



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **FERRAMENTAS PROTEÓMICAS E A DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS - UMA REVISÃO CRÍTICA**

Trabalho submetido por

**Luís Rodrigues**

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**outubro de 2014**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**FERRAMENTAS PROTEÓMICAS E A DESCOBERTA  
DE NOVOS FÁRMACOS - UMA REVISÃO CRÍTICA**

Trabalho submetido por  
**Luís Rodrigues**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Gabriela Almeida**

**outubro de 2014**



## DEDICATÓRIA

Dedicado à minha família,  
os pilares por vezes sacrificados  
mas sem os quais tudo ruiria.

*“Não existe arte  
patriótica ou ciência patriótica.  
Ambas pertencem, a par de todas  
as coisas boas, ao mundo inteiro  
e podem ser promovidas somente  
pela relação sem entraves entre  
todos os contemporâneos, tendo  
sempre em mente aquilo que  
herdamos do passado.”*

Goethe



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, a Prof. Doutora Gabriela Almeida. Tornou este trabalho possível e revalidou a teoria da relatividade, provando que com pouco tempo se consegue fazer muito.

Agradeço a todos os docentes do ISCSEM pelos ensinamentos transmitidos e pela preparação para o mundo farmacêutico. Deixo, no entanto, uma palavra especial às minhas estimadas Prof. Doutora Alexandra Bernardo, Prof. Doutora Ana Paula Ferreira, Prof. Doutora Carla Ascenso, Prof. Doutora Fernanda Mesquita, Prof. Doutora Mara Guerreiro e Prof. Doutora Margarida Costa. Uma palavra de apreço aos patronos desta instituição, Prof. Doutor Martins dos Santos e Prof. Doutor Queiroz Medeiros, por cumprirem a promessa de manterem a sua porta sempre aberta.

Agradeço a todos os amigos e colegas, cujo caminho se cruzou com o meu. Ao meu padrinho, Gonçalo Silva, pelo seu altruísmo e companheirismo. Ao Rui Tomás, por ser o amigo de todas as horas, pela sua agudeza de espírito e por nunca me negar nenhum plano. À minha afilhada, Beatriz Mota Jordão, pela sua lealdade, prontidão e cuidados dentários. À Ana Raquel Silva, Joana Carmo e Madalena Cabral, por me terem debaixo da sua asa, pelas confidências e piadas sem fim.

Provando que a vivência na Egas Moniz vai muito além dos laboratórios, agradeço às duas entidades que me acolheram durante estes anos. Por um lado, obrigado a todos os que partilharam comigo o prazer e a responsabilidade de dirigir a AE-ISCSEM. Por outro, mas não menos importante, agradeço à minha família dentro desta Academia, a TinTuna. Pelas amizades genuínas, pelas tradições e músicas só nossas, levo-vos comigo.



## RESUMO

A proteômica pode ser definida como a disciplina que estuda o conjunto de proteínas expressas por uma cultura celular, tecido ou organismo, num determinado momento no tempo. Este estudo pode visar a identificação proteica, a sua expressão, conformação, atividade, interação ou modificação num determinado estado patológico. A maior parte dos medicamentos tem eficácia terapêutica através da interação com proteínas. Além disso, estas podem constituir excelentes marcadores patológicos, sinalizando ou mediando este processo. Existe então uma oportunidade bastante favorável para o *design* de fármacos que se adaptem a esta conformação proteica, daí resultando efeito terapêutico. Para que tal possa ser executado, importa compreender os mecanismos essenciais de ferramentas proteômicas como a eletroforese, a cromatografia ou a espectrometria de massa.

### **Palavras-chave:**

Proteômica | Descoberta de fármacos | Eletroforese | Espectrometria de massa



## **ABSTRACT**

Proteomics can be defined as a discipline that studies the set of proteins expressed by a cell culture , tissue or organism at a given moment in time . This study aims the protein identification, its expression , conformation, activity, interaction or modification in a particular pathological state. Most of drugs has therapeutic efficacy by protein interacting. Furthermore, proteins can be remarkable pathological markers, signaling or mediating this process. There is then a very advantageous opportunity to drug design, so that it can fit that protein conformation, resulting in therapeutic effect. For that to happen, it is important to understand mechanisms of proteomic tools such as electrophoresis, chromatography or mass spectrometry.

### **Keywords:**

Proteomics | Drug discovery | Electrophoresis | Mass Spectrometry



# ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO.....	23
DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	25
Farmacognosia – dos produtos naturais aos princípios ativos.....	25
Farmacologia tradicional – o impulso da síntese química.....	26
Farmacologia reversa – do alvo para o medicamento.....	28
Descoberta de fármacos – Aproximações e metodologias .....	30
Descoberta de fármacos – Atualidade .....	32
Futuro na descoberta de fármacos – Reposição de medicamentos e métodos futuros	34
FERRAMENTAS PROTEÓMICAS.....	35
Introdução à proteômica .....	35
Proteoma – O passo seguinte ao genoma.....	36
Ferramentas proteômicas .....	39
Eletroforese.....	41
IEF – Focagem isoeletrica.....	42
SDS-PAGE.....	46
DIGE – <i>Difference gel electrophoresis</i> .....	50
MS – Espetrometria de massa.....	52
Proteômica diferencial e aplicações farmacêuticas.....	53
CONCLUSÃO.....	57
BIBLIOGRAFIA .....	59



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – “Estruturas de antibióticos $\beta$ -lactâmicos clássicos (à esquerda) e novos lactamos, não convencionais (à direita). Estão indicados os respetivos nomes e classes de antibióticos a que pertencem” (adaptado e traduzido de <i>Liras &amp; Martín, 2006</i> ). .....	27
Figura 2 – “Comparação entre a Farmacologia Clássica e a Farmacologia Inversa na descoberta de fármacos” (traduzido de Takenaka, 2008). .....	28
Figura 3 – “Visão geral dos ensaios de screening na descoberta de fármacos” (traduzido de Hughes et al., 2011). .....	29
Figura 4 – “Classificação de medicamentos <i>first in class</i> , de acordo com a metodologia de descoberta: baseados no alvo e baseados em sistemas” (traduzido e adaptado de Eder et al., 2014). .....	32
Figura 5 – “Descoberta de medicamentos <i>first in class</i> aprovados pela FDA entre 1999 e 2013” .....	33
Figura 6 – “Categorização dos métodos de reposição de medicamentos já existentes”. 34	
Figura 7 – “Artigos de pesquisa publicados anualmente (excluindo revisões, abstracts, editoriais ou comentários), contendo as palavras-chave “proteómica” ou “proteoma”, baseado numa pesquisa no Thompson Reuters Web of Knowledge Science Citation Index” (traduzido de Gu & Yu, 2014). .....	35
Figura 8 – “O dogma central da biologia molecular” (traduzido de Koonin, 2012). ....	36
Figura 9 – Mecanismo de <i>splicing</i> alternativo (traduzido do sítio do <i>National Human Genome Research Institute</i> - (INHGR, 2014)). .....	37
Figura 10 – “Abundância relativa das proteínas de abundância elevada, moderada e baixa no plasma humano” (traduzido e adaptado de Shi et al., 2012). .....	38



Figura 11 – Tipos de proteômica e sua aplicação na biologia molecular.....	39
Figura 12 –Visão esquemática sobre identificação, perfil de expressão e interação proteica, utilizando ferramentas proteômicas (traduzido e adaptado de Butterfield, Gu, Di Domenico, & Robinson, 2014).....	40
Figura 13 – Dois géis de poliacrilamida para eletroforese 2D com colorações .....	41
Figura 14 – “Fluxo de trabalho para separação de proteínas por técnicas eletroforéticas” (Garfin & Ahuja, 2005), ilustrado com figuras cedidas pelos laboratórios Bio Rad (Bio Rad, 2014). .....	42
Figura 15 – “Resolução por IEF de uma mistura proteica num IPG com pH entre 3 e 10, de acordo com o pI de cada proteína, independentemente do seu tamanho” (traduzido e adaptado do sítio da Bio Rad, 2014).....	44
Figura 16 – Eletroforegrama de proteínas padrão focadas em IPG-IEF, com diferentes tempos de corrida e respetiva representação esquemática (traduzido e adaptado de <i>Guo et al., 2013</i> ).....	44
Figura 17 – Estrutura química do detergente não iónico Triton X-100 e do detergente zwitteriónico CHAPS (adaptado de <i>Rodi et al., 2014</i> ).....	45
Figura 18 – “Reação de polimerização na formação do gel de poliacrilamida” (traduzido de <i>Rabilloud, 2002</i> ). .....	47
Figura 19 – “Comparação de métodos de coloração de proteínas do plasma humano” (traduzido e adaptado de Desrosiers, Beaulieu, Buchanan, & Béliveau, 2007) .....	49
Figura 20 – Proteínas extraídas de diferentes estirpes de <i>Toxoplasma gondii</i> . Foram separadas na primeira dimensão com pH entre 4 e 9 e na segunda dimensão através de SDS-PAGE num gel a 12%. Ambas as estirpes apresentam expressão de proteínas, corando diferencialmente de verde e vermelho. Através do <i>software</i> utilizado, é possível identificar quais as proteínas mais abundantes e em que estirpe estão presentes.....	51



Figura 21 – “Estratégias para identificação e caracterização de proteínas com base em MS” (traduzido de <i>Han et al., 2008</i> ).....	53
Figura 22 – Esquema de trabalho em proteômica <i>shotgun</i> (traduzido de Meissner & Mann, 2014). O esquema 22 A é o utilizado atualmente, com uma linha proteômica baseada em LC-MS. As seguintes variantes incluem passos de enriquecimento para amostras cujo alvo contenha:.....	54
Figura 23 – “Representação esquemática de exemplos de fluxos de trabalho proteômico relacionados com a descoberta de fármacos” (traduzido de Schirle et al., 2012). .....	55



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – “A ascensão e queda da Farmacologia” - Parte I (traduzido e adaptado de Winqvist et al., 2013). .....	30
Tabela 2 – “A ascensão e queda da Farmacologia” - Parte II (traduzido e adaptado de Winqvist et al., 2013). .....	31
Tabela 3 – “Corantes habitualmente utilizados para proteínas após separação eletroforética em gel de poliacrilamida. <sup>a</sup> Os limites de detecção são valores médios, uma vez que cada proteína pode corar individualmente com maior ou menor intensidade. ” (traduzido de <i>(Magdeldin, 2012)</i> ). .....	48



## ABREVIATURAS

2-DE – *2 dimension electrophoresis*

2-ME – 2-mercaptoeptanol

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANOVA – *Analysis of variance*

ARN – Ácido ribonucleico

CHAPS – 3-[(3-Colamidopropil)-dimetil amónio]-propano- sulfonato

DIGE – *Difference gel electrophoresis*

DTT - Ditiotreitól

ESI – *Electrospray ionization*

FDA – *Food and Drug Administration*

FTICR - *Fourier-transform ion cyclotron resonance*

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

IEF – *Isoelectric focusing*

IR – *Infra-red*

LIT – *Linear ion trap*

MALDI – *Matrix-assisted laser dessorption/ionization*

MPT – Modificações pós-traducionais

M<sub>r</sub> – Massa molecular relativa

MS – *Mass spectrometry*

NEPHGE – *Non-equilibrium pH gel electrophoresis*

PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial de Hidrogénio

pI – Ponto isoelétrico

QIT – *Quadrupole ion trap*

RP – *Reversed phase*

SDS – Sodium dodecyl sulfate

TEMED – Tetrametiloetilenodiamina

TFA – *Trifluoroacetic acid*

TOF – *Time of flight*

WHO – *World Health Organization*



## **INTRODUÇÃO**

Desde o início da história civilizacional que o ser humano procura assegurar as condições necessárias para a sua sobrevivência e melhoria da qualidade de vida. São inúmeras as definições para este último conceito mas alguns fatores reúnem um consenso alargado. A WHO (1998) enumera então seis domínios que considera basilares na definição de qualidade de vida: o domínio da saúde física, o domínio psicológico, o grau de independência, as relações sociais, o meio envolvente e ainda as crenças pessoais e espirituais. O farmacêutico do século XXI deverá estar consciente de todas estas áreas no exercício das suas funções. Porém, é acima de tudo um profissional de saúde e, como tal, deve dar especial enfoque à área da saúde física e psicológica. Aprofundando esta noção, a mesma instituição define ainda o conceito saúde como sendo “o completo bem-estar físico, mental e social e não a mera ausência de doença ou enfermidade” (WHO, 1946).

Recuando à história civilizacional, o ser humano procurou sempre assegurar a manutenção do seu estado de saúde. Assim, desde muito cedo, e com documentos que nos remetem para sociedades de há cinco mil anos atrás, o Homem iniciou um percurso de descobertas de substâncias que lhe permitiam uma melhoria no seu estado patológico (J. W.-H. Li & Vederas, 2009). Assim, começa por recolher na natureza produtos, como plantas, com atividade terapêutica, associando a sua administração a um benefício. A ciência moderna, porém, permitiu reconhecer que nem toda a planta era essencial nesse efeito e impulsionou o isolamento de substâncias ativas, com posterior estudo das doses e sua relação com o efeito terapêutico pretendido (J. J. Li & Corey, 2013). Atualmente, vive-se uma viragem de dimensão semelhante no que se refere à metodologia de descoberta de novos fármacos. Nas últimas décadas o mundo da ciência viu nascer a era das “ómicas”, onde a sequenciação de alto débito de ADN permitiu o surgimento de disciplinas como a genómica, a proteómica e a interatómica (Kandpal, Saviola, & Felton, 2009). Dada a origem essencialmente proteica dos alvos terapêuticos, a proteómica e as ferramentas que lhe estão associadas apresentam-se então como um caminho essencial na descoberta de novas moléculas com efeito terapêutico (Imming, Sinning, & Meyer, 2006).

Julgando atestada a relevância inerente a esta área, apresenta-se então o tema “Ferramentas proteómicas e a descoberta de novos fármacos – uma revisão crítica”.



## DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

### Farmacognosia – dos produtos naturais aos princípios ativos

A procura de produtos com ação benéfica sobre o organismo tem sido, desde sempre, promovida pela ocorrência da própria enfermidade. Ao tomar consciência das debilidades do seu organismo e do seu estado de saúde, o ser humano começou por procurar alguma ação terapêutica nos produtos que a natureza oferecia.

Com a aplicação destes produtos naturais, essencialmente plantas, percebeu que nelas estavam contidos compostos benéficos. Todavia, apercebeu-se também que, além destes, estariam também presentes compostos que provocavam efeitos nocivos. Foram então feitos diversos esforços no sentido de minimizar as consequências para o organismo, aquando da administração de substâncias provindas de plantas. Com um sucesso que na altura não se previu, a segunda década do século XIX assistiu ao isolamento do primeiro composto puro com atividade terapêutica: Sertürner isolava a morfina a partir da espécie *Papaver somniferum* (J. W.-H. Li & Vederas, 2009). Este marco deu início ao desenvolvimento de técnicas que visavam separar o benéfico do nocivo, o efeito terapêutico do efeito adverso. Não obstante a descoberta dum composto que tem uso regular na prática clínica passados dois séculos, a administração destas substâncias continuava a comportar riscos. De um ponto de vista evolutivo, as plantas sofrem transformações, não com o intuito de criar fármacos para humanos, mas no sentido de sintetizar substâncias que a protejam e assegurem a sua sobrevivência. Dessa forma, é fácil perceber que alguns fármacos vegetais têm um efeito curativo mas possuem também um elevado grau de toxicidade, passível de induzir efeitos nefastos (Sneader, 2006).

De novo, a comunidade científica via-se forçada a trabalhar para minimizar estes riscos. Surgia então, a partir da segunda metade do século XIX, a síntese química. O paradigma natural dava lugar ao paradigma laboratorial.

