

32. Saúde Humana

Análise proteômica do secretoma obtido a partir do meio da cultura de células de pacientes com esquizofrenia e controle

Danielle Gouvêa-Junqueira; dani.junq@hotmail.com; Daniel Martins-de-Souza; danms90@gmail.com; Giuliana S. Zuccoli; giuliana.zuccoli@hotmail.com; Juliana M. Nascimento; juminardi@gmail.com.

Laboratório de Neuroproteômica; Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual; IB Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

Resumo

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica complexa, sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais. Sendo que os sintomas podem ser organizados 3 classes principais de sintomas: positivos, negativos e cognitivos. O principal meio de tratamento da esquizofrenia são as drogas antipsicóticas, utilizadas geralmente na fase aguda da doença para aliviar principalmente os sintomas positivos. O proteoma corresponde ao conjunto de proteínas expressas em um indivíduo em determinadas condições fisiológicas, sendo possível através da análise proteômica identificar proteínas e relacioná-las com a vias metabólicas em que elas atuam. Este estudo analisou o proteoma do secretoma obtido a partir do meio de cultura de células progenitoras neurais de pacientes com esquizofrenia, comparando com o controle. A fim de identificar possíveis proteínas diferentemente expressas, bem como vias metabólicas, que possam estar relacionadas com a fisiopatologia da esquizofrenia.

1. Introdução

1.1 Esquizofrenia

A esquizofrenia é uma doença psiquiátrica multifatorial e complexa, sendo influenciada por fatores genéticos e fatores ambientais (Sullivan, Kendler, & Neale, 2003). Os sintomas se manifestam geralmente no final da adolescência e no início da fase adulta, podendo ser divididos em 3 classes principais: positivos, negativos e cognitivos (van Os & Kapur, 2009). Os sintomas positivos envolvem a perda de conexão com a realidade em algum nível, como alucinações, delírios. Já os negativos caracterizam-se pela dificuldade de comunicação e retraimento social. E os sintomas cognitivos se relacionam principalmente com memória deficiente e dificuldade de concentração.

Ademais, a doença se relaciona com mudanças patológicas em células neurais e na comunicação entre células, que se iniciam desde o neurodesenvolvimento intrauterino (Kahn et al., 2015). Tais alterações no desenvolvimento neural foram evidenciadas em estudos postmortem, abrangendo aspectos moleculares relacionados com as consequências avançadas na doença (Brennand et al., 2014; Gulsuner et al., 2013; Wong et al., 2003).

Em virtude disso, modelos in vitro, como o emprego de células humanas pluripotentes induzidas (hiPSCs), podem auxiliar e fornecer mais informações sobre os mecanismos da doença no início e ao longo do desenvolvimento neural (Brennand et al. 2014). Com esse modelos, a carga genética do paciente é mantida nas células reprogramadas, permitindo investigar as alterações neurais nos processos de proliferação celular e diferenciação para as linhagens neurais (Hyman et al 2014; Nascimento & Martins-de-Souza 2015).

1.2 Células iPSCs

Recentemente, foi desenvolvida uma técnica em que se obtém células humanas pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de reprogramação genética de células somáticas (Brennand et al. 2014). As hiPSCs podem ser diferenciadas em diferentes linhagens celulares, como as células neurais. Diante disso, esse modelo é muito interessante para a investigação de doenças psiquiátricas e cerebrais, por permitir a análise do neurodesenvolvimento e desse modo, ultrapassando as limitações de estudos com tecidos postmortem (Brennand et al. 2014).

Em relação à esquizofrenia, estudos utilizando o modelo das iPSCs obtiveram células neurais a partir da reprogramação de células somáticas dos pacientes com esquizofrenia. Foram evidenciadas alterações previamente vinculadas com a fisiopatologia da doença, como vias relacionadas com processos de adesão celular e estresse oxidativo (Brennand et al. 2011; Brennand et al. 2014).

Novos estudos com o emprego dessa nova técnica são essenciais para uma melhor e mais ampla compreensão dos mecanismos da doença, principalmente por esse modelo permitir a investigação de alterações no processo de diferenciação neural (Brennand et al. 2014). A investigação dessas alterações celulares associadas às análises moleculares de larga escala, como a técnica da proteômica, podem auxiliar na investigação das principais vias metabólicas relacionadas com as alterações provocadas pela doença ao longo do neurodesenvolvimento.

