriormente. Os péptidos marcados são isolados por cromatografia de afinidade com a avidina, submetidos a 2D-LC-MS e quantificados pela integração das áreas dos picos dos cromatogramas dos iões extraídos (XIC – *extracted ion chromatograms*) para cada péptido (94). O facto de apenas os grupos tióis serem marcados

com este reagente traz a vantagem de a complexidade da amostra ser simplificada significativamente, tornando a análise mais fácil e permitindo a quantificação de proteínas de baixa abundância (93). No entanto, também constitui a grande desvantagem do método, visto que proteínas sem cisteínas não podem ser marcadas e quantificadas (94). A técnica de marcação metabólica SILAC, por seu lado, é efetuada *in vivo*, onde são introduzidos aminoácidos essenciais marcados com isótopos em meios de cultura. Durante o seu crescimento, as células incorporam esses aminoácidos nas suas proteínas, e após alguns ciclos de duplicação, grande parte das proteínas encontram-se marcadas (107, 108). A identificação e quantificação são efetuadas posteriormente por análise dos péptidos, comparando os picos de péptidos marcados e não marcados (93). Apesar de estas técnicas serem precisas na quantificação de abundância proteica, possuem limitações relacionadas com os altos custos dos isótopos, e requerem peritos e software específico na análise dos dados obtidos (101). Complicações técnicas, como a alta dependência da eficiência da marcação, e a capacidade limitada de quantificar várias amostras, constituem ainda problemas a ultrapassar (109).

Os métodos sem marcação (LFQP – *Label Free Quantitative Proteomics*) têm vindo gradualmente a ganhar mais relevância, providenciando uma capacidade de análise de milhares de proteínas em misturas complexas (109-111). Hains e colaboradores (112), por exemplo, na análise de resíduos de cisteína oxidados nas cataratas, utilizaram técnicas de quantificação sem marcação. A abordagem LFQP é mais rápida e mais sensível que os métodos com marcação, é automatizada, e capaz de análises de larga escala do proteoma (109). Existem duas estratégias implementadas na quantificação com esta metodologia: contagem de espectros ou medições da intensidade dos picos cromatográficos (101, 109). O método de contagem de espectros baseia-se no facto de os péptidos mais abundantes, aquando da fragmentação, irem produzir um maior número de espectros MS/MS. Este número é proporcional à abundância do péptido na amostra. A partir do índice de abundância proteica na sua forma exponencial (emPAI – *protein abundance index*), retira-se uma relação diretamente proporcional entre o PAI e a quantidade de proteína (101). Liu *et al.* (113) demonstrou que este método possui uma correlação linear muito grande com a abundância relativa de proteína. As vantagens desta abordagem baseiam-se no facto de não serem necessários ferramentas ou algoritmos muito sofisticados, e à sua facilidade de implementação. No entanto, serão sempre necessárias normalizações e análises estatísticas

dos conjuntos de dados da contagem, e o facto de o método não retirar toda a informação disponível dos picos ao nível do LC-MS, leva a que seja pouco eficiente (114, 115). O método de contagem de espectros tem sido cada vez mais utilizado em diversos trabalhos. Rao et. al (116), por exemplo, utilizou o método da contagem de espectros na quantificação de proteínas da saliva na identificação de potenciais biomarcadores da diabetes tipo II. Por seu lado, o método da medição de intensidades baseia-se na medição das áreas dos picos cromatográficos de todos os péptidos na corrida de LC-MS. A correlação linear da área do pico e da concentração do péptido é alta ($r^2=0,991$) para concentrações de 10 fmol-100pmol (101, 114, 117). O processo de quantificação envolve a medição das abundâncias de iões a um tempo de retenção específico para os péptidos ionizados, sem a utilização de um padrão (101). Esta é uma abordagem prática de quantificação relativa, no entanto são necessários alguns cuidados. A resolução dos picos de LC, variações biológicas que resultem em sinais múltiplos para o mesmo péptido, bem como variações técnicas nos tempos de retenção, intensidade do MS e interferências químicas no *background* da amostra, são alguns dos aspetos em ter em conta (101). Consequentemente, os dados obtidos por este método têm de ser submetidos a processos de alinhamento de tempos de retenção, supressão de interferências no *background*, e normalizações das abundâncias dos picos (118).

Apesar do crescendo evidenciado por estas metodologias, a técnica sem marcação mais promissora e eficaz de quantificação é a MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) (119). Utilizando o espectrómetro de triplo quadropolo, no primeiro quadropolo o ião de interesse é selecionado e induzido a fragmentar na célula de colisões. De seguida, são medidas as intensidades dos iões de transição (originados pela fragmentação do precursor) no último quadropolo, e convertidas a concentrações (120). Esta análise e monitorização de iões específicos de interesse aumentam o limite mínimo de deteção de péptidos em cerca de 100 vezes (119). Com a utilização deste método são determinadas especificidades estruturais do analito, e, quando acoplado a padrões internos marcados isotopicamente (SISs – *Stable Isotope-labeled internal Standards*), pode fornecer quantificações absolutas das concentrações dos analitos (121). A capacidade multiplex também é outra das grandes vantagens, já tendo sido realizados 30 análises numa corrida (122).

5.3. Análise de Proteínas Oxidadas por Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é, hoje em dia, o método de eleição para a deteção de modificações pós-traducionais em proteínas. Esta metodologia permite mapear e quantificar os sítios das modificações, permitindo ainda a identificação de novas estruturas (27). A vantagem mais relevante das técnicas de MS é a de fornecer a posição inequívoca da modificação oxidativa (26). Consequentemente, a importância da espectrometria de massa no campo da oxidação proteica tem vindo a aumentar, visto que todas estas modificações provocam mudanças de massa nos resíduos de aminoácidos sujeitos a oxidação (4, 27). Algumas destas mudanças são facilmente observáveis por MS, no entanto existem modificações cuja natureza pode ser mal interpretada. Modificações de massa nos péptidos poderão estar associadas tanto a modificações pós-tradução, como a mudanças químicas que ocorreram durante o processamento da amostra (123). São várias as estratégias analíticas implementadas nesta área (3, 26), sendo as variações de massa observadas na proteína não digerida por ESI-MS, ou por estudos de MS e MS tandem em péptidos resultantes da digestão da proteína (abordagem *bottom-up*) (4). No entanto, devido à diversidade de modificações que ocorrem e ao facto de as suas reações não serem estequiométricas, a maioria dos estudos dedica-se a um tipo particular de modificação (23). Dai *et al.* (124), por exemplo, utilizaram um método *shotgun* para o isolamento e enriquecimento de péptidos contendo cisteínas oxidadas, tendo-os detetado e identificado facilmente pela combinação do MALDI-MS em modo negativo com o MALDI-MS/MS em modo positivo. Mais recentemente, outro método de enriquecimento de péptidos com cisteínas modificadas foi desenvolvido, baseando-se na captura de afinidade iónica utilizando nanodiamantes cobertos com poliarginina como sondas (125). Este método de enriquecimento foi aplicado com sucesso a soluções altamente diluídas e a misturas com uma abundância de péptidos contendo cisteínas oxidadas até 0.02%. Isto demonstra a alta afinidade das sondas para os péptidos oxidados. Segundo os autores, este método permite mapeamentos rápidos de modificações nas cisteínas com MALDI-MS. A quantificação de cisteínas oxidadas pode ser efetuada tirando partido da técnica de ICAT. Sethuraman *et al.* (126) aplicaram esta metodologia na identificação e quantificação de grupos tióis de cisteínas. O desenvolvimento de uma adaptação específica desta técnica para o campo da oxidação proteica, o chamado oxICAT (127), representou um avanço significativo na

quantificação de tióis modificados (106). Esta técnica permite a quantificação de modificações oxidativas nos grupos tiol de centenas de proteínas diferentes numa única experiência (127), e é adaptável a estudos *in vivo* (106, 128).

A identificação de proteínas carboniladas é normalmente efetuada com base nas abordagens espectrométricas ilustradas na figura 11. Após a derivatização dos grupos carbonilos com o DNPH ou BHZ, as amostras enriquecidas podem ser sujeitas a uma das abordagens (106). Mirzaei e Regnier (129) compararam-nas e concluíram que a estratégia onde a separação por afinidade e a cromatografia são efetuadas antes da proteólise é a mais informativa. Além de simplificar a complexidade da mistura peptídica, é a que permite a identificação de mais sítios de oxidação e de cross-links, sendo no entanto a mais demorada (21, 129).

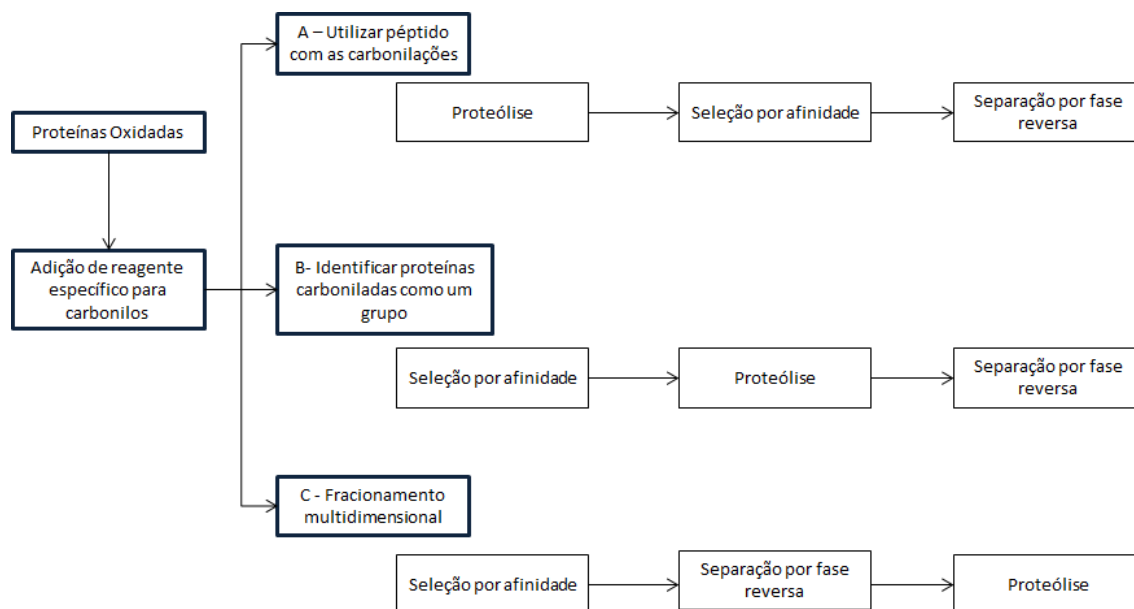


Figura 11 – Diagrama comparativo das 3 abordagens utilizadas na identificação de proteínas carboniladas e dos sítios da carbonilação. (retirado da referência (21))

5.3.1. *Problemas na Análise de Proteínas Oxidadas por MS*

Apesar de a espectrometria de massa ser um pilar nas técnicas de identificação em proteômica, a ocorrência de modificações pós-tradução (*Post-translational modifications* - PTM's) em proteínas ainda coloca imensos desafios analíticos na sua investigação. A grande variabilidade das modificações que ocorrem nas proteínas e que alteram as suas propriedades físico-químicas permanece como um obstáculo na identificação e quantificação de proteínas modificadas por espectrometria de massa. As modificações possuem diferentes tamanhos e poderão ocorrer várias modificações na mesma proteína. Os produtos resultantes da oxidação são instáveis e poderão sofrer reações adicionais, originando modificações inesperadas que dificultam a análise por espectrometria de massa. A ocorrência de quebras da cadeia principal e de interligações entre proteínas poderá ainda tornar mais difícil a sua identificação (23). A natureza das modificações, a ineficiência das digestões proteolíticas e as cargas adotadas pelos resíduos modificados constituem os principais obstáculos na análise espectrométrica de proteínas oxidadas.

A análise de proteínas por MS envolve regularmente a degradação proteolítica das proteínas. Para quantificar proteínas por MS, é imperial uma digestão eficiente das proteínas para obter valores reais de concentração. Os métodos de quantificação têm como base uma digestão quantitativa da proteína, assumindo a correspondência de uma mole do péptido identificado a uma mole de proteína intacta (130). A otimização dos parâmetros de digestão é então de extrema importância para uma quantificação eficaz. Com a maximização da produção de péptidos resulta também um aumento do número de picos nos espectros de MS e MS/MS e uma maior certeza na identificação das proteínas (131). Em proteínas oxidadas, existe o problema de estas estarem sujeitas a mudanças químicas e estruturais que poderão levar à ocorrência de interligações proteicas, resultando na inacessibilidade dos locais de clivagem (27). A enzima de eleição para digestões em proteômica é a tripsina, enzima com alta especificidade para os resíduos de lisina e arginina (78). Segundo Mirzaei e Regnier (132), os resíduos de lisina e arginina oxidados estarão inacessíveis à proteólise por parte da tripsina. As modificações nas cadeias laterais destes resíduos levam a que percam a carga positiva responsável pelo reconhecimento da enzima, não havendo a hidrólise da ligação nesses resíduos. Isto leva a que ocorra um maior número de clivagens falhadas e uma consequente produção de péptidos longos e

mais carregados, originando espectros de difícil interpretação (133). Estes péptidos possuem comportamentos cromatográficos e taxas de ionização diferentes e poderão encontrar-se fora da gama analítica do espectrómetro, não sendo detetados (27). Em digestões completas, digestos trípticos irão possuir lisinas ou argininas no seu terminal C e um grupo amina no terminal N. A pH baixo, a carga global destes péptidos irá ser de +2. No entanto, péptidos modificados resultantes de clivagens falhadas poderão possuir cargas diferentes. A ionização de péptidos em modo positivo depende das zonas básicas do péptido, como a amina do terminal N e a cadeia lateral de lisinas, argininas e histidinas. A incorporação de grupos carbonilo em argininas e lisinas está associada às perdas dos grupos guanidina e amónia, responsáveis pela carga positiva. Isto leva a que a eficiência de ionização seja menor e a que a deteção dos péptidos com o modo positivo fique comprometida (27). Resíduos de cisteína que são oxidados a ácido sulfónico também originam péptidos mais negativos e com uma menor eficiência de ionização em modo positivo (4). Como consequência, a análise bioinformática dos dados obtidos de MS e MS/MS torna-se mais complexa. Todos estes fatores levam ainda à necessidade de aumentar o número de clivagens falhadas inserido nos algoritmos de pesquisa, complicando a análise bioinformática dos dados. Quanto maior o número de clivagens falhadas inserido nos algoritmos de pesquisa, mais demoradas são as pesquisas e maior a probabilidade de obter resultados falsos positivos (27). Em PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) poderão ainda ser obtidos falsos negativos resultantes de atribuições incorretas da massa dos péptidos modificados, ou falsos positivos resultantes de atribuições aleatórias das massas de péptidos modificados a massas de fragmentos de proteínas que não estão presentes nas amostras (134). Em PFF (*Peptide Fragmentation Fingerprinting*) surge o problema de só encontrarmos nas bases de dados as modificações que procuramos. As ferramentas disponíveis para estas pesquisas normalmente disponibilizam uma lista restrita de modificações conhecidas de aminoácidos. Ao incluir possíveis modificações nas pesquisas estamos a aumentar o número de possíveis péptidos para cada espectro, o tempo da pesquisa e a possibilidade de obter falsos positivos nas identificações (133).

Os estudos *in vivo* de proteínas oxidadas também representam uma das grandes dificuldades da área. A complexidade das amostras biológicas e a baixa abundância das oxidações levam à necessidade da utilização de técnicas complexas de enriquecimento e de *pooling* de vários tecidos. Esta representa a grande barreira na evolução de estudos *in vivo*,

pois as proteínas oxidadas são sujeitas a processos de *turnover* e de reparação. Se a oxidação ocorrer em proteínas submetidas a este tipo de processos, a sua identificação não será feita (5).

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes

A BSA (A6003-25G, livre de ácidos gordos), o FeCl_2 (380024-5G) e o H_2O_2 30% foram adquiridos à Sigma. O hidrocloreto de guanidina (50950) e o β -mercaptoetanol (63690) foram obtidos da Fluka e o TCA (33731) da Riedel de Haen. A tripsina (TPCK treated, 4370285) foi obtida da Applied Biosystems e a proteinase K (*Tritirachium* álbum 539480) foi obtida da Calbiochem. Os anticorpos anti-DNP e anti-rabbit foram adquiridos da Sigma. Todos os solventes utilizados foram HPLC-*grade* obtidos da Fischer Scientific.

2. Oxidação da BSA

A oxidação da proteína foi feita com base na reação de Fenton. A 200 μl de BSA a 5g/L adicionaram-se 650 μl de tampão fosfato de sódio 20mM pH = 7.4, 50 μl de solução de H_2O_2 20 mM e 100 μl da solução de Fe^{II} (EDTA) 500 μM . A solução de Fe^{II} (EDTA) foi efetuada pela dissolução de FeCl_2 em EDTA e água miliQ. As concentrações finais na mistura reativa foram de 1mg/ml para a BSA, 1mM de H_2O_2 e 50 μM de Fe^{II} (EDTA). Posteriormente os tubos de reação foram colocados a incubar a 37°C. Foram realizadas oxidações em triplicado e foram retiradas alíquotas de 250 μl a diferentes períodos de incubação (15min, 30min, 1h, 1h30min, 2h, 4h, 6h, 24h). Como controlo foi utilizada uma solução de BSA 1g/L em tampão fosfato. Para parar a reação de oxidação foram adicionados 10 μl de uma solução de HCl 2.5M, e 10 μl de NaOH 2.5M para neutralizar o pH. As amostras foram congeladas a -70°C até análise posterior.

3. Determinação da concentração de proteína por SDS-PAGE

Para a determinação da concentração de proteína em gel, foram utilizados géis de corrida e empacotamento com 10% e 4% de acrilamida, respetivamente, de acordo com o protocolo de Laemmli (135). A 20µl de amostra oxidada foram adicionados 40µl de tampão de amostra, e a mistura levada a ferver durante ~2mins. O tampão de amostra foi preparado pela mistura de 4 ml de SDS 10%, 2,5 ml de Tris 0.5M pH 6.8, 1,5 ml de glicerol, 10mg de azul bromofenol e 2 ml de mercaptoetanol. Posteriormente foram adicionados 15µl da mistura em cada poço do gel, numa corrida de 45 minutos a 200V. Foram efetuados géis das amostras controlo e oxidadas em triplicado. Em cada gel foram colocados padrões de concentração com BSA a 0,1g/L e 0,5 g/L. Os géis foram colocados a fixar durante uma hora numa solução de 10% v/v ácido acético e 40% v/v metanol, a corar durante duas horas com Coomassie Brilliant Blue G250 0.12% m/v em 20% metanol e a descorar durante a noite numa solução de 25% (v/v) de metanol. Foram determinadas as intensidades de cada banda com o auxílio do programa QuantityOne, e os seus valores normalizados ao valor da intensidade da banda de 0,5 g/L. Posteriormente calcularam-se as concentrações de cada amostra em triplicado partindo de uma reta padrão obtida previamente com diluições conhecidas de BSA.

4. Determinação dos grupos carbonilo

4.1. Método Espectrofotométrico

A determinação de grupos carbonilo foi efetuada com base no método do 2,4-dinitrofenilhidrazina, como descrito por Levine et. al (136). A 100 µl de amostra cada amostra oxidada adicionou-se 300 µl de DNPH 10mM preparado em 2.5M HCl. A mistura foi incubada no escuro durante 1h com agitações periódicas. Foram efetuados dois brancos, além das amostras controlo: misturas sem proteína e misturas sem DNPH, em triplicado. Após a incubação, foram adicionados 50µl de TCA, incubou-se em gelo durante 1h e centrifugou-se a mistura durante 30 minutos a 14600rpm para recuperar o precipitado. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 100µl de acetona

fria, centrifugando 15 minutos a 14600rpm entre as lavagens. As amostras foram secas na hotte, os precipitados ressuspensos em 200µl de cloreto de guanidina 6M em HCl 2.5M e as incubadas durante 1h a 37°C com agitação. A absorvância das amostras derivatizadas foi lida a 370nm num espectrofotômetro (Genesys 10 UV-visible; ThermoScientific) e a concentração de carbonilos calculada a partir do coeficiente de extinção molar ($\epsilon=22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para a hidrazona resultante da derivatização.

4.2. Determinação por Western Blot

Foram preparadas alíquotas de 10 µl de cada amostra a 0,077 g/L. Posteriormente adicionaram-se 10 µl SDS 12%, 20 µl DNPH 10mM em TFA 10% e incubou-se durante 30 minutos no escuro. Após a incubação, adicionaram-se 15 µl de 2M Tris 30% glicerol 18% b-mercaptoetanol. As amostras derivatizadas foram colocadas a ferver durante 1-2 min, sendo de seguida carregados 15 µl de cada amostra para o gel de empacotamento 5%. A percentagem de acrilamida do gel de corrida foi de 10%, e as corridas efetuadas durante 40-50 min a 200V. Posteriormente os géis foram colocados em contacto com membranas de nitrocelulose na câmara de transferência. A transferência foi feita durante 2h a 200mA. As membranas foram bloqueadas em leite em pó (Molico Magro) 5% em TBS-T durante a noite a 4°C. Posteriormente incubaram-se as membranas com anticorpo primário anti-DNP durante uma hora com agitação à temperatura ambiente, seguindo-se três lavagens de 10 minutos com TBS-T antes da incubação com o anticorpo secundário (*anti-rabbit*) durante 2 horas, com agitação e à temperatura ambiente. A deteção foi feita incubando a membrana com 1 ml de reagente ECL e expondo-a ao filme fotográfico numa cassete escura. Após a exposição, o filme foi revelado e fixado.

5. Análise por Espectrometria de Massa

5.1. Digestão “in gel”

5.1.1. *Tripsina*

15 µl contendo 0,5 µg de cada amostra foram injetados em cada poço dos géis de SDS-PAGE e colocadas a correr 40-50 min a 200V. Cada amostra foi carregada em dois poços paralelos no mesmo gel, de modo a obter duas bandas. As bandas da BSA não fragmentada foram cortadas e os duplicados colocados em eppendorfs, obtendo assim 1 µg de cada amostra. As bandas foram lavadas com 50 µl de hidrogenocarbonato de amónio e 50 µl de ACN, com 15 minutos de incubação à temperatura ambiente entre cada lavagem. Estas lavagens foram repetidas mais duas vezes. Posteriormente foi efetuada uma lavagem final com 50 µl de ACN com incubação de 10 minutos, e as bandas já descoradas foram colocadas a secar na *speed vac* (SC210A SpeedVac Plus, Thermo Scientific). Após as bandas estarem completamente desidratadas, adicionou-se 50 µl de tripsina a 12,5 µg/ml e colocaram-se as amostras a incubar durante 1h a 37°C com agitação. Após uma hora, adicionou-se hidrogenocarbonato de amónio de modo a submergir as bandas, e os tubos foram colocados a incubar durante a noite a 37°C com agitação. No dia seguinte, os sobrenadantes foram recolhidos para eppendorfs vazios. De seguida foram adicionados 25 µl de ácido fórmico 10% (v/v) às bandas e deixou-se à temperatura ambiente durante 30min. O sobrenadante foi recolhido para o mesmo eppendorf. Foram efetuadas mais três lavagens às bandas para extração dos péptidos com 50 µl de ácido fórmico e ACN 1:1, com incubações de 30min entre cada lavagem, e os sobrenadantes sempre recolhidos para o mesmo eppendorf. Os digestos foram posteriormente secos na *speed vac*, e ressuspendidos em tampão A (5% ACN, 0.1% TFA) para análise por espectrometria de massa.

Foram também efetuados géis apenas com amostras da reação de oxidação de 4h, de modo a cortar as bandas que acompanharam a frente de corrida. Em 8 poços foram carregados 15 µL de uma mistura da amostra oxidada com tampão de amostra. O gel foi colocado a correr durante 40-50 min a 200V, e posteriormente as bandas cortadas. Em dois

ependorfs colocaram-se 4 bandas. O procedimento da digestão com a tripsina foi o mesmo.

5.1.2. *Proteinase K*

A digestão com a proteinase K foi efetuada com o mesmo procedimento que o descrito em 5.1.1, e a enzima foi adicionada à mesma concentração da tripsina (12,5 µg/ml). As digestões com proteinase K foram efetuadas apenas em bandas de BSA não fragmentada.

5.2. Análise das digestões com tripsina e proteinaseK por MALDI-TOF-MS

Para a aplicação direta na placa de MALDI, foram misturados 1 µL da solução dos péptidos com 1 µL de matriz α -CHCA 5mg/ml preparada em 0.1% TFA. Em cada spot da placa foram colocadas alíquotas de 0.8 µL. As amostras foram aplicadas em duplicado. Os espectros de massa dos péptidos foram obtidos com o espectrómetro MALDI-TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Europe) com refletrão em modo positivo. A gama de massas para aquisição dos espectros foi de 600 a 4000 Da, com cerca de 1500 tiros laser.

5.3. Separação e Análise dos digestos trípticos por nano-HPLC-ESI-ion trap-MS/MS

A separação por nano-HPLC foi efetuada no instrumento Ultimate 3000 (LC Packings). Foram injetados 2µg de cada amostra. As amostras foram injetadas numa coluna C18 (C18 Acclaim 120, partículas de 5µm) utilizando um autosampler. As amostras foram lavadas isocriticamente na coluna durante 3 min com 95% de tampão A (5% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) e 5% de tampão B (90% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico) com um caudal de 30ul/min. Após a lavagem, o fluxo foi direcionado para a coluna analítica capilar (C18 Acclaim Pepmap 120, partículas de 3 µm, 150mm x 75µm) com um caudal de 0.3µl/min. A separação dos péptidos ocorreu utilizando um gradiente

linear de 5-50% de tampão B durante 57 min, 50-90% tampão B durante 2 min e mais 3 minutos com 90% tampão B. A análise espectrométrica foi efetuada no instrumento *Linear Ion Trap LXQ (Thermo Scientific)*. Foi utilizado o modo ESI positivo, sendo os péptidos ionizados com um *spray* de voltagem de 1.9kV e a uma temperatura do capilar de 275°C. Para a aquisição *data-dependent* dos espectros de MS/MS, foi utilizado um intervalo de seleção de 0.5 Da com tempo de ativação de 30ms. A energia de colisão normalizada foi de 35%.

5.4. Pesquisa nas bases de dados

Os espectros de MALDI foram analisados no software *Data Explorer 4.9 (Applied Biosystems)*. As pesquisas dos espectros de MS foram efetuadas através da ferramenta Ms-Fit do motor de busca *ProteinProspector v5.10.6 (University of California, San Francisco)* com desvios de massa de 30 ppm. Foram efetuadas pesquisas individuais sem modificações e com algumas modificações oxidativas (Oxidação da metionina, tirosina, triptofano e prolina, dioxidação da cisteína e conversão do triptofano a hidroquinurenina e kinurenina). As pesquisas dos espectros de MS/MS foram efetuadas utilizando a ferramenta MS-Tag, utilizando desvios de 60 ppm para o ião precursor e 0.6 Da para os iões fragmento. Efetuaram-se pesquisas procurando por todas as modificações de massa possíveis entre -50 a 50 Da a todos os resíduos de aminoácidos.

Nos espectros obtidos do ESI, as pesquisas e identificações dos péptidos foram efetuadas utilizando o algoritmo *TurboSequest* do software *Bioworks 3.1 (Thermo Electron Corporation)* com uma base de dados interna de proteínas de bovino. Esta base de dados foi construída descarregando a lista de proteínas de *Bos Taurus* do *Swissprot v2012_9*.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo principal deste trabalho baseou-se em compreender de que modo a oxidação da BSA influenciaria a eficiência da sua digestão com proteases. Pretendeu-se analisar de que modo as modificações oxidativas das cadeias laterais de alguns aminoácidos iriam afetar a ação das enzimas proteolíticas. Para tal, submeteu-se a BSA a um sistema *in vitro* de oxidação catalisada por metais durante 8 tempos de incubação (0-24h). Posteriormente avaliou-se o nível de oxidação das diferentes amostras por determinação dos grupos carbonilo associados à proteína, e analisaram-se as digestões com duas enzimas (tripsina e proteinaseK) das amostras controlo e oxidadas nos quatro tempos de incubação mais relevantes (30 min, 1h, 2h, 4h) por MALDI-TOF -MS e nano-HPLC-ESI-iontrap-MS/MS.

1. Determinação da concentração da proteína oxidada

Neste trabalho foram efetuados géis de SDS-PAGE de modo a determinar a concentração da proteína não fragmentada presente nas amostras. O Coomassie Blue, um corante não específico, é dos mais adequados quando se pretende efetuar quantificações por gel, tendo uma sensibilidade até cerca de 30 ng (80). Esta abordagem permite que os péptidos resultantes de uma possível fragmentação da proteína sejam separados. Através da análise e quantificação da banda correspondente à BSA, tornou-se assim possível determinar a quantidade de proteína não fragmentada nas amostras. Efetuaram-se quantificações da banda da BSA, de bandas que acompanharam a frente de corrida, e de proteína total em cada amostra.

Na figura 12 encontram-se exemplificados os géis obtidos para os controlos (Fig. 12A e 12B) e para as amostras oxidadas (Fig. 12C e 12D). Nos géis das amostras controlo, a banda da BSA encontra-se com uma intensidade semelhante ao longo dos diversos períodos de incubação. No entanto, observando a aparência dos géis das amostras oxidadas (Fig. 12C e 12D), é perceptível uma diminuição da intensidade na banda da BSA e um aumento do arrastamento das mesmas, com o decorrer do tempo da incubação. Este

resultado sugere que à medida que a reação de oxidação se prolonga no tempo, existe uma fragmentação crescente da proteína, relacionada com os mecanismos de oxidação proteica descritos na introdução deste trabalho. Além do arrastamento crescente, analisando a parte inferior de cada gel é perceptível um aumento na intensidade das bandas que acompanharam a frente de corrida. Isto sugere que estas bandas correspondam a péptidos resultantes da fragmentação da proteína.