## Farmacologia tradicional – o impulso da síntese química

A síntese química veio revolucionar a produção de medicamentos. Um exemplo que ilustra este facto é o medicamento mais comercializado em todo mundo, o ácido acetilsalicílico (Warner & Mitchell, 2002). Teve início na fase natural já referida, em que Hipócrates descreve o efeito analgésico e antipirético da casca de salgueiro-branco (*Salix alba*) triturada (Mahdi, Mahdi, & Bowen, 2006). Ainda de acordo com estes autores, estes efeitos terapêuticos devem-se ao ácido salicílico, molécula igualmente responsável pela sua moderada toxicidade. No século XIX, a síntese química viria a contornar problemas desta natureza. Em 1897, a Bayer anuncia a síntese laboratorial da forma purificada de ácido acetilsalicílico. Hoffman, sob a supervisão de Eichengrün, conjuga o ácido salicílico com o radical acetato, dando origem ao primeiro medicamento produzido na indústria farmacêutica (Sneader, 2000).

Já no âmbito dos fármacos etiotrópicos, surge outro exemplo da utilidade da síntese química no início do século XX. Alexander Fleming, bacteriologista escocês, descobre em 1929 um fármaco que viria a revolucionar o mundo: a penicilina. Juntamente com a sua equipa, foi capaz de reconhecer a capacidade bactericida sobre *Staphylococcus* desta substância, isolada a partir de colónias do género *Penicillium* (Demain & Elander, 1999). A sua eficácia antimicrobiana estava então perfeitamente estabelecida mas continuava em cima da mesa o problema da produção. A quantidade produzida em laboratório não cobria as necessidades mínimas, principalmente tendo em conta que deflagrava nessa década a segunda guerra mundial. A síntese química era então forçada a entrar neste cenário, procurando identificar a estrutura da molécula, definir uma forma estável e criar um método de produção em massa. Em 1945, Dorothy Crowfoot Hodgkins viria então a determinar, através da cristalografia por raio-X, a estrutura molecular da penicilina (Kademani, Kalyane, & Jange, 1999). Este passo revelou-se imprescindível para que esta molécula pudesse ser recriada industrialmente. Assim, entre a Merck e o Massachusetts Institute of Technology, John Sheehan sintetizava a Penicilina V, assim como um seu intermediário, o ácido 6-aminopenicilânico (Sheehan & Logan, 1959). A primeira das duas moléculas viria a representar um dos maiores avanços médicos do século passado, sendo um antibiótico de largo espectro e pondo cobro a infeções por muitos agentes infecciosos, resistentes até à altura. A segunda molécula funcionaria, anos mais tarde, como ponto de partida para outras variantes de antibióticos beta-lactâmicos. Os laboratórios foram contornando diversas resistências bacterianas, como as

betalactamases, adicionando radicais a estes núcleos. Deram assim origem, como ilustra a figura 1, a novas classes de antibióticos e salvaram milhões de vidas (Hamilton-Miller, 2008).

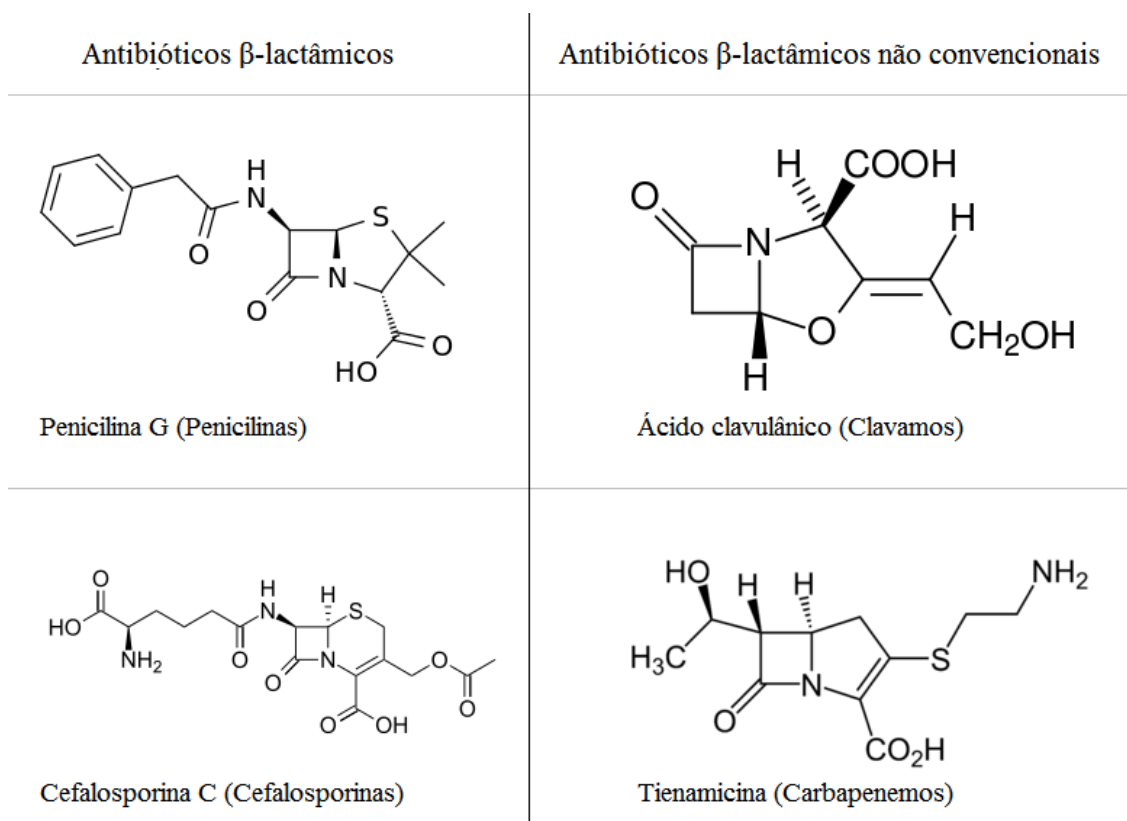


Figura 1 – “Estruturas de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos clássicos (à esquerda) e novos lactamos, não convencionais (à direita). Estão indicados os respetivos nomes e classes de antibióticos a que pertencem” (adaptado e traduzido de *Liras & Martín, 2006*).

Estes avanços laboratoriais permitiam criar catálogos de numerosas moléculas com potencial ação terapêutica. Este facto criara um novo paradigma na descoberta de fármacos e as atenções voltavam-se para a Farmacologia clássica. Nesta, o fármaco hipotético é testado em células como um todo, não sendo necessário o conhecimento prévio do local de interação ou dum completo mecanismo fisiopatológico (Lazo, 2008). De acordo com o mesmo autor, a medição do efeito pretendido, executada ao nível celular como um todo, dita então se o fármaco tem potencial para vir a transformar-se num medicamento.

A síntese química, difundida pelas emergentes empresas da indústria farmacêutica, veio abrir portas a novos produtos para classes terapêuticas carentes na primeira metade do século XX, como a antibioterapia e analgesia (J. J. Li, 2013).

## Farmacologia reversa – do alvo para o medicamento

A Farmacologia reversa, por oposição à Farmacologia tradicional ou fenotípica, percorre o caminho inverso, desde o alvo terapêutico até ao fármaco candidato. A figura 2, elaborada por Takenaka em 2008, descreve ambos os percursos.

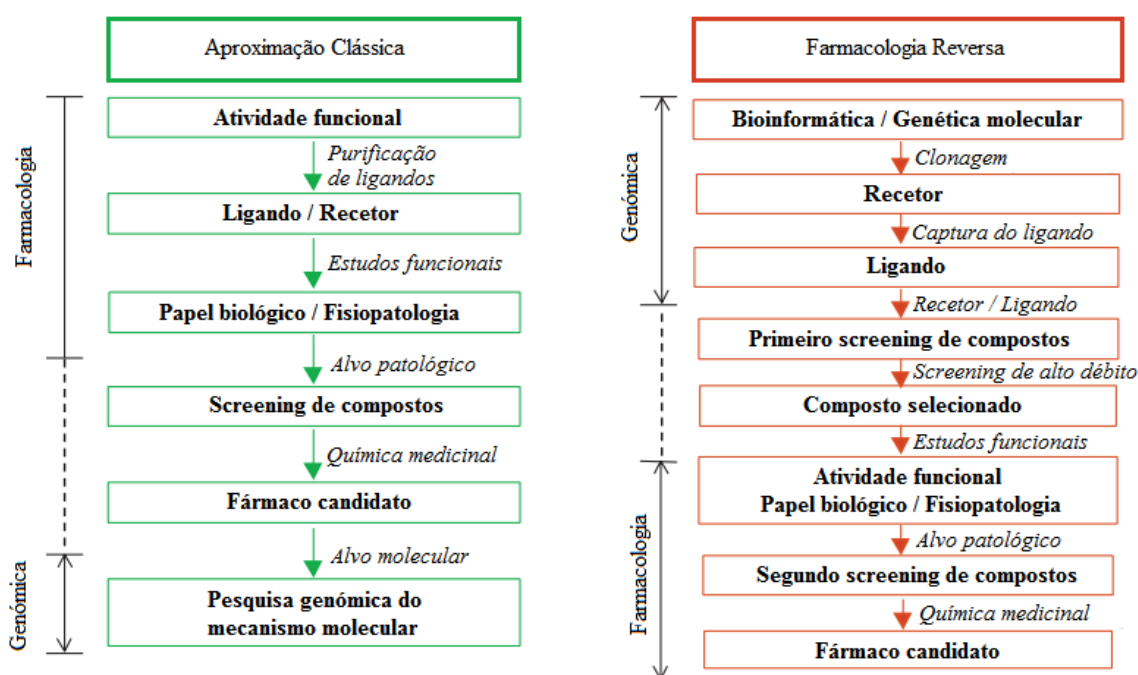


Figura 2 – “Comparação entre a Farmacologia Clássica e a Farmacologia Inversa na descoberta de fármacos” (traduzido de Takenaka, 2008).

Como constata Takenaka em 2008, a Farmacologia inversa baseia-se no estudo prévio da enzima ou recetor do fármaco. Refere que, para que tal aconteça, é necessário um conhecimento *a priori* do mecanismo fisiopatológico da doença, onde se identificam

bioquimicamente as moléculas nele implicadas. O passo seguinte consiste na criação de uma biblioteca de compostos por screening de alto débito, donde saem os compostos líderes. Estes carecem no entanto de um estudo consequente, onde são avaliados parâmetros como a sua atividade e papel desempenhado na patologia. O composto que aqui reunir cumulativamente as melhores características, é então o fármaco candidato. A figura 3, apresentada por Hughes, Rees, Kalindjian, e Philpott em 2011, ilustra o processo de descoberta de fármacos por Farmacologia inversa (ou baseada no alvo).

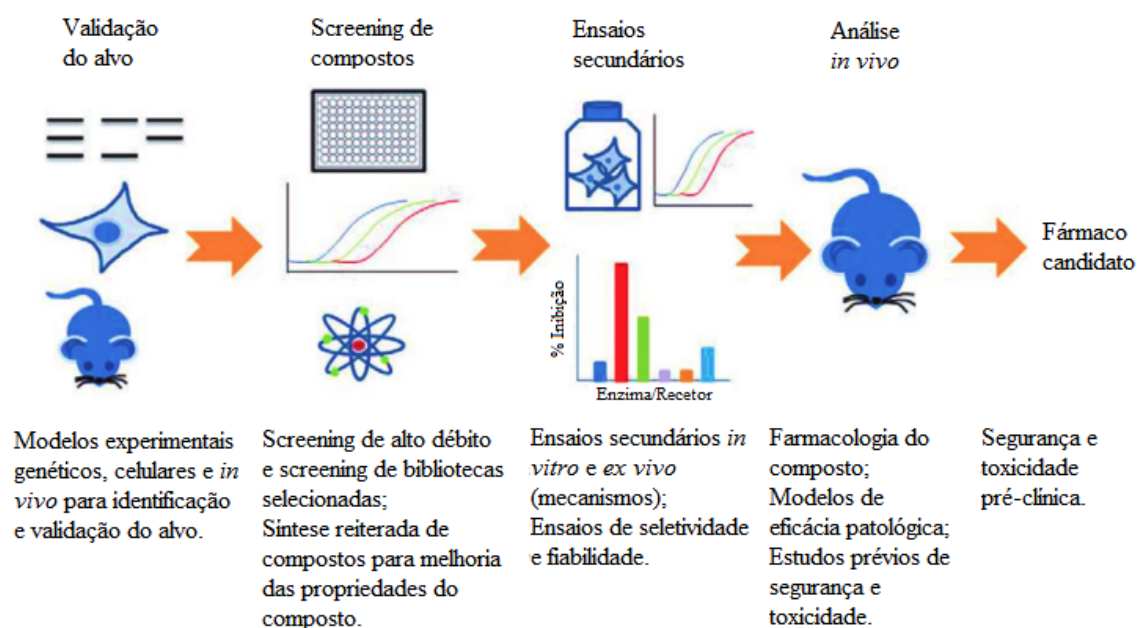


Figura 3 – “Visão geral dos ensaios de screening na descoberta de fármacos” (traduzido de Hughes et al., 2011).

Após a descoberta do fármaco, este prossegue o seu percurso de desenvolvimento, onde se efetuam estudos pré-clínicos e clínicos, e onde se prepara todo o processo de avaliação. Todos estes passos são cruciais para a descoberta de medicamentos, aos quais a indústria farmacêutica presta especial atenção devido à dimensão deste processo, uma vez que dura em média quinze anos e ascende muitas vezes a um custo aproximado de mil milhões de dólares americanos (Malik, 2008). Apesar do tema deste trabalho não abranger a parte do desenvolvimento correspondente aos estudos clínicos, pré-clínicos e de lançamento no mercado, fica a nota da onerosidade e preponderância deste fator na indústria farmacêutica.

## Descoberta de fármacos – Aproximações e metodologias

Como evidenciado pelo acima descrito, a descoberta de fármacos esteve sempre assente na evolução tecnológica. A sua magnitude tem então correspondido diretamente ao avanço das técnicas, dos meios laboratoriais e industriais envolvidos. A tabela 2, elaborada por Winquist, Mullane e Williams em 2013, resume esta evolução de paradigmas e conceitos.

Tabela 1 – “A ascensão e queda da Farmacologia” - Parte I (traduzido e adaptado de Winquist et al., 2013).

Era	Clássica	Bioquímica
Janela temporal	1800s - 1940s	1948 - 1970
Conceitos, teorias de recetores e alvos farmacológicos	Recetores / alvos farmacológicos; Modelo chave-fechadura; Lei da ação de massas.	Atividade intrínseca; Eficácia; Recetores de reserva e recetores livres; Cinética química; Controlo alostérico; Dessensibilização, taquifilaxia, tolerância.
Conceitos	Recetores; Hipótese nula.	Isolamento de recetores; Subtipos de recetores; Canais iónicos ligando-dependente.
Técnicas	Banhos de tecidos; Modelos animais.	Enzimologia; Bioquímica; Eletrofisiologia; Modelos patológicos animais; Linhas celulares imortalizada;
Tecnologias associadas	Química medicinal; Estatística.	Rotulagem por afinidade; Radioimunoensaios.

Tabela 2 – “A ascensão e queda da Farmacologia” - Parte II (traduzido e adaptado de Winquist et al., 2013).

Era	Molecular	Genômica	Sistemas
Janela temporal	1970 - 1986	1987 - Presente	2003 - Presente
Conceitos, teorias de recetores e alvos farmacológicos	Coleções de proteínas; Mecanismos de complexo ternário; Oligo / dimerização; Tráfego de recetores.	Recetores com ativação constitutiva; Tempo de residência no alvo.	Eficácia pluridimensional; Sinalização enviesada.
Conceitos	Recetor acoplado à proteína G; Recetores de fármacos; Ensaio de segurança pré-clínico; Reduccionismo.	Moduladores alostéricos positivos e negativos; Recetores órfãos.	Proteômica, epigenômica, metabolômica etc.; Análise de vias; Redefinição de fármaco; Replicação de dados; Medicina de tradução; Redes moleculares.
Técnicas	Ensaio de ligação por radioligandos; Sistemas recombinantes.	Transferência ressonante de energia por fluorescência / bioluminescência; Cristalografia por raio-X; Imagiologia; Engenharia genética em modelos patológicos.	Função do recetor; Recetores desenhados e ativados exclusivamente por fármacos de <i>design</i> .
Tecnologias associadas	Computador pessoal; Genética - clonagem, expressão, mutação de alvos; <i>Design</i> de fármacos auxiliados por computador.	Screening de alto-débito; Bibliotecas de compostos obtidos por química combinatória / paralela; Mapa do genoma humano; Enciclopédia de elementos de ADN; Estudo de associação do genoma completo; Sequenciação de próxima geração; Biomarcadores; Bioinformática.	Modelos animais de patologias humanas; Screening de alto-conteúdo; Screening fenotípico; Questionário para bases de dados públicas.

## Descoberta de fármacos – Atualidade

A descoberta de fármacos na atualidade baseia-se fundamentalmente em duas aproximações distintas: fenotípica e baseada no alvo. A aproximação fenotípica, empírica, mede a atividade de múltiplos fármacos sobre o fenótipo (*in vivo*, *ex vivo*); já a aproximação baseada no alvo, uma abordagem a nível molecular, mais racional, faz uso de ferramentas genéticas e proteômicas, da química medicinal e de modelos bioinformáticos para guiar o tipo de moléculas a pesquisar, doses e estudos de eficácia, segurança e toxicidade (Swinney, 2013).

A figura 4, da autoria de Eder, Sedrani, & Wiesmann, em 2014, retrata então as principais metodologias utilizadas na atualidade.

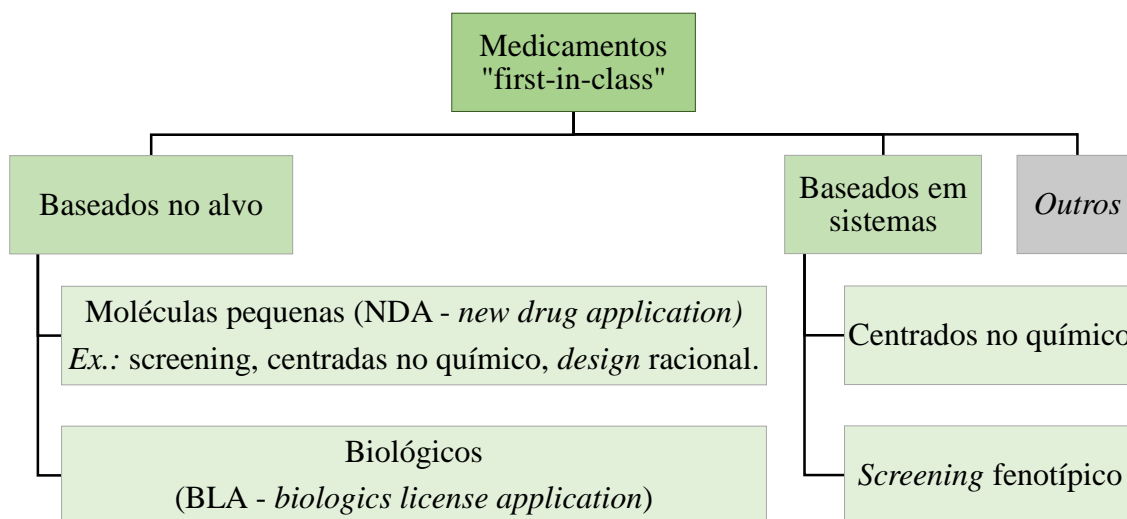


Figura 4 – “Classificação de medicamentos *first in class*, de acordo com a metodologia de descoberta: baseados no alvo e baseados em sistemas” (traduzido e adaptado de Eder et al., 2014).

Apresentados os métodos, impõe-se averiguar se existe uma tendência preponderante nos laboratórios farmacêuticos. Com efeito, Eder et al., neste mesmo estudo publicado em julho de 2014, preconizam a intenção de perceber que rumo está então a tomar esta indústria que movimenta anualmente milhões de dólares. Analisaram os fármacos *first in class* autorizados pela FDA entre os anos entre 1999 e 2013 – a FDA torna-se uma excelente referência nesta área, uma vez que quase metade dos fármacos, descobertos entre 1998 e 2007, provêm dos Estados Unidos da América (Kneller, 2010). Os gráficos presentes na figura 5 mostram então as metodologias de onde estão a provir os fármacos inovadores dos últimos quinze anos.

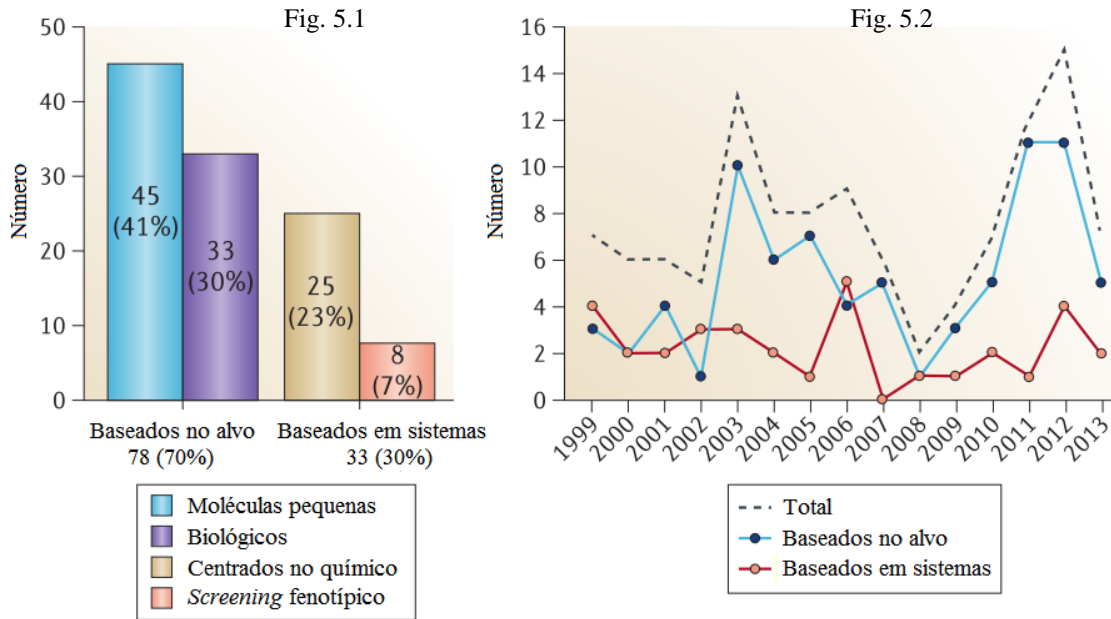


Figura 5 – “Descoberta de medicamentos *first in class* aprovados pela FDA entre 1999 e 2013” (traduzido de Eder et al., 2014).

Como se pode inferir dos dados ilustrados no gráfico 5.1, as estratégias baseadas no alvo apresentam um maior número medicamentos aprovados. Dentro destes, a maioria reside nas pequenas moléculas obtidas por *screening* em função do alvo terapêutico identificado, enquanto a restante fração representa os medicamentos biológicos. Já as estratégias baseadas em sistemas apresentam resultados inferiores. Nesta abordagem, a maioria dos medicamentos são centrados no químico. Esta metodologia baseia-se na identificação de compostos com atividade terapêutica provindos de plantas ou microrganismos; na derivação química de compostos endógenos com atividade fisiológica no ser humano; ou ainda por síntese química, apostando em variações de fármacos descobertos anteriormente por serendipidade.

O gráfico 5.2 revela que existem, em número absoluto, mais fármacos inovadores a ser lançados no mercado através de estratégias baseadas no alvo, do que através de estratégias baseadas em sistemas. Porém, percebe-se também que não existe uma clara tendência de crescimento ao longo do tempo para nenhuma das metodologias, sendo ambas utilizadas com grande frequência na atualidade.

## Futuro na descoberta de fármacos – Reposição de medicamentos e métodos futuros

Como tem sido divulgado no meio farmacêutico, a *pipeline* de medicamentos atravessa neste momento alguma estagnação. Desta forma, urge criar ou recriar medicamentos para indicações ainda por cobrir no prontuário terapêutico. A figura 6, criada por Jin & Wong em 2013, retrata as metodologias utilizadas neste processo.

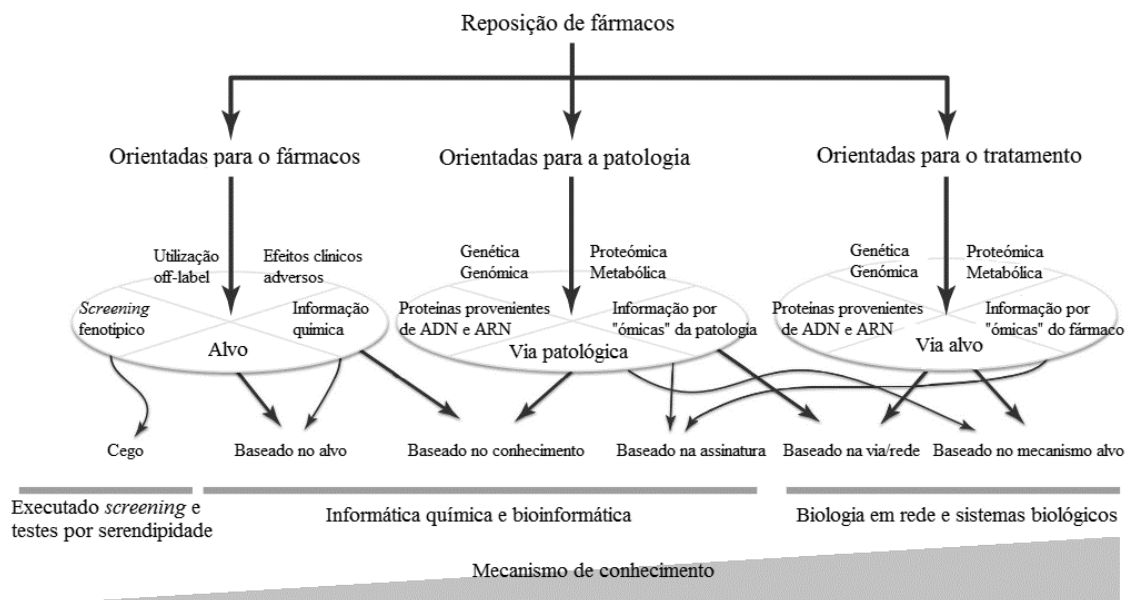


Figura 6 – “Categorização dos métodos de reposição de medicamentos já existentes” (traduzido de Jin & Wong, 2013).

Desta forma, a reposição pode ser centrada no fármaco, onde este é sujeito a testes adicionais e, por serendipidade, é descoberta eficácia para uma nova patologia; é descoberta uma nova atividade terapêutica para o fármaco ou este inibe um alvo noutra doença (Jin & Wong, 2013). Ainda de acordo com estes autores, a reposição pode ser orientada para a patologia, onde a via metabólica envolvida pode ser um alvo importante numa outra patologia; e ainda orientada para o tratamento dirigido a um alvo específico, onde a mesma proteína pode vir a revelar-se importante noutra patologia.

Dada a pressão económica ubíqua em todo o setor farmacêutico, a indústria vê-se obrigada a desenvolver novas estratégias para que o fluxo de fármacos e as necessidades da população sejam cobertas. Tendo-se iniciado numa era puramente empírica, atravessando uma fase essencialmente científica, regressa agora a necessidade de olhar para o fármaco não como uma simples molécula mas como parte integrante na resolução de uma disfunção num organismo vivo. Aqui entra a proteómica e as ferramentas que lhe estão associadas, numa era biotecnológica em constante progressão.

## FERRAMENTAS PROTEÓMICAS

### Introdução à proteômica

“A proteômica é o estudo em larga escala da estrutura e função de proteínas presentes numa amostra biológica complexa” (Chandramouli & Qian, 2009) e foi um termo cunhado por Marc Wilkins em 1994, no desenvolvimento da sua tese de doutoramento nesta área (Wilkins, 2009).

Para a génese desta disciplina, como em tantas outras na área da ciência, foram necessárias algumas tecnologias que a sustentassem. Décadas de evolução em técnicas como separação de proteínas, espectrometria de massa, sequenciação e anotação do genoma de diversos organismos, incluindo o humano, microarranjos e algoritmos de pesquisa de proteínas criaram as condições necessárias (Šamaj & Thelen, 2007).

Hoje, vinte anos após o seu surgimento, algumas barreiras da proteômica já foram ultrapassadas mas continuam a existir algumas limitações nas metodologias e processos, como abordado mais à frente. Não obstante, continua a ser uma ciência em crescimento, como o comprova o número de artigos publicados anualmente, apresentado em gráfico por Gu & Yu, em 2014.

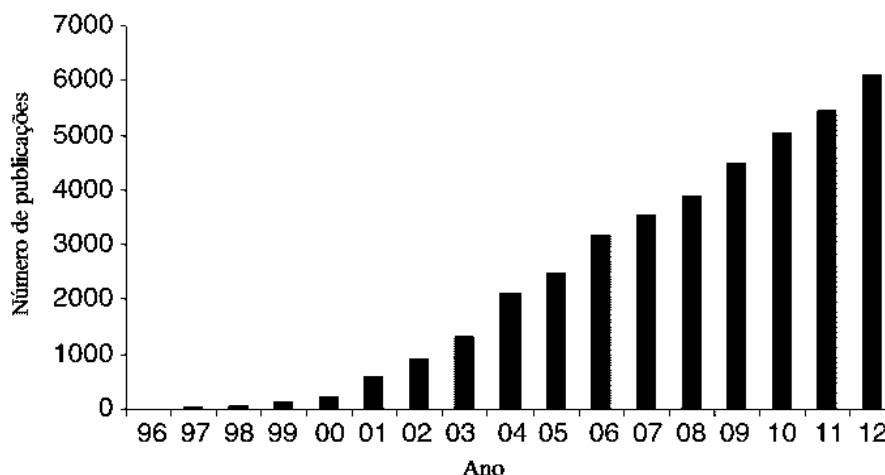


Figura 7 – “Artigos de pesquisa publicados anualmente (excluindo revisões, abstracts, editoriais ou comentários), contendo as palavras-chave “proteômica” ou “proteoma”, baseado numa pesquisa no Thompson Reuters Web of Knowledge Science Citation Index” (traduzido de Gu & Yu, 2014).

## Proteoma – O passo seguinte ao genoma

Como já referido, o proteoma foi um termo introduzido por Wilkins, na primeira conferência de Siena, em 1994 (Wilkins & Appel, 2007). Uma das definições propostas para o conceito de proteoma corresponde às “proteínas presentes numa amostra (tecido, organismo, cultura celular) num determinado momento” (Neha & Harikumar, 2013).

Em 1941, Beadle e Tatum realizam uma experiência com o bolor *Neurospora crassa*, onde estirpes mutadas através de raio-X não apresentam enzimas essenciais na sua via metabólica. Através de meios diferenciais, supuseram que os genes atuavam mediante a produção de enzimas, e cada gene levava à síntese de uma única enzima (Beadle & Tatum, 1941). Esta hipótese, apelidada por Horowitz de “Um gene, uma enzima”, é hoje tida como uma simplificação demasiado redutora e que não corresponde à realidade (Bussard, 2005).

Outra teoria impulsionadora na área da genética foi apelidada pelo seu autor como “O dogma central da biologia molecular”. Foi apresentada por Francis Crick e estabelece a relação entre os ácidos nucleicos e a expressão de proteínas (Crick, 1970). Numa imagem mais atual, a figura 8 ilustra este paradigma.