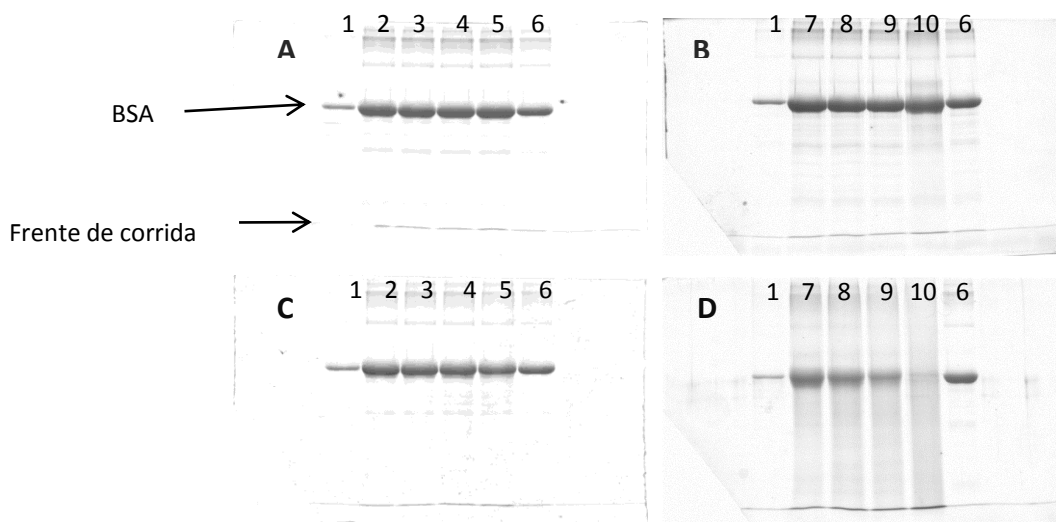


Figura 12 – Géis SDS-PAGE das corridas dos controlos (A e B) e oxidações (C e D). Os números 1 e 6 representam as colunas dos padrões de BSA de 0,1 g/L e 0,5 g/L, respetivamente. Os números de 2-5 e 7-10 representam as colunas das amostras com diferentes tempos de incubação. 2- 15min ; 3- 30min ; 4- 60min ; 5- 90min ; 7- 2h ; 8- 4h ; 9- 6h ; 10- 24h

Na figura 13 estão representadas as concentrações da BSA não fragmentada calculadas para os diferentes tempos de incubação estudados, nos controlos e nas amostras oxidadas. A mistura reativa continha uma concentração inicial (0h) de 1g/L de BSA. A determinação da concentração de BSA intacta nas amostras a cada tempo de incubação foi feita com base na intensidade das bandas em triplicado de cada alíquota. Nos controlos podemos observar que a concentração de proteína na banda mantém-se estável ao longo das 24h de incubação. Olhando para os valores das amostras oxidadas, as concentrações da banda mantêm-se semelhantes à dos controlos até cerca de meia hora de incubação. Para tempos de incubação superiores, nota-se um evidente decréscimo nestes valores, com uma diminuição mais abrupta entre a 1h e as 4h de incubação. A partir das 6h até às 24h, a quantidade de proteína na banda é residual. Estes resultados estão de acordo com alguns

estudos já efetuados sobre sistemas de oxidação da BSA. Ogino et. al (57) testou uma incubação de 30 minutos da BSA com Fe^{III} NTA (ácido nitrilotriacético – *NitriloTriacetic Acid*) a 37°C , verificando que ocorria uma diminuição de 77% da absorvância da banda da proteína intacta, como resultado da sua fragmentação a péptidos de dimensões menores. Kocha et. al (137) verificou que sistemas MCO induzem degradação não específica da albumina através de radicais hidroxilo provenientes da reação de Fenton. O autor propôs que a degradação da proteína resultava de ataques aleatórios dos radicais hidroxilo na sua superfície.

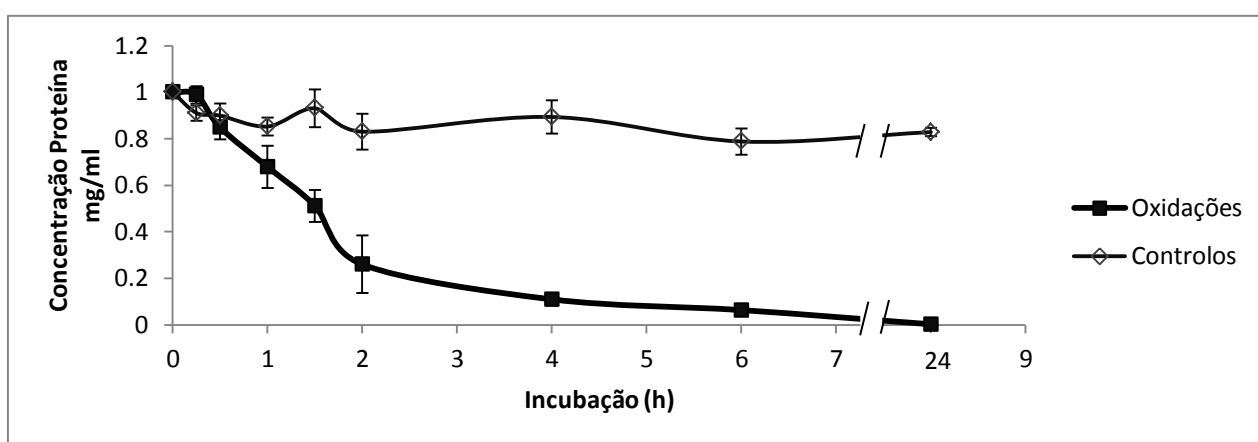


Figura 13 – Médias das concentrações (mg/mL) \pm desvio padrão da BSA não fragmentada ao longo da reação de oxidação. As concentrações foram determinadas por densimetria das bandas obtidas em géis de SDS-PAGE com o auxílio do programa QuantityOne.

As bandas dos péptidos que acompanharam a frente de corrida também foram quantificadas, de modo a comprovar a sua relação com a oxidação da proteína. Na figura 14 estão representados graficamente os valores obtidos para as quantificações a cada tempo de incubação. Aqui a tendência é inversa à da proteína não fragmentada, como seria de esperar. Os controlos mantêm-se igualmente estáveis ao longo da incubação, enquanto nas amostras oxidadas verifica-se um aumento da concentração dos péptidos à medida que a reação de oxidação se prolonga no tempo. Este aumento começa a ser verificado relativamente aos controlos a partir de uma hora de reação. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos já efetuados sobre a oxidação da BSA. Davies *et al.* (138) já havia verificado, por SDS-PAGE, que em proteínas submetidas a sistemas de oxidação com radicais hidroxilo ocorriam processos de agregação e fragmentação das proteínas. Estes processos levavam à aparição de bandas com pesos moleculares maiores

(agregações) e menores (fragmentação) nos géis. Ogino et. al (57) também verificou este aumento de péptidos de pequeno peso molecular, tendo verificado que ocorria um aumento de 34.6% na absorvância da banda da frente de migração após uma reação de oxidação de 30 minutos com 5 μm de BSA com 0.5 μm de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{NTA}$.

Os produtos de fragmentação resultam da clivagem da cadeia principal da proteína pela via da diamida (cisão na ligação N-C) ou da α -amidação (cisão na ligação C-C), já descritos na introdução deste trabalho. Estas vias de clivagem iniciam-se após ataques dos radicais hidroxilo ao carbono α dos aminoácidos. A decomposição dos radicais peroxilo formados no carbono α corresponde ao mecanismo principal de fragmentação proteica (139). À medida que a reação se prolongou no tempo maior foi o número de ligações quebradas. Assim formaram-se mais produtos de fragmentação, daí a maior concentração de péptidos observada na frente de corrida.

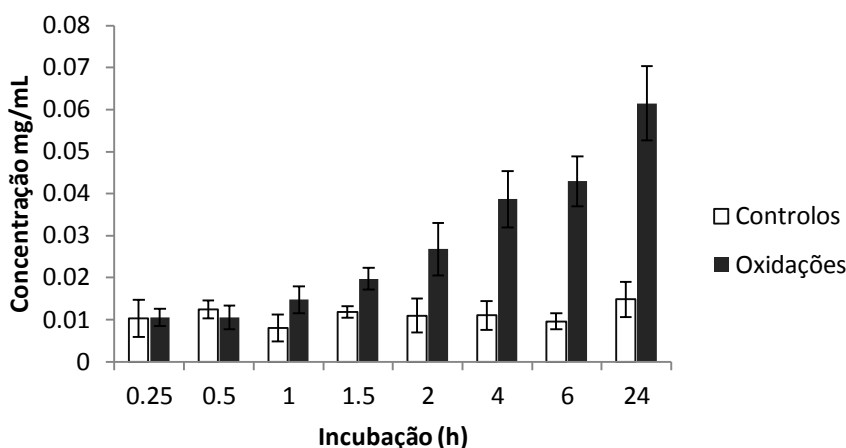


Figura 14 – Médias das concentrações em mg/mL \pm desvio padrão dos péptidos resultantes da fragmentação da BSA ao longo da reação de oxidação. As concentrações foram determinadas por densiometria das bandas obtidas em géis de SDS-PAGE com o auxílio do programa QuantityOne.

Também foi quantificada toda a coluna de cada amostra para confirmar que o conjunto das intensidades das bandas corresponderia aos 1 g/l iniciais. Estes resultados permitiram verificar que não ocorre precipitação irreversível de proteína durante o processo oxidativo. Na figura 15 estão representados os resultados obtidos nesta quantificação. Apesar dos desvios elevados, devido a este tipo de quantificação ser complicada de efetuar, não se encontram diferenças entre os valores dos controlos e das amostras oxidadas.

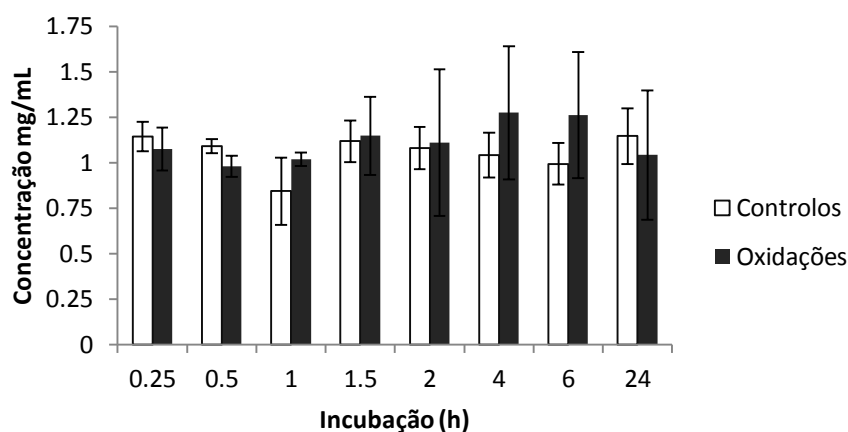


Figura 15 – Médias das concentrações \pm desvio padrão de proteína total nas amostras controlo e oxidadas ao longo da reação oxidativa. As concentrações foram determinadas a partir da medição da intensidade de toda a coluna no gel de SDS-PAGE com o auxílio do programa QuantityOne.

2. Determinação de grupos carbonilo

Os grupos carbonilo são o biomarcador de oxidação proteica mais utilizado e a sua determinação é usual quando se estudam proteínas oxidadas. Estes grupos são produzidos nas cadeias laterais das proteínas aquando da sua oxidação. Neste trabalho a determinação dos grupos carbonilo foi efetuada pelo método espectrofotométrico e por Western Blot.

2.1. Método Espectrofotométrico

Para o método espectrofotométrico os grupos carbonilos das amostras foram determinados aplicando o método de derivatização com DNPH descrito por Levine *et al.* (136). Na figura 16 encontram-se representados graficamente os resultados obtidos para as concentrações dos grupos carbonilo em mmol CO/mg proteína.

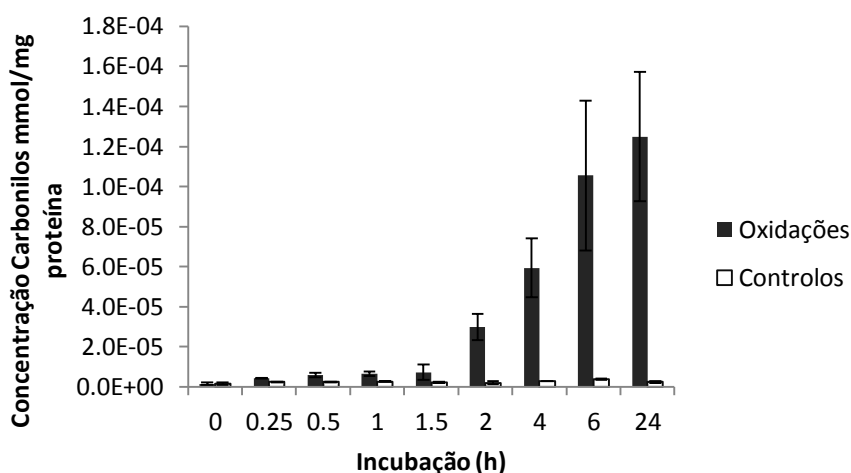


Figura 16 – Médias das concentrações \pm desvio padrão dos carbonilos em solução pelo método espectrofotométrico. As concentrações foram determinadas pela divisão entre a absorvância das amostras a 370nm e o coeficiente de extinção molar para a hidrazona ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e normalizadas à concentração de proteína na amostra.

Pela análise destes resultados verificou-se que existe um aumento dos grupos carbonilo nas amostras oxidadas ao longo dos períodos de incubação, havendo um aumento mais significativo a partir das 1,5h. Isto confirma que existe um aumento de proteína oxidada, em consonância com o aumento da fragmentação da BSA.

2.2. Western Blot

A determinação dos níveis de carbonilos foi também efetuada por Western blot, com o principal objetivo de verificar a localização e distribuição destes após a separação das amostras por SDS-PAGE. Este ensaio é altamente sensível, permitindo a deteção de grupos carbonilo ao nível dos pmol, e requer quantidades mínimas de amostra (quantidades de cerca 50ng de proteína oxidada serão suficientes). Moléculas de DNPH livres não reagem com os anticorpos mesmo que estejam ligadas à membrana (140).

Para a deteção por Western Blot foram apenas utilizadas as amostras correspondentes às reações entre as 0,5 e as 4h. Analisando os dados obtidos até ao momento verifica-se que é neste período de tempo que ocorrem as maiores diferenças entre os controlos e as amostras oxidadas: o declínio dos valores da concentração da BSA intacta (Fig. 13), o aumento dos produtos de fragmentação (Fig. 14) e o aumento da concentração

dos carbonilos (Fig. 16). Toda a análise subsequente também foi efetuada com as amostras entre as 0,5 - 4h, intervalo onde o processo oxidativo começou a provocar maior dano à proteína. Deste modo a análise foi feita na fase em que os processos de oxidação e fragmentação da proteína se iniciam, até uma fase onde as diferenças entre controlos e oxidações são já significativas o suficiente para retirar conclusões.

Na figura 17 encontra-se exemplificado um dos blots obtidos. As amostras dos controlos foram colocadas junto às amostras oxidadas do tempo de reação correspondente, para uma melhor comparação. Nas amostras controlo, os níveis de carbonilos permanecem relativamente constantes, e quando comparados com as oxidações do mesmo tempo de reação, é perceptível uma diferença acentuada no sinal dos carbonilos. Analisando apenas as oxidações verifica-se um aumento na intensidade do sinal ao longo dos tempos de incubação, evidenciando níveis mais elevados de carbonilos à medida que o tempo da reação de oxidação aumenta. Este resultado confirma os dados anteriormente obtidos com a quantificação em solução por método espectrofotométrico. No entanto, aqui é possível aferir a localização dos carbonilos, sendo visível que em todas as amostras encontram-se na banda da BSA não fragmentada

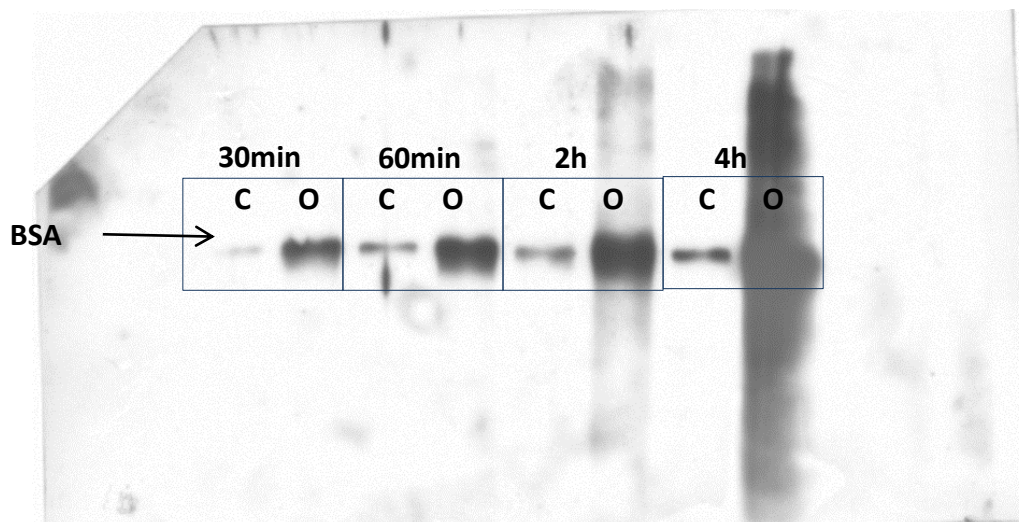


Figura 17 – Filme do Western Blot obtido após a obtenção do sinal dos carbonilos das amostras controlo e oxidadas ao longo da reação de oxidação entre as 0,5h e as 4h. Os grupos carbonilo foram determinados por imunodeteção com anticorpos primários anti-DNP e anticorpos secundários anti-*rabbit*. Legenda: **1-** Controlo 0,5h ; **2-** Oxidação 0,5h ; **3-** Controlo 1h ; **4-** Oxidação 1h ; **5-** Controlo 2h ; **6-** Oxidação 2h ; **7-** Controlo 4h ; **8-** Oxidação 4h

Apenas nas 2h e nas 4h (coluna 6 e 8) já se verifica um arrastamento do sinal ao longo de toda a lane. Isto significa que a estes tempos de reação já são libertados péptidos carbonilados resultantes da fragmentação da proteína. Esta informação de que a maior parte dos carbonilos pertencem à proteína é importante, pois vem confirmar que as quantificações de grupos carbonilo efetuadas no método espectrofotométrico correspondem maioritariamente à proteína não fragmentada e não a outras espécies presentes em solução. Podemos então confirmar que a proteína presente na banda correspondente à BSA não fragmentada sofreu danos oxidativos que resultam na modificação das cadeias laterais e originam grupos carbonilos.

Com o auxílio do programa QuantityOne, a intensidade dos sinais obtidos dos carbonilos na zona da banda da BSA foi também quantificada. Na figura 18 encontram-se representados graficamente os valores obtidos para as intensidades de cada amostra. O aumento da intensidade é evidente até às 2h, apesar dos elevados desvios padrões obtidos. A variabilidade inerente ao fato de serem três reações independentes levou ao aumento dos desvios padrão. Também a dificuldade em ver os sinais de todas as bandas sem saturar o sinal levou a que as amostras das 2h e 4h ficassem muito intensas. Por essa razão não se vislumbram grandes diferenças entre as 2h e as 4h. Contudo a tendência é semelhante à observada no método espectrofotométrico.

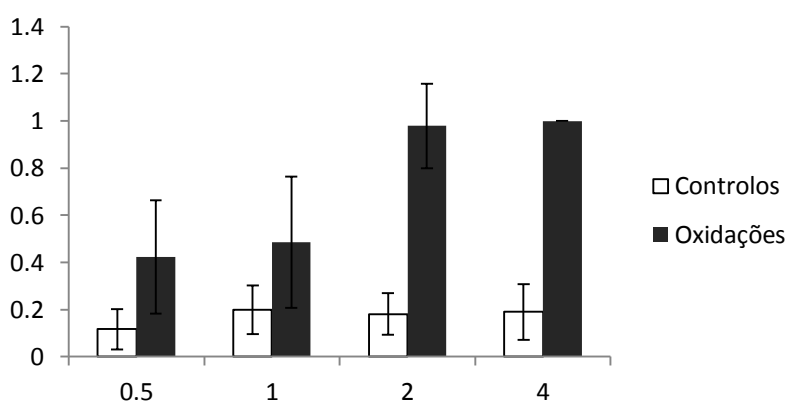


Figura 18 – Intensidades relativas (normalizadas à amostra de maior intensidade - oxidações 4h), medidas no QuantityOne dos sinais obtidos na deteção dos carbonilos por Western Blot, das amostras controlo e oxidadas ao longo da reação de oxidação entre as 0,5 e as 4h.

Os resultados obtidos estão de acordo com alguns trabalhos onde também se verificou aumento do nível dos carbonilos na BSA ao longo de reações oxidativas. Maisonneuve *et al.* (141), por exemplo, submeteu a BSA a níveis crescentes de MCO e obteve resultados concordantes com os aqui descritos. Por análise em SDS-PAGE, o autor verificou a diminuição da intensidade da banda de BSA e um aumento de produtos de fragmentação. Em consonância com estas alterações, os níveis de carbonilos também aumentaram significativamente no monómero da BSA com condições oxidativas mais intensas, como verificado pela análise da densiometria do sinal dos carbonilos nas membranas de western blot.

3. Avaliação da eficiência da digestão com tripsina e proteinaseK por MALDI-TOF-MS

Uma vez verificada a ocorrência de oxidação na proteína não fragmentada, o passo seguinte do projeto consistiu na avaliação da eficiência da digestão em gel das diferentes amostras. Com esse propósito as bandas da BSA não fragmentada foram digeridas com tripsina e proteinase K, duas proteases com especificidades distintas. A digestão da banda da BSA não fragmentada assegurou que todos os péptidos originados provinham da digestão e não da fragmentação oxidativa da proteína. Foram efetuadas digestões dos controlos e das amostras oxidadas com os tempos de reação de 0,5 a 4h para uma primeira análise por MALDI-TOF-MS. Para avaliar a eficiência da digestão, foram avaliadas as taxas de cobertura da proteína obtidas por *peptide mass fingerprint* (PMF) nas pesquisas dos espectros MS. Através deste parâmetro é possível aferir, por comparação dos controlos com as amostras oxidadas ao longo dos diversos períodos de incubação, se a oxidação da albumina iria influenciar a ação da protease no passo da digestão. A cobertura da sequência de aminoácidos é normalmente utilizada para determinar a extensão de uma digestão proteica e a eficiência de deteção dos digestos trípticos, e é usualmente utilizado como um parâmetro de avaliação da taxa de digestão (100, 142).

De seguida encontram-se representadas graficamente as taxas de cobertura obtidas nas pesquisas dos espectros de MS dos controlos (barras brancas) e das amostras oxidadas (barras a preto) para as digestões com tripsina (figura 19) e com proteinaseK (figura 20). Os gráficos A correspondem aos valores das médias das taxas de cobertura das pesquisas

sem modificações, enquanto os gráficos B correspondem aos valores das médias das taxas de cobertura das pesquisas quando a possibilidade de ocorrência de modificações oxidativas é incluída na pesquisa. As modificações incluídas nas pesquisas foram as que, segundo a literatura (56), são as mais comuns na BSA: oxidação dos resíduos de metionina, prolina, triptofano e tirosina, a dioxidação da cisteína, e as conversões do triptofano a quinurenina e a hidroxiquinurenina. As modificações nos resíduos de lisinas e argininas não estavam disponíveis para seleção na lista de modificações da ferramenta de pesquisa. Por essa razão não foram incluídas nestas pesquisas. Analisando os gráficos da figura 19, podemos verificar que a alta variabilidade obtida entre triplicados da mesma amostra promove a obtenção de desvios padrão altos para algumas amostras. No entanto é possível verificar que nos controlos as taxas de cobertura se mantêm constantes ao longo dos tempos de reação. Para as amostras oxidadas obtiveram-se taxas de cobertura maiores nas amostras oxidadas durante 2h e 4h relativamente aos controlos e às amostras oxidadas das 0.5h e 1h (Figura 19A).

As digestões com proteinase K demonstraram uma melhor reprodutibilidade dos resultados obtidos (Figura 20). Apesar das baixas taxas de cobertura obtidas nas pesquisas (entre 30-40% nas pesquisas sem modificações, e entre 50-60% nas pesquisas com modificações) foi possível obter um padrão semelhante entre amostras controlo e oxidadas. Analisando os gráficos verifica-se que não existe nenhuma variação entre as taxas de cobertura de controlos e amostras oxidadas ao longo dos vários tempos de reação.

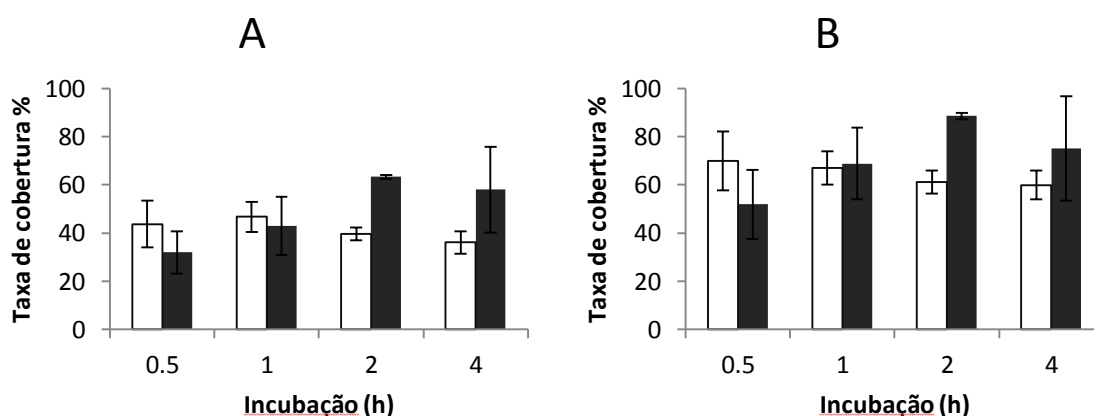


Figura 19 – Taxas de cobertura (%) obtidas nas pesquisas com o MS-Fit do software Protein Prospector para as amostras digeridas com tripsina ao longo das reações de oxidação entre as 0.5 – 4h. O gráfico A representa as taxas obtidas com pesquisas sem modificações. O gráfico B representa as taxas obtidas com pesquisas com as seguintes modificações: Oxidação M, P, W, Y, Trp->hidroxiquinurenina, Trp->quinurenina, dioxidação C.

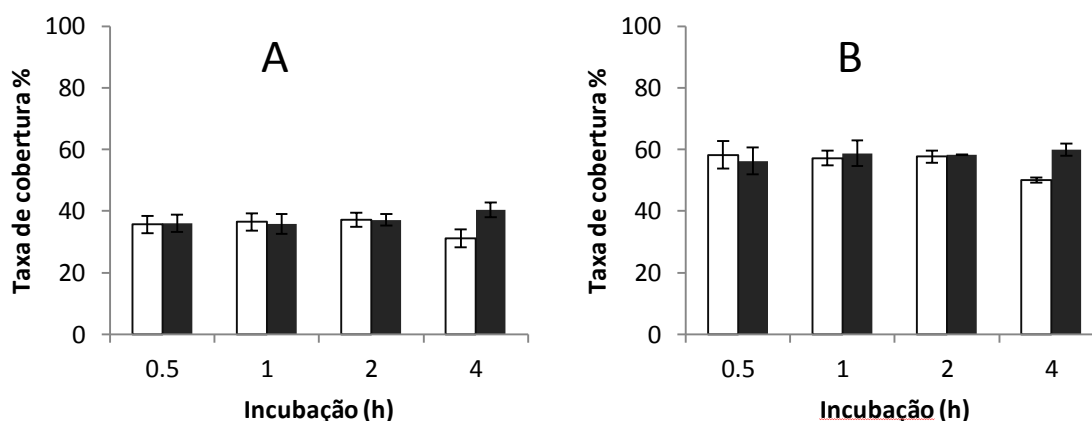


Figura 20 – Taxas de cobertura (%) obtidas nas pesquisas com o MS-Fit do software Protein Prospector para as amostras digeridas com proteinase K ao longo das reações de oxidação entre as 0.5 – 4h. O gráfico A representa as taxas obtidas com pesquisas sem modificações. O gráfico B representa as taxas obtidas com pesquisas com as seguintes modificações: Oxidação M, P, W, Y, Trp->hidroxiquinurenina, Trp->quinurenina, dioxidação C.

Nas figuras 21 e 22 encontra-se representado graficamente o número de péptidos identificados em cada amostra para as digestões com tripsina e proteinase K, respetivamente. Nas amostras digeridas com tripsina (Fig. 21A e 21B), variação é a mesma observada nos valores das taxas de cobertura. É possível observar um aumento do número de péptidos identificados nas amostras mais oxidadas (2 – 4h). Nas amostras digeridas com proteinase K (Fig. 22A e 22B), a variação não foi a mesma obtida nos valores das taxas de cobertura. Enquanto as taxas de cobertura entre todas as amostras eram semelhantes, aqui verifica-se um aumento do número de péptidos das amostras oxidadas nas pesquisas efetuadas com modificações (Fig. 22B). Nos digestos das oxidações das 4h foram identificados mais 45 péptidos relativamente aos digestos das oxidações das 0.5h. Após uma análise aos péptidos identificados pela ferramenta de pesquisa, verificou-se que este aumento deveu-se ao facto de estar a ser contabilizado o mesmo péptido na forma não modificada e com modificações.

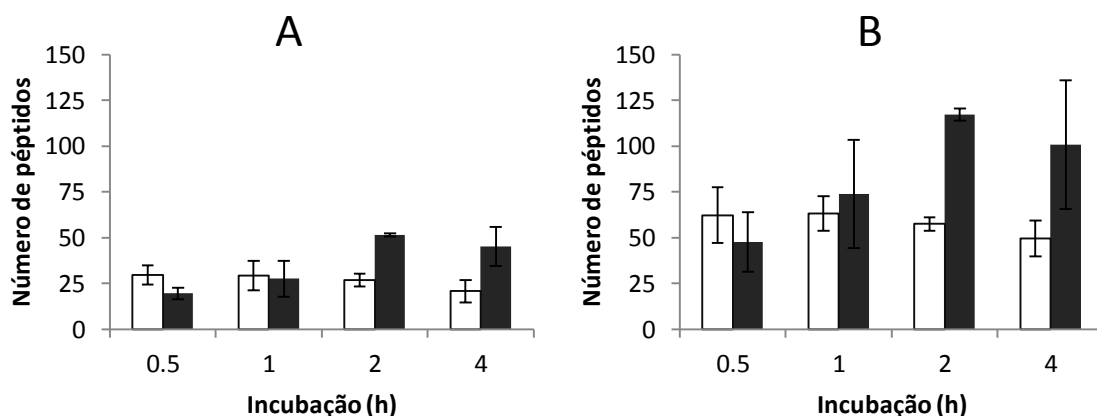


Figura 21 – Número de péptidos obtidos nas pesquisas com o MS-Fit do software Protein Prospector para as amostras digeridas com tripsina ao longo das reações de oxidação entre as 0.5 – 4h. As barras brancas representam os controles e as barras pretas as amostras oxidadas. O gráfico A representa o n° obtido com pesquisas sem modificações. O gráfico B representa o n° obtido com pesquisas com as seguintes modificações: Oxidação M, P, W, Y, Trp->hidroxiquinurenina, Trp->quinurenina, dioxidação C.