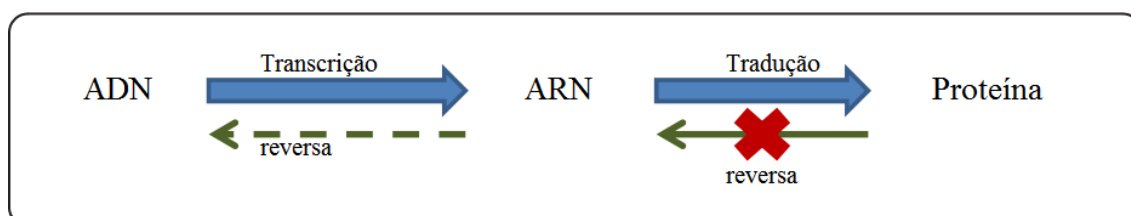


Figura 8 – “O dogma central da biologia molecular” (traduzido de Koonin, 2012).

Esta expressão de proteínas no organismo é controlada a cada instante por diversos fatores, intrínsecos e extrínsecos, como “saúde vs. doença”, a natureza de cada tecido, o estado de desenvolvimento celular ou tratamentos farmacológicos” (Neha & Harikumar, 2013).

O conceito de proteoma realça particularmente a sua natureza mutável pois, ao invés da relativa estabilidade do genoma, o proteoma sofre constantes alterações induzidas pela sinalização intra- e extracelular. Um exemplo clássico, ilustrativo deste conceito, é o das espécies que sofrem metamorfose. O seu genoma mantém-se inalterado desde o estado larvar até ao imago. O seu proteoma, porém, atravessa fases muito díspares, de acordo com a necessidade do organismo (Warren, 2011). Este facto foi

percecionado laboratorialmente, uma vez que a identificação e quantificação das proteínas não tinha correlação direta com o transcriptoma (coleção do ARN mensageiro, ribossómico, transportador, linc e microARN presente na célula) e nem todas as proteínas eram expressas em todos os locais do organismo e ao mesmo tempo (Rogers et al., 2008). Assim, faz sentido pensar no proteoma como a coleção de proteínas expressas num determinado conjunto celular, num determinado tempo e em determinadas condições.

Somados a este facto, mecanismos como o *splicing* alternativo ou as modificações pós-traducionais (MPT) conferem uma natureza ainda mais variável às proteínas expressas (Šamaj & Thelen, 2007).

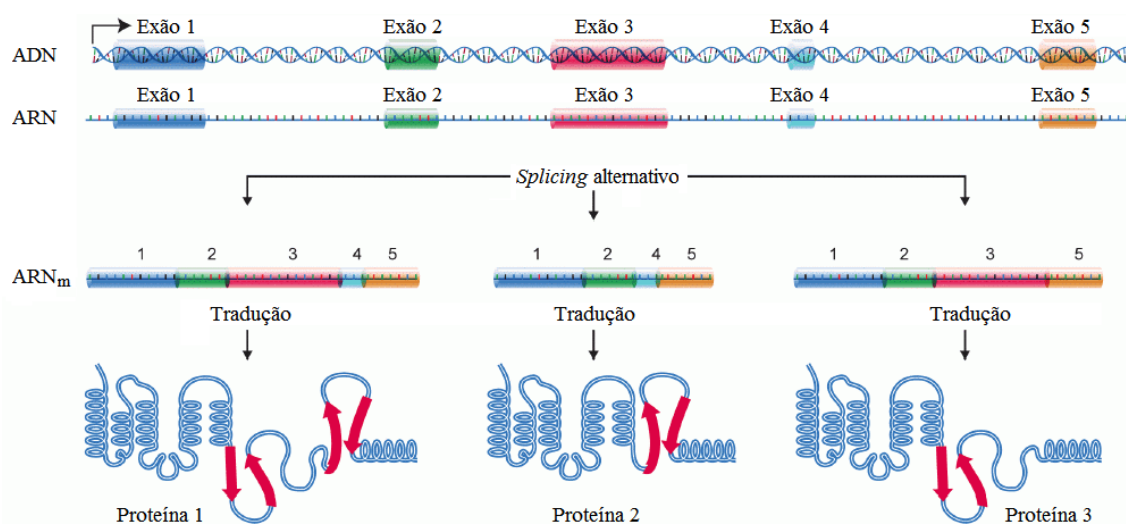


Figura 9 – Mecanismo de *splicing* alternativo (traduzido do sítio do *National Human Genome Research Institute* - (INHGR, 2014)).

O *splicing* alternativo, presente na figura 9, é um mecanismo através do qual os exões se combinam de forma alternativa ao *splicing* geral. Desta forma, um só gene codifica diferentes ARNm, que originarão diferentes proteínas (Mackereth et al., 2011).

As MPT são alterações induzidas no polipéptido após a sua tradução. Nela estão incluídas reações como as de acetilação, fosforilação, ubiquitinação, metilação ou a formação de pontes dissulfeto. Estas modificações podem ter um papel ativador, inativador, regulatório, entre outros, conferindo variabilidade na forma e função da proteína expressada (Xu et al., 2014).

Tais mecanismos vieram destituir o dogma central da biologia “um gene, uma proteína”, dado que hoje se sabe que um gene codifica, na maioria das vezes, mais do que uma proteína (Wilhelm et al., 2014).

Por exemplo, a última atualização no estudo do proteoma humano, existem cerca de 20 687 genes codificantes. Destes, 17 294 foram analisados, tendo em conta as proteínas que codificavam. Foram então apresentados os proteomas de 30 amostras de humanos, sendo 17 de adulto, 7 fetais e 6 de hemocitoblastos purificados, concluindo que dariam origem a cerca de 293 000 péptidos não redundantes (Kim et al., 2014). A título exemplificativo, a figura 10 ilustra o proteoma do plasma humano, tal como descrito no mesmo estudo.

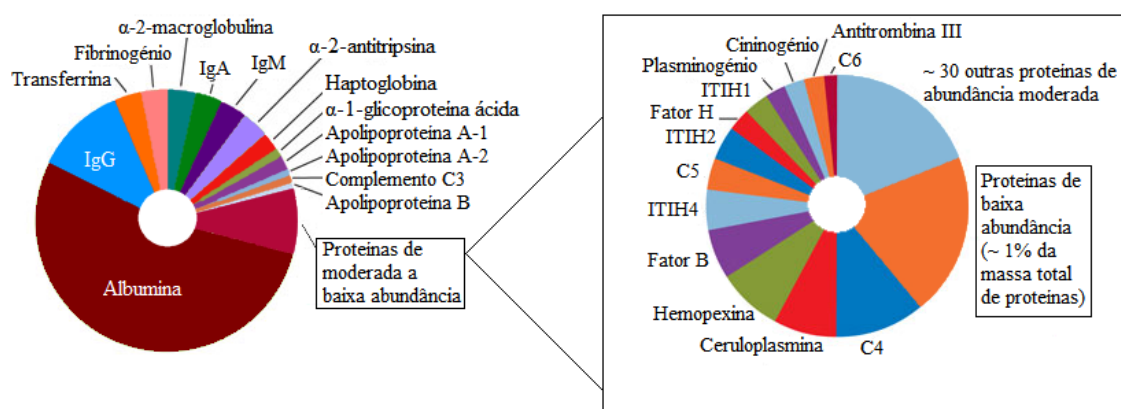


Figura 10 – “Abundância relativa das proteínas de abundância elevada, moderada e baixa no plasma humano” (traduzido e adaptado de Shi et al., 2012).

Tendo em conta a superioridade numérica em várias ordens de grandeza das proteínas, face ao número de genes que as codificam, é então intuitivo perceber que um gene terá de codificar bem mais do que uma proteína (Burkard et al., 2011). O *splicing* alternativo, as MPT, as interações proteicas e variabilidade na expressão de acordo com a sinalização intra- e extra celular constituem então fatores de dificuldade acrescida no estudo do proteoma. É, comparativamente com o estudo do genoma, um desafio de maior complexidade, que carece de meios tecnológicos e laboratoriais mais avançados, apresentados seguidamente como ferramentas proteômicas.

## Ferramentas proteômicas

Como foi demonstrado, o estudo do proteoma envolve um elevado grau de complexidade, passível de ser restringido a diversas sub-áreas, como ilustra a figura 11. Para o estudo das diversas áreas e respectivos objetivos e processos, houve a necessidade de se desenvolver diversas técnicas.

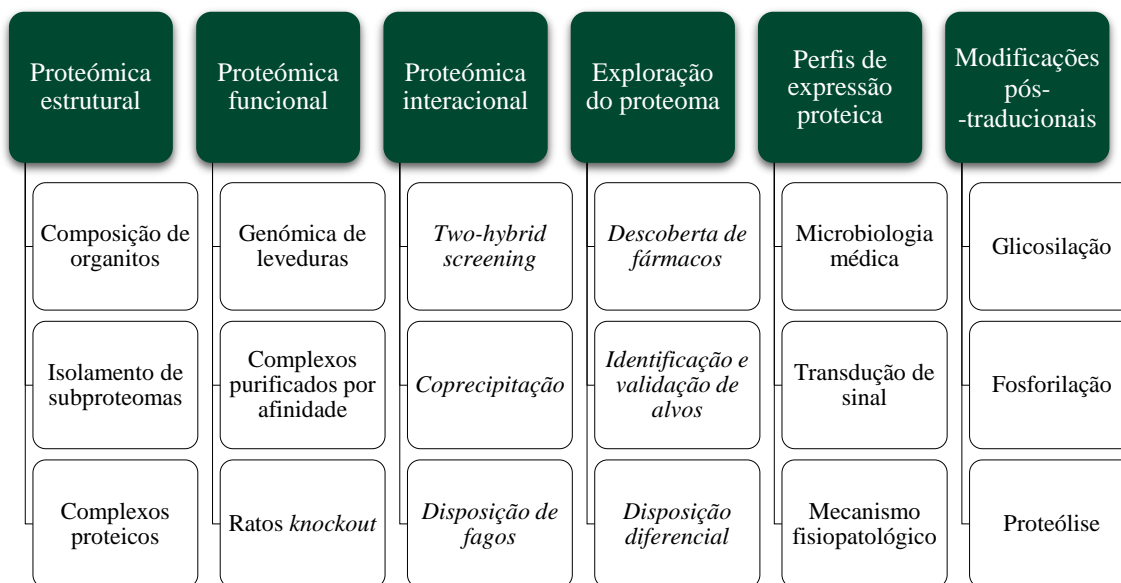


Figura 11 – Tipos de proteômica e sua aplicação na biologia molecular (traduzido e adaptado de Graves & Haystead, 2002).

A figura 12 representa um fluxo de trabalho no qual estão presentes as técnicas mais utilizadas atualmente na caracterização de proteínas. Apesar de coligir as ferramentas proteômicas de maior relevância, existem muitas outras técnicas ao dispor do estudo proteômico. A escolha da metodologia dependerá sempre de fatores como o tipo de amostra a analisar, dos equipamentos e reagentes disponíveis, do tipo de estudo pretendido ou do custo total da operação (Villanueva, Carrascal, & Abian, 2014).

Posto isto, apresentar-se-ão os aspetos relevantes sobre as técnicas mais utilizadas em proteômica: a eletroforese 2D, a espectrometria de massa e os sistemas bioinformáticos. Estes métodos visam, respetivamente, a separação, identificação/caracterização e comparação das amostras proteicas.

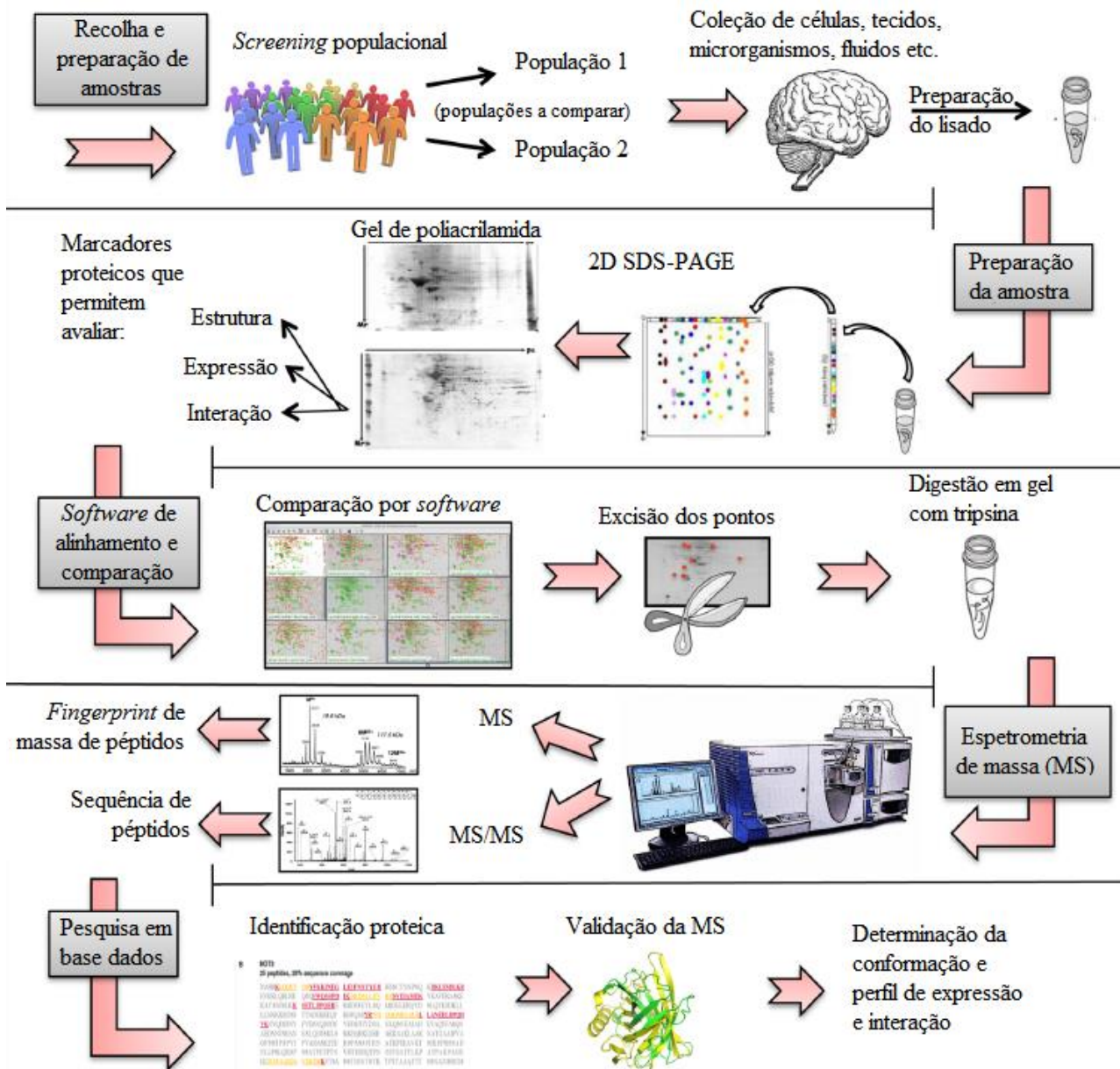


Figura 12 –Visão esquemática sobre identificação, perfil de expressão e interação proteica, utilizando ferramentas proteômicas (traduzido e adaptado de Butterfield, Gu, Di Domenico, & Robinson, 2014).

## Eletroforese

A eletroforese 2D é um dos métodos clássicos para separação de proteínas, sendo mesmo anterior ao aparecimento da proteômica. Foi muito graças a ela que a proteômica conseguiu surgir como disciplina, uma vez que possibilitava a detecção, separação e quantificação de misturas proteicas complexas, expressas em sistemas celulares ou amostras biológicas (Rabilloud, 2002).

Esta técnica baseia-se na disposição de componentes proteicos de uma amostra num gel, de acordo com a sua mobilidade eletroforética. Esta mobilidade está diretamente dependente de propriedades físico-químicas da molécula proteica, que aqui representam coordenadas no gel, como a carga elétrica (eixo das abcissas) ou a massa molecular (eixo das ordenadas) (Banach, Adaszek, Wyłupek, Winiarczyk, & Winiarczyk, 2013). A figura 13 retrata os resultados obtidos com esta mesma técnica.

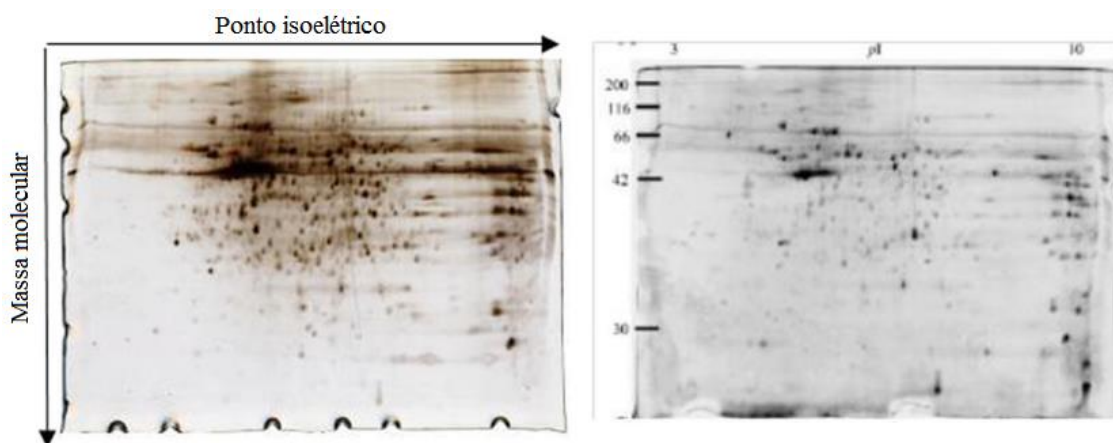


Figura 13 – Dois géis de poliacrilamida para eletroforese 2D com colorações (traduzido de Magdeldin et al., 2014).

Na sua génese, a eletroforese baseava-se apenas numa dimensão, isto é, as proteínas eram separadas apenas com base num parâmetro físico-químico. Este método era claramente insuficiente pois, se eram separadas, por exemplo, de acordo com a sua carga elétrica, poderiam continuar agrupadas proteínas de pesos moleculares muito díspares. (Banach et al., 2013). O'Farrel apresentou um método inovador que permitia a separação de proteínas em duas dimensões, o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular ( $M_r$ ). Assim, a separação de acordo com a primeira dimensão era obtida por focagem isoelétrica – IEF (*isoelectric focusing*) – e a segunda dimensão por eletroforese em gel de

poliacrilamida, em condições desnaturantes – SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (O’Farrell, 1975).

Uma vez que a técnica ainda é amplamente utilizada, será feita uma descrição dos materiais e métodos envolvidos atualmente na IEF e na SDS-PAGE, da sua utilização em proteômica, assim como as suas principais vantagens e desvantagens. O fluxo de trabalho proposto na figura 14 é o habitual na utilização de técnicas eletroforéticas para separação de proteínas (Garfin & Ahuja, 2005).

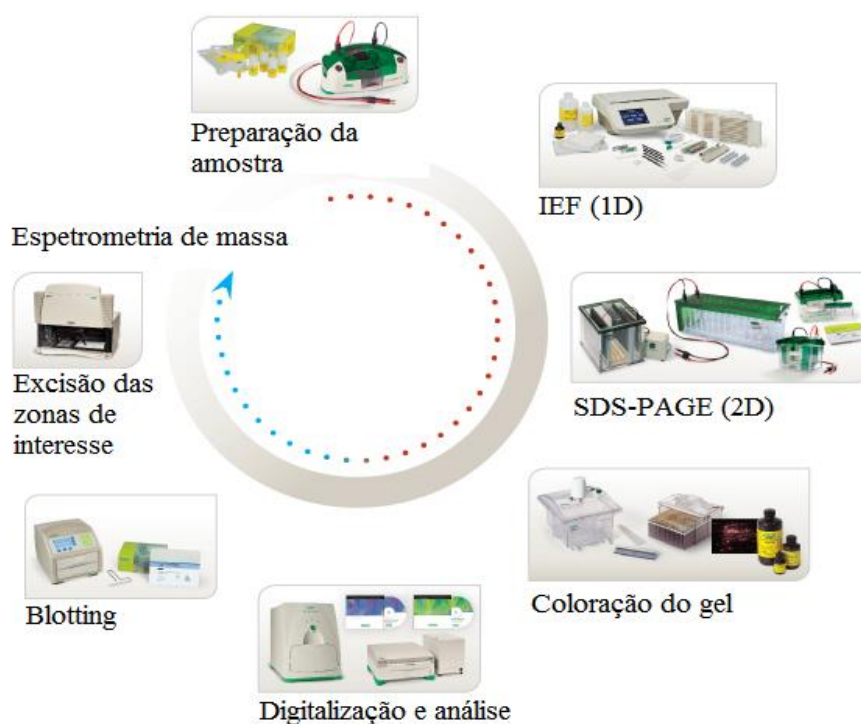


Figura 14 – “Fluxo de trabalho para separação de proteínas por técnicas eletroforéticas” (Garfin & Ahuja, 2005), ilustrado com figuras cedidas pelos laboratórios Bio Rad (Bio Rad, 2014).

### IEF – Focagem isoeletrica

A focagem isoeletrica é uma técnica eletroforética, através da qual, compostos anfotéricos são fracionados de acordo com o seu ponto isoeletrico (pI), ao longo de um gradiente de pH (Righetti, 2004). A propriedade das proteínas que permite usar esta

técnica é o facto de a carga eléctrica total ser determinada pelo pH do meio e, dessa forma, as proteínas admitem carga positiva, negativa ou neutra, em função do pH envolvente (Davey & Lord, 2003).

Esta carga total é determinada pela soma das cargas positivas e negativas da proteína a um dado pH, conferidas pela cadeias laterais ionizáveis, acídica ou básicas, constituintes dos aminoácidos proteicos e do grupo prostético. Desta forma, quando o número de grupos acídicos excede o de grupos básicos, o pI da proteína situar-se-á a um pH inferior a 7 e esta diz-se acídica. O inverso é igualmente verdade (Davey & Lord, 2003).

As proteínas podem apresentar pI muito díspares. Situam-se habitualmente entre um pH de 3 e 12 mas a grande maioria está entre 4 e 7 (Wilkins & Appel, 2007). Os mesmos autores referem ainda que, devido ao facto de as proteínas serem estruturas anfotéricas, podem comportar-se como ácidos ou bases, havendo variações na sua carga global. Assim, quando presentes num gradiente de pH imobilizado – IPG (*immobilized pH gradient*) – abaixo do seu valor de pI adquirem carga positiva e migrarão para o cátodo, enquanto se estiverem numa solução com pH acima do seu valor pI, migrarão para o ânodo (Righetti, 2004). Durante este deslocamento, as proteínas poderão ganhar ou perder protões, de acordo com o pKa das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e atingirão um ponto onde as cargas eléctricas negativas compensarão as cargas positivas (carga global nula). Terão então alcançado o seu ponto isoelétrico e a sua migração cessará. Se a proteína continuar a sua migração, protonará ou desprotonará novamente e tende a regressar à zona de equilíbrio eléctrico (Righetti, 2004). Deste modo, cada proteína atingirá, a velocidades diferentes, um foco no gel, correspondente à neutralidade de cargas. Tal facto confere a designação atribuída a esta técnica, focagem isoelétrica. Por tal acontecer, a amostra pode ser colocada em qualquer parte do gel pois, no fim do processo, cada proteína migrará e ficará retida na sua zona isoelétrica, independentemente do seu tamanho ou massa molecular, como ilustra a figura 15 (Rabilloud & Lelong, 2011). Para resolução de proteínas com um pI entre 7 e 11, é utilizada a técnica de IPG em não-equilíbrio (NEPHGE – *non-equilibrium pH gel electrophoresis*), com funcionamento semelhante à IEF em IPG mas com a polaridade invertida (Bjarnadóttir & Flengsrud, 2014).

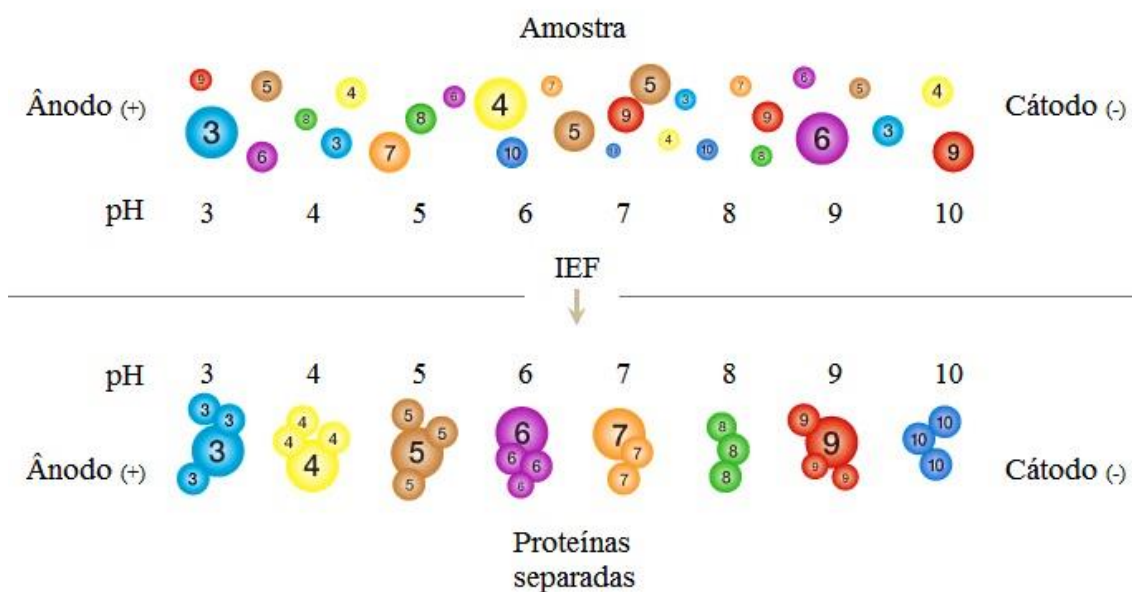


Figura 15 – “Resolução por IEF de uma mistura proteica num IPG com pH entre 3 e 10, de acordo com o pI de cada proteína, independentemente do seu tamanho” (traduzido e adaptado do sítio da Bio Rad, 2014).

Uma vez abordado o conceito teórico no qual assenta a IEF, apresenta-se agora a parte laboratorial do procedimento. Para a sua execução, são utilizadas fitas com um gradiente de pH. A figura 16 ilustra uma montagem IPG-IEF.

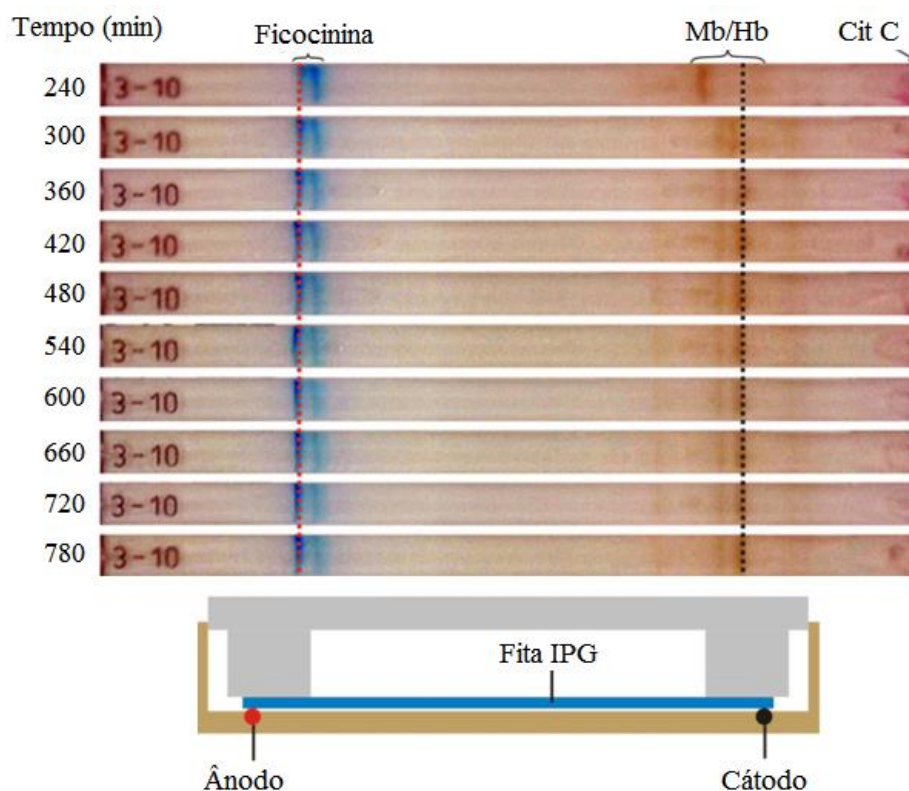


Figura 16 – Eletroforegrama de proteínas padrão focadas em IPG-IEF, com diferentes tempos de corrida e respetiva representação esquemática (traduzido e adaptado de Guo *et al.*, 2013).

O primeiro passo é a extração de proteína da amostra, que carece desta preparação antes de ser sujeita ao IEF. A adição de SDS, um detergente aniônico, é habitualmente utilizado com a dupla função de solubilizar as proteínas e inibir enzimas proteolíticas. Porém, uma vez que interfere com a carga proteica, não é adequado para IEF. Assim, utilizam-se detergentes, sendo o Triton X-100 e o CHAPS os de eleição para este efeito. O primeiro é um detergente não iônico com elevada capacidade de dissolução da membrana; o segundo é um detergente zwitteriônico, derivado de sais de biliar, tendo ampla utilização na solubilização das proteínas membranares mas mantendo a relativa integridade da membrana, devido à posição quase paralela com que estabelece a ligação (Rodi, Bocco Gianello, Corregido, & Gennaro, 2014). A figura 17 representa a estrutura de ambos os detergentes.

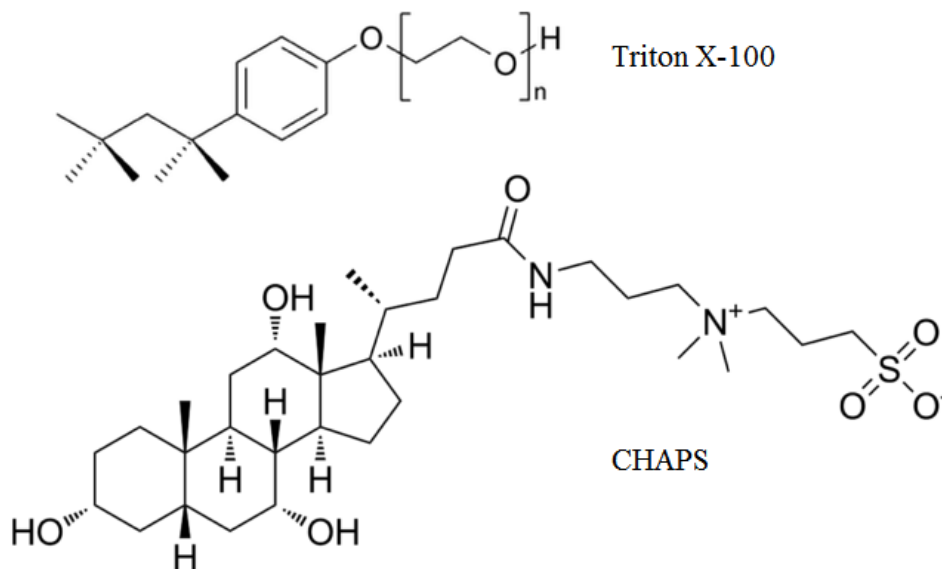


Figura 17 – Estrutura química do detergente não iônico Triton X-100 e do detergente zwitteriônico CHAPS (adaptado de Rodi *et al.*, 2014).