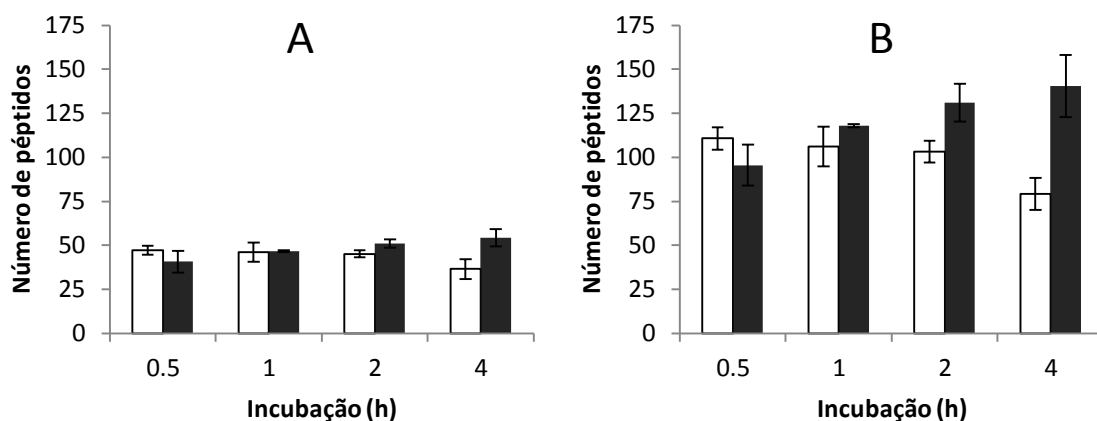


Figura 22 – Número de péptidos obtidos nas pesquisas com o MS-Fit do software Protein Prospector para as amostras digeridas com proK ao longo das reações de oxidação entre as 0.5 – 4h. As barras brancas representam os controles e as barras pretas as amostras oxidadas. O gráfico A representa o n° obtido com pesquisas sem modificações. O gráfico B representa o n° obtido com pesquisas com as seguintes modificações: Oxidação M, P, W, Y, Trp->hidroxiquinurenina, Trp->quinurenina, dioxidação C.

As taxas de cobertura e número de péptidos obtidos nas amostras digeridas com tripsina sugerem que a suscetibilidade da proteína à hidrólise com tripsina aumentou com o aumento do seu estado oxidativo. O aumento da percentagem da cobertura da sequência nas amostras oxidadas das 2 e 4h evidencia uma digestão mais eficiente da proteína nestas amostras. O estado oxidativo avançado da proteína nestas amostras terá facilitado a ação da

enzima, levando a que esta reconhecesse e acesse mais facilmente aos sítios de corte. No entanto, nas taxas de cobertura obtidas para as amostras digeridas com a proteinase K não se verificou o mesmo padrão. A cobertura da sequência foi semelhante em todas as amostras. Isto significa que o aumento do estado de oxidação da BSA ao longo dos tempos de reação não influenciou a ação da proteinase K na digestão. Os sítios de corte continuaram acessíveis à proteína, que atuou de forma idêntica nos controlos e na proteína oxidada. O número de péptidos obtidos nas pesquisas das amostras digeridas com esta enzima foi superior ao número obtido nas amostras tripticas devido a esta enzima ser menos específica e efetuar mais cortes.

O aumento verificado nas taxas de cobertura dos digestos tripticos poderá ter sido devido a várias razões. A primeira poderá estar associada ao fato de a desnaturação da proteína ser mais avançada nos estados oxidativos mais avançados. Apesar de a digestão ser feita a partir de um gel desnaturante, as amostras oxidadas poderão apresentar a afinidade para o SDS alterada e como consequência uma conformação ligeiramente diferente. Esta conformação poderá permitir à enzima atingir mais rapidamente os sítios de corte ou facilitar a remoção do SDS nos passos de lavagem anteriores à digestão. A proteína oxidada poderá também ter sofrido um aumento substancial na sua hidrofiliabilidade durante o processo oxidativo. Com a introdução de espécies oxigenadas nas suas cadeias laterais, especialmente grupos OH, a proteína tornou-se mais solúvel. Este fator poderá também ter favorecido a ação da tripsina.

4. Avaliação da eficiência da digestão com tripsina por nano-HPLC-ESI-ion trap-MS/MS

Para confirmação dos resultados obtidos na análise por MALDI-TOF-MS, as amostras digeridas com tripsina foram submetidas a análise por nano-HPLC-ESI-iontrap-MS/MS. Com a combinação da cromatografia à espectrometria de massa a análise dos péptidos torna-se mais fácil, pois estes são separados e entram individualmente no espectrómetro. Após a obtenção dos espectros, as pesquisas e identificações dos péptidos foram efetuadas utilizando o algoritmo TurboSequest do *software* Bioworks 3.1 (*Thermo*

Electron Corporation) com uma base de dados interna de proteínas de bovino. Apenas os digestos trípticos foram utilizados neste passo do trabalho, pois não foi possível efetuar a mesma análise para os digestos da proteinase K. A avaliação da eficiência da digestão das amostras com tripsina foi efetuada igualmente com base nas taxas de coberturas da sequência da BSA e no número de péptidos identificados nas pesquisas. Foram ainda efetuadas pesquisas por possíveis modificações oxidativas de modo a determinar o número de resíduos modificados, com especial enfoque nos resíduos de lisina e arginina, sítios de corte da tripsina. As modificações incluídas nas pesquisas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Lista das modificações utilizadas nas pesquisas dos espectros de MS/MS das amostras tríplicas. (retirado de (56))

Modificação	Descrição	Δm (monoisotópica)
Amino (Tyr)	Oxidação da tirosina a 2-aminotirosina	15.0108
Arg -> GluSA	Oxidação da arginina a semialdeído glutâmico	-43.0534
Cys -> oxoalanina	Oxidação da cisteína a oxoalanina	-17.9928
Lys -> alisina	Oxidação da lisina a semialdeído aminoadípico	-1.0316
Lys -> ácido aminoadípico	Oxidação da lisina a ácido α -aminoadípico	14.9632
Trp -> hidroxiquinurenina	Oxidação do triptofano a hidroxiquinurenina	19.9898
Trp -> quinurenina	Oxidação do triptofano a quinurenina	3.9949
Trp -> oxolactona	Oxidação do triptofano a oxolactona	13.9792
Trioxidação (Cys)	Oxidação da cisteína a ácido cisteico	47.9847
Oxidação e dioxidação	Adição de oxigénio e hidroxilação (Lys, Arg, Cys, Met, Tyr, Trp, Asp, Glu)	15.9949 / 31.9898
Deamidação (Arg)		0.984
Carbamilação (Lys, Arg, Cys, Met)	Reação do isocianato com grupos amina	43.0058
Quinona (Tyr)		29.9741
Descarboxilação (Asp, Glu)		-30.02

Na figura 23 encontram-se representadas graficamente as taxas de cobertura obtidas para os controlos e para as amostras oxidadas ao longo dos quatro tempos de incubação. Não se verificaram diferenças nas taxas de cobertura entre os controlos e as amostras oxidadas. Comparando com os resultados obtidos para as pesquisas dos espectros de MALDI, aqui não se verificou o aumento das taxas de cobertura nas amostras mais oxidadas. Nos dados obtidos destas pesquisas os valores das taxas de cobertura da

sequência encontram-se entre os 40-60% para as amostras controle e oxidadas ao longo do tempo de reação. Estes resultados sugerem que apesar do estado de oxidação que a BSA apresentava ao longo da reação, a tripsina hidrolisou a proteína de modo semelhante nas amostras controle e nas oxidações.

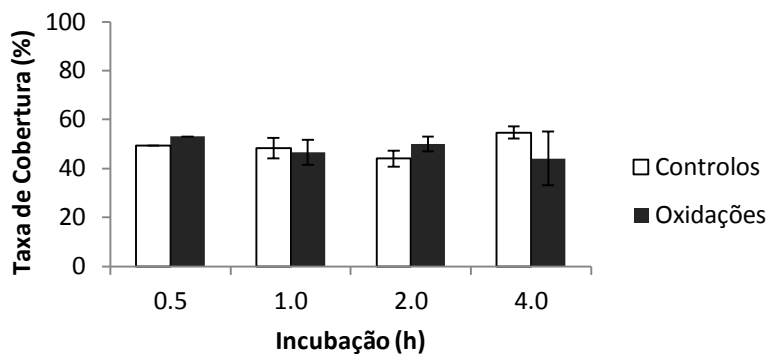


Figura 23 – Médias das taxas de cobertura (%) \pm desvio padrão obtidas nas pesquisas efetuadas no TurboSequest para as amostras dos controlos e oxidadas digeridas com tripsina.

Na figura 24 encontra-se representado graficamente o número de péptidos identificados para cada uma das amostras. Tal como nas taxas de cobertura, aqui também não se verificou qualquer variação entre amostras, sendo que o número médio de péptidos identificados em cada amostra encontra-se entre 60-80.

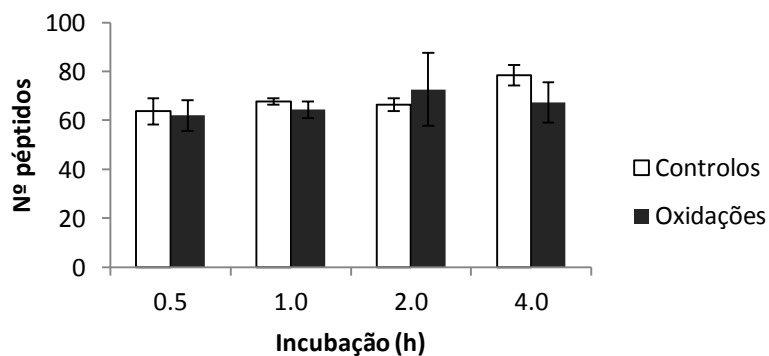


Figura 24 – Média do número de péptidos identificados \pm desvio padrão nas pesquisas efetuadas no TurboSequest para as amostras controle e oxidadas digeridas com tripsina.

Até agora foi possível verificar que o sistema MCO utilizado provocou danos oxidativos significativos na BSA, induzindo a sua fragmentação e à acumulação de grupos carbonilo nas cadeias laterais da restante proteína não fragmentada. Após as digestões efetuadas com as proteases verificou-se numa primeira instância, pela análise por MALDI-TOF-MS, que a suscetibilidade da proteína oxidada à proteólise com tripsina aumentaria (Figura 19A e 19B). No entanto quando submetemos os mesmos digestos a análise por nano-HPLC-ESI-iontrap-MS, não se verificaram diferenças na eficiência da digestão triptica entre controlos e amostras oxidadas ao longo dos tempos de reação. Deste modo não se conseguiu comprovar que a proteína oxidada seria digerida mais facilmente, mas sim que o seu estado de oxidação não teve influência na eficiência da sua digestão.

Anteriormente, Hunt (143) havia verificado que após incubações da BSA com sistemas de hidroperóxidos, a proteína modificada estaria mais suscetível à hidrólise com tripsina. Essa suscetibilidade dependia principalmente da extensão da fragmentação ocorrida durante a oxidação. No entanto, a hidrólise da proteína foi efetuada em solução ao invés da proteína não fragmentada. Os péptidos resultantes da fragmentação da proteína durante o processo oxidativo também estariam em solução e foram igualmente digeridos. Não é possível extrapolar dos resultados descritos por Hunt se a digestão da proteína não fragmentada também seria favorecida.

Regnier *et al.* (144) também colocou a hipótese em estudo nesta dissertação no seu trabalho de identificação de modificações em BSA oxidada *in vitro* por um sistema MCO. Após a digestão com tripsina, os péptidos foram submetidos a uma separação cromatográfica. Na análise dos cromatogramas obtidos para BSA não oxidada e oxidada, o autor reparou numa diminuição significativa (área total do cromatograma diminuiu cerca de 2.5 vezes) no número de péptidos tripticos obtidos nas amostras oxidadas. Regnier propôs que as modificações ocorridas nas cadeias laterais das lisinas e argininas da BSA eliminariam estes resíduos como sítios de corte para a tripsina, levando a que houvesse mais clivagens falhadas e uma consequente diminuição do número de péptidos obtidos após a separação. A ocorrência de precipitações de péptidos muito grandes ou de proteína interligada também poderia influenciar a sua solubilidade e consequente deteção, contribuindo também para a diminuição de péptidos tripticos nos cromatogramas.

Os nossos resultados são discordantes dos obtidos por Regnier *et al.* A observação de que a taxa de cobertura da BSA não é alterada no caso da proteína se encontrar oxidada

permitiria supor que apesar do estado oxidativo avançado das moléculas de BSA, poucas cadeias laterais dos resíduos de lisina e arginina se encontrariam oxidadas. Dessa forma estes resíduos continuariam a ser reconhecidos como sítios de corte para a enzima, ocorrendo a digestão normal da proteína. Temple *et. al* (58), por exemplo, utilizou um sistema MCO para oxidar a albumina do soro humana e determinar os resíduos de lisinas modificados. Das 59 lisinas da sequência da proteína, apenas duas estavam carboniladas, o que demonstra que com este sistema de oxidação é possível que as lisinas sejam pouco afetadas. No entanto, também existem trabalhos onde a oxidação da BSA leva a um aumento significativo de lisinas e argininas modificadas. Guedes *et al.* (56) implementou um sistema MCO semelhante ao utilizado neste trabalho, e ao fim de duas horas de reação oxidativa encontrou 31 lisinas e 5 argininas modificadas.

Na figura 25 encontra-se representado o número de resíduos de lisina, arginina, triptofano, cisteína, tirosina, aspartato, glutamato e metionina modificados nas amostras controlo e oxidadas. Analisando a figura verificamos que o número de resíduos de arginina modificados nas amostras controlo e oxidadas foi semelhante, enquanto nas amostras oxidadas temos 16 lisinas modificadas, mais 9 do que nos controlos. Contudo o número de resíduos modificados não reflete necessariamente a sua concentração, sendo expectável que nas oxidações exista um maior número de moléculas com aqueles resíduos oxidados. Segundo a hipótese colocada neste trabalho, o aumento da oxidação nos resíduos de lisina e arginina deveria influenciar a ação da tripsina, levando à diminuição da eficiência de digestão nas amostras oxidadas. A especificidade da tripsina para os resíduos de lisina e arginina baseia-se principalmente na atração de cargas, através do reconhecimento da carga positiva das cadeias laterais destes aminoácidos. As cargas positivas de ambos os resíduos são atraídas para o sítio catalítico negativo da tripsina, ocorrendo a ligação da enzima ao polipéptido. No entanto, os principais produtos de oxidação da lisina (ex. aldeído semiadípico) perdem a carga positiva na cadeia lateral. Em teoria, isto faria com que o reconhecimento por parte da tripsina ficasse comprometido, mas os resultados aqui apresentados não permitem sustentar esta hipótese. Após uma análise aos péptidos identificados, verificou-se que as lisinas modificadas se encontravam todas a meio da sequência de cada péptido e não nos seus terminais. Isto significa que os cortes da enzima não ocorreram nas lisinas modificadas. Apesar deste fato, com base nas taxas de cobertura não se verificaram diferenças na eficiência da digestão.

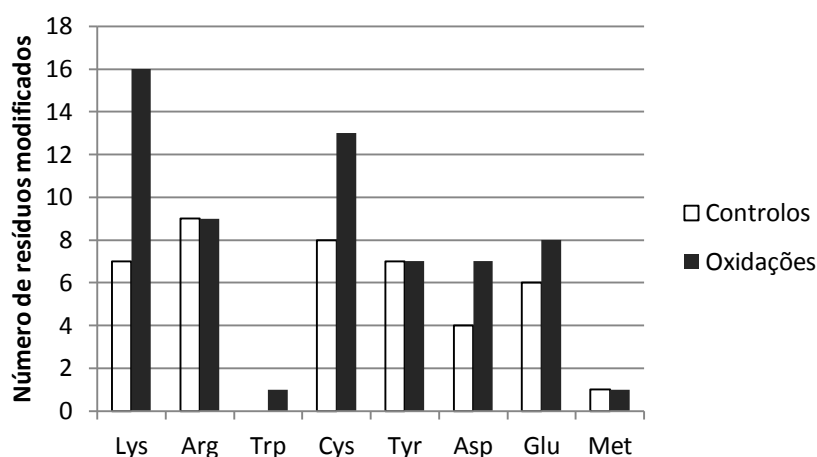


Figura 25 – Número de resíduos modificados obtidos nas pesquisas por modificações no TurboSequest ao fim de 4h de oxidação. Foram efetuadas pesquisas individuais para as várias modificações de cada aminoácido da tabela nos controlos e nas amostras oxidadas.

Assim podemos afirmar que o facto de a proteína estar oxidada não deve condicionar a sua digestão, pelo que este passo não será responsável pela dificuldade na sua identificação ou quantificação por espectrometria de massa. As dificuldades inerentes a essas análises devem estar relacionadas com a sua degradação (clivagem oxidativa ou precipitação), e ao fato de péptidos oxidados não serem detetados pois a sua identificação só será feita quando procuramos por determinada modificação.

5. Identificação dos péptidos resultantes da fragmentação da BSA oxidada por MALDI-TOF/TOF

Após as análises à BSA não fragmentada, foram também analisados alguns produtos da fragmentação da proteína após 4h de oxidação. Para essa análise procedeu-se à extração dos péptidos resultantes da fragmentação da proteína através de uma ziptip C18 e cortaram-se as bandas da frente de corrida dos géis de SDS-PAGE para extrair os péptidos do gel. No entanto nenhuma das extrações foi eficaz, pois após a obtenção dos espectros de MS/MS não se conseguiram identificar péptidos nas pesquisas na base de dados. Por essa razão foi efetuada a extração dos péptidos do gel digerindo-os anteriormente com tripsina. Com esta metodologia obtiveram-se espectros de melhor qualidade após análise por MALDI-TOF-TOF e conseguiram-se identificar alguns dos péptidos.

Na tabela 4 encontram-se os péptidos identificados nas pesquisas dos espectros de MS/MS com a ferramenta MS-Tag do motor de busca ProteinProspector. As identificações foram posteriormente confirmadas manualmente para minorar a possibilidade de ocorrência de falsos positivos. Analisando a tabela 4, verificamos que nem todos os péptidos identificados são trípticos. Os péptidos com massas de 1408.65, 1433.71, 1492.76, 1894.94 e 2163.05 (sombreados a preto) não possuem resíduos de lisina (K) ou arginina (R) nos seus terminais. Isto significa que estes péptidos libertaram-se da proteína aquando do processo de fragmentação da BSA e não resultaram da digestão tríptica. Podemos também observar que 4 destes péptidos se encontram modificados oxidativamente. Os péptidos identificados foram ainda mapeados na sequência primária da proteína de forma a verificar quais as regiões da BSA mais suscetíveis a clivagem oxidativa (Figura 26).

Tabela 4 – Péptidos identificados nas pesquisas dos espectros de MS/MS com a ferramenta MS-Tag do Protein Prospector. A preto estão sombreados os péptidos que não correspondem a digestos trípticos.

Massa (Da)	Sequência	Score	Erro (ppm)
659.37	(R)SLGKVG(Tcarbonilação)(R)	26.8	2.01
712.36	(K)SEIAHR(F)	20.1	-22.9
927.49	(K)YLYEIAR(R)	32.7	-1.09
1163.62	(K)LVNELTEFAK(T)	71.5	-7.18
1193.61	(R)DTHKSEIAHR(F)	73.5	6.66
1249.62	(R)FKDLGEEHFK(G)	61	-2.5
1408.65	(A)DDKEACFAVEGPK(L)	53.1	7.66
1415.69	(K)TVM(Oxidação)ENFVAFVDK(C)	70.8	-1.31
1433.71	(L)HTLFGDELCKVA(carbonilação)S(L)	61.9	1.98
1439.81	(R)RHPEYAVSVLLR(L)	70.3	0.854
1479.80	(K)LGEYGFQNALIVR(Y)	97.6	3.28
1492.76	(E)TM(Oxidação)REKVLASSARQ(R)	53.6	-21.3
1567.74	(K)DAFLGSFLYEYSR(R)	79.3	-0.194
1639.94	(R)KVPQVSTPTLVEVSR(S)	96.6	0.743
1894.94	(L)GKVGTRCCTKPESERM(Oxidação)P(C)	78.7	23
2163.05	(T)LFGDELCKVASLRETY(Oxidação)GDM(A)	82	20.2

Estes resultados suportam o mecanismo proposto por Kocha (137) de que os ataques de radicais hidroxilo provenientes da reação de Fenton ocorrem aleatoriamente à superfície da proteína. Por esta razão ocorre clivagem não específica de algumas ligações, sendo libertados péptidos ao longo de toda a cadeia peptídica da BSA. A clivagem e fragmentação da proteína devido a processos oxidativos pode ter consequências a nível da sua identificação por electroforese e provocar desvios na quantificação. No caso de este processo originar péptidos muito grandes e de baixa solubilidade, estes poderão precipitar, não sendo detetados posteriormente por MS. A perda de péptidos não modificados desta natureza corresponde a uma das maiores dificuldades na análise de proteínas oxidadas (144).

MKWVTFISLLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQCCPFDEHVKLVNELTEF
AKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTL
CDEFKADEKKFWGKLYYEIARHPYFYAPELLYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIE TMREKVLASSARQ
RLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQD
TISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYA
VSVLLRLAKEYEATLEECCA KDDPHACYSTVFDK LKHLVDEPQNLIKQNCDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKV
PQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESEMPCTEDYLSLI LNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCF
SALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQK TVMENFVAFVDKCCAA
DDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA

Figura 26 – Mapeamento dos péptidos resultantes da fragmentação da BSA (a amarelo) na sua sequência primária.

IV. CONCLUSÃO

A oxidação proteica tem vindo a ser o foco de diversos estudos nas últimas décadas, e sofreu desenvolvimentos significativos com o desenvolvimento de novas técnicas proteómicas. Já foram identificados centenas de produtos resultantes da oxidação proteica, e identificados os mecanismos e os sítios onde ocorreram as modificações. Muitos destes produtos constituem biomarcadores de algumas doenças associadas ao stress oxidativo, sendo que ainda não existe um marcador universal de stress oxidativo. A identificação de produtos de oxidação é feita principalmente com a espectrometria de massa, que constitui a técnica mais adequada para este tipo de estudos. Para efetuar a identificação e quantificação de proteínas utilizando técnicas de espectrometria de massa é essencial uma digestão eficaz das proteínas da amostra. Quando se estudam proteínas com modificações oxidativas, devido às modificações que ocorrem na proteína, os sítios de clivagem poderão estar inacessíveis à protease. O objetivo deste trabalho consistiu em aferir a influência que a oxidação de proteínas poderá ter no passo da digestão enzimática de uma análise por MS. Foi colocada a hipótese de que quanto maior o estado oxidativo de uma proteína, menos eficiente seria a sua digestão.

Após oxidação da proteína, foi possível verificar que a BSA sofre uma degradação contínua ao longo dos vários tempos de incubação, relacionados com os mecanismos de quebra da cadeia principal e oxidações das cadeias laterais. Na oxidação de 24h a concentração de BSA era substancialmente menor que a inicial. Quanto ao conteúdo de carbonilos, e como seria de esperar, existiu também um aumento contínuo da concentração destes nas amostras oxidadas ao longo dos vários tempos de incubação, sugerindo que a proteína se encontrava cada vez mais oxidada. Pela análise por Western blot verificou-se que esses carbonilos se localizavam na proteína não fragmentada e não nos fragmentos resultantes da sua degradação. A proteína estava num estado oxidativo avançado a tempos de reação maiores. Para aferir a influência do estado oxidativo da BSA na sua digestão foram avaliadas as taxas de cobertura e o número de péptidos obtidos nas pesquisas nas bases de dados dos espectros de MS. Os resultados obtidos inicialmente por MALDI apontavam para que a oxidação aumentasse a suscetibilidade da proteína à hidrólise. Esta observação estaria em desacordo com a hipótese testada e com as observações de Regnier. Contudo, após análise dos digestos trípticos por HPLC-ESI, não se conseguiu comprovar

este aumento na eficiência da digestão. Conjugando todos os resultados obtidos, a conclusão é a de que a oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos não influenciou o reconhecimento e corte por parte das enzimas utilizadas. Também foram ainda analisados os produtos de fragmentação resultantes de quebras de ligações na proteína durante o processo oxidativo, e identificados alguns dos péptidos que são libertados durante este processo. A fragmentação da proteína resultante das clivagens da sua cadeia principal leva à libertação de péptidos em solução, que poderão ser perdidos durante a análise se a sua solubilidade for alterada. Ao contrário do proposto nesta dissertação, será essa a maior dificuldade a ultrapassar na análise de proteínas oxidadas por MS. Os dados obtidos neste trabalho indicam que a eficiência da digestão da BSA oxidada não é influenciada pelo seu nível de oxidação.

V. PERSPETIVAS FUTURAS

De modo a compreender melhor as limitações impostas à análise por espectrometria de massa de proteínas oxidadas ainda é necessário o estudo de diferentes fatores que poderão ser condicionantes. No âmbito das limitações no passo da digestão, será necessário efetuar o mesmo estudo com diferentes enzimas com propriedades catalíticas diferentes das proteases de serina. De entre as mais utilizadas em proteómica (tabela 2), as enzimas papaína, Arg C, Asp N, termolisina ou pepsina perfilam-se como candidatas a esta análise. Assim seria possível comparar as eficiências de digestão de enzimas consoante os seus mecanismos catalíticos e verificar se existe o mesmo padrão que o obtido neste trabalho. Também seria interessante efetuar as digestões em grandes péptidos ou pequenas proteínas obtidas comercialmente com determinados aminoácidos oxidados, para verificar se essas oxidações iriam influenciar o reconhecimento por parte da enzima. Análises a agregados de proteínas e de produtos de fragmentação de elevado peso molecular também poderiam adicionar alguns conhecimentos úteis. Digestões dos agregados permitiriam ver de que forma a eficiência de digestão iria ser influenciada no caso da ocorrência de interligações proteicas, enquanto a análise de produtos de fragmentação de peso molecular elevado levaria a uma melhor compreensão dos mecanismos de fragmentação da proteína.

Como descrito na introdução deste trabalho, as possíveis limitações impostas por proteínas oxidadas na sua análise por MS não se cingem apenas ao passo da digestão. A eficiência de ionização e de fragmentação dos péptidos oxidados também poderá ser influenciada. Péptidos que não ionizem eficientemente poderão influenciar a sua identificação e quantificação, principalmente com a utilização de métodos de quantificação *label free* baseados nas intensidades ou áreas dos picos cromatográficos dos péptidos identificados. Péptidos que não sejam identificados não serão quantificados. O estudo destes parâmetros permitirá aprofundar um pouco mais o conhecimento sobre o comportamento de péptidos modificados nos passos mais cruciais de análises por espectrometria de massa.

VI. REFERÊNCIAS

1. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Bba-Proteins Proteom.* 2005 Jan 17;1703(2):93-109.
2. Xu GH, Chance MR. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem Rev.* 2007 Aug;107(8):3514-3543.
3. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 2005 Jan-Feb;24(1):55-99.
4. Törnvall U. Pinpointing oxidative modifications in proteins - Recent advances in analytical methods. *Anal Methods.* 2010;2(11):1638-1650.
5. Schoneich C, Sharov VS. Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2006 Nov 15;41(10):1507-1520.
6. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Proteomics identification of oxidatively modified proteins in brain. *Methods Mol Biol.* 2009;564:291-301.
7. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32(3-4):307-326.
8. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(10):1456-1462.
9. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459-469.
10. Davies MJ, Hawkins CL, Morgan PE. Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Bio Med.* 2009 Apr 15;46(8):965-988.
11. Gadoth N. Oxidative stress and free radical damage in neurology. New York: Springer; 2010.
12. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:395-418.
13. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* [10.1038/nchembio.85]. 2008;4(5):278-286.
14. Buettner. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300(2):535-543.
15. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215(2):213-219.
16. Cheng F-C, Jen J-F, Tsai T-H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. *J Chromatogr B.* 2002;781(1-2):481-496.
17. Deng Y. Role of The Reactive Oxygen Species Peroxynitrite in Traumatic Brain Injury. Kentucky2008.
18. Maher * P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(8):1287-1305.
19. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. *Free Radical Bio Med.* 1997;22(1-2):269-285.
20. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002 January 1, 2002;82(1):47-95.
21. Regnier FE, Madian AG. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J Proteome Res.* 2010 Aug;9(8):3766-3780.
22. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20313-20316.

23. Barelli S, Canellini G, Thadikaran L, Crettaz D, Quadroni M, Rossier JS, Tissot J-D, Lion N. Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(2):142-157.
24. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):207-218.
25. Davies MJ, Fu SL, Wang HJ, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Bio Med*. 1999 Dec;27(11-12):1151-1163.
26. Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA. Redox proteomics : from protein modifications to cellular dysfunction and diseases. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2006.
27. Moller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RS. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *J Proteomics*. 2011 May 11.
28. Regnier FE, Madian AG, Myracle AD, Diaz-Maldonado N, Rochelle NS, Janle EM. Differential Carbonylation of Proteins as a Function of in vivo Oxidative Stress. *J Proteome Res*. 2011 Sep;10(9):3959-3972.
29. Requena JR, Levine RL, Stadtman ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):221-226.
30. Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF, Floyd RA. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(9):3633-3636.
31. Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *P Natl Acad Sci*. 1993 August 1, 1993;90(15):7255-7259.
32. Kelvin J.A D. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*.83(3-4):301-310.
33. Grant AJ, Jessup W, Dean RT. Inefficient degradation of oxidized regions of protein molecules. *Free Radic Res Commun*. 1993;18(5):259-267.
34. SITTE N, HUBER M, GRUNE T, LADHOFF A, DOECKE W-D, VON ZGLINICKI T, DAVIES KJA. Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J*. 2000 August 1, 2000;14(11):1490-1498.
35. Friguet B, Szweda LI, Stadtman ER. Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase modified by 4-hydroxy-2-nonenal and metal-catalyzed oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch Biochem Biophys*. 1994;311(1):168-173.
36. Nguyen AT, Donaldson RP. Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities. *Arch Biochem Biophys*. 2005;439(1):25-31.
37. Powell SR, Gurzenda EM, Wahezi SE. Actin is oxidized during myocardial ischemia. *Free Radical Bio Med*. 2001;30(10):1171-1176.
38. Jeong W, Jung Y, Kim H, Park SJ, Rhee SG. Thioredoxin-related protein 14, a new member of the thioredoxin family with disulfide reductase activity: Implication in the redox regulation of TNF- α signaling. *Free Radical Bio Med*. 2009;47(9):1294-1303.
39. Toda T, Nakamura M, Morisawa H, Hirota M, Nishigaki R, Yoshimi Y. Proteomic approaches to oxidative protein modifications implicated in the mechanism of aging. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10:S25-S31.

40. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol*. 2012;52(3-4):174-182.
41. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspects Med*. 2012;33(3):209-290.
42. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3(2):293-311.
43. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(6):695-704.
44. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *Febs Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783-1787.
45. Damiani E, Carloni P, Biondi C, Greci L. Increased oxidative modification of albumin when illuminated in vitro in the presence of a common sunscreen ingredient: Protection by nitroxide radicals. *Free Radical Bio Med*. 2000;28(2):193-201.
46. Kim KJ, Lee BW. The roles of glycated albumin as intermediate glycation index and pathogenic protein. *Diabetes Metab J*. 2012;36(2):98-107.
47. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 1999;107(3):323-332.
48. Curry S. Beyond Expansion: Structural Studies on the Transport Roles of Human Serum Albumin. *Vox Sanguinis*. 2002;83:315-319.
49. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 2005;41(6):1211-1219.
50. Wang N, Ye L, Zhao BQ, Yu JX. Spectroscopic studies on the interaction of efonidipine with bovine serum albumin. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Jul;41(7):589-595.
51. Brown JR. Structural origins of mammalian albumin. *Fed Proc*. 1976;35(10):2141-2144.
52. Peters T. All about albumin : biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego :: Academic Press; 1996.
53. Peters T, Jr. Serum albumin. *Adv Protein Chem*. 1985;37:161-245.
54. Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *Febs Lett*. 1995;364(3):279-282.
55. Hidalgo FJ, Zamora R. Modification of bovine serum albumin structure following reaction with 4,5(e)-epoxy-2(E)-heptenal. *Chem Res Toxicol*. 2000;13(6):501-508.
56. Guedes S, Vitorino R, Domingues R, Amado F, Domingues P. Oxidation of bovine serum albumin: Identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Commun Mass Sp*. 2009;23(15):2307-2315.
57. Ogino T, Okada S. Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron-chelate complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1995;14(3):359-365.
58. Temple A, Yen T, Gronert S. Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin. *J Am Soc Mass Spectr*. 2006;17(8):1172-1180.
59. Dai J, Zhang Y, Wang J, Li X, Lu Z, Cai Y, Qian X. Identification of degradation products formed during performic oxidation of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(9):1130-1138.

60. Faure P, Wiernsperger N, Polge C, Favier A, Halimi S. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin Sci*. 2008 February 1, 2008;114(3):251-256.
61. Chesne S, Rondeau P, Armenta S, Bourdon E. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie*. 2006;88(10):1467-1477.
62. Rondeau P, Singh NR, Caillens H, Tallet F, Bourdon E. Oxidative stresses induced by glycoxidized human or bovine serum albumin on human monocytes. *Free Radical Bio Med*. 2008;45(6):799-812.
63. Rawlings ND, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(1):325-331.
64. Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*. 1993;290(Pt 1):205-218.
65. Barrett AJ, Rawlings ND. Families and Clans of Serine Peptidases. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318(2):247-250.
66. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D160-164.
67. Polgár L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(19):2161-2172.
68. Hartley BS. Proteolytic enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1960;29:45-72.
69. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 2010 January 1, 2010;38(suppl 1):D227-D233.
70. Tóth J, Medveczky P, Szilágyi L, Gráf L. Serine Proteases *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. In: Lajtha A, Banik N, editors.: Springer US; 2007. p. 409-443.
71. Huber R, Bode W. Structural basis of the activation and action of trypsin. *Accounts Chem Res*. 1978 1978/03/01;11(3):114-122.
72. Blow DM, Birktoft JJ, Hartley BS. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature*. 1969;221(5178):337-340.
73. Page M, Di Cera E. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7):1220-1236.
74. Bender ML, Kezdy FJ. Mechanism of Action of Proteolytic Enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1965;34(1):49-76.
75. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;27(2):157-162.
76. Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*. 2002;102(12):4501-4524.
77. Westermeier R, Naven T. Expression Proteomics. *Proteomics in Practice: Wiley-VCH Verlag GmbH*; 2002. p. 11-160.
78. Sweeney PJ, Walker JM. Proteolytic enzymes for peptide production. *Methods Mol Biol*. 1993;16:277-303.
79. Krieger M, Kay LM, Stroud RM. Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *J Mol Biol*. 1974;83(2):209-230.
80. Granvogl B, Plösch M, Eichacker L. Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(4):991-1002.
81. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem*. 1974;47(1):91-97.

82. Betzel C, Singh TP, Visanji M, Peters K, Fittkau S, Saenger W, Wilson KS. Structure of the complex of proteinase K with a substrate analogue hexapeptide inhibitor at 2.2-Å resolution. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15854-15858.
83. Betzel C, Pal GP, Struck M, Jany KD, Saenger W. Active-site geometry of proteinase K. Crystallographic study of its complex with a dipeptide chloromethyl ketone inhibitor. *FEBS Lett*. 1986;197(1-2):105-110.
84. Siezen RJ, Leunissen JA. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci*. 1997;6(3):501-523.
85. Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. [10.1038/nrm1939]. 2006;7(6):391-403.
86. Han X, Aslanian A, Yates III JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(5):483-490.
87. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
88. Loo JA, Udseth HR, Smith RD. Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1989;179(2):404-412.
89. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 1988;2(8):151-153.
90. Yates JR, Wong CCL, Cociorva D, Venable JD, Xu T. Comparison of Different Signal Thresholds on Data Dependent Sampling in Orbitrap and LTQ Mass Spectrometry for the Identification of Peptides and Proteins in Complex Mixtures. *J Am Soc Mass Spectr*. 2009 Aug;20(8):1405-1414.
91. Khalsa-Moyers G, McDonald WH. Developments in mass spectrometry for the analysis of complex protein mixtures. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006;5(2):98-111.
92. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11:49-79.
93. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 February 1, 2006;4(4):295-320.
94. Monteoliva L, Albar JP. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004 Nov;3(3):220-239.
95. America AHP, Cordewener JHG. Comparative LC-MS: A landscape of peaks and valleys. *Proteomics*. 2008;8(4):731-749.
96. Chen G, Pramanik BN. Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug Discov Today*. 2009;14(9-10):465-471.
97. Zubarev RA, Kelleher NL, McLafferty FW. Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *J Am Chem Soc*. 1998 1998/04/01;120(13):3265-3266.
98. McAlister GC, Berggren WT, Griep-Raming J, Horning S, Makarov A, Phanstiel D, Stafford G, Swaney DL, Syka JE, Zabrouskov V, Coon JJ. A proteomics grade electron transfer dissociation-enabled hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer. *J Proteome Res*. 2008 Aug;7(8):3127-3136.
99. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-2860.

100. Hanne Hustoft HM, Steven Ray Wilson, Leon Reubsaet, Elsa Lundanes, Tyge Greibrokk. A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics. *Integrative Proteomics* 2012.
101. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, Van Sluyter SC, Haynes PA. Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011;11(4):535-553.
102. Chiappetta G, Corbo C, Palmese A, Marino G, Amoresano A. Quantitative identification of protein nitration sites. *Proteomics*. 2009;9(6):1524-1537.
103. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotech*. [10.1038/13690]. 1999;17(10):994-999.
104. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002 May 1, 2002;1(5):376-386.
105. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2006 June 1, 2006;5(2):112-120.
106. D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L. Redox proteomics and drug development. *J Proteomics*. 2011 Nov 18;74(12):2575-2595.
107. Gevaert K, Impens F, Ghesquière B, Van Damme P, Lambrechts A, Vandekerckhove J. Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics*. 2008;8(23-24):4873-4885.
108. Emadali A, Gallagher-Gambarelli M. La protéomique quantitative par la méthode SILAC. *Med Sci (Paris)*. 2009;25(10):835-842.
109. Wang M, You J, Bemis KG, Tegeler TJ, Brown DP. Label-free mass spectrometry-based protein quantification technologies in proteomic analysis. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2008 Sep;7(5):329-339.
110. Wang G, Wu WW, Zeng W, Chou C-L, Shen R-F. Label-Free Protein Quantification Using LC-Coupled Ion Trap or FT Mass Spectrometry: Reproducibility, Linearity, and Application with Complex Proteomes. *J Proteome Res*. 2006 2006/05/01;5(5):1214-1223.
111. Zhang B, VerBerkmoes NC, Langston MA, Uberbacher E, Hettich RL, Samatova NF. Detecting Differential and Correlated Protein Expression in Label-Free Shotgun Proteomics. *J Proteome Res*. 2006 2006/11/01;5(11):2909-2918.
112. Hains PG, Truscott RJW. Proteomic analysis of the oxidation of cysteine residues in human age-related nuclear cataract lenses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. 2008;1784(12):1959-1964.
113. Liu H, Sadygov RG, Yates JR. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Anal Chem*. 2004 2004/07/01;76(14):4193-4201.
114. Zhu W, Smith JW, Huang C-M. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010.
115. Dicker L, Lin X, Ivanov AR. Increased Power for the Analysis of Label-free LC-MS/MS Proteomics Data by Combining Spectral Counts and Peptide Peak Attributes. *Mol Cell Proteomics*. 2010 December 1, 2010;9(12):2704-2718.
116. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, Roberts CT, Nagalla SR. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *J Proteome Res*. 2009 2009/01/02;8(1):239-245.

117. Bondarenko PV, Chelius D, Shaler TA. Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2002 2002/09/01;74(18):4741-4749.
118. Listgarten J, Emili A. Statistical and Computational Methods for Comparative Proteomic Profiling Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2005 April 1, 2005;4(4):419-434.
119. Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E, Carr SA. Quantitative, Multiplexed Assays for Low Abundance Proteins in Plasma by Targeted Mass Spectrometry and Stable Isotope Dilution. *Mol Cell Proteomics.* 2007 December 2007;6(12):2212-2229.
120. Kim K, Kim Y. Preparing multiple-reaction monitoring for quantitative clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2009 2009/06/01;6(3):225-229.
121. Anderson L, Hunter CL. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006 April 2006;5(4):573-588.
122. Barr DB, Barr JR, Maggio VL, Whitehead Jr RD, Sadowski MA, Whyatt RM, Needham LL. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2002;778(1–2):99-111.
123. Baldwin MA. Protein Identification by Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2004 January 1, 2004;3(1):1-9.
124. Dai J, Wang J, Zhang Y, Lu Z, Yang B, Li X, Cai Y, Qian X. Enrichment and Identification of Cysteine-Containing Peptides from Tryptic Digests of Performic Oxidized Proteins by Strong Cation Exchange LC and MALDI-TOF/TOF MS. *Anal Chem.* 2005 2005/12/01;77(23):7594-7604.
125. Chang Y-C, Huang C-N, Lin C-H, Chang H-C, Wu C-C. Mapping protein cysteine sulfonic acid modifications with specific enrichment and mass spectrometry: An integrated approach to explore the cysteine oxidation. *Proteomics.* 2010;10(16):2961-2971.
126. Sethuraman M, McComb ME, Heibeck T, Costello CE, Cohen RA. Isotope-coded Affinity Tag Approach to Identify and Quantify Oxidant-sensitive Protein Thiols. *Mol Cell Proteomics.* 2004 March 1, 2004;3(3):273-278.
127. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, Strahler JR, Andrews PC, Jakob U. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *P Natl Acad Sci.* 2008 June 17, 2008;105(24):8197-8202.
128. Thamsen M, Jakob U. The redoxome: Proteomic analysis of cellular redox networks. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(1):113-119.
129. Mirzaei H, Regnier F. Identification of yeast oxidized proteins: Chromatographic top-down approach for identification of carbonylated, fragmented and cross-linked proteins in yeast. *J Chromatogr A.* 2007;1141(1):22-31.
130. Norrgran J, Williams TL, Woolfitt AR, Solano MI, Pirkle JL, Barr JR. Optimization of digestion parameters for protein quantification. *Anal Biochem.* 2009;393(1):48-55.
131. Finehout EJ, Cantor JR, Lee KH. Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. *Proteomics.* 2005;5(9):2319-2321.
132. Mirzaei H, Regnier F. Creation of Allotypic Active Sites during Oxidative Stress. *J Proteome Res.* 2006 2006/09/01;5(9):2159-2168.
133. Ahrné E, Müller M, Lisacek F. Unrestricted identification of modified proteins using MS/MS. *Proteomics.* 2010;10(4):671-686.

134. Karty JA, Ireland MME, Brun YV, Reilly JP. Artifacts and unassigned masses encountered in peptide mass mapping. *J Chromatogr B*. 2002;782(1-2):363-383.
135. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
136. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1994;233:346-357.
137. Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: Different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1337(2):319-326.
138. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9895-9901.
139. Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9908-9913.
140. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329(1-2):23-38.
141. Maisonneuve E, Ducret A, Khoeiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S. Rules governing selective protein carbonylation. *PLoS One*. 2009;4(10).
142. Xu F, Wang W-H, Tan Y-J, Bruening ML. Facile Trypsin Immobilization in Polymeric Membranes for Rapid, Efficient Protein Digestion. *Anal Chem*. 2010 2010/12/15;82(24):10045-10051.
143. Hunt JV, Simpson JA, Dean RT. Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochem J*. 1988 Feb 15;250(1):87-93.
144. Mirzaei H, Regnier F. Affinity chromatographic selection of carbonylated proteins followed by identification of oxidation sites using tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005;77(8):2386-2392.

Anexo I – Tabelas das Pesquisas dos dados de MS

Tabela 1 – Pesquisas MS-Fit sem modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras controlo digeridas com tripsina e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data	Species	Protein Name
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol		
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	0.00521	18/18/3	33	4	-0.724	36.7	BOVIN	Serum albumin
	0.368	47/44/12	68	73	1.67	24.9	BOVIN	Serum albumin
	0.847	22/22/7	30	38	-20	17.2	BOVIN	Serum albumin
	0.00605	19/19/4	30	6	5.28	35.1	BOVIN	Serum albumin
	0.0331	49/46/10	73	61	10.3	27.1	BOVIN	Serum albumin
1h	0.00274	17/17/3	29	3.6	3.11	34.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0631	19/19/4	48	3.3	11.1	30.5	BOVIN	Serum albumin
	5.12	32/31/9	40	34	3.56	16.7	BOVIN	Serum albumin
	2.81	40/39/10	52	35	7.37	25.3	BOVIN	Serum albumin
	0.00195	17/17/3	32	3.2	6.36	29.6	BOVIN	Serum albumin
	0.17	51/48/11	68	71	8.67	25.2	BOVIN	Serum albumin
2h	0.011	17/17/4	32	2.2	4.33	29.7	BOVIN	Serum albumin
	5.59E-05	27/27/5	45	2.5	1.29	38.6	BOVIN	Serum albumin
	0.00291	23/23/5	37	3.4	7.19	31.7	BOVIN	Serum albumin
	6.09E-04	36/35/7	50	28	11.1	38.3	BOVIN	Serum albumin
	0.00259	16/16/3	25	2.4	8.34	30.6	BOVIN	Serum albumin
	5.30E-05	42/41/9	50	52	14.6	35.5	BOVIN	Serum albumin
4h	0.00477	14/14/3	27	2.3	1.54	33.8	BOVIN	Serum albumin
	0.00309	44/42/9	58	41	16.3	33.7	BOVIN	Serum albumin
	5.61E-04	17/17/4	30	2.1	6.06	22.5	BOVIN	Serum albumin
	0.0218	21/21/5	41	2.6	8.59	33.5	BOVIN	Serum albumin
	0.0733	11/11/2003	23	2.6	9.28	27.1	BOVIN	Serum albumin
	0.00317	17/17/4	38	2.2	1.09	38.5	BOVIN	Serum albumin

Tabela 2 – Pesquisas MS-Fit com modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras controlo digeridas com tripsina e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data		
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol	Species	Protein Name
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	1.63E-05	60/71/14	71	6.6	4.95	38.7	BOVIN	Serum albumin
	0.0435	92/88/24	88	76	0.941	31.3	BOVIN	Serum albumin
	0.00608	41/44/15	53	42	-11.4	34.6	BOVIN	Serum albumin
	3.79E-05	51/58/13	62	8.5	4.63	33.6	BOVIN	Serum albumin
	0.00612	88/88/20	94	64	7.73	31.2	BOVIN	Serum albumin
1h	3.72E-06	56/62/12	63	6.7	5.49	33.6	BOVIN	Serum albumin
	3.86E-04	61/65/13	80	6.2	3.47	33	BOVIN	Serum albumin
	1.58E-06	57/67/12	59	6	5.82	35.1	BOVIN	Serum albumin
	0.00163	96/95/21	86	74	5.83	31.1	BOVIN	Serum albumin
	0.0118	45/48/15	49	35	4.25	21.3	BOVIN	Serum albumin
	0.00461	64/65/17	65	38	5	30.7	BOVIN	Serum albumin
2h	1.36E-04	44/54/12	47	4.3	3.11	28.4	BOVIN	Serum albumin
	2.57E-05	64/73/13	71	4.8	0.666	34.4	BOVIN	Serum albumin
	7.09E-05	55/64/13	61	5.9	5.61	34	BOVIN	Serum albumin
	3.16E-04	70/76/15	75	30	7.81	36.3	BOVIN	Serum albumin
	4.24E-04	38/46/10	42	4.4	5.08	36.2	BOVIN	Serum albumin
	4.75E-06	74/84/19	73	55	9.21	36.6	BOVIN	Serum albumin
4h	0.00268	45/53/12	62	4.5	4.38	32.3	BOVIN	Serum albumin
	0.0132	79/86/19	74	45	10.7	35.9	BOVIN	Serum albumin
	1.08E-05	44/53/13	57	4.1	6.95	22.8	BOVIN	Serum albumin
	0.0015	52/57/14	61	5.1	9.61	31	BOVIN	Serum albumin
	0.00182	33/39/12	46	5.1	5.06	32	BOVIN	Serum albumin
	5.35E-05	44/50/12	60	4.4	1.15	33.8	BOVIN	Serum albumin

Tabela 3 – Pesquisas MS-Fit sem modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras oxidadas digeridas com tripsina e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data		
	Score	# mat	TC	TIC	Err	Tol	Species	Protein Name
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	1.30E-04	18/18/3	32	3	0.0241	38.6	BOVIN	Serum albumin
	5.25E-04	17/17/3	24	3	3.4	37.1	BOVIN	Serum albumin
	2.1	21/21/6	29	17	-14.5	20.2	BOVIN	Serum albumin
	0.295	13/13/6	19	19	-20.8	21.3	BOVIN	Serum albumin
	9.17E-04	20/20/4	34	4.6	6.21	32	BOVIN	Serum albumin
	0.141	28/27/6	55	19	10	34	BOVIN	Serum albumin
1h	9.17E-04	20/19/4	28	3.7	6.97	34.5	BOVIN	Serum albumin
	0.0026	22/21/4	42	2.7	3.06	39.2	BOVIN	Serum albumin
	0.00626	20/20/4	26	4.6	6.08	30.1	BOVIN	Serum albumin
	0.134	20/20/4	42	3.5	-1.03	30.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0221	51/50/9	66	44	-4.69	25.2	BOVIN	Serum albumin
	2.1	42/40/10	55	58	-14.2	24.5	BOVIN	Serum albumin
2h	0.00148	53/50/11	68	62	4.57	29.8	BOVIN	Serum albumin
	0.00412	52/50/10	61	65	-8.52	22.7	BOVIN	Serum albumin
	0.0089	51/48/9	64	56	3.5	28.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0023	52/50/9	61	52	-0.927	25.7	BOVIN	Serum albumin
	4.48E-04	50/48/9	69	41	11.9	31.5	BOVIN	Serum albumin
	0.0166	51/49/9	58	64	-6.99	20.9	BOVIN	Serum albumin
4h	4.78	30/29/10	31	39	1.34	19.3	BOVIN	Serum albumin
	0.373	30/30/14	35	47	-10.9	18.9	BOVIN	Serum albumin
	0.06	54/51/10	72	63	1.57	23.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0317	52/50/10	71	61	-7.93	22.3	BOVIN	Serum albumin
	7.38E-04	55/53/10	73	71	-8.48	23.1	BOVIN	Serum albumin
	0.00679	50/49/10	66	69	-11.4	19.1	BOVIN	Serum albumin

Tabela 4 – Pesquisas MS-Fit com modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras oxidadas digeridas com tripsina e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data		
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol	Species	Protein Name
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	2.09E-10	60/72/12	56	6.4	1.75	36.6	BOVIN	Serum albumin
	1.29E-06	46/53/11	51	5.7	2.78	35.7	BOVIN	Serum albumin
	1.50E-08	59/68/12	49	7.3	3.07	34.8	BOVIN	Serum albumin
	2.80E-04	70/71/15	89	22	4.27	34.1	BOVIN	Serum albumin
	0.0409	30/31/9	39	18	-9.96	25.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0303	21/21/9	29	20	-12.5	34.4	BOVIN	Serum albumin
1h	0.00235	44/53/11	46	6	5.49	31.8	BOVIN	Serum albumin
	9.40E-05	56/64/13	63	6.3	0.829	33.7	BOVIN	Serum albumin
	8.85E-07	54/59/12	52	7.2	3.25	34.2	BOVIN	Serum albumin
	7.99E-05	58/64/12	74	6	2.15	33.4	BOVIN	Serum albumin
	0.0146	114/117/21	90	61	5.93	33.7	BOVIN	Serum albumin
	1.09E-05	117/112/22	89	59	-1.05	28.2	BOVIN	Serum albumin
2h	1.91E-06	110/112/25	88	66	6.24	32.4	BOVIN	Serum albumin
	1.75E-07	133/130/25	88	69	-2.18	30.7	BOVIN	Serum albumin
	1.57E-06	112/111/21	91	59	4.07	33.2	BOVIN	Serum albumin
	1.17E-08	121/120/22	90	55	1.16	29.8	BOVIN	Serum albumin
	4.23E-06	109/106/20	88	46	8.46	32.3	BOVIN	Serum albumin
	1.76E-06	118/122/23	86	67	-2.68	25.9	BOVIN	Serum albumin
4h	2.79E-04	124/123/25	91	66	2.93	29.1	BOVIN	Serum albumin
	6.88E-05	118/115/23	91	64	-2.86	29.2	BOVIN	Serum albumin
	3.62E-06	133/128/24	90	73	-1.09	29.9	BOVIN	Serum albumin
	3.61E-06	127/127/25	90	72	-4.08	27.4	BOVIN	Serum albumin
	5.95E-04	48/50/17	41	43	1.86	25.9	BOVIN	Serum albumin
	0.00178	55/57/26	48	53	-8.43	25	BOVIN	Serum albumin

Tabela 5 – Pesquisas MS-Fit sem modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras controlo digeridas com proteinase K e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data	Species	Protein Name
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol		
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	1.55E+16	47/44/10	41.4	28.8	3.8	37.5	BOVIN	Serum albumin
	4.66E+12	38/32/10	30.3	24.2	3.05	31.2	BOVIN	Serum albumin
	5.15E+10	43/36/9	34.3	29.7	2.17	33	BOVIN	Serum albumin
	4.64E+14	50/41/12	34.8	39	-0.853	31.9	BOVIN	Serum albumin
	7.60E+11	49/41/13	33.3	29.8	1.17	35.8	BOVIN	Serum albumin
	3.71E+15	56/44/11	39.9	34.4	2.88	34.7	BOVIN	Serum albumin
1h	1.44E+15	52/45/12	40.4	32.6	3.18	35.1	BOVIN	Serum albumin
	5.97E+13	47/44/10	37.2	28.6	2.79	33.3	BOVIN	Serum albumin
	3.09E+12	42/38/10	33.3	27	4.49	35	BOVIN	Serum albumin
	4.42E+13	55/44/13	39	39.9	0.348	31.4	BOVIN	Serum albumin
	1.14E+13	42/38/9	33.1	29.9	3.62	33.7	BOVIN	Serum albumin
	1.18E+12	39/35/8	35.7	22.9	5.36	32.7	BOVIN	Serum albumin
2h	1.17E+14	44/38/11	33.4	33.1	3.58	33.6	BOVIN	Serum albumin
	1.77E+14	52/50/12	43.2	24.6	3.18	38.7	BOVIN	Serum albumin
	8.36E+10	40/36/10	30	28.6	5.53	33.4	BOVIN	Serum albumin
	1.25E+17	47/45/10	42.5	23.7	2.52	37.8	BOVIN	Serum albumin
	1.08E+13	43/39/10	37.6	25.1	6.14	38.2	BOVIN	Serum albumin
	3.01E+13	45/39/12	36.7	17.5	5.39	34.8	BOVIN	Serum albumin
4h	6.86E+11	52/49/11	45.1	16.6	-2.54	35.6	BOVIN	Serum albumin
	1.49E+12	46/40/12	35.9	30.5	4.45	34.9	BOVIN	Serum albumin
	1.09E+11	38/34/12	33.3	28.2	5.09	33.1	BOVIN	Serum albumin
	8.98E+10	36/30/12	30.6	23.6	4.79	33.7	BOVIN	Serum albumin
	364111	25/19/8	19.8	10.4	5.49	34.1	BOVIN	Serum albumin
	428883	22/16/9	22.1	18	5.48	32	BOVIN	Serum albumin

Tabela 6 – Pesquisas MS-Fit com modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras controlo digeridas com proteinase K e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data	Species	Protein Name
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol		
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	1.53E+27	113/97/22	61.1	44.9	4.08	34.5	BOVIN	Serum albumin
	1.18E+23	96/80/25	52.7	42.1	3.35	32.7	BOVIN	Serum albumin
	3.77E+25	106/88/23	57.2	48.9	2.47	34	BOVIN	Serum albumin
	3.28E+26	120/92/26	60.6	49.3	-0.449	33.6	BOVIN	Serum albumin
	6.66E+25	108/90/28	57.2	45.3	2.61	34.2	BOVIN	Serum albumin
	6.66E+25	122/92/24	60.3	40.7	1.82	34.8	BOVIN	Serum albumin
1h	1.06E+26	118/98/27	61	50.4	2.61	35.1	BOVIN	Serum albumin
	2.45E+29	112/94/21	61.1	46	2.71	34.5	BOVIN	Serum albumin
	3.83E+28	95/79/21	53.4	46	4.22	34.3	BOVIN	Serum albumin
	5.62E+21	120/91/26	57.8	45.6	3.13	31.7	BOVIN	Serum albumin
	7.91E+26	103/88/21	54	47.1	3.8	34.4	BOVIN	Serum albumin
	3.20E+20	88/78/19	55.8	39.6	5.1	32.5	BOVIN	Serum albumin
2h	9.53E+24	109/84/24	56.5	50.1	1.13	35.9	BOVIN	Serum albumin
	8.32E+23	100/89/21	57.2	37.3	4.22	35.6	BOVIN	Serum albumin
	2.48E+23	93/80/22	51.9	45.8	3.11	33.6	BOVIN	Serum albumin
	2.54E+31	115/99/22	59.6	37.5	2.5	34.5	BOVIN	Serum albumin
	6.20E+21	98/81/22	59.5	43.2	4.36	34.8	BOVIN	Serum albumin
	2.45E+25	105/91/28	61.3	34.4	2.46	34.9	BOVIN	Serum albumin
4h	1.07E+23	99/87/19	59	23.9	-0.729	34.2	BOVIN	Serum albumin
	7.57E+24	110/91/27	61.1	49.7	2.39	34.1	BOVIN	Serum albumin
	1.13E+20	94/78/27	59	45.6	2.87	33	BOVIN	Serum albumin
	6.64E+19	79/61/24	50.1	35.8	4.76	33	BOVIN	Serum albumin
	1.26E+08	53/36/16	38.2	17.5	5.86	32.5	BOVIN	Serum albumin
	1.35E+09	40/28/16	32.8	25.8	3.29	29.6	BOVIN	Serum albumin

Tabela 7 – Pesquisas MS-Fit sem modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras oxidadas digeridas com proteinase K e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data	Species	Protein Name
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol		
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	3.68E+11	44/42/12	40.5	18.5	4.94	35.1	BOVIN	Serum albumin
	2.85E+08	37/34/10	33.8	17.5	7.79	35.9	BOVIN	Serum albumin
	2.24E+12	49/43/11	38.4	26.3	6.72	31.4	BOVIN	Serum albumin
	1.27E+08	32/27/12	30	21.2	8.28	29.1	BOVIN	Serum albumin
	6.55E+08	33/32/9	31.6	18.4	5.55	35.6	BOVIN	Serum albumin
	7.25E+12	49/46/12	42.2	21.3	0.745	35.2	BOVIN	Serum albumin
1h	3.65E+11	44/37/11	36.7	36.3	-2.24	34.2	BOVIN	Serum albumin
	3.23E+10	50/38/11	35.1	34.9	0.71	35.4	BOVIN	Serum albumin
	1.27E+13	41/36/12	35.4	25.2	1.58	32.1	BOVIN	Serum albumin
	1.44E+11	49/39/11	39	27.1	-2.1	34.6	BOVIN	Serum albumin
	5.04E+09	45/33/8	31.5	29.8	-2.76	35.3	BOVIN	Serum albumin
	1.95E+13	51/40/11	37.2	34.4	0.785	36.8	BOVIN	Serum albumin
2h	2.17E+22	56/47/8	38.7	37.7	1.16	32.1	BOVIN	Serum albumin
	2.56E+20	59/49/8	44.5	37.9	-1.13	34.1	BOVIN	Serum albumin
	4.59E+15	58/47/12	39.2	45	-3.35	30.5	BOVIN	Serum albumin
	3.49E+14	44/36/6	36.1	38.2	-6.06	29.6	BOVIN	Serum albumin
	8.03E+12	50/39/8	35.3	38.8	-4.8	32.5	BOVIN	Serum albumin
	2.00E+11	40/30/5	28.7	34.7	-3.13	31.8	BOVIN	Serum albumin
4h	3.21E+18	52/43/8	37.4	41.4	-0.784	32	BOVIN	Serum albumin
	3.66E+19	55/45/7	40.4	44.2	-1.77	31.1	BOVIN	Serum albumin
	2.39E+20	59/48/9	46	45.4	-2.16	36.9	BOVIN	Serum albumin
	5.75E+12	44/36/6	33.6	39	-7.19	31.7	BOVIN	Serum albumin
	1.56E+19	64/53/9	44.3	37.7	-2.49	33.5	BOVIN	Serum albumin
	1.05E+14	52/42/10	40.4	43	-4.55	35.1	BOVIN	Serum albumin

Tabela 8 – Pesquisas MS-Fit com modificações efetuadas no motor de busca *Protein Prospector* para as amostras oxidadas digeridas com proteinase K e analisadas por MADI-TOF-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, número de péptidos identificados, taxas de cobertura (%) e erros associados para duplicados de cada reação.

	MOWSE	# pep	%	%	Mean	Data	Species	Protein Name
	Score	# mat	Cov	TIC	Err	Tol		
		% mat			ppm	ppm		
0.5h	4.00E+19	92/79/22	50.4	25	3.67	34	BOVIN	Serum albumin
	1.94E+15	92/76/22	58.6	35	4.55	34.8	BOVIN	Serum albumin
	3.69E+26	120/98/26	63.8	46.1	1.9	34.1	BOVIN	Serum albumin
	2.04E+14	77/61/28	53.7	36.6	4.81	33.3	BOVIN	Serum albumin
	6.21E+20	89/76/21	50.9	28	4.23	34.6	BOVIN	Serum albumin
	1.81E+22	103/86/22	60.3	38.7	2.79	33.1	BOVIN	Serum albumin
1h	3.92E+23	119/89/25	58.3	49.3	-1.54	34.7	BOVIN	Serum albumin
	1.46E+21	123/93/28	59.5	48.2	0.535	35.6	BOVIN	Serum albumin
	4.80E+24	105/86/28	57.7	43.9	3.47	32.8	BOVIN	Serum albumin
	2.46E+25	115/87/24	59.3	34.7	-0.971	34.8	BOVIN	Serum albumin
	3.47E+20	115/84/21	58.2	52.8	0.181	33.2	BOVIN	Serum albumin
	7.44E+23	131/100/28	59.6	43.5	3.03	35.7	BOVIN	Serum albumin
2h	1.08E+38	128/92/16	59.1	42.8	0.838	34.2	BOVIN	Serum albumin
	2.92E+40	147/115/20	62.4	44.4	-0.0463	34	BOVIN	Serum albumin
	7.82E+29	141/104/26	57.7	52.4	-0.693	35.5	BOVIN	Serum albumin
	7.44E+30	112/82/13	56.8	52.4	-2.27	35.5	BOVIN	Serum albumin
	2.21E+27	144/109/23	59.3	47.9	-1.33	34.8	BOVIN	Serum albumin
	5.47E+25	114/81/13	54.5	41.2	-1.49	35.6	BOVIN	Serum albumin
4h	5.30E+32	120/92/17	53.4	47.7	0.684	33.6	BOVIN	Serum albumin
	5.48E+39	157/117/19	60.3	55.2	-0.503	35.6	BOVIN	Serum albumin
	8.81E+40	145/112/21	61.3	54	0.441	36.1	BOVIN	Serum albumin
	2.97E+23	118/86/15	58.8	54.6	-2.74	34.7	BOVIN	Serum albumin
	3.55E+40	168/129/21	67.1	48.3	0.52	33.5	BOVIN	Serum albumin
	7.60E+26	135/103/24	58.3	58.8	-2.72	33.6	BOVIN	Serum albumin

Tabela 9 – Pesquisas sem modificações efetuadas no motor de busca *Turbo Sequest* para as amostras controle digeridas com tripsina e analisadas por nano-HPLC-ESI-iontrap-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, as taxas de cobertura (%) e o n° de péptidos identificados.

Amostra	Score	Taxa Cobertura (%)	N° Péptidos
B 30	300.2713	54.9	71 (58 2 2 5 4)
B 30	258.2473	44.8	61 (53 3 3 1 1)
B 30	240.2879	48.8	59 (48 1 1 3 6)
B 60	296.2806	53	69 (63 1 2 1 2)
B 60	284.2573	45.3	66 (59 3 3 0 1)
B 60	286.2839	46.79	68 (61 2 3 2 0)
B2	350.2971	46.5	70 (63 1 1 4 1)
B2	308.2707	45	65 (59 2 3 1 0)
B2	312.2868	40.7	64 (57 2 3 1 1)
B4	346.3139	53.05	77 (68 1 3 2 3)
B4	348.2849	53.21	74 (63 3 2 2 4)
B4	344.3048	58	84 (71 1 4 3 5)

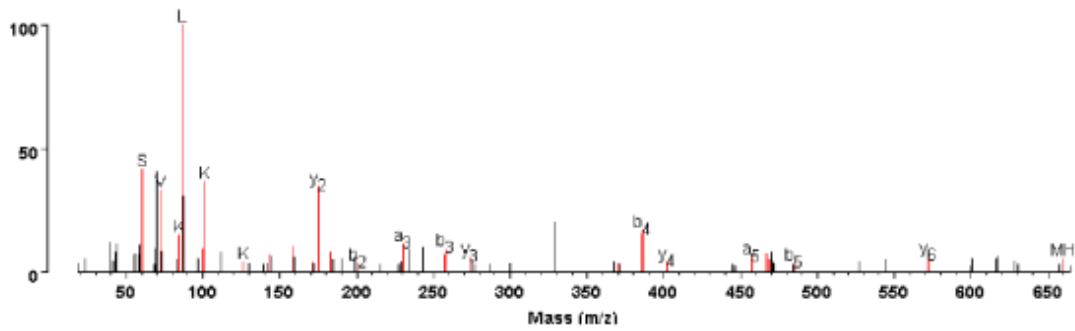
Tabela 10 – Pesquisas sem modificações efetuadas no motor de busca *Turbo Sequest* para as amostras oxidadas digeridas com tripsina e analisadas por nano-HPLC-ESI-iontrap-MS. Na tabela encontram-se representados os scores, as taxas de cobertura (%) e o n° de péptidos identificados.

Amostra	Score	Taxa Cobertura (%)	N° Péptidos
Ox 30	342.2607	59.8	71 (61 1 1 6 2)
Ox 30	308.2642	51.73	57 (50 3 1 1 2)
Ox 30	288.2473	47.78	58 (48 3 2 1 4)
Ox 60	306.2602	46.46	68 (54 6 4 2 2)
Ox 60	262.2552	43	60 (54 3 0 1 2)
Ox 60	318.2722	50.41	65 (58 1 3 1 2)
Ox 2h	300.2856	45.14	76 (67 1 1 3 4)
Ox 2h	236.3	39.87	53 (46 0 1 4 2)
Ox 2h	402.279	65.4	89 (79 3 4 3 0)
Ox 4h	282.2535	45.3	68 (60 2 2 3 1)
Ox 4h	250.2665	36.08	57 (52 0 2 2 1)
Ox 4h	298.2626	50.74	77 (67 2 3 2 3)

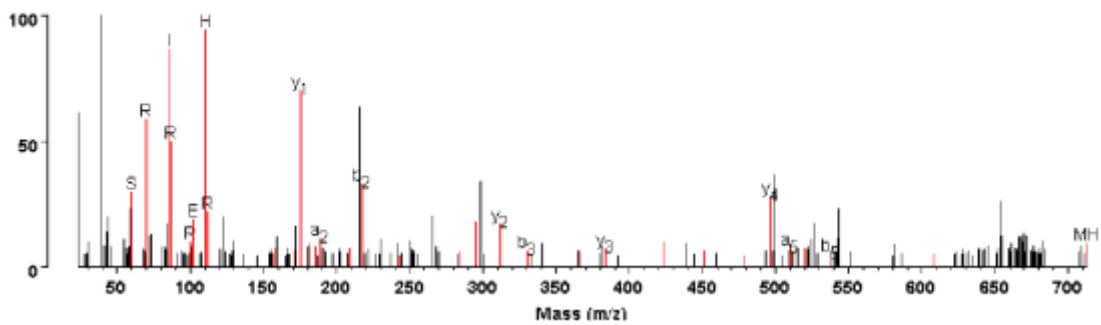
Anexo II – Espectros dos péptidos identificados a partir dos dados de MS/MS

- Espectros dos péptidos identificados para os produtos de fragmentação da BSA por MALDI-TOF-TOF

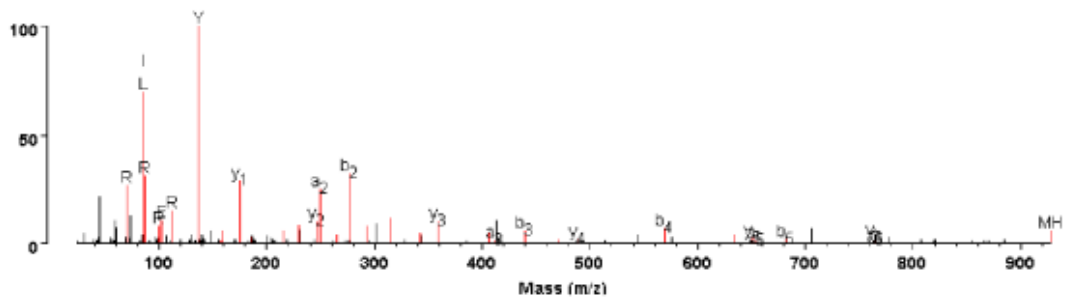
SLGKVG(-2.0207)



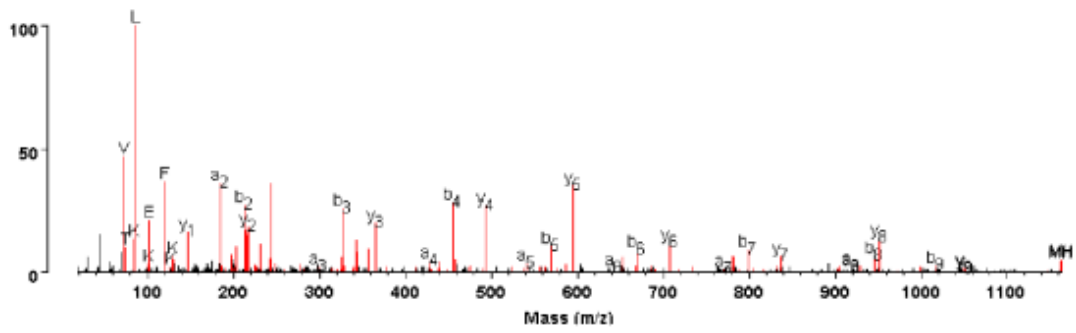
SEIAHR



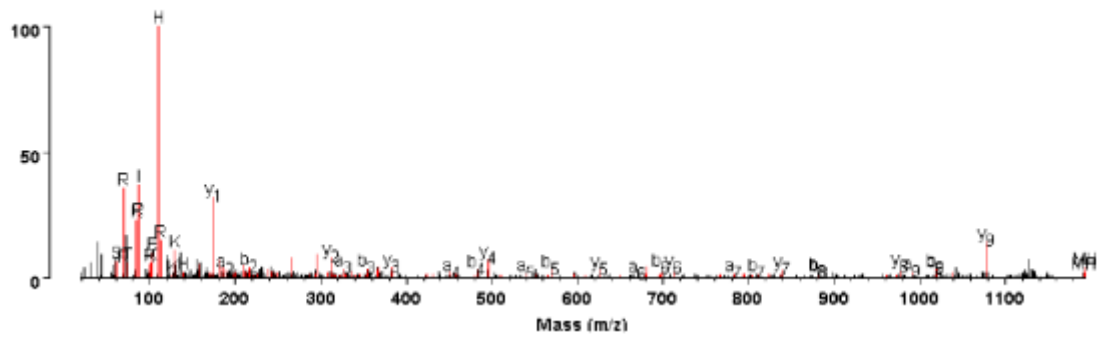
YLYEIAR



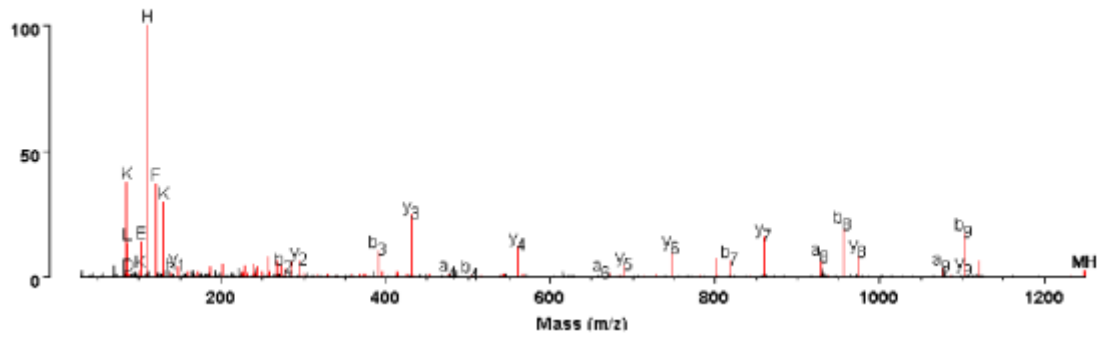
LVNELTEFAK



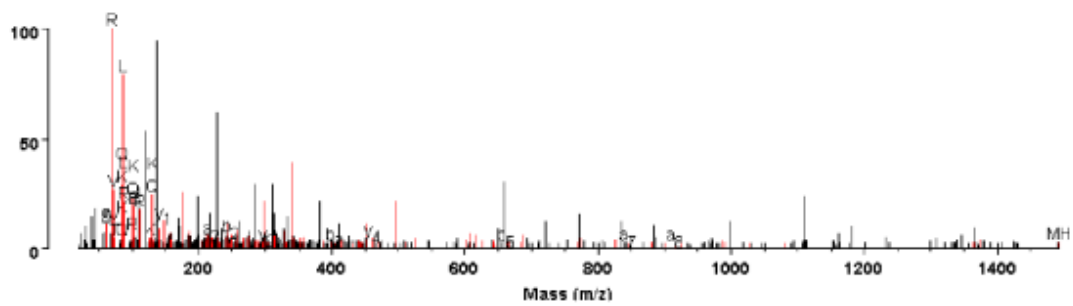
DTHKSEIAHR



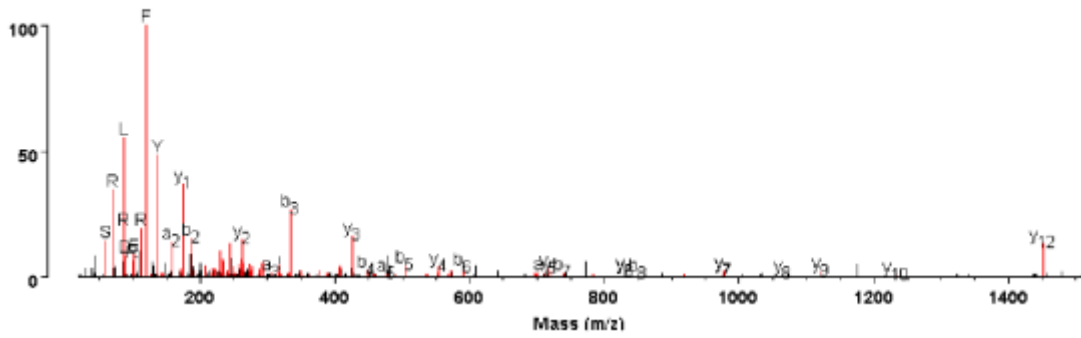
FKDLGEEHFK



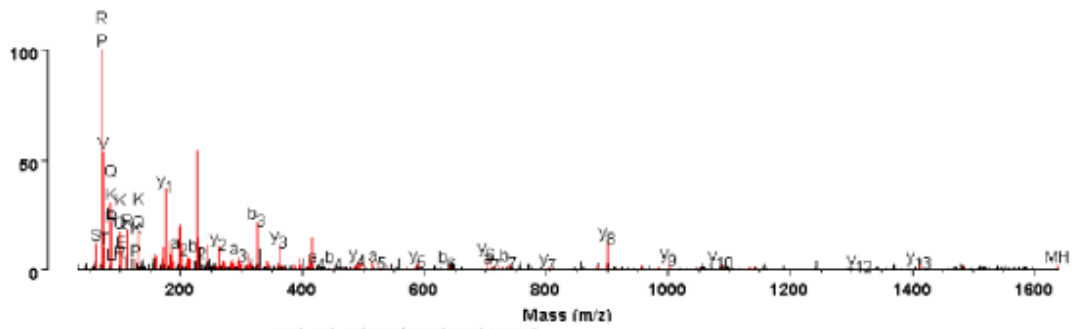
TM(Oxidation)REKVLASSARQ



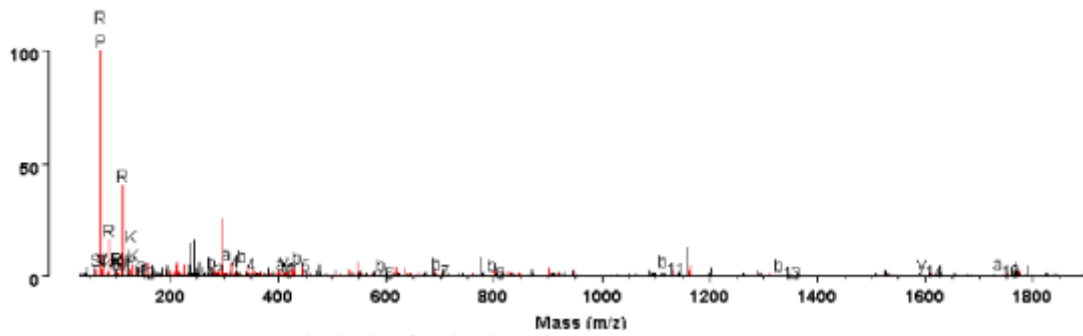
DAFLGSFLYEYSR



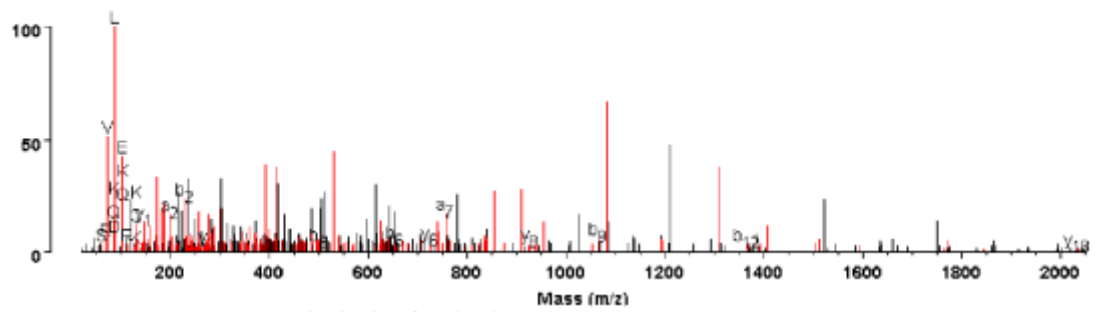
KVPQVSTPTLVEYSR



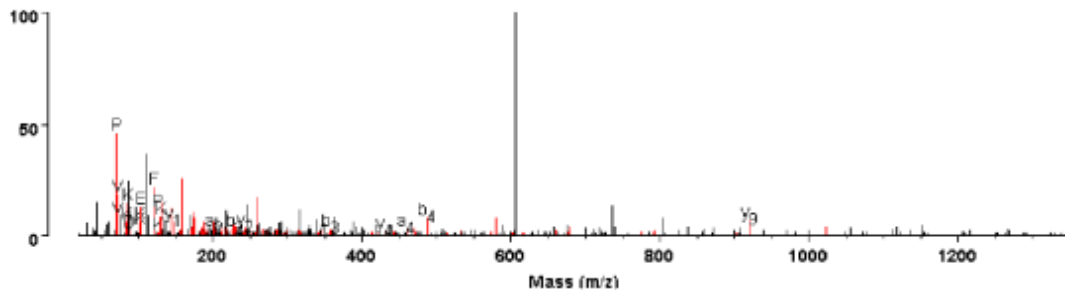
GKVGTRCCTKPESERM(Oxidation)P



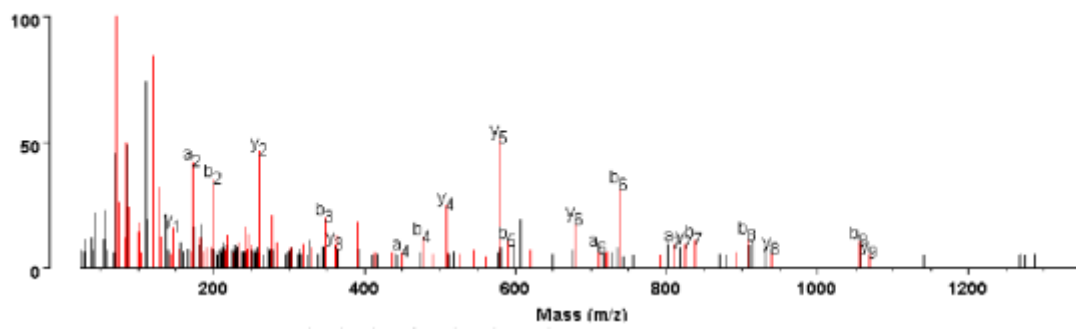
KVASLRETY(Oxidation)GDMADCCEKQ



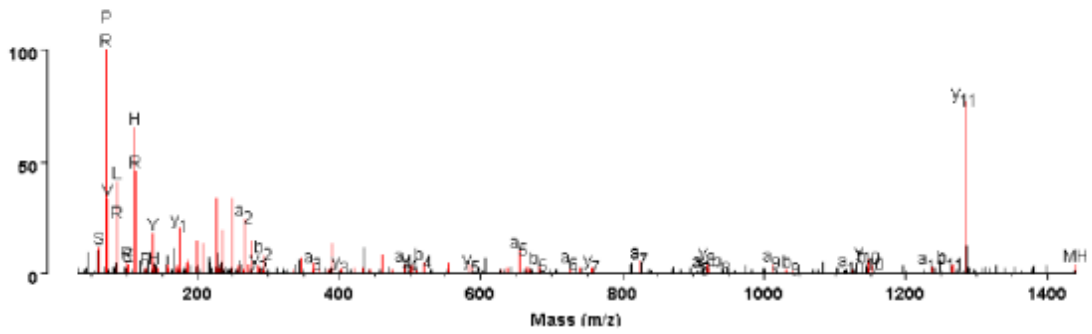
DDKEACFAVEGPK



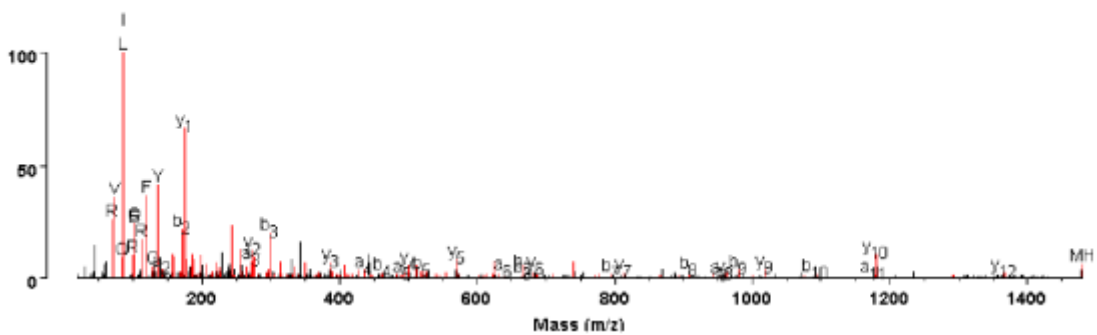
TVM(Oxidation)ENFVAFVDK



RHPEYAVSVLLR



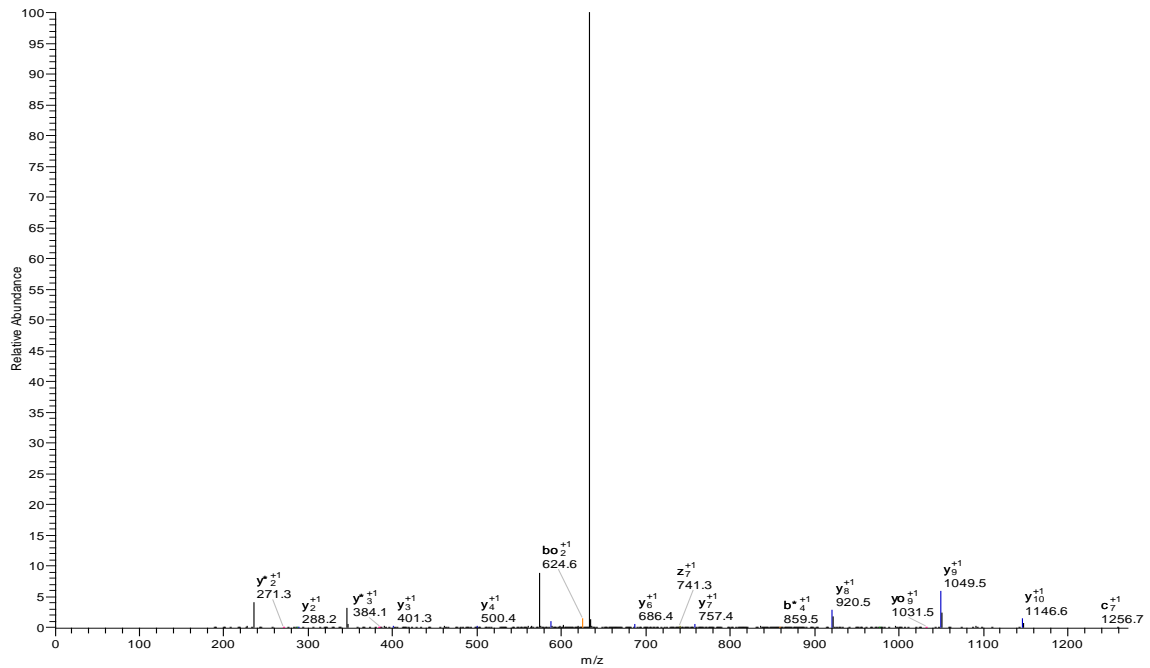
LGEYGFQNALIVR



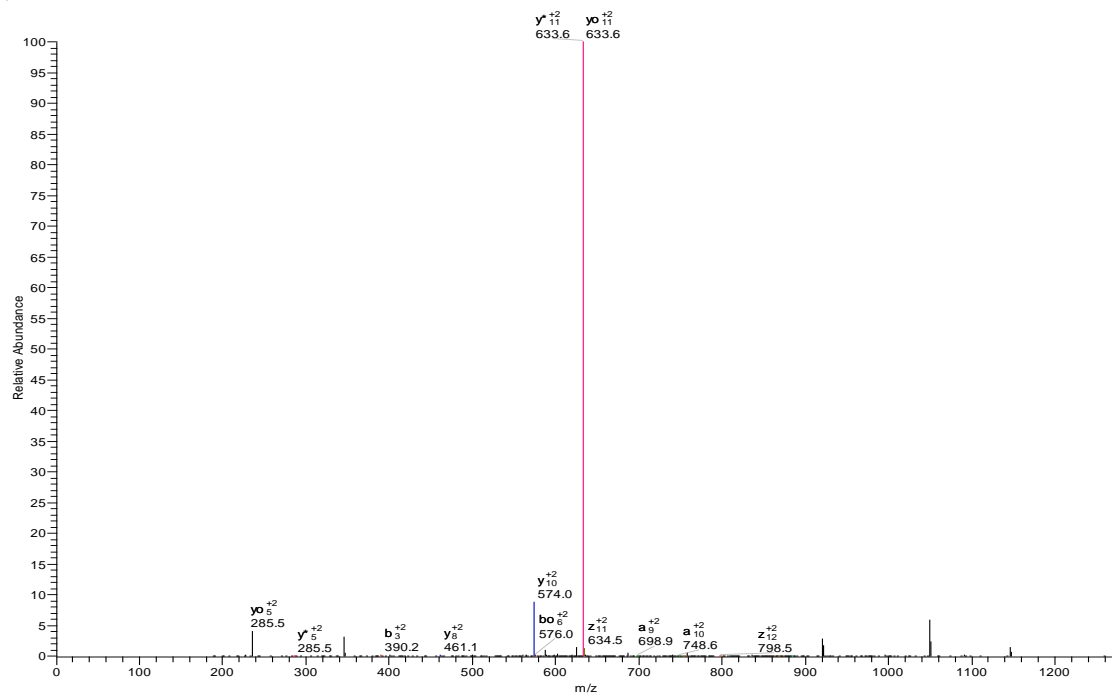
- Espectros dos péptidos identificados nas pesquisas com modificações em argininas e lisinas efetuadas no *Turbo Sequest* para as amostras oxidadas digeridas com tripsina após análise por nanoHPLC-ESI-iontrap-MS/MS. Para cada péptido poderão estar representados os espectros de iões de carga múltipla, dependendo da cobertura dos y e b.