Para lisar as células é utilizado um tampão de lise com agentes caotrópicos, com a possível constituição: 7M de ureia, 2M de tioureia, 4% (m/v) de CHAPS, anfólitos a 2% (v/v, pH 3 a 10) e um agente redutor como o mercaptoetanol (2-ME) ou o ditioneitol (DTT) a 1% (m/v) .

Numa fase posterior à lise da célula, é ainda necessária a remoção de material desnecessário e passível de contaminar a IEF. Assim, são adicionados

solventes para remover os lípidos, nucleases para remoção de ácidos nucleicos, ou tratamento com diálise para remoção de moléculas iônicas.

Extraídas as proteínas, estas são reidratadas durante a noite com um tampão, solubilizando e desnaturando as proteínas, preparando-as para a eletroforese.

Concluído o procedimento de IEF, as proteínas ficam então separadas de acordo com o seu pI. Uma das vantagens da 2-DE é que a resolução adquirida pela IEF não se perde com o segundo processo eletroforético, uma vez que o gel obtido na IEF é transposto para a posterior SDS-PAGE (Magdeldin et al., 2014). As desvantagens da IEF assentavam na grande variabilidade entre focagens e a tendência para o desvio catódico (perda progressiva de proteínas básicas durante focalizações elétricas demoradas) (Rabilloud & Lelong, 2011). O problema foi ultrapassado quando se percebeu que o problema estaria no meio de acrilamida, passando então a ser utilizado o *immobilized pH gradient* (IPG), onde os anfólitos constituintes do gradiente de pH se encontram imobilizados covalentemente. Este fator incrementou enormemente a reprodutibilidade deste método.

Uma vez que esta técnica é o ponto de partida para a grande maioria das atividades na área da proteômica, contínuos investimentos continuam a ser feitos no sentido de obter melhor fiabilidade, reprodutibilidade, resolução e custos. Assim, a tendência tem sido aumentar os sistemas eletroforéticos, uma vez que, com gradientes de pH de maiores dimensões, consegue aumentar-se drasticamente a resolução deste método (Iori, Rattazzi, & Millionsi, 2014).

## SDS-PAGE

Como já foi referido, a SDS-PAGE é o segundo passo da eletroforese de duas dimensões. Enquanto o primeiro passo separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoelétrico, a SDS-PAGE visa separá-las de acordo com a sua massa molecular. Como técnica eletroforética, possui bastantes semelhanças com o passo anterior, nomeadamente a existência de um campo elétrico que arrasta as proteínas mas, aqui, a velocidade de migração das proteínas vai estar direta e unilateralmente relacionada com a sua massa molecular.

O contacto da amostra com o dodecil sulfato de sódio (SDS) é o primeiro passo da segunda dimensão, visando envolver as proteínas com as cargas negativas do SDS e promover o equilíbrio elétrico da fita (Rabilloud & Lelong, 2011).

O gel de poliacrilamida, por vezes também utilizado na primeira dimensão deste processo de separação, é outra parte fundamental deste sistema. Trata-se de uma mistura de acrilamida e bisacrilamida, cuja polimerização tem início com os radicais persulfato e deve ser catalisada com tetrametiletenodiamina a 0,1 e 0,2% v/v (TEMED) (Rabilloud, 2002). A polimerização ocorrida entre a acrilamida e a bisacrilamida varia de acordo com a percentagem presente de cada composto e resulta num gel de elevada resolução, resistente e quimicamente inerte. O número de ligações cruzadas vai ditar a porosidade do gel e o tipo de moléculas a separar – para proteínas, um rácio de 40:1 entre acrilamida:bisacrilamida.

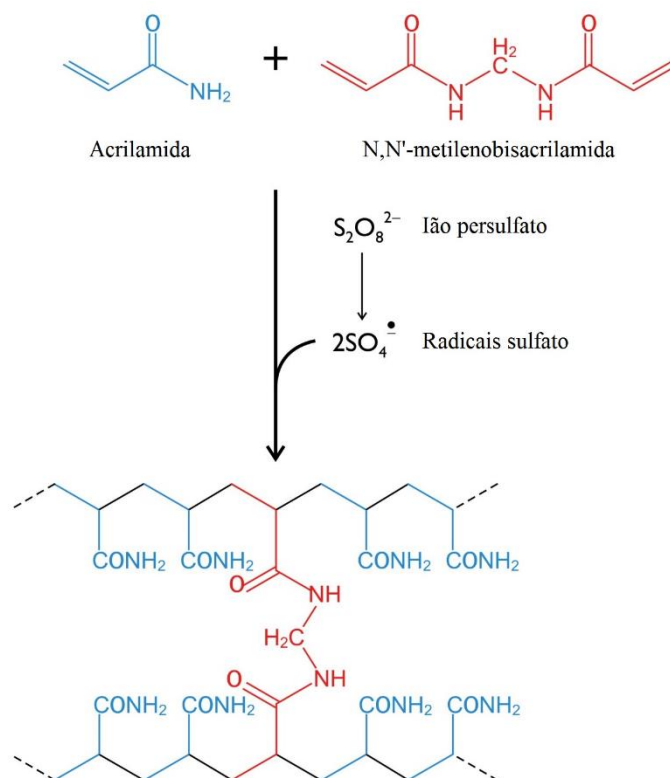


Figura 18 – “Reação de polimerização na formação do gel de poliacrilamida” (traduzido de Rabilloud, 2002).

Finalizada a corrida eletroforética, segue-se outro passo crucial na técnica de PAGE, a coloração do gel. Será esta que permitirá revelar a localização e abundância de cada proteína e, conseqüentemente, do seu pI e  $M_r$  (Garfin & Ahuja, 2005).

Apresenta-se então a tabela 3, onde figuram os principais corantes utilizados na coloração de proteínas.

Tabela 3 – “Corantes habitualmente utilizados para proteínas após separação eletroforética em gel de poliacrilamida. <sup>a</sup> Os limites de detecção são valores médios, uma vez que cada proteína pode corar individualmente com maior ou menor intensidade.” (traduzido de (Magdeldin, 2012).

Corante	Limite de detecção <sup>a</sup> (ng)
Negro de amido	400
Azul de Coomassie	200
Vermelho Nilo (reversível)	20
Nitrato de Prata	1
Rubi SYPRO	0,5

A escolha do corante está subjacente a alguns fatores. O Nitrato de Prata, por exemplo, apresenta uma sensibilidade muito aceitável mas nem sempre é compatível com a espectrometria de massa, passo subsequente à eletroforese.

Para resolver problemas desta natureza, algumas marcas comerciais induziram alterações em marcadores conhecidos, compatibilizando-os com a MS, ou criaram até corantes fluorescentes. Um exemplo destes novos corantes é o Rubi SYPRO, umas das referências atuais, dada a sua compatibilidade e limite de detecção (Magdeldin, 2012).

Outro dos corantes mais utilizados atualmente é o Azul de Coomassie. Este corante aniônico tem uma hidrossolubilidade aceitável mas, ainda assim, consegue estabelecer ligações com proteínas membranares, devido às suas propriedades hidrofóbicas. Este corante apresenta algumas semelhanças a um detergente aniônico, uma vez que tem a capacidade de dissociar ligações lábeis perante um detergente mas, por outro lado, mantém as unidades respiratórias intactas. Esta propriedade torna-se particularmente útil no estudo de proteínas membranares da mitocôndria (Wittig, Braun, & Schägger, 2006).

Após coloração das proteínas, obtém-se uma imagem semelhante à da figura 19.

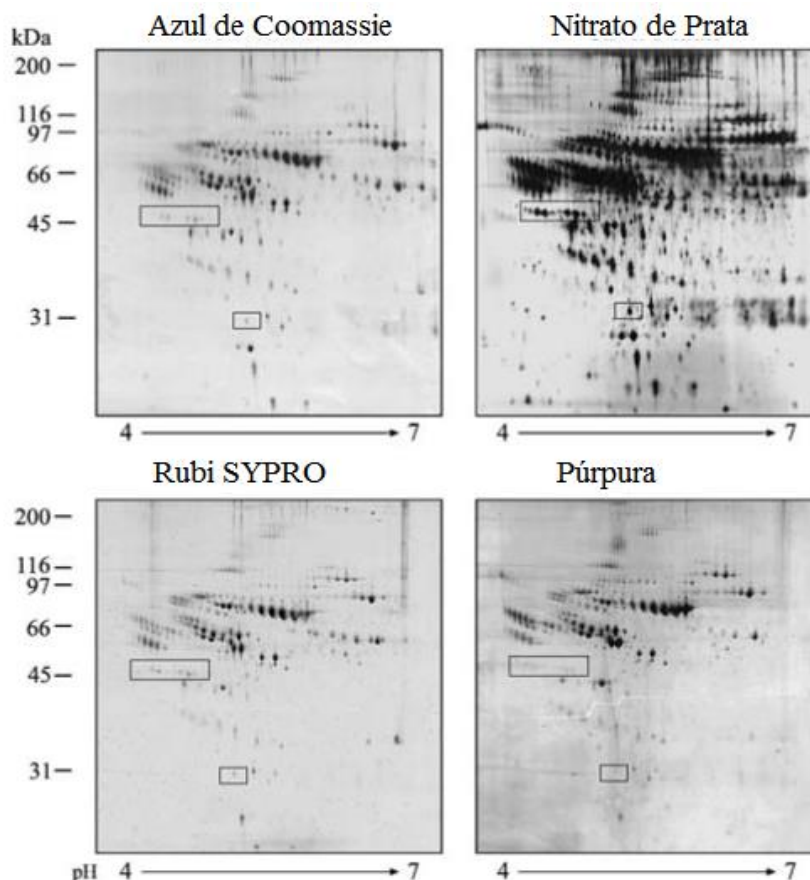


Figura 19 – “Comparação de métodos de coloração de proteínas do plasma humano”  
(traduzido e adaptado de Desrosiers, Beaulieu, Buchanan, & Béliveau, 2007)

Para a análise do gel obtido no final da eletroforese existem hoje em dia diversos *softwares* de imagem especializados, como o Flicker, o PDQuest ou o Delta 2D (Bjarnadóttir & Flengsrud, 2014). Estes *softwares* têm a capacidade de, após digitalização do gel, fazer alinhamento de diversos géis, analisar manchas, o seu centro, o raio de difusão e efetuar tratamento estatístico (ANOVA). Em suma, determinando o pI e  $M_r$  da molécula por comparação com os padrões, o software é um excelente auxílio na identificação da molécula em questão. Outra ponto de enorme relevância neste tipo de *softwares* é a possibilidade de comparar níveis de expressão em diferentes condições, como em amostras onde se procurem biomarcadores patológicos, por exemplo.

O último passo visa remover a proteína isolada no gel para posterior identificação. Desta forma, os *spots* de interesse identificados no gel são excisados manualmente ou através de um robô *spot-picker*, inseridos num microtubo, onde ocorre digestão das

proteínas em tripsina, uma protease específicas (Rabilloud & Lelong, 2011). Após a digestão, executa-se a eluição dos péptidos e sua aplicação numa placa de MALDI, tendo estes dimensão própria para serem analisados por espectrometria de massa.

Apesar de este ser um método bem estabelecido e capaz de separar simultaneamente mais de mil proteínas, de ser útil na identificação de proteínas com MPT ou ainda na comparação de proteínas ausentes em genes *knocked out*, continua a apresentar algumas desvantagens (Bunai & Yamane, 2005). Limitações como baixa capacidade de amostra, separação insuficiente de proteínas hidrofóbicas e acídicas ou a incapacidade de separar proteínas com mais de quatro domínios transmembranares, são alguns dos problemas ainda por contornar.

Não obstante, este processo de separação prévio à análise por MS é essencial, dado o elevado número de diferentes moléculas presentes numa amostra biológica. Este facto torna-se bastante evidente numa amostra de plasma, por exemplo. Se se quiser detetar biomarcadores (toxicológicos, patológicos, entre outros), muitas vezes presentes em concentrações na ordem do ng/ml ou pg/ml, é essencial que se retirem primeiro as proteínas mais abundantes, muitas vezes presentes na ordem do mg/ml, para que seja possível a deteção das proteínas de menor abundância (Shi et al., 2012).<sup>7</sup>

### DIGE – Difference gel electrophoresis

Especialmente na área da proteómica comparativa, surge a necessidade de comparar vários géis, contendo amostras de vários indivíduos ou populações. Na 2-DE a comparação entre géis não está imune ao viés da variabilidade deste método. Desta forma, poderiam obter-se resultados com menor fiabilidade. A DIGE surge então no sentido de facilitar esta comparação entre proteínas de amostras diferentes, uma vez que permite a migração de diferentes amostras num só gel (Pasquali, Serchi, Renaut, Hoffmann, & Bohn, 2013).

Este facto é possível devido à marcação de cada uma das amostras com um conjunto de corantes fluorescentes, sendo estes os compostos chave deste método. Assim, é necessária a validação de alguns pressupostos. Cada conjunto de corantes terá de reagir com o mesmo resíduo de aminoácido; devem preservar a carga do aminoácido alvo; os

corantes devem ter uma  $M_r$  semelhante; devem ter características fluorescentes distintas, permitindo corar diferencialmente cada amostra (Minden, Dowd, Meyer, & Stühler, 2009).

Este processo decorre, a par dos processos já referidos, num gel de poliacrilamida. As dimensões do gel são variáveis, dependendo delas o poder de resolução. Após a migração das proteínas e a ligação com o corante para o qual possuem afinidade, o resultado é um gel com pontuações de diversas cores, referentes às diferentes amostras. Mantêm as duas dimensões, pI e  $M_r$ . A figura 20 ilustra um exemplo do resultado obtido num gel de DIGE.

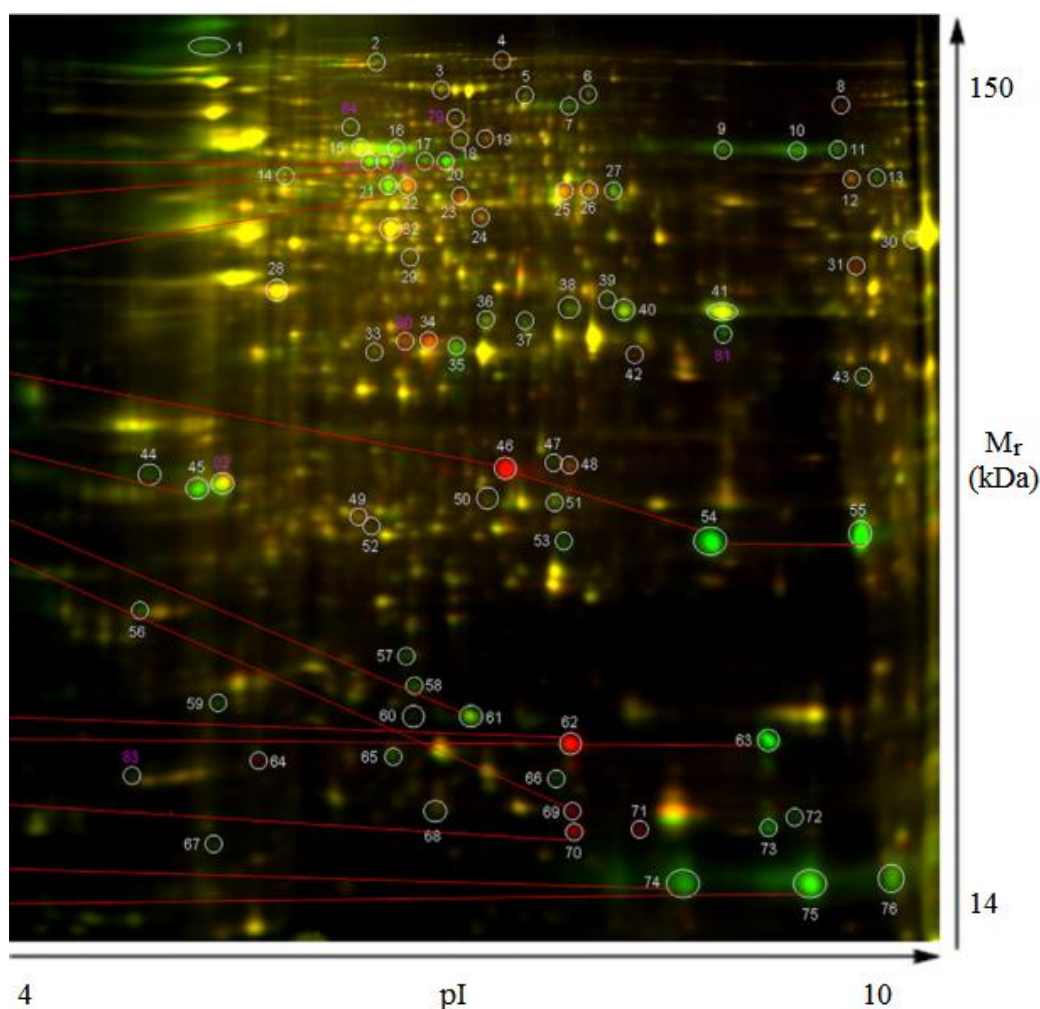


Figura 20 – Proteínas extraídas de diferentes estirpes de *Toxoplasma gondii*. Foram separadas na primeira dimensão com pH entre 4 e 9 e na segunda dimensão através de SDS-PAGE num gel a 12%. Ambas as estirpes apresentam expressão de proteínas, corando diferencialmente de verde e vermelho. Através do *software* utilizado, é possível identificar quais as proteínas mais abundantes e em que estirpe estão presentes.

## MS – Espectrometria de massa

Uma das metas da proteômica passa pela identificação e caracterização massiva dos mais variados proteomas, começando pelo humano, passando por espécies bacterianas de interesse laboratorial ou até de vegetais com interesse industrial. Este estudo inclui as proteínas expressas, as isoformas por *splicing*, as proteínas com MPT, a estrutura dos seus domínios e atividade funcional (Han, Aslanian, & Yates, 2008).

A MS é um método de identificação e quantificação utilizado em proteômica e avalia essencialmente o rácio massa/carga ( $m/z$ ) de iões em fase gasosa através dum aparelho denominado espectrómetro, que apresenta os seguintes constituintes (Wilhelm et al., 2014):

Fonte de iões que converte as moléculas da amostra em iões em fase gasosa;

Analisador que separa a amostra ionizada de acordo com o seu  $m/z$ ;

Detetor que capta o número de iões a cada  $m/z$ .

Diversas técnicas foram então criadas para melhorar cada um destes passos ou os componentes neles envolvidos. Assim, surgiram duas técnicas revolucionárias de ionização, por serem capazes de ionizar péptidos e proteínas: ionização por eletrospray (ESI – *electrospray ionization*) e dessorção/ionização com laser assistido por matriz (MALDI – *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (Han et al., 2008). Existem essencialmente quatro tipos de espectrómetros: quadrupolo (Q – *quadrupole*); captura de iões quadrupolo e linear (QIT – *quadrupole ion trap* e LIT – *linear ion trap*); tempo de voo (TOF – *time of flight*) e analisador por ressonância iónica ciclotrónica com transformada de Fourier (FTICR – *Fourier-transform ion cyclotron resonance*), podendo ainda haver analisadores mistos, que combinam algumas destas tecnologias (Hager, 2004). A figura 21 ilustra os espectrómetros de massa mais comuns.

Em 1999 é criado um espectrómetro que ainda hoje consegue conciliar múltiplas vantagens num só aparelho – o Orbitrap. Nele, os iões são capturados orbitam em torno de um eléctrodo fusiforme central que oscila harmonicamente ao longo do seu eixo com uma frequência característica dos seus valores de  $m/z$ , induzindo uma imagem nos eléctrodos externos que, após a transformada de Fourier, gera um espectro (Hu et al., 2005). Possui uma resolução de 40 000 e medições de massas na ordem dos 2 ppm.

Proteômica diferencial e aplicações farmacêuticas

A proteômica diferencial divide-se duas grandes classificações que acabam por englobar as técnicas já mencionadas: *bottom-up* e *top-down*, ambas ilustradas no esquema presente na figura 21. Ambas os percursos visam o estudo da estrutura, expressão e interação das proteínas. Não é um processo de uso exclusivo na área do medicamento mas esta informação tem especial relevo no *design* de fármacos. Viabiliza então a descoberta de moléculas que se adaptem farmacocinética e farmacodinamicamente às proteínas

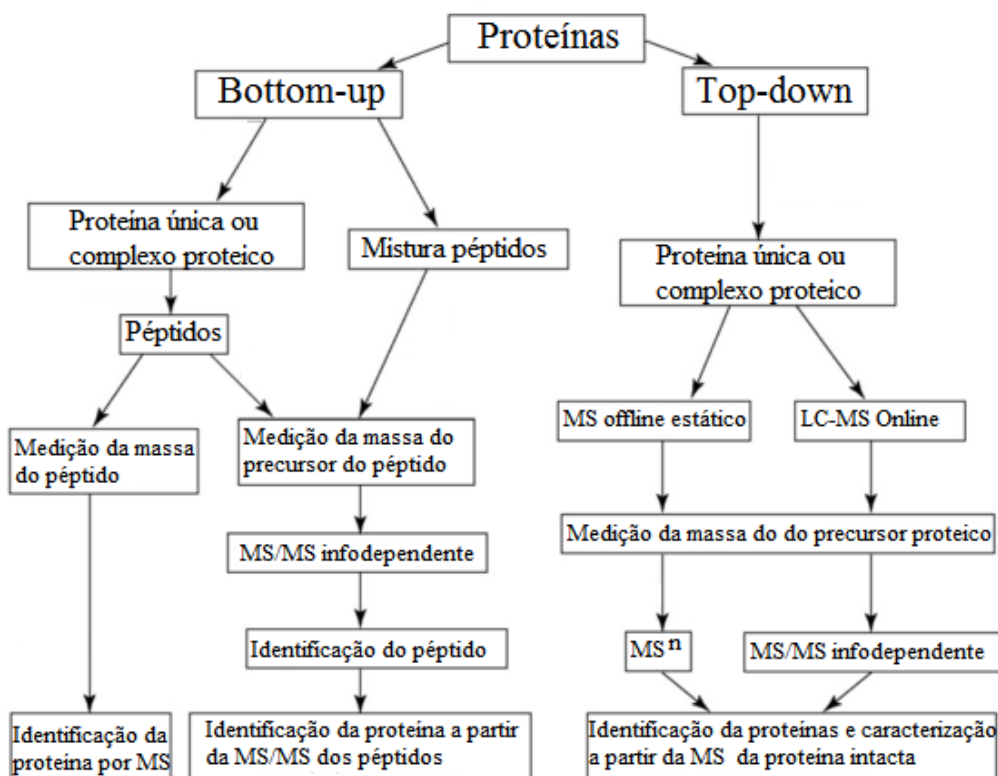


Figura 21 – “Estratégias para identificação e caracterização de proteínas com base em MS” (traduzido de (Han et al., 2008).

alvo de interação em vias patológicas.

Tendo este esquema em conta, serão apresentadas algumas metodologias comumente utilizadas na área farmacêutica:

#### MS tandem

(MS/MS, espectrometria massa/massa ou MS<sup>2</sup>) (Schirle, Bantscheff, & Kuster, 2012): Nesta metodologia, são efetuadas diversas espectrometrias em cadeia onde, a cada

passo, vai ocorrendo uma fragmentação da amostra, no sentido de refinar as moléculas obtidas ao longo do processo.

### Proteômica *shotgun*

Esta metodologia surge no sentido de dar resposta a proteínas que até à altura não eram passíveis de ser resolvidas, tais como proteínas em baixas concentrações, aberrantes e proteínas membranares com múltiplos domínios (Gilmore & Washburn, 2010). Esta técnica baseia-se na extração de proteínas e na sua imediata digestão com proteases específicas. Os péptidos assim gerados são separados por HPLC, segregando-se a amostra de acordo com o seu  $m/z$  e prosseguindo para um MS *tandem*. Esta técnica aumenta a eficiência e sensibilidade e tem sido utilizada para *fingerprint* de péptidos e proteínas.

A figura 22 (A - D) ilustra a técnica e suas variantes atuais. O esquema de trabalho 22 A é o método utilizado mais frequentemente e inclui os seguintes passos (Meissner & Mann, 2014):

- 1 – Extração de proteínas de tecidos, fluidos corporais, células ou compartimentos subcelulares;
- 2 – Digestão proteolítica;
- 3 – Os péptidos são separados por ultra-HPLC;
- 4 – Os péptidos são ionizados por ESI, fazendo com que as suas massas e fragmentos de massa atinjam o espectrómetro de massa;

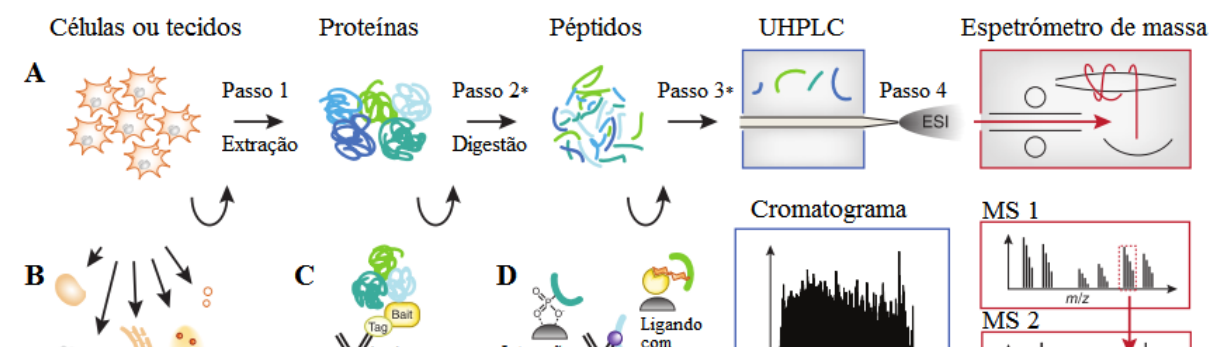


Figura 22 – Esquema de trabalho em proteômica *shotgun* (traduzido de Meissner & Mann, 2014). O esquema 22 A é o utilizado atualmente, com uma linha proteômica baseada em LC-MS. As seguintes variantes incluem passos de enriquecimento para amostras cujo alvo contenha:

- 22 B: proteínas em compartimentos subcelulares;
- 22 C: interação proteica;
- 22 D: péptidos com MPT.

Quanto às aplicações específicas da MS na área farmacêutica, Schirle apresenta em 2012 um esquema que ilustra as principais aplicações desta tecnologia, aqui presente na figura 24.

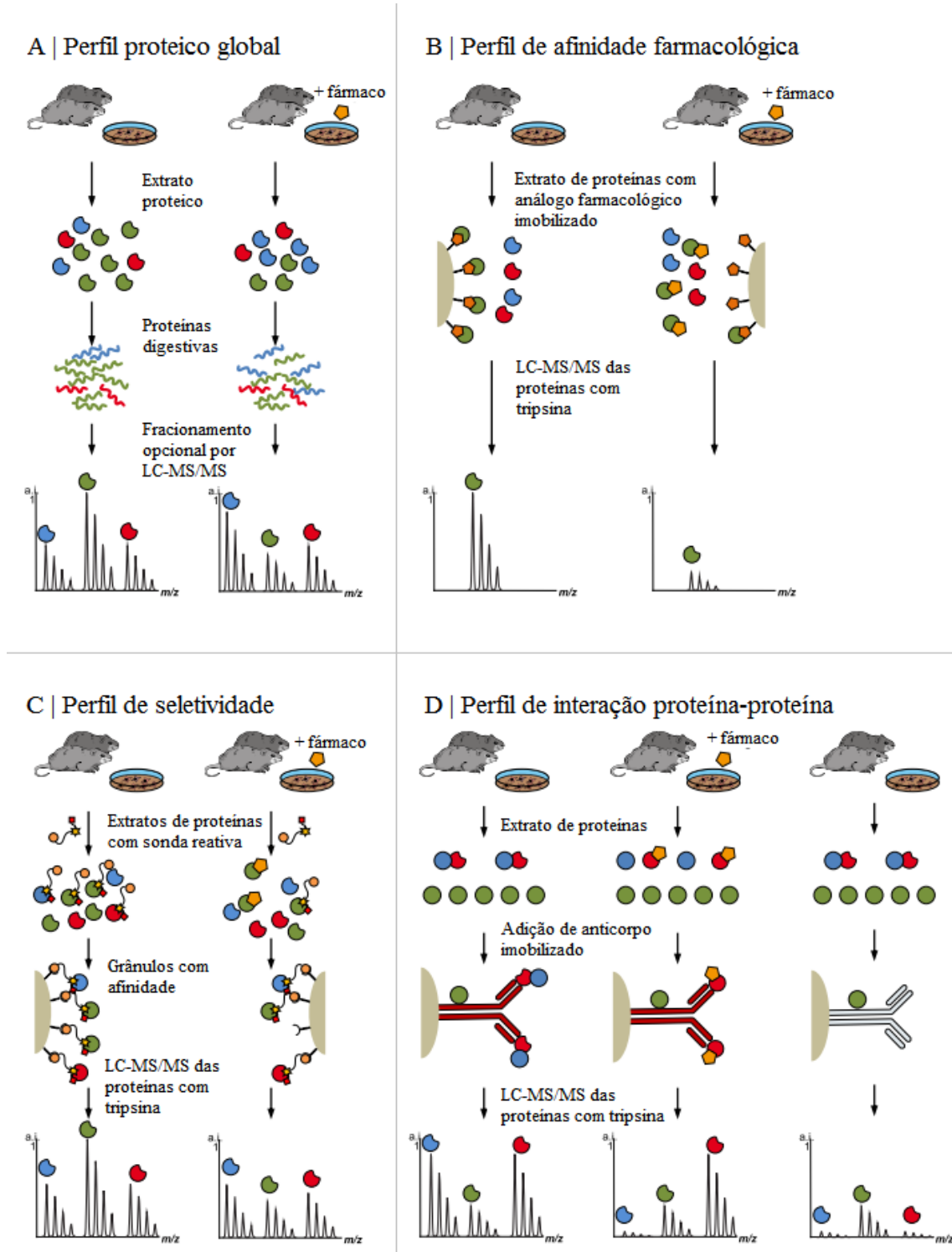


Figura 23 – “Representação esquemática de exemplos de fluxos de trabalho proteômico relacionados com a descoberta de fármacos” (traduzido de Schirle et al., 2012).

Nos quatro casos presentes na figura 24, a quantificação proteica é obtida, em todos eles, por SM quantitativa, sendo passível de realizar marcação com isótopos.

No método A são traçados os perfis da proteína global e da proteína com MPT após exposição ao fármaco. Os resultados são comparados com um tecido ou animal controle, sem administração de fármaco. No final da exposição ao fármaco, as proteínas são extraídas, digeridas em péptidos e analisadas por CL associada a MS em *tandem*.

No método B, é traçado um perfil de afinidade farmacológica, utilizando proteômica química dirigida ao centro do fármaco, baseado numa biomolécula ativa. A especificidade da ligação proteica à matriz farmacológica é testada face à competição com fármaco livre.

No método C, é traçado um perfil de seletividade. As sondas são desenhadas de forma a permitir a ligação e subsequente purificação em relação a toda uma classe de proteínas extraídas, como as quinases. Num segundo passo, as sondas e os alvos ligados são purificados através de uma cromatografia de afinidade antes da digestão com tripsina e análise por CL e MS *tandem*.