S.R*R@HPEYAVSVLLR.L

#1107-1107 RT:25.82-25.82 NL: 3.51E5

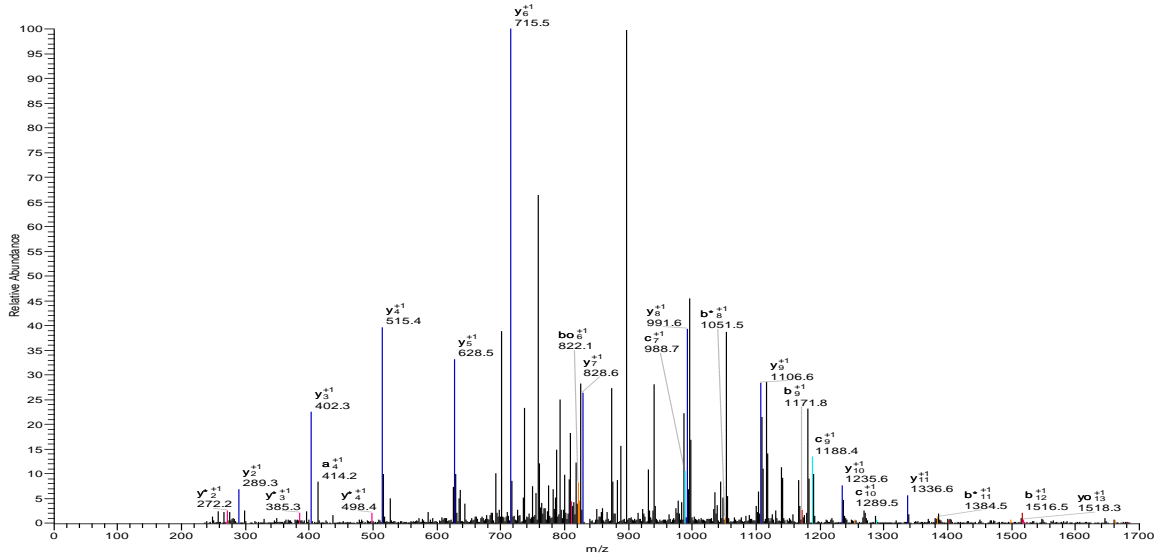


#1107-1107 RT:25.82-25.82 NL: 3.51E5

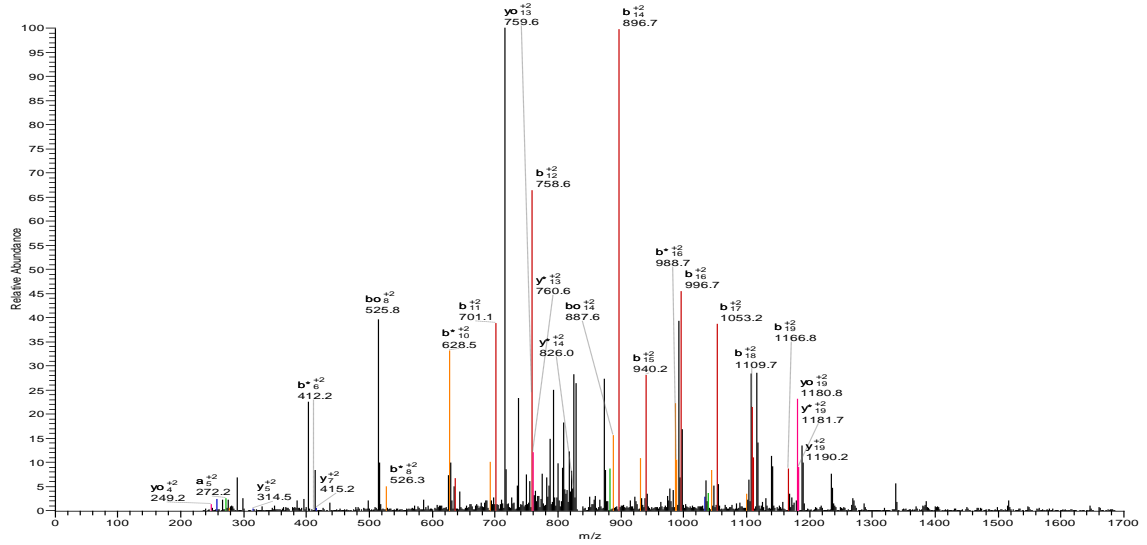


T.KPESER#MPCTEDYLSLILNR.L

#1315-1315 RT:29.74-29.74 NL:2.50E3

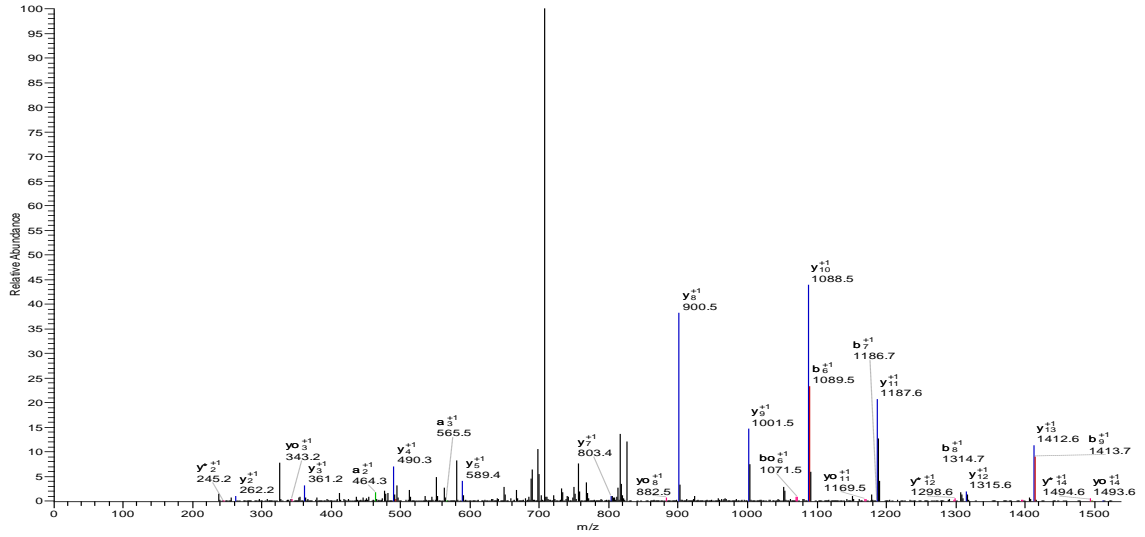


#1315-1315 RT:29.74-29.74 NL:2.50E3

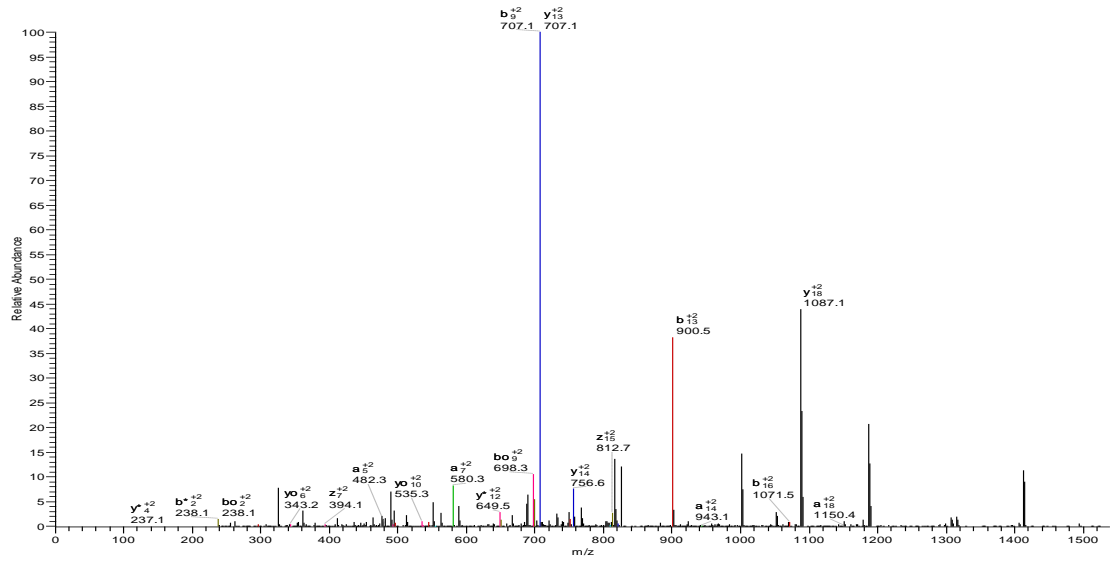


V.R@YTR#KVPQVSTPTLVEVSR.S

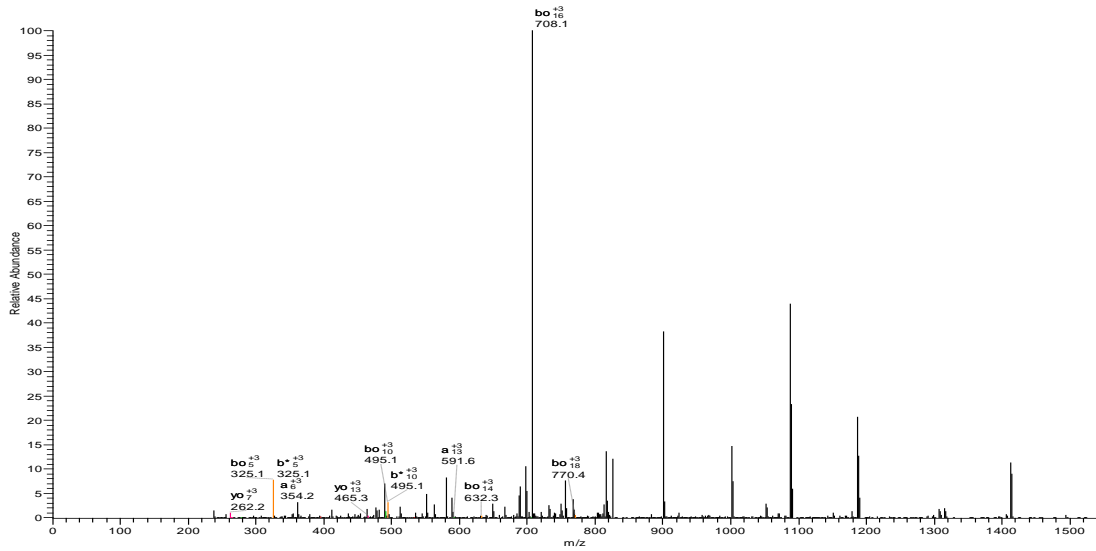
#1116-1116 RT:26.49-26.49 NL: 1.95E4



#1116-1116 RT:26.49-26.49 NL: 1.95E4

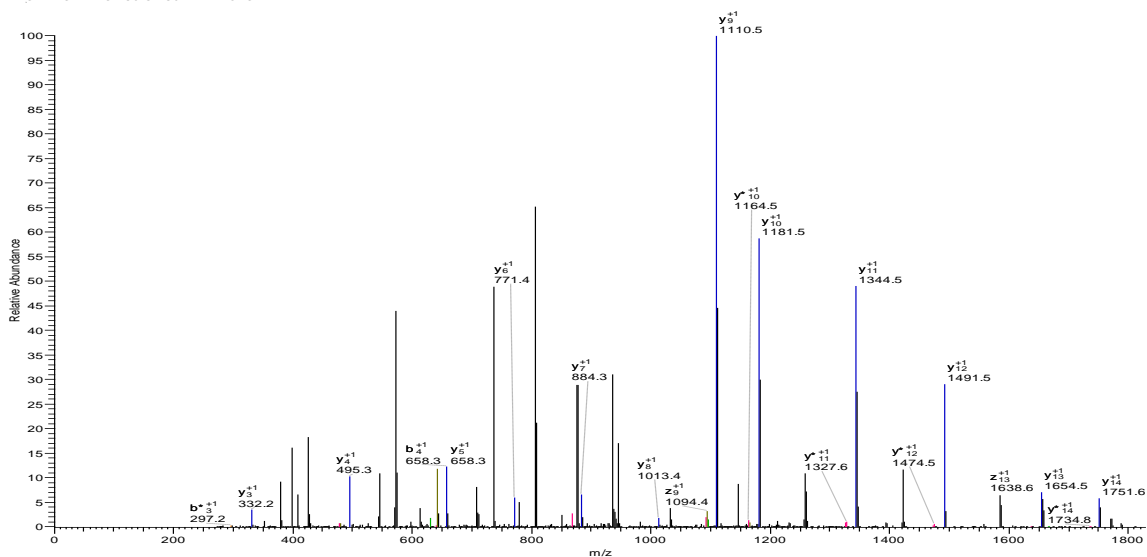


#1116-1116 RT:26.49-26.49 NL: 1.95E4

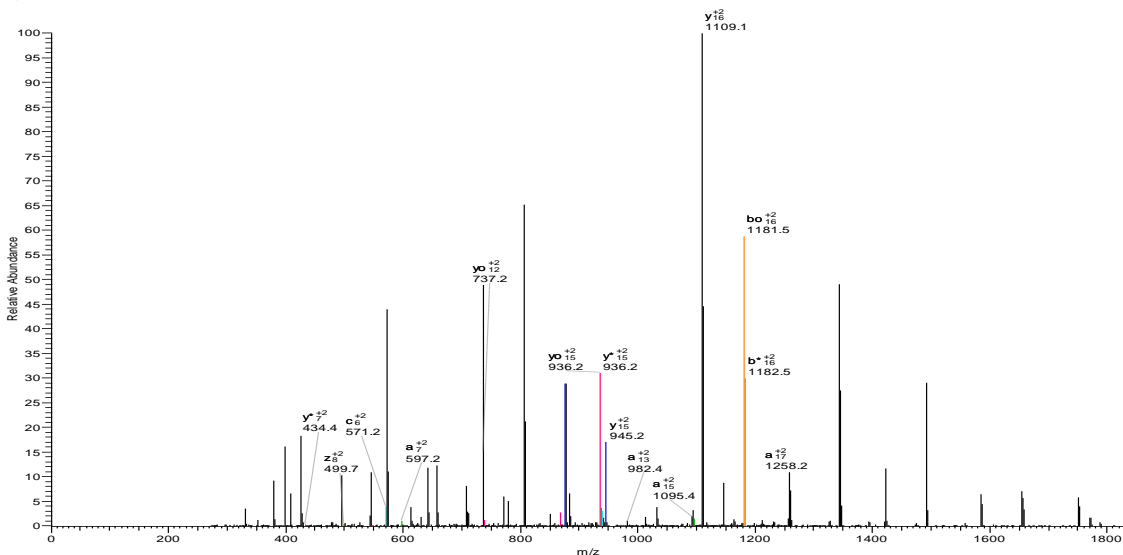


Y.EIAR^R@HPYFYAPELLYANK.Y

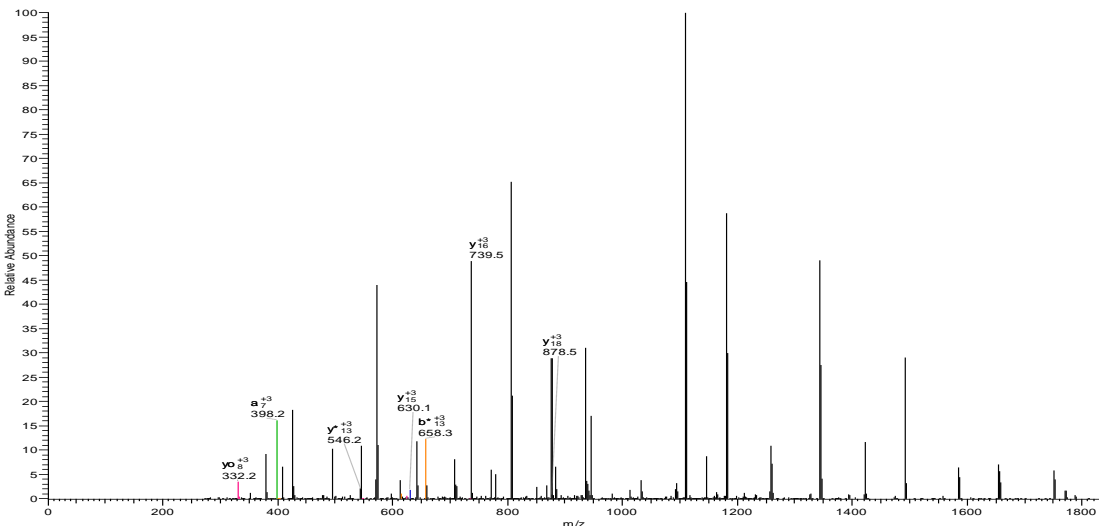
#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3



#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3

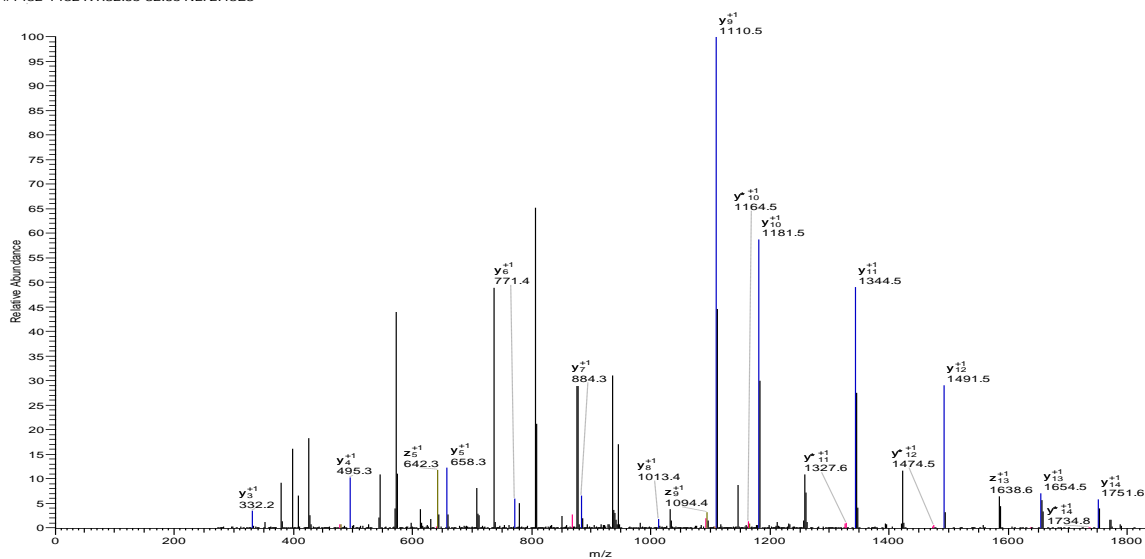


#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3

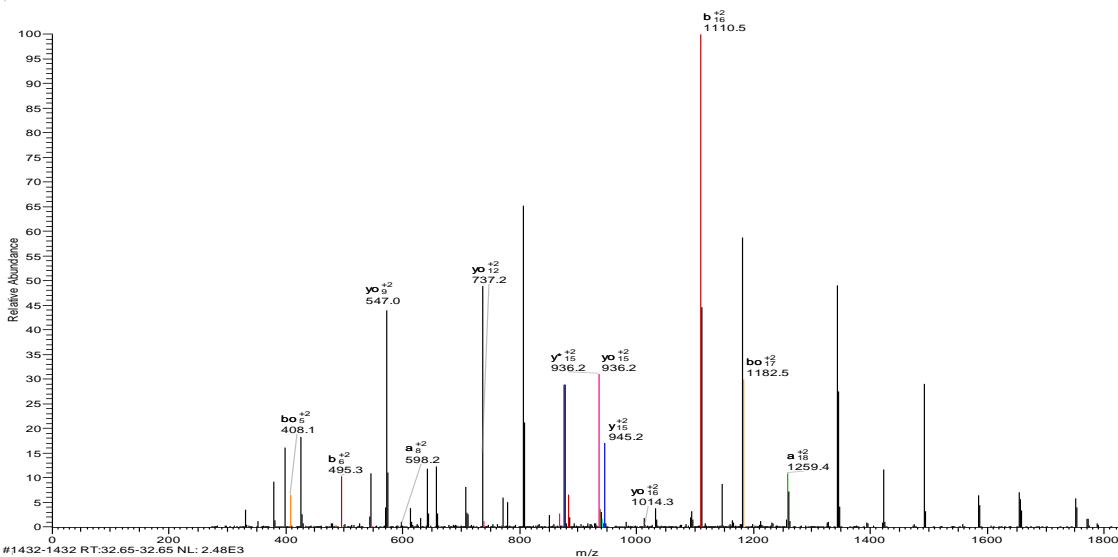


L.YEJAR~RHPYFYAPELLYANK.Y

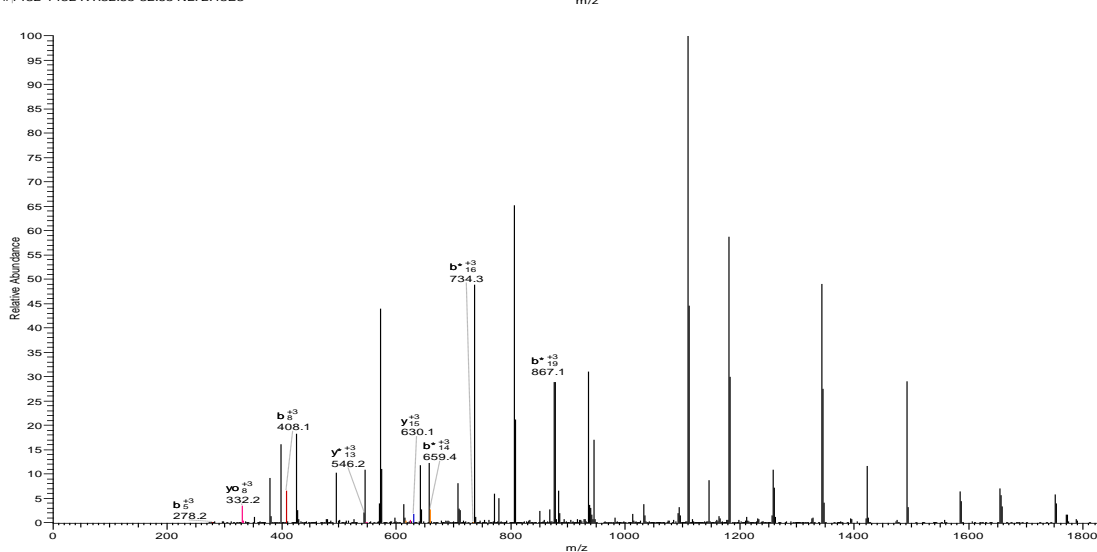
#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3



#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3

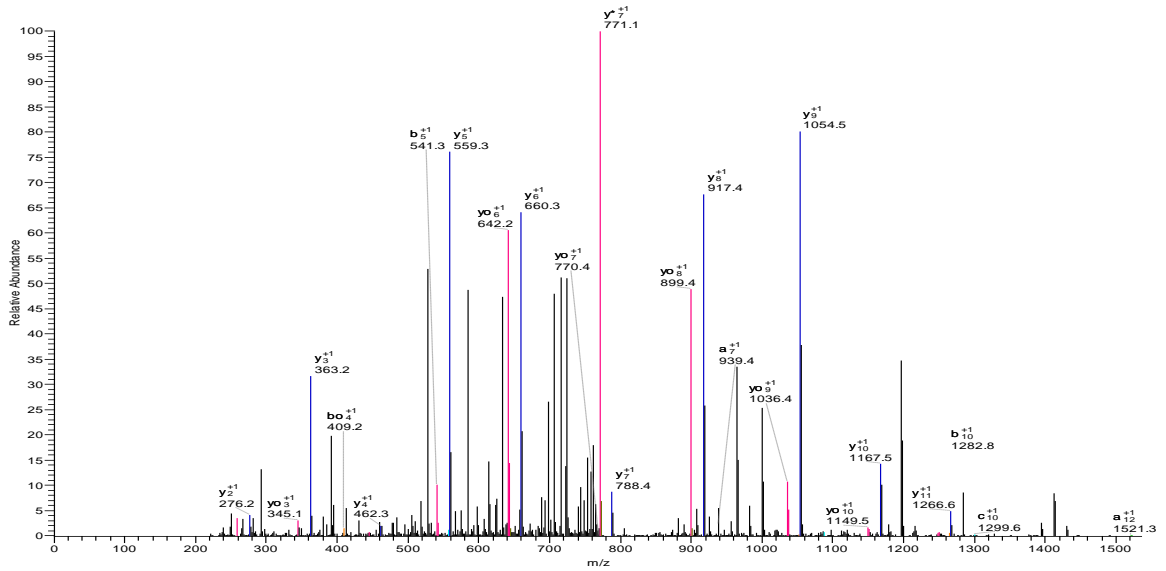


#1432-1432 RT:32.65-32.65 NL: 2.48E3

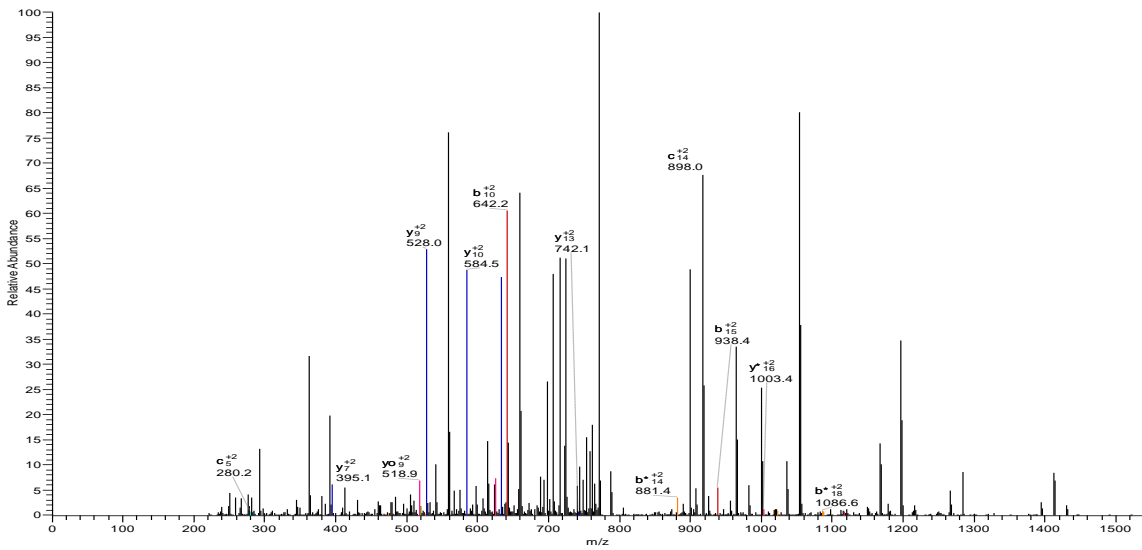


L.SLILNR*LCVLHEKTPVSEK.V

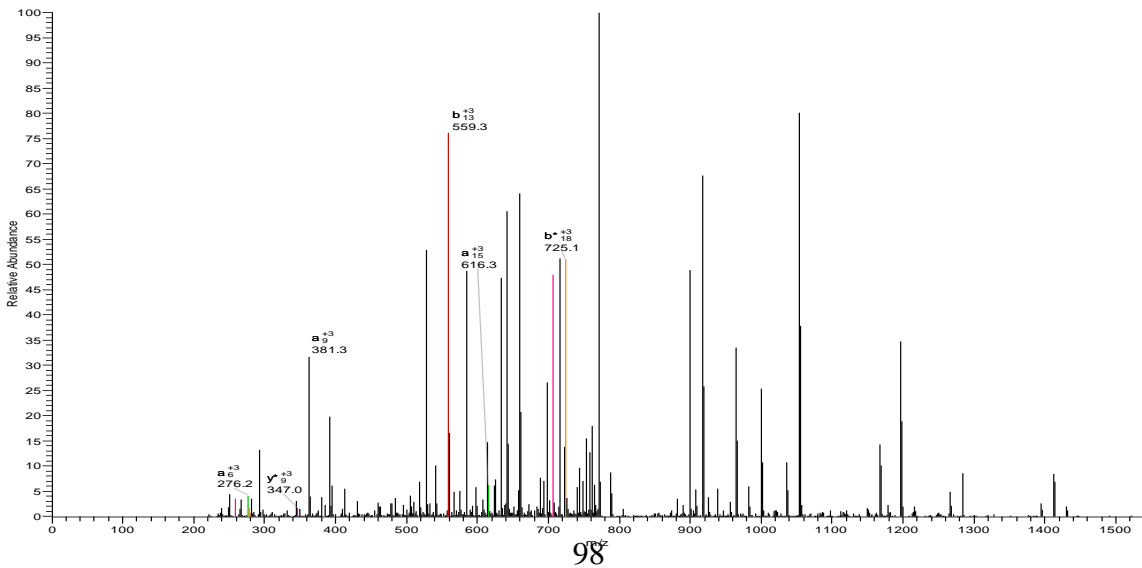
#792-792 RT:20.20-20.20 NL: 1.61E3



#792-792 RT:20.20-20.20 NL: 1.61E3

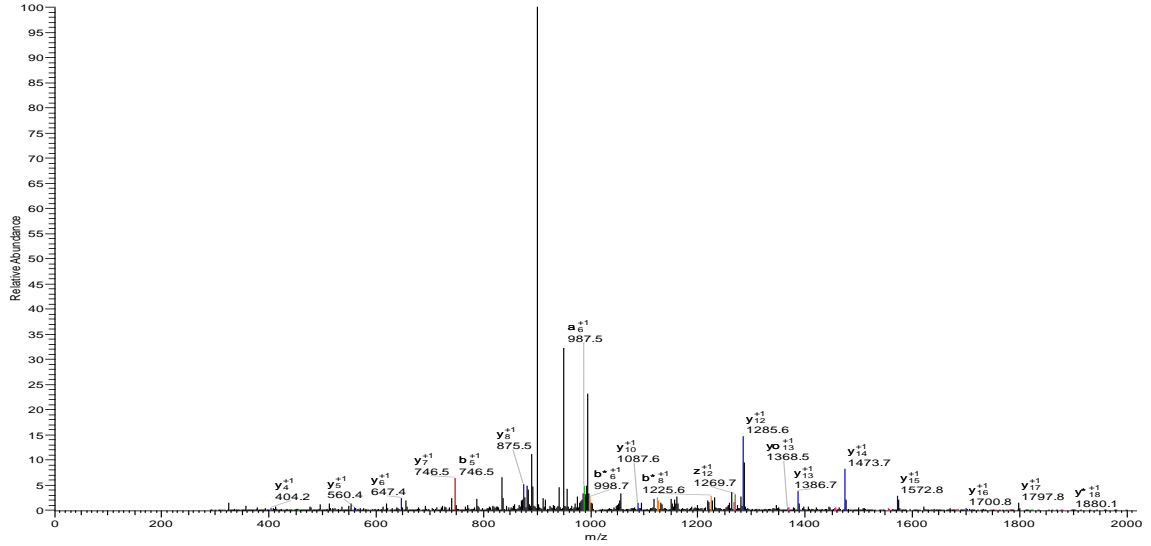


#792-792 RT:20.20-20.20 NL: 1.61E3

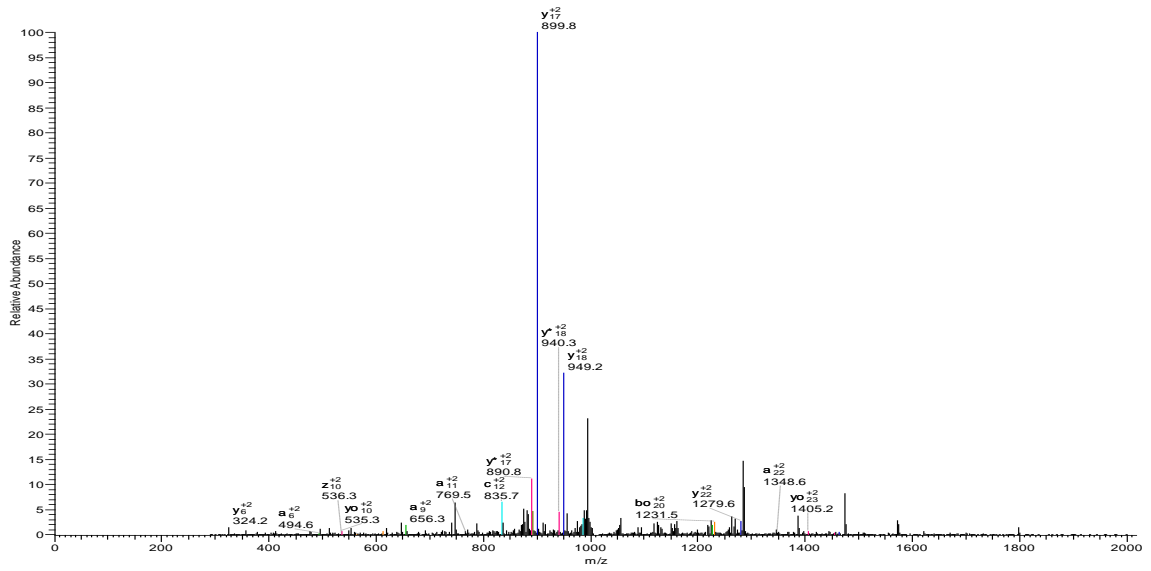


L.IVR#YTR#KVPQVSTPTLVEVSRSLGK.V

#996-996 RT:24.16-24.16 NL: 3.13E3

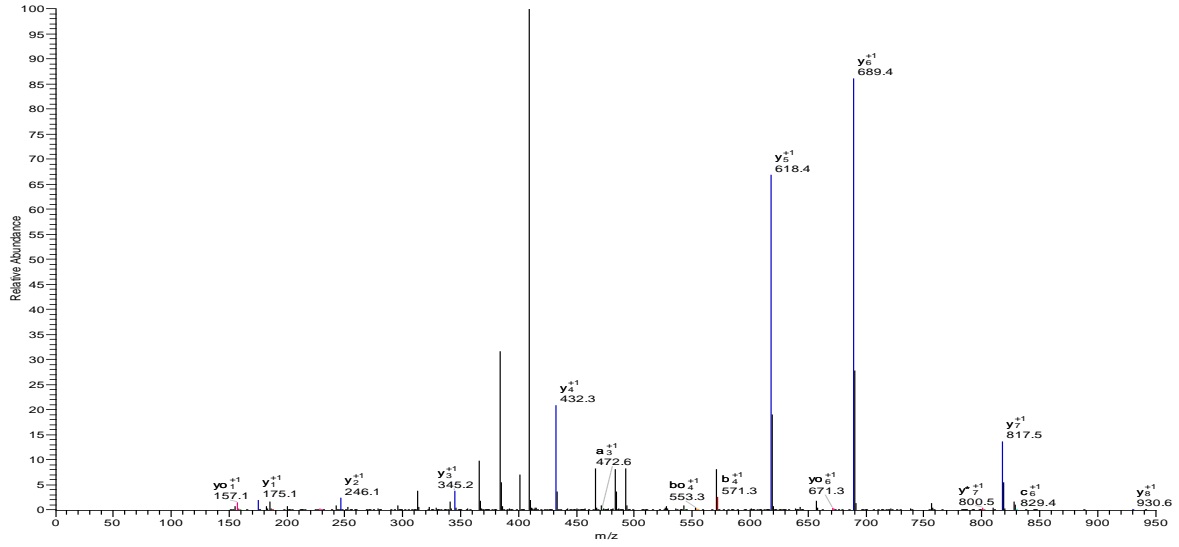


#996-996 RT:24.16-24.16 NL: 3.13E3

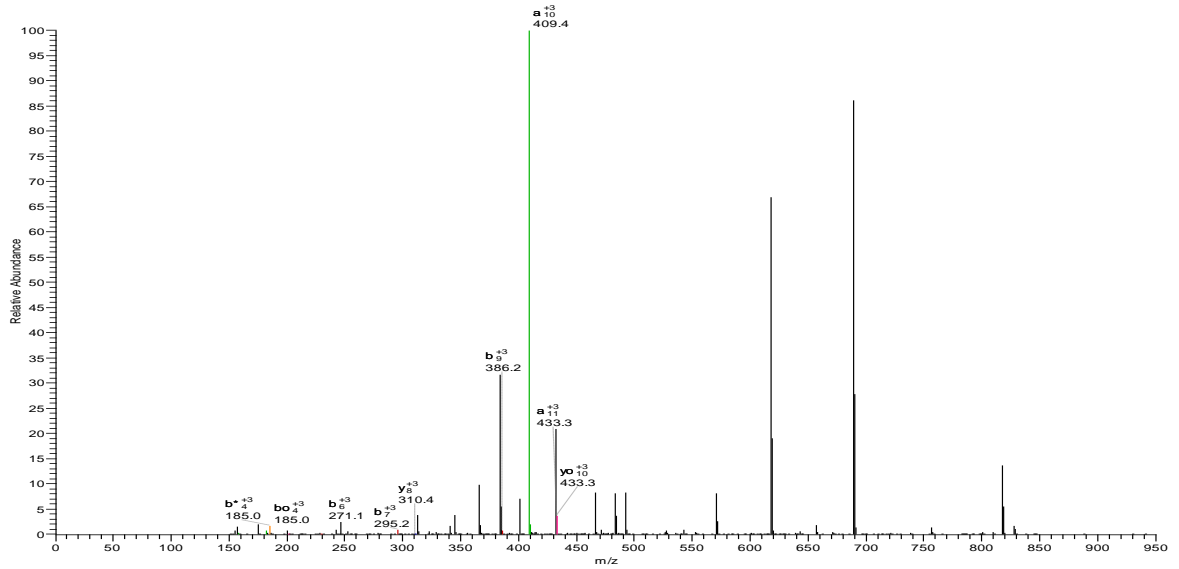


F.GER*ALKAWSVAR.L

#826-826 RT:20.78-20.78 NL: 6.11E4

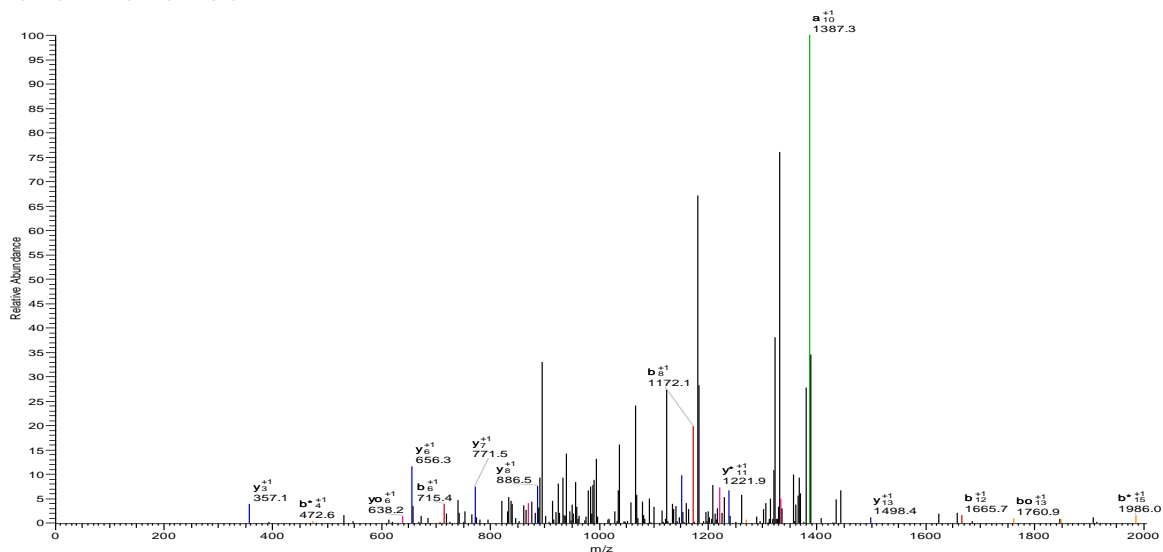


#826-826 RT:20.78-20.78 NL: 6.11E4

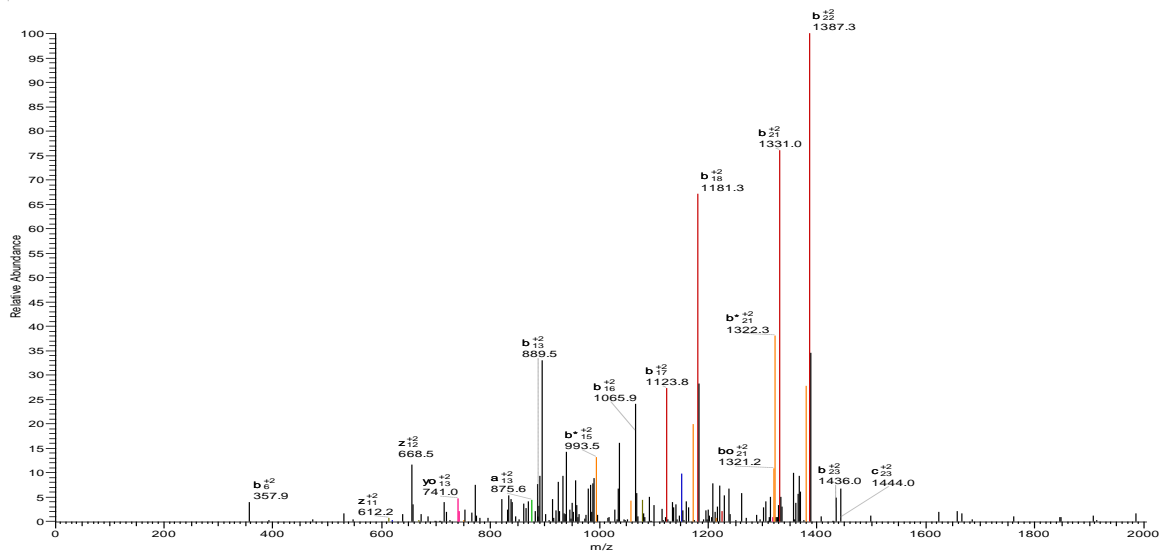


C.CEKQEPER@NECFLSHKDDSPDLPK.L

#1014-1014 RT:24.52-24.52 NL: 3.48E2

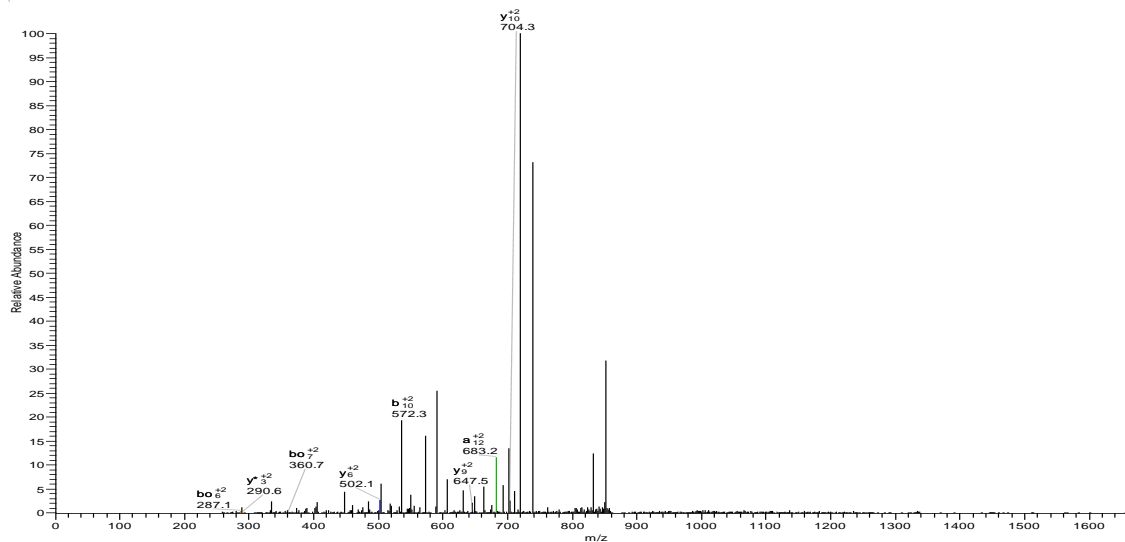


#1014-1014 RT:24.52-24.52 NL: 3.48E2

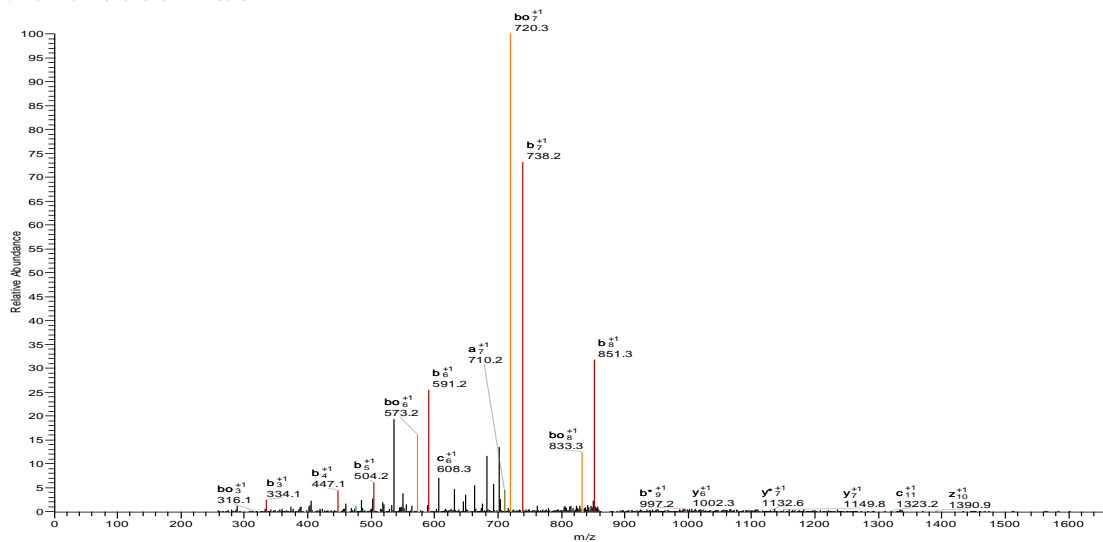


K.DAFLGSFLYEYSR@.R

#1479-1479 RT:32.94-32.94 NL: 1.69E3

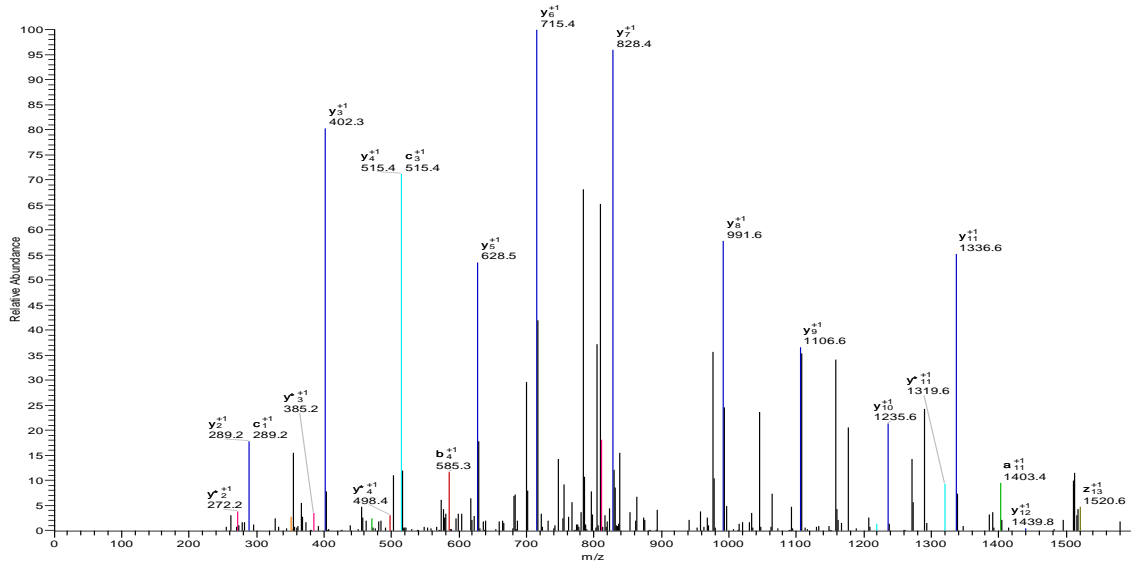


#1479-1479 RT:32.94-32.94 NL: 1.69E3



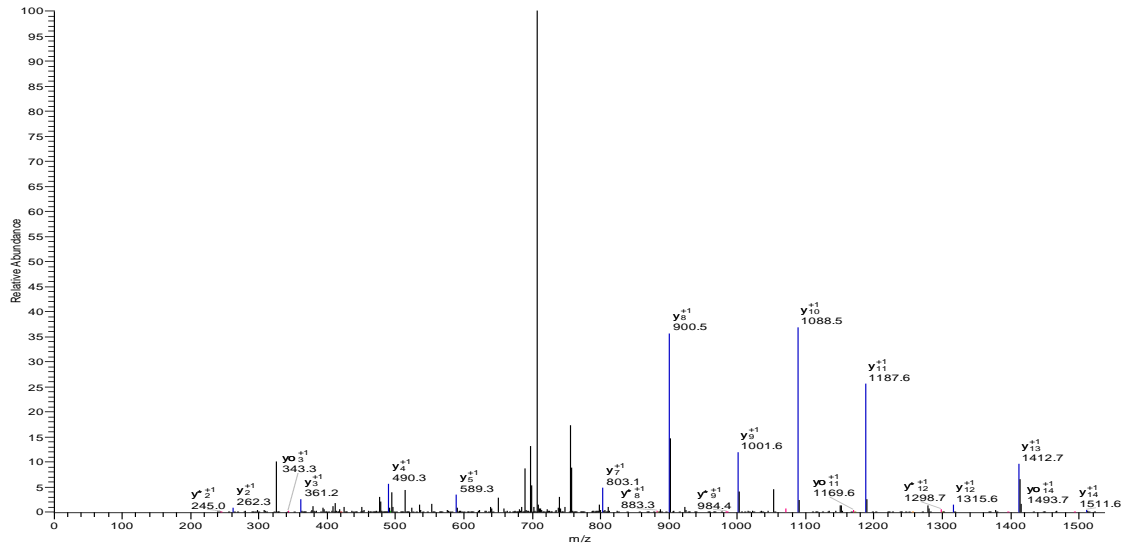
T.K#PESERMPCTEDYLSLILNR.L

#1304-1304 RT:30.03-30.03 NL: 1.03E2

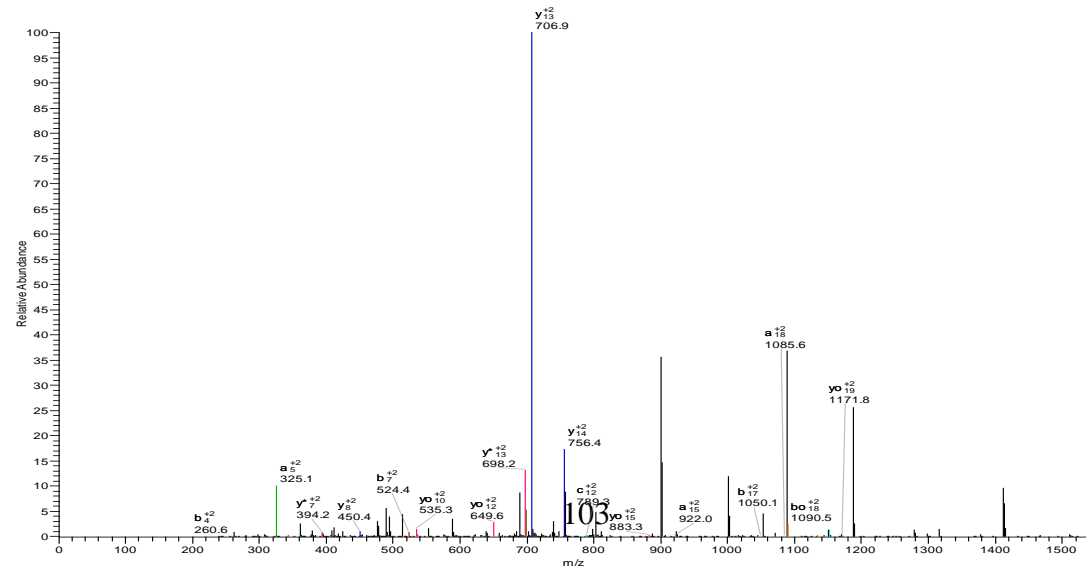


I.VRYTRK@VPQVSTPTLVEVSR.S

#870-870 RT:21.52-21.52 NL: 2.52E5

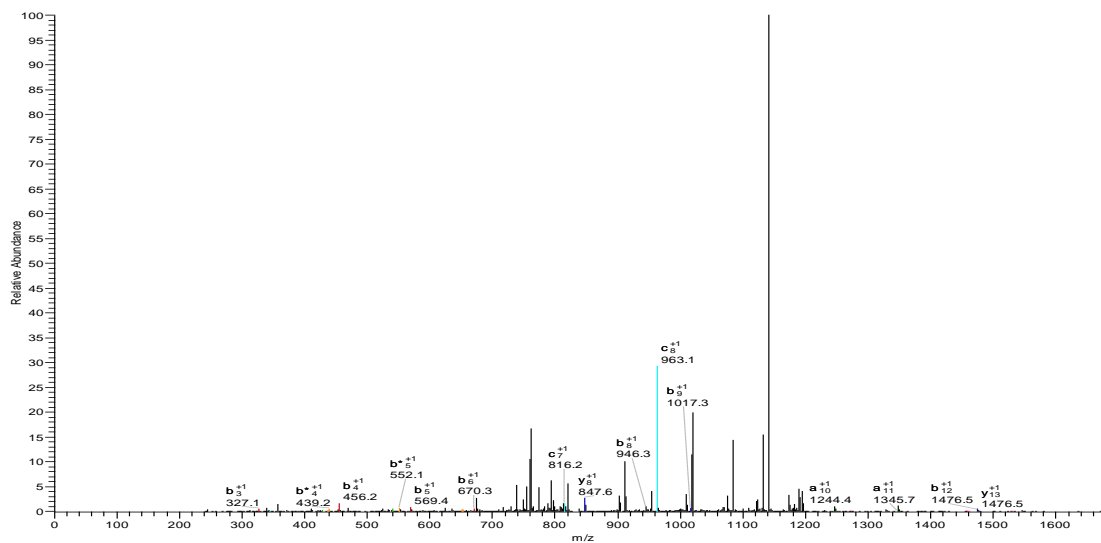


#870-870 RT:21.52-21.52 NL: 2.52E5

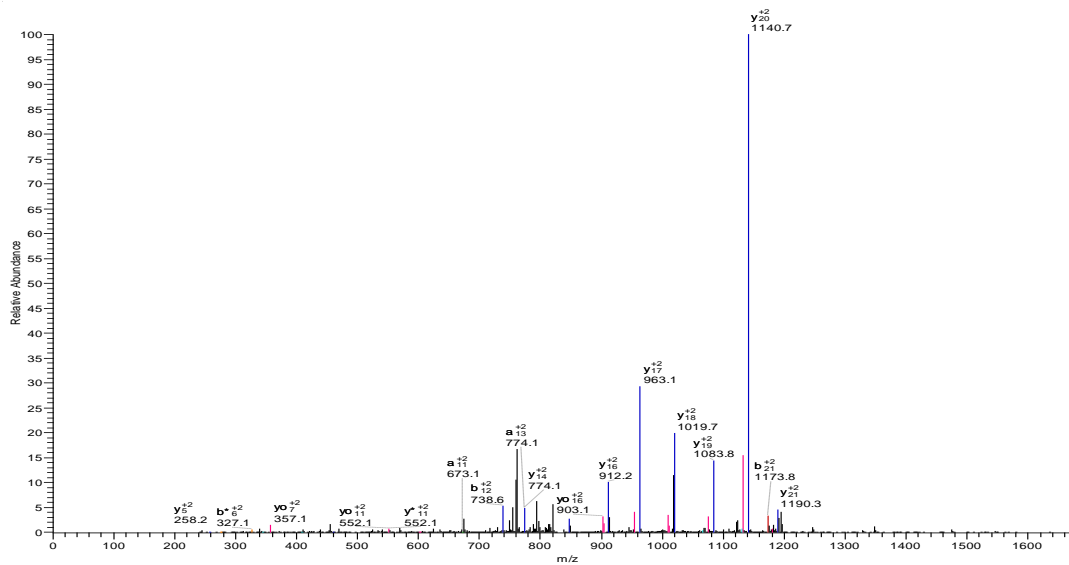


K.LVNELTEFAK*TCVADESHAGCE.K

#997-997 RT:23.80-23.80 NL: 2.32E4

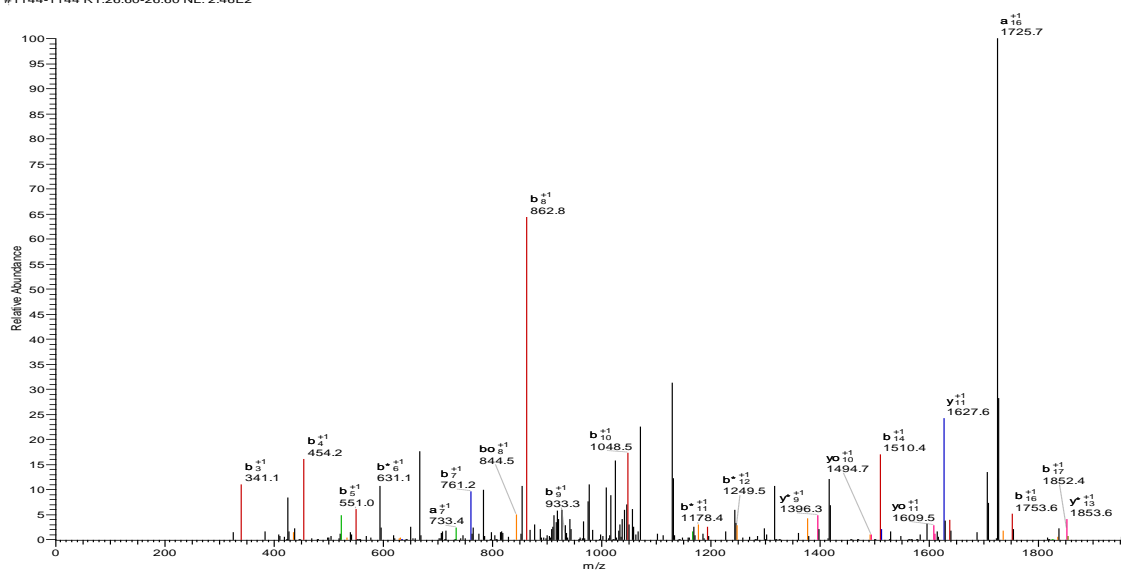