Por fim, no método D é traçado um perfil de interação proteína-proteína, neste caso conseguido através de uma estratégia baseada em anticorpos. Os extratos celulares são incubados com um anticorpo imobilizado diretamente na proteína alvo (vermelha). Apenas a proteína alvo e as moléculas endógenas que com ela interagem funcionalmente (azul) são seletivamente enriquecidos com os anticorpos.

## CONCLUSÃO

Após a elaboração desta monografia existem algumas conclusões que surgem facilmente. A primeira é que a proteómica é uma disciplina molecular bastante atual e em presente desenvolvimento, como o comprova o crescente número de publicações ao longo da última década. Também notório é o seu grau de complexidade, pelos conhecimentos na área da química farmacêutica, biologia molecular, métodos instrumentais de análise e bioinformática que estão envolvidos.

Após as considerações gerais, passo a conclusão mais objetivas. O proteoma, apesar de ter o seu nome inspirado no genoma, traz consigo algumas características que acrescenta alguma dificuldade no seu estudo. Fatores como a inconstância da sua expressão ao longo do tempo, as modificações pós-traducionais ou o seu perfil de atividade por interação com outras proteínas, trazem alguma dificuldade em conseguir identificar e analisar todo o proteoma, tal como foi executado com o genoma.

Ao nível das metodologias empregues, compreende-se que se trata de uma área extremamente abrangente pelas inúmeras técnicas utilizadas atualmente. Algumas provêm já da altura em que foi criada a proteómica, há 20 anos atrás. Assim, técnicas de separação como a eletroforese mantêm-se em uso ainda hoje. Este facto também foi possível, claro está, graças a uma melhoria contínua nos equipamentos, no sentido de aumentar a sua resolução, poder de separação e maior cobertura em relação ao tipo de moléculas. Como também foi referido, a espetrometria de massa contínua, com todas as suas variantes e equipamentos, a ser o método fundamental no estudo do proteoma. Atualmente atingiu-se a poderosa capacidade de deteção, já na ordem do femtomol, abrindo portas à deteção de, por exemplo, proteínas sanguíneas de concentração muito baixa.

Este facto remete para parte do âmbito deste trabalho, a descoberta de fármacos. Havendo a possibilidade de deteção de moléculas em ínfimas concentrações, torna-se também possível a descoberta de proteínas que atuem como marcadores fisiopatológicos ou que sejam, elas próprias, intervenientes nessa via. Conseguindo identificar e estudar estruturalmente as proteínas assinaladas, estas tornam-se potenciais alvos de ação farmacológica e terapêutica. Nesta fase, é necessária a participação da química farmacêutica, no campo do *design* de fármacos. Sendo revelada, ao nível atómico, a estrutura de uma proteína envolvido num processo patológico, recorrem-se a sistemas de

síntese combinatória, no sentido de encontrar uma molécula que consiga estabelecer ligação à proteína. Chegando a esta molécula, prossegue-se com melhorias no seu desempenho farmacodinâmico e farmacocinético. Mantendo o farmacóforo funcional, exploram-se alternativas para as suas cadeias laterais, no sentido de melhorar a sua eficácia e segurança.

Como perspectivas futuras, distingo aqui duas realidades distintas, a da descoberta de fármacos e a da proteómica. A indústria farmacêutica atravessa neste momento uma “crise de *pipeline*”, no sentido que os meios disponíveis nem sempre estão a fornecer à indústria e à população a quantidade de moléculas inovadoras desejável. De uma era onde a descoberta de fármacos foi reduzida à técnica pura, quase totalmente informática, parece importante redescobrir o doente como um todo, onde a ligação entre um princípio ativos e um recetor pode não ser o suficiente para solucionar a patologia. Surge assim a segunda realidade apontada, a proteómica. A análise de mecanismos regulatórios e de expressão dá alguns passos no sentido de entender o mecanismo fisiopatológico como uma realidade dinâmica. Esta disciplina consegue então fornecer uma visão mais holística e abre novas possibilidades à descoberta de fármacos realmente inovadores.

## BIBLIOGRAFIA

- Banach, T., Adaszek, Ł., Wylupek, D., Winiarczyk, M., & Winiarczyk, S. (2013). Applicability of 2D gel electrophoresis and liquid chromatography in proteomic analysis of urine using mass spectrometry MALDI-TOF. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(3), 587–592. doi:10.2478/pjvs-2013-0083
- Beadle, G. W., & Tatum, E. L. (1941). Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27(11), 499–506. Consultado em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1078370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bio Rad, L. (2014). 2D Electrophoresis. Consultado em October 28, 2014, from <http://www.bio-rad.com/en-pt/applications-technologies/first-dimension-separation-isolectric-focusing#1>
- Bjarnadóttir, S. G., & Flengsrud, R. (2014). Affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis, adapted immunodepletion and mass spectrometry used for detection of porcine and piscine heparin-binding human plasma proteins. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 944, 107–13. doi:10.1016/j.jchromb.2013.11.004
- Bunai, K., & Yamane, K. (2005). Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 815(1-2), 227–36. doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.030
- Burkard, T. R., Planyavsky, M., Kaupe, I., Breitwieser, F. P., Bürckstümmer, T., Bennett, K. L., ... Colinge, J. (2011). Initial characterization of the human central proteome. *BMC Systems Biology*, 5, 17. doi:10.1186/1752-0509-5-17
- Bussard, A. E. (2005). A scientific revolution? The prion anomaly may challenge the central dogma of molecular biology. *EMBO Reports*, 6(8), 691–4. doi:10.1038/sj.embor.7400497
- Butterfield, D. A., Gu, L., Di Domenico, F., & Robinson, R. A. S. (2014). Mass spectrometry and redox proteomics: applications in disease. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(4), 277–301. doi:10.1002/mas.21374
- Chandramouli, K., & Qian, P.-Y. (2009). Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Human Genomics and Proteomics : HGP, 2009*. doi:10.4061/2009/239204
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258), 561–563. doi:10.1038/227561a0
- Davey, J., & Lord, J. (2003). *Essential Cell Biology: A Practical Approach Volume 1: Cell Structure* (First Edit.). Oxford University Press. Consultado em

<http://www.amazon.com/Essential-Cell-Biology-Practical-Structure/dp/0199638314>

- Demain, A. L., & Elander, R. P. (1999). The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75(1-2), 5–19. Consultado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10422578>
- Desrosiers, R. R., Beaulieu, E., Buchanan, M., & Béliveau, R. (2007). Proteomic analysis of human plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis and by antibody arrays following depletion of high-abundance proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 49(3), 182–95. doi:10.1007/s12013-007-0048-z
- Eder, J., Sedrani, R., & Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(8), 577–87. doi:10.1038/nrd4336
- Garfin, D., & Ahuja, S. (2005). *Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics - Volume 7*. Elsevier Academic Press. Consultado em <http://www.amazon.com/Handbook-Isoelectric-Proteomics-Separation-Technology/dp/0120887525>
- Gilmore, J. M., & Washburn, M. P. (2010). Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. *Journal of Proteomics*, 73(11), 2078–91. doi:10.1016/j.jprot.2010.08.005
- Graves, P. R., & Haystead, T. A. J. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(1), 39–63; table of contents. Consultado em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=120780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gu, Q., & Yu, L.-R. (2014). Proteomics quality and standard: from a regulatory perspective. *Journal of Proteomics*, 96, 353–9. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.024
- Guo, C.-G., Li, S., Wang, H.-Y., Zhang, D., Li, G.-Q., Zhang, J., ... Cao, C.-X. (2013). Study on stability mechanism of immobilized pH gradient in isoelectric focusing via the Svensson-Tiselius differential equation and moving reaction boundary. *Talanta*, 111, 20–7. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.026
- Hager, J. W. (2004). Recent trends in mass spectrometer development. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(4), 845–50. doi:10.1007/s00216-003-2287-1
- Hamilton-Miller, J. M. T. (2008). Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(3), 189–92. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.11.010
- Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483–90. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.024

- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 40(4), 430–43. doi:10.1002/jms.856
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–49. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
- Imming, P., Sinning, C., & Meyer, A. (2006). Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5, 821–834. doi:10.1038/nrd2132
- INHGR. (2014). Splicing alternativo. *National Human Genome Research Institute*. Consultado em [http://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j\\_large.gif](http://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j_large.gif)
- Iori, E., Rattazzi, M., & Millioni, R. (2014). No peptide left behind: the “out of range” recovery in IPG-IEF fractionation. *Amino Acids*, 46(5), 1415–7. doi:10.1007/s00726-014-1720-4
- Jin, G., & Wong, S. T. C. (2013). Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discovery Today*. doi:10.1016/j.drudis.2013.11.005
- Kademani, B. S., Kalyane, V. L., & Jange, S. (1999). Scientometric portrait of nobel laureate Dorothy Crowfoot Hodgkin. *Scientometrics*, 45(2), 233–250. doi:10.1007/BF02458435
- Kandpal, R. P., Saviola, B., & Felton, J. (2009). The era of “omics” unlimited. *BioTechniques*. doi:10.2144/000113137
- Kim, M.-S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., ... Pandey, A. (2014). A draft map of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 575–81. doi:10.1038/nature13302
- Kneller, R. (2010). The importance of new companies for drug discovery: origins of a decade of new drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(11), 867–82. doi:10.1038/nrd3251
- Koonin, E. V. (2012). Does the central dogma still stand? *Biology Direct*, 7, 27. doi:10.1186/1745-6150-7-27
- Lazo, J. S. (2008). Rear-view mirrors and crystal balls: a brief reflection on drug discovery. *Molecular Interventions*, 8(2), 60–3. doi:10.1124/mi.8.2.1
- Li, J. J. (2013). *Drug Discovery*. (J. J. Li & E. J. Corey, Eds.) *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives* (pp. 1–42). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118354483

- Li, J. J., & Corey, E. J. (2013). *Drug Discovery*. (J. J. Li & E. J. Corey, Eds.) *Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives* (pp. 1–42). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118354483
- Li, J. W.-H., & Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 161–5. doi:10.1126/science.1168243
- Liras, P., & Martín, J. F. (2006). Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 9(1), 9–19. Consultado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16636985>
- Mackereth, C. D., Madl, T., Bonnal, S., Simon, B., Zanier, K., Gasch, A., ... Sattler, M. (2011). Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. *Nature*, 475(7356), 408–11. doi:10.1038/nature10171
- Magdeldin, S. (2012). *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. (S. Magdeldin, Ed.). InTech. doi:10.5772/2205
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., ... Yamamoto, T. (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics*, 11(1), 16. doi:10.1186/1559-0275-11-16
- Mahdi, J. G., Mahdi, A. J., & Bowen, I. D. (2006). The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Proliferation*, 39(2), 147–55. doi:10.1111/j.1365-2184.2006.00377.x
- Malik, N. N. (2008). Drug discovery: past, present and future. *Drug Discovery Today*, 13(21-22), 909–12. doi:10.1016/j.drudis.2008.09.007
- Meissner, F., & Mann, M. (2014). Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nature Immunology*, 15(2), 112–7. doi:10.1038/ni.2781
- Minden, J. S., Dowd, S. R., Meyer, H. E., & Stühler, K. (2009). Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 30 Suppl 1, S156–61. doi:10.1002/elps.200900098
- Neha, S., & Harikumar, S. L. (2013). Use of genomics and proteomics in pharmaceutical drug discovery and development, a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 24–28. Consultado em <http://www.ijppsjournal.com/Vol5Issue3/6887.pdf>
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007–21. Consultado em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Pasquali, M., Serchi, T., Renaut, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2013). 2D difference gel electrophoresis reference map of a *Fusarium graminearum* nivalenol producing strain. *Electrophoresis*, *34*(4), 505–9. doi:10.1002/elps.201200256
- Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, *2*(1), 3–10. Consultado em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788986>
- Rabilloud, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *Journal of Proteomics*, *74*(10), 1829–41. doi:10.1016/j.jprot.2011.05.040
- Righetti, P. G. (2004). Determination of the isoelectric point of proteins by capillary isoelectric focusing. *Journal of Chromatography A*, *1037*(1-2), 491–499. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.025
- Rodi, P. M., Bocco Gianello, M. D., Corregido, M. C., & Gennaro, A. M. (2014). Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1838*(3), 859–66. doi:10.1016/j.bbamem.2013.11.006
- Rogers, S., Girolami, M., Kolch, W., Waters, K. M., Liu, T., Thrall, B., & Wiley, H. S. (2008). Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *24*(24), 2894–900. doi:10.1093/bioinformatics/btn553
- Šamaj, J., & Thelen, J. J. (2007). *Plant Proteomics* (p. 400). Springer Science & Business Media. Consultado em <http://books.google.com/books?id=ikENwt6eq9QC&pgis=1>
- Schirle, M., Bantscheff, M., & Kuster, B. (2012). Mass spectrometry-based proteomics in preclinical drug discovery. *Chemistry & Biology*, *19*(1), 72–84. doi:10.1016/j.chembiol.2012.01.002
- Sheehan, J. C., & Logan, K. R. H. (1959). A general synthesis of the penicillins. *Journal of the American Chemical Society*, *81*(21), 5838–5839. doi:10.1021/ja01530a079
- Shi, T., Zhou, J.-Y., Gritsenko, M. A., Hossain, M., Camp, D. G., Smith, R. D., & Qian, W.-J. (2012). IgY14 and SuperMix immunoaffinity separations coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for human plasma proteomics biomarker discovery. *Methods (San Diego, Calif.)*, *56*(2), 246–53. doi:10.1016/j.ymeth.2011.09.001
- Sneader, W. (2000). The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *321*(7276), 1591–4. Consultado em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1119266&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Sneader, W. (2006). *Drug Discovery: A History*. *Drug Discovery: A History* (pp. 1–468). doi:10.1002/0470015535
- Swinney, D. C. (2013). Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 93(4), 299–301. doi:10.1038/clpt.2012.236
- Takenaka, T. (2008). Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU International*, 88, 7–10. doi:10.1111/j.1464-410X.2001.00112.x
- Villanueva, J., Carrascal, M., & Abian, J. (2014). Isotope dilution mass spectrometry for absolute quantification in proteomics: concepts and strategies. *Journal of Proteomics*, 96, 184–99. doi:10.1016/j.jprot.2013.11.004
- Warner, T. D., & Mitchell, J. A. (2002). Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13371–3. doi:10.1073/pnas.222543099
- Warren, J. (2011). Drug discovery: lessons from evolution. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 71(4), 497–503. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03854.x
- WHO. (1946). Constitution of the World Health Organization. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 983–4. Consultado em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2567705&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- WHOQOL Group. (1998). Development of the World Health Organization WHOQOL-BREF quality of life assessment. *Psychological Medicine*, 28, 551–558. doi:10.1017/S0033291798006667
- Wilhelm, M., Schlegl, J., Hahne, H., Moghaddas Gholami, A., Lieberenz, M., Savitski, M. M., ... Kuster, B. (2014). Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*, 509(7502), 582–7. doi:10.1038/nature13319
- Wilkins, M. (2009). Proteomics data mining. *Expert Review of Proteomics*, 6(6), 599–603. doi:10.1586/epr.09.81
- Wilkins, M., & Appel, R. (2007). *Proteome Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-72910-5
- Winqvist, R. J., Mullane, K., & Williams, M. (2013). The fall and rise of pharmacology--(re-)defining the discipline? *Biochemical Pharmacology*, 87(1), 4–24. doi:10.1016/j.bcp.2013.09.011
- Wittig, I., Braun, H.-P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 418–28. doi:10.1038/nprot.2006.62
- Xu, Y., Wang, X., Wang, Y., Tian, Y., Shao, X., Wu, L.-Y., & Deng, N. (2014). Prediction of posttranslational modification sites from amino acid sequences with

kernel methods. *Journal of Theoretical Biology*, 344, 78–87.  
doi:10.1016/j.jtbi.2013.11.012