#997-997 RT:23.80-23.80 NL: 2.32E4

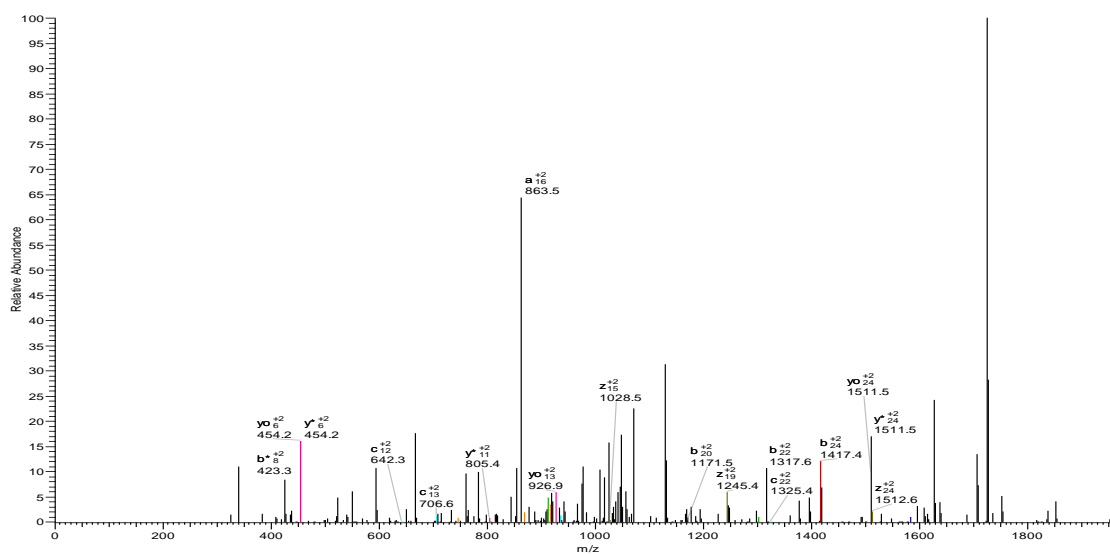


I.PENLPPLTADFAEDKDVCK@NYQEAK^D.A

#1144-1144 RT:26.60-26.60 NL: 2.46E2

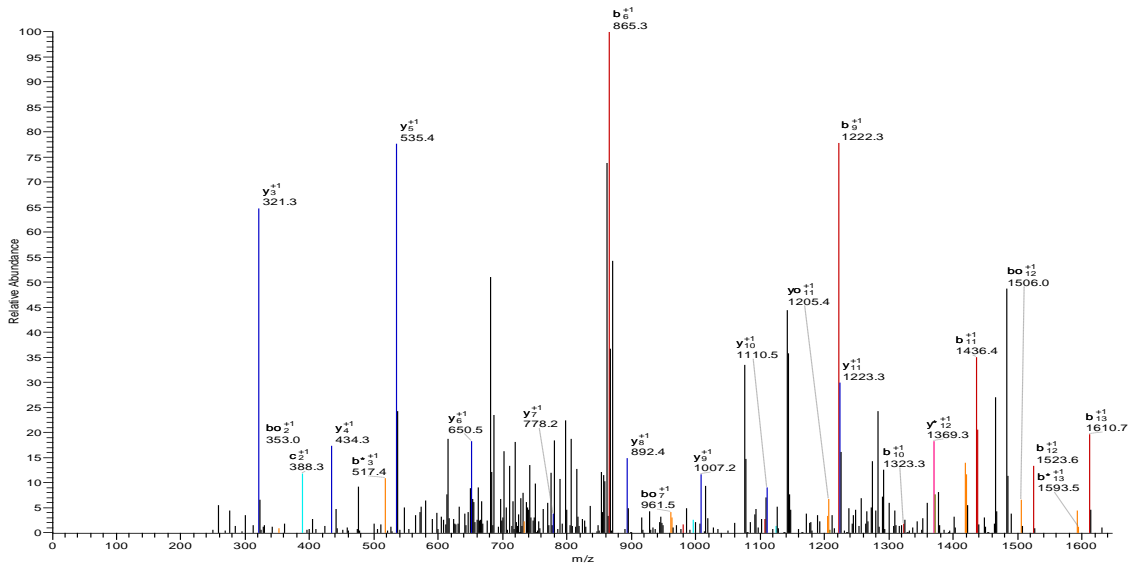


#1144-1144 RT:26.60-26.60 NL: 2.46E2

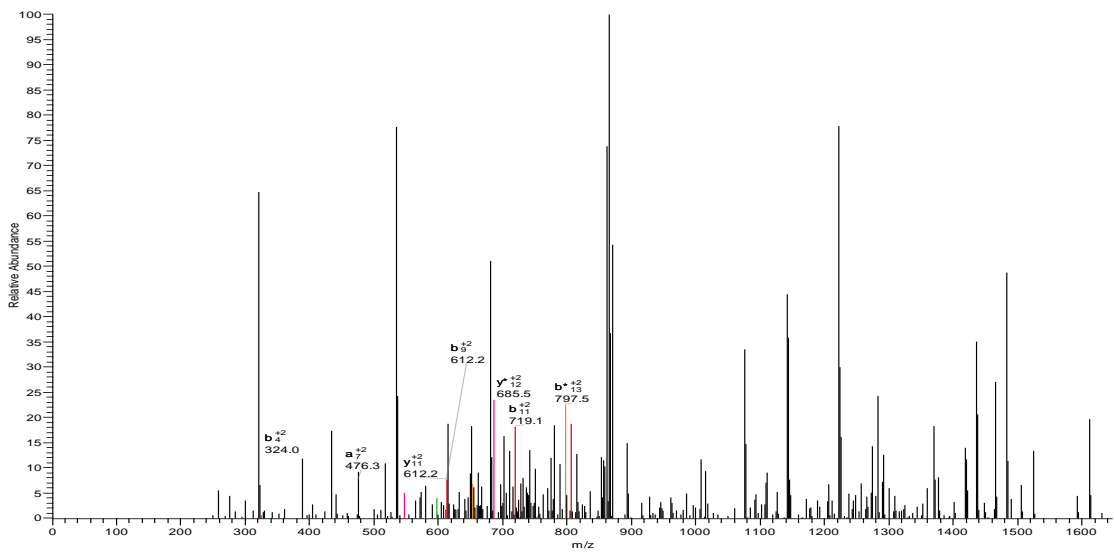


L.AK^YICDNQDTISSK.L

#562-562 RT:15.14-15.14 NL: 1.47E2

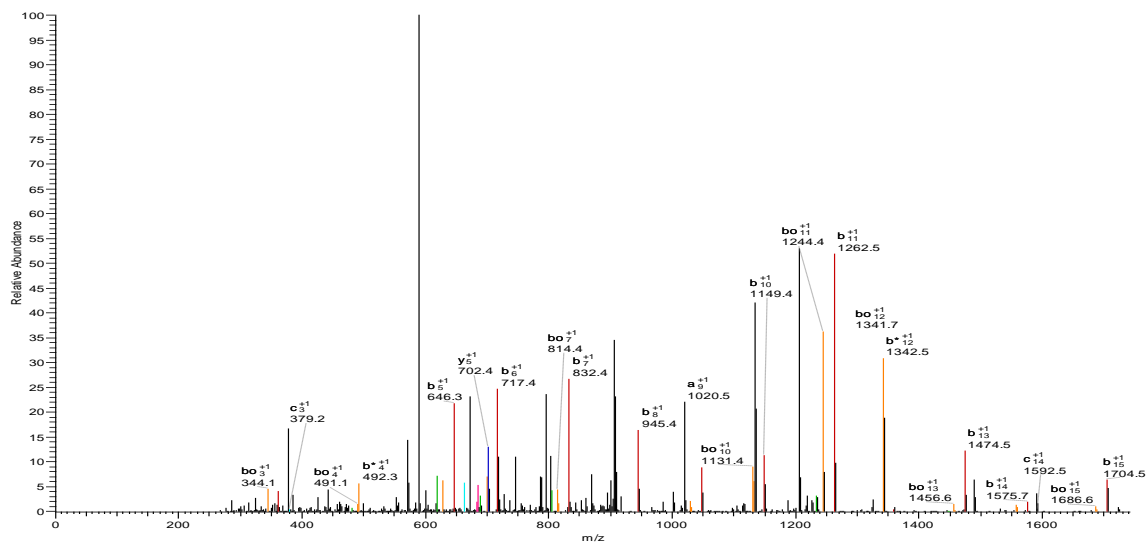


#562-562 RT:15.14-15.14 NL: 1.47E2

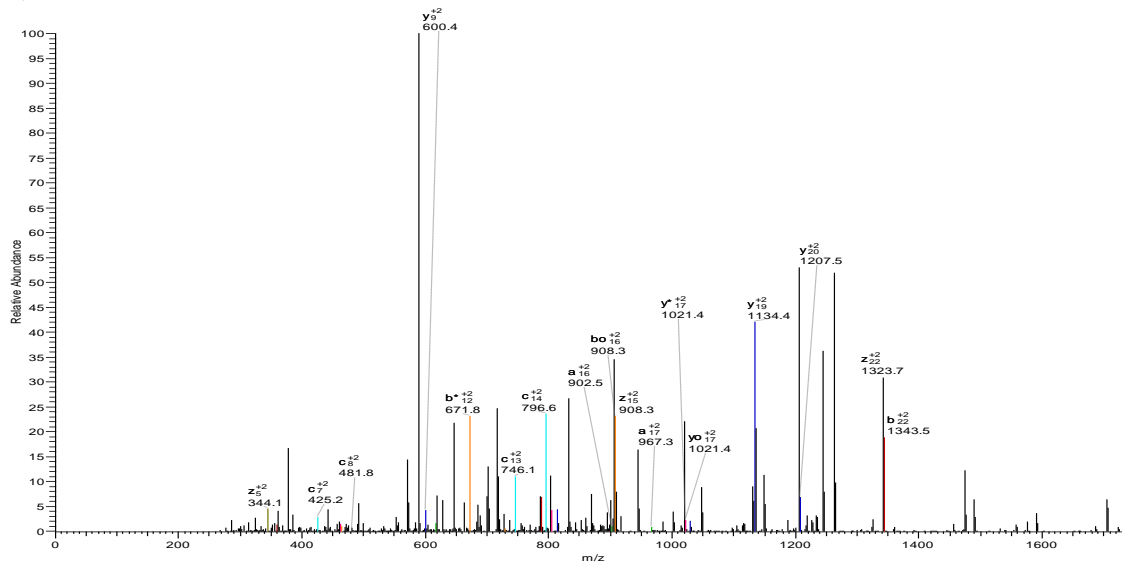


K.LFTFHADICTLPDTEKQIKK*QTAL

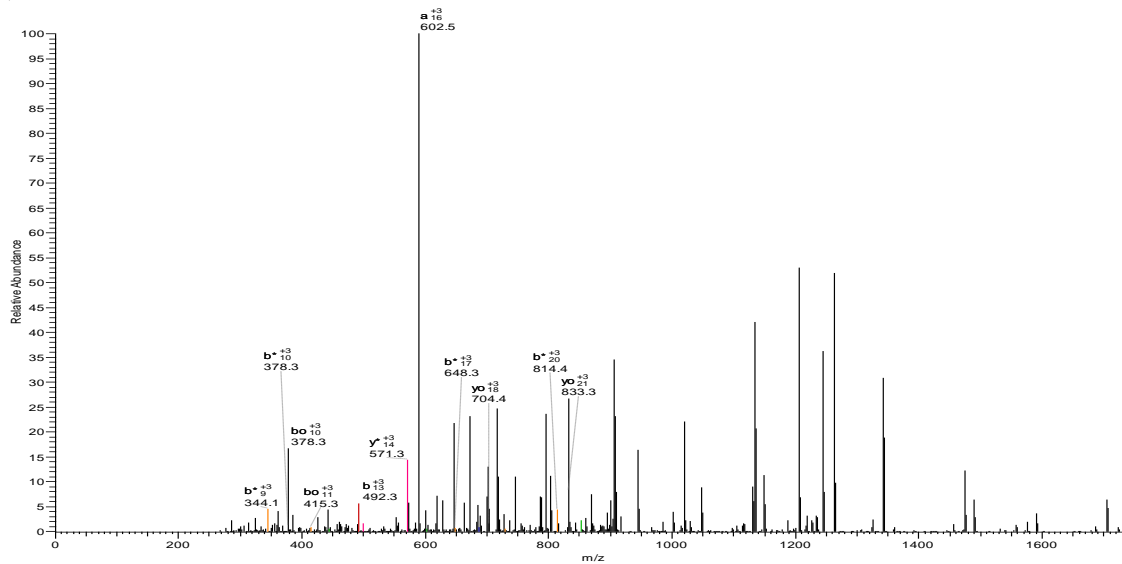
#1172-1172 RT:26.87-26.87 NL: 3.09E3



#1172-1172 RT:26.87-26.87 NL: 3.09E3

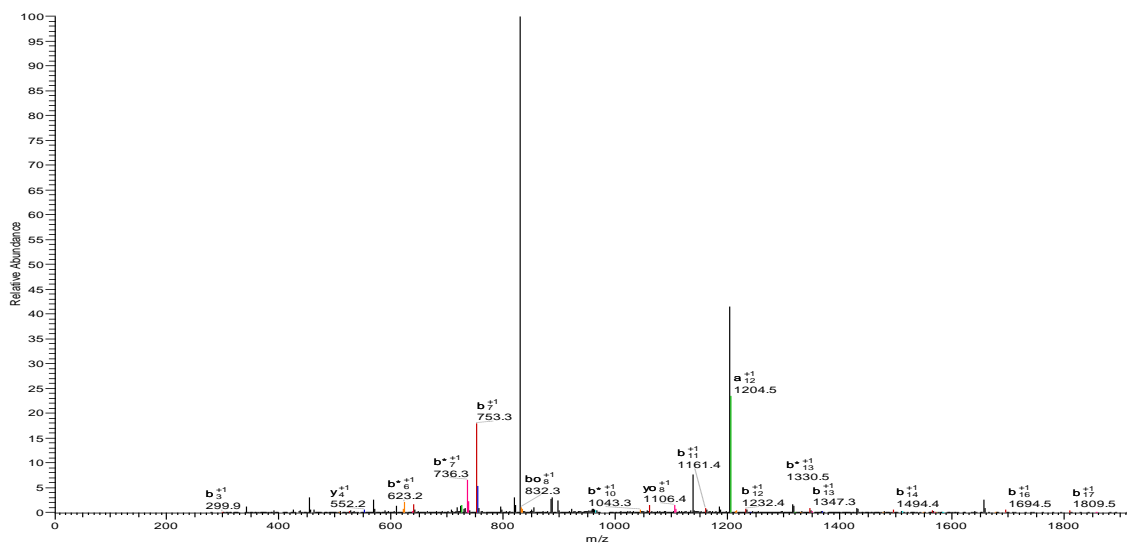


#1172-1172 RT:26.87-26.87 NL: 3.09E3

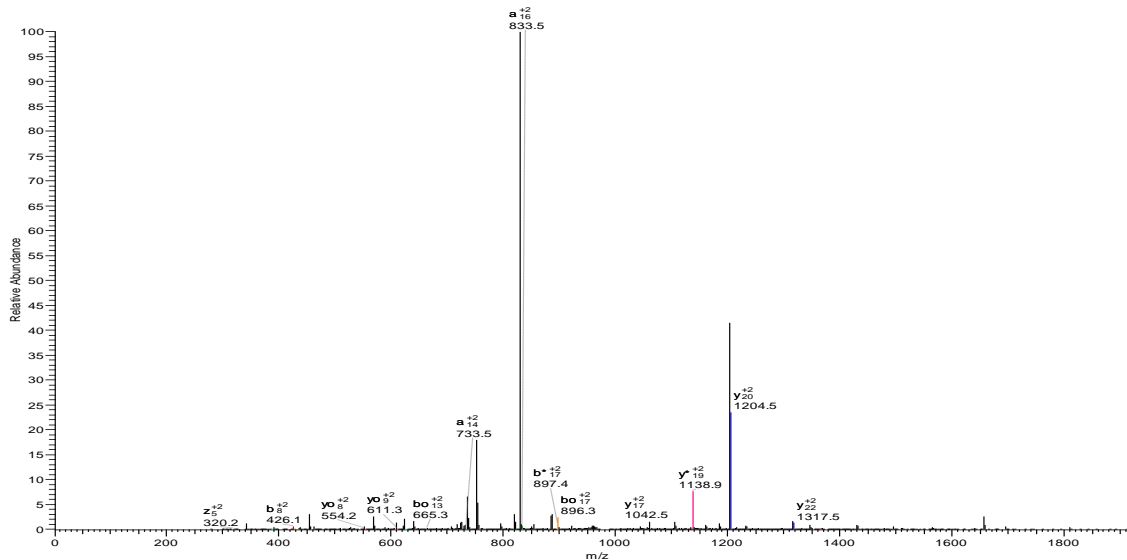


K.DAIPENLPPLTADFAEDK*DVCKNYQ.E

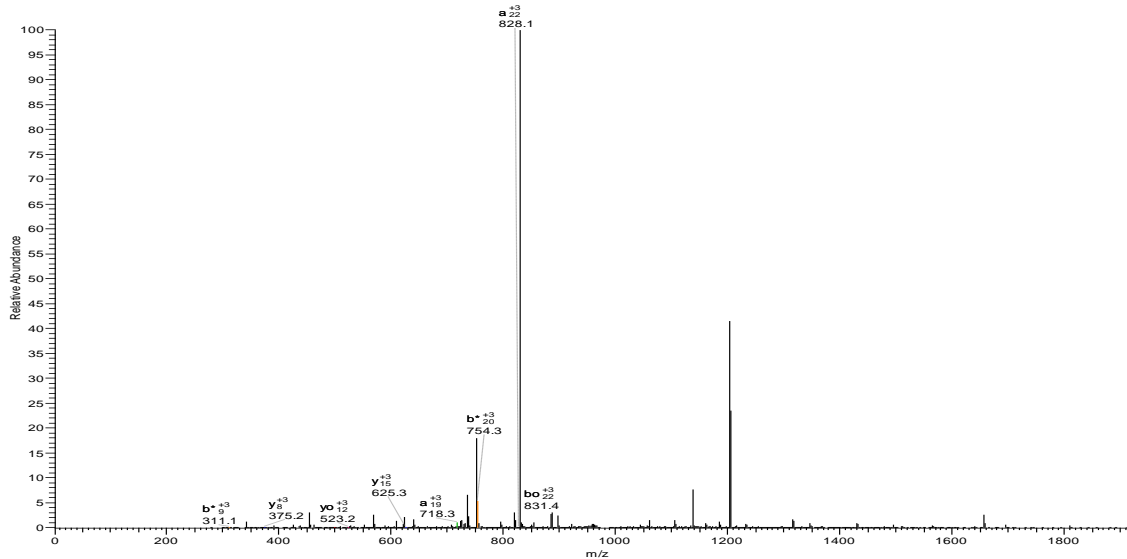
#1186-1186 RT:27.20-27.20 NL: 3.71E4



#1186-1186 RT:27.20-27.20 NL: 3.71E4

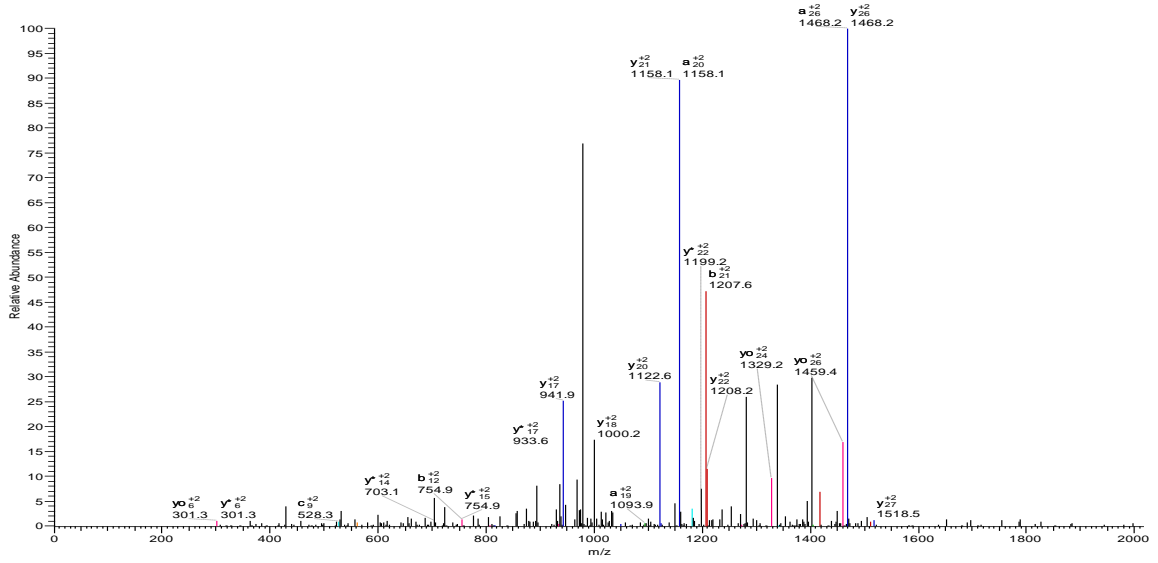


#1186-1186 RT:27.20-27.20 NL: 3.71E4

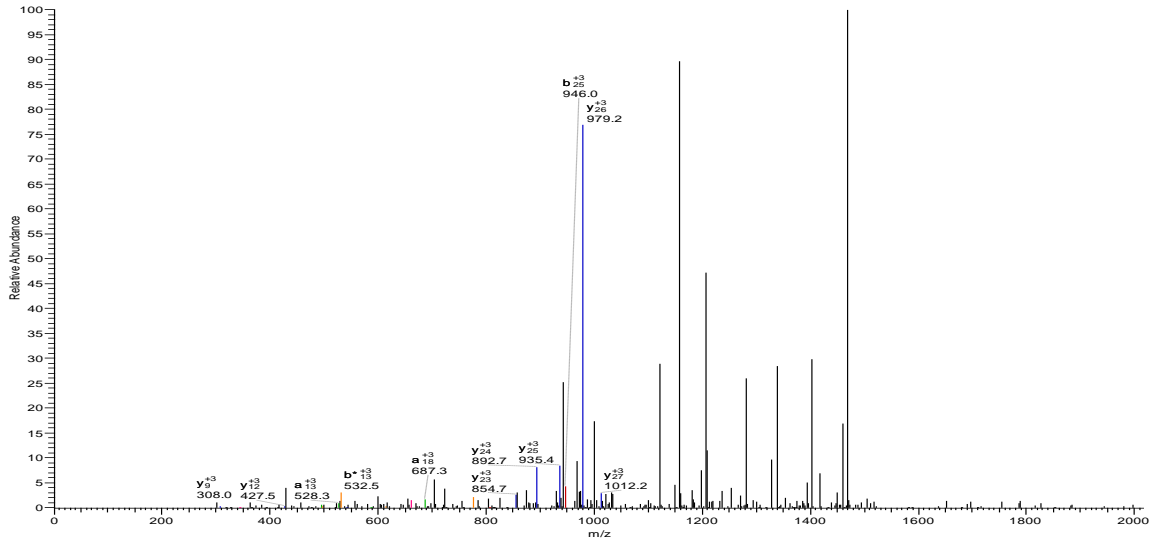


K.TVMENFVAFVDK*CCAADDKEACFAVEGP.K

#1294-1294 RT:29.35-29.35 NL: 2.89E2

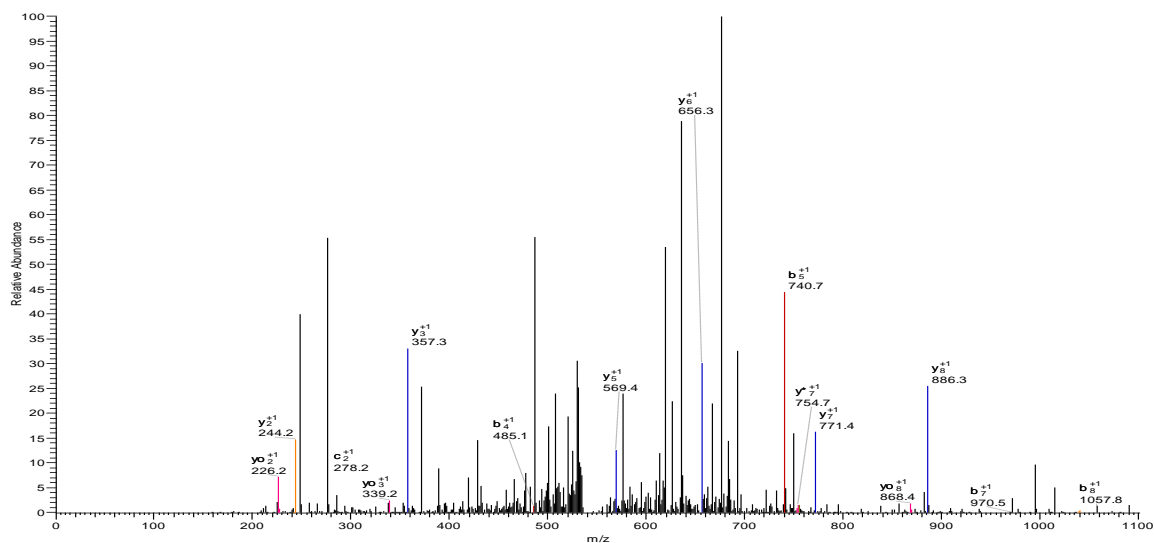


#1294-1294 RT:29.35-29.35 NL: 2.89E2

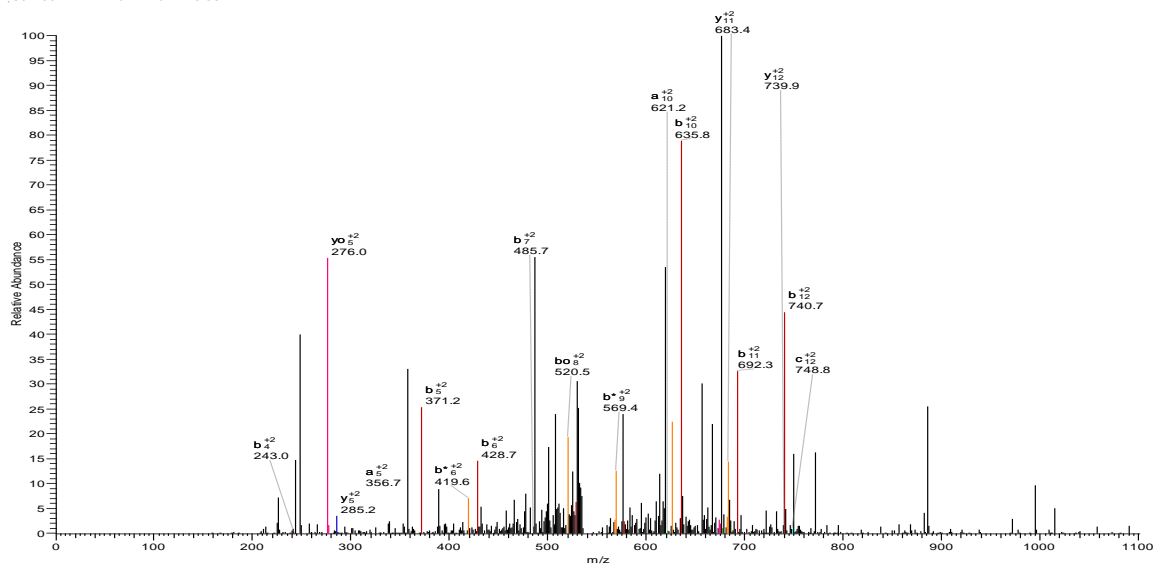


C.FLSHK*DDSPDLPK.L

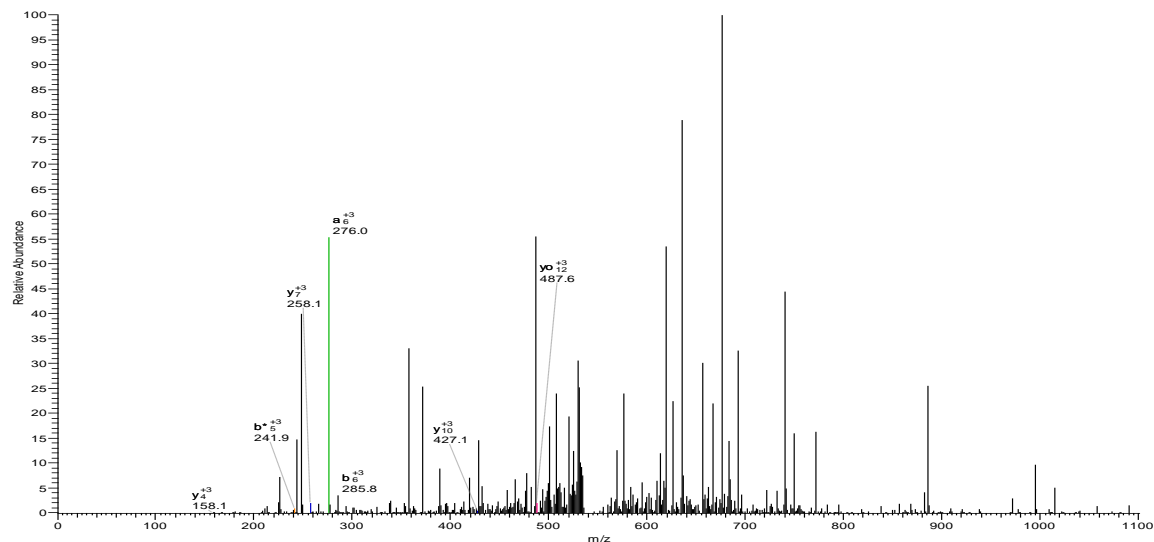
#691-691 RT:17.75-17.75 NL: 3.33E2



#691-691 RT:17.75-17.75 NL: 3.33E2

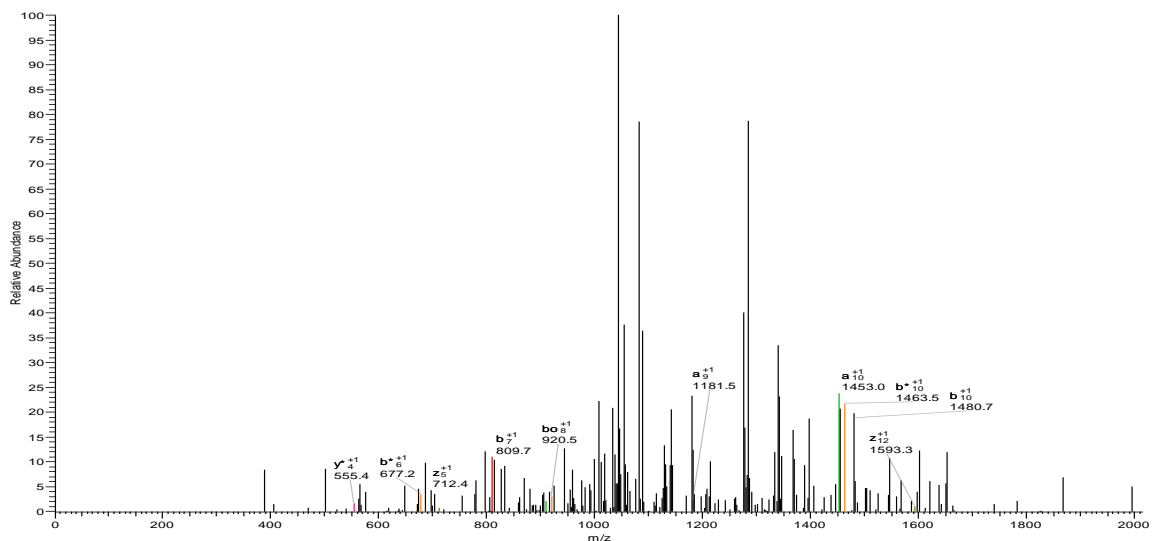


#691-691 RT:17.75-17.75 NL: 3.33E2

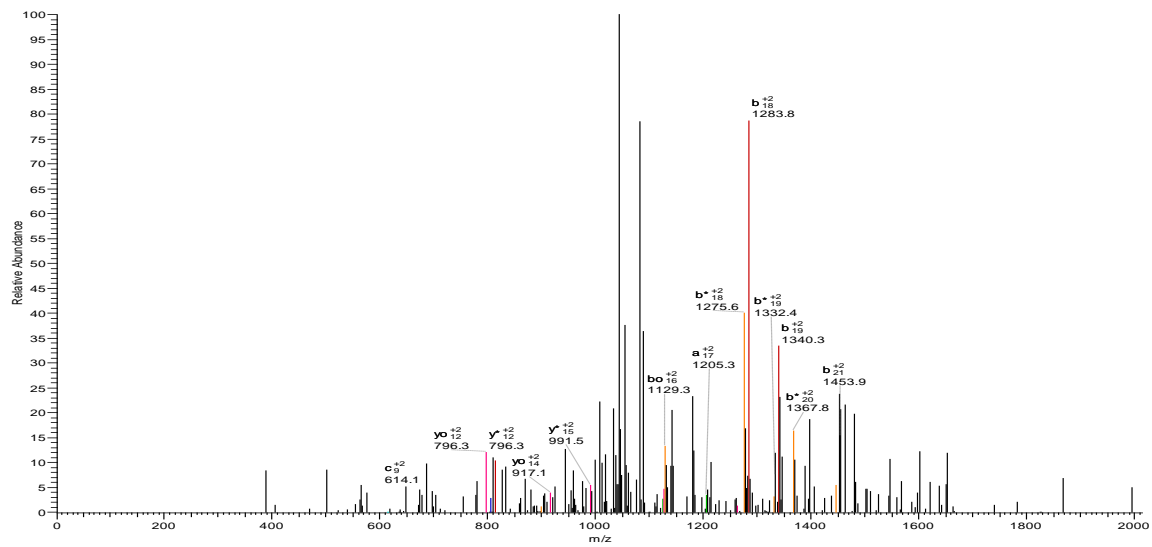


L.CDEFKADEK#K#FWGKLYEIARRHPY.F

#1133-1133 RT:26.24-26.24 NL: 1.03E2



#1133-1133 RT:26.24-26.24 NL: 1.03E2



#1133-1133 RT:26.24-26.24 NL: 1.03E2