1.3 Proteoma

O proteoma corresponde ao conjunto de proteínas expressas em um indivíduo, um tecido ou uma célula, em um dado momento e/ou condição fisiológica (Wilkins et al 1996). A partir de análises proteômicas em larga escala, foi possível buscar e identificar as proteínas presentes em uma determinada condição fisiológica. Inicialmente pelo emprego de técnicas de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE), juntamente com a espectrometria de massas (MS), foram por muitos anos a base da proteômica e propiciou melhorias nos processos de separação e identificação de proteínas (Oliveira, Coorsen, & Martins-de-Souza, 2014). Recentemente, um dos métodos mais utilizados consiste na combinação de sistemas de cromatografia líquida (LC) e MS, denominado *shotgun proteomics*.

Tal técnica de análise em larga escala possibilita a identificação de proteínas diferencialmente expressas nas amostras estudadas, além de permitir a investigação de vias metabólicas que se relacionem com essas proteínas, sejam elas por identificação, mas também quantificação (Martins-de-Souza, 2011; Martins-de-Souza et al., 2015; Nascimento et al., 2016).

Em relação à esquizofrenia, a análise proteômica permitiu a investigação de tecidos post mortem, além de outros tecidos como o sangue (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015). De modo a encontrar alterações em processos como transmissão neural, plasticidade sináptica, metabolismo energético e estresse oxidativo, auxiliando na compreensão dos mecanismos da doença (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015).

Ademais, técnicas proteômicas permitem a busca por possíveis candidatos a biomarcadores a fim de auxiliar no diagnóstico das doenças, bem como biomarcadores relacionados com os medicamentos empregados no tratamento das doenças (Oliveira & Martins-de-Souza, 2013; Nascimento & Martins-de-Souza, 2015).

2. Objetivos

O objetivo deste projeto foi analisar o secretoma obtido a partir de células progenitoras neurais derivadas de pacientes com esquizofrenia, a fim de investigar a comunicação celular e buscar por vias metabólicas que possam estar relacionadas com o desenvolvimento deste distúrbio psiquiátrico.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção e culturas das células pluripotentes

Realizamos o cultivo de células progenitoras neurais (NPCs) diferenciadas de células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) de pacientes com esquizofrenia e controle, otimizando protocolos de cultivo assim como de coleta para análise do meio de cultivo. Trabalhamos com linhagens iPSCs fornecidas pelo laboratório do Prof. Stevens Rehen (Rehen Lab, UFRJ-IDOR), sendo que duas das linhagens de células controle (CF1 clone10 e CF2 clone2) foram reprogramadas pela equipe do laboratório, e outras quatro, GM23760B, GM23761B e GM23762B - derivadas de pacientes com esquizofrenia, e GM23679A - controle, são provenientes do repositório do Coriell Institute.

As NPCs foram plaqueadas em placas tratadas com Poli L-ornitina e Laminina, sendo cultivadas com meio DMEM/F12 suplementado com 1% de N2, 1% de B27, 25 mg/mL de FGF e 20 mg/mL de Fator de Crescimento Epidermal (EGF) a 37°C em 5% CO₂. O meio foi trocado a cada dois dias, sendo concentrado para as posteriores etapas de análise e concentração.

3.2 Separação do meio de cultura e concentração

Ao longo do cultivo das células, a cada troca de meio cultura, o meio era recolhido e armazenado a 4°C para posterior concentração. Após coleta de aproximadamente 80 mL de meio, realizamos a concentração 10x, utilizando tubos Vivaspin de 15mL a 7500rpm em etapas de 20 minutos.

3.3 Extração de proteínas

Para realizar a extração das proteínas empregamos um tampão de lise, que foi mantido nas amostras durante 30 minutos. Em seguida, realizamos a homogeneização com pistilo no gelo e posteriormente a centrifugação a 9.000g durante 30 minutos, retirando o sobrenadante.

3.4 Preparação para a espectrometria de massas

As proteínas obtidas no processo de extração foram quantificadas por fluorescência no Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), sendo utilizados 50 µg de proteína nos processos de redução, alquilação e digestão. Para tanto, serão adicionados 0,2% de Rapigest (Waters Corporation, Milford, MA) nas amostras, incubando-as durante 15 minutos a 80°C. Posteriormente, será realizada a redução das amostras com 100mM de DTT durante 30min, a 60° C e a alquilação com 200mM iodoacetamida, durante 30 min à temperatura ambiente. Em seguida processa-se a digestão em uma razão de 1:100 tripsina:proteína durante 16 horas a 37°C e o ajuste do pH com NH₄OH para 10. Mantendo as amostras congeladas até a realização da análise de espectrometria de massas.

3.5 Análise proteômica por espectrometria de massas

Foi realizada a dissolução dos peptídeos liofilizados em solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%, sendo injetados 1µL de solução em um sistema nano- LC, que está acoplado ao espectrômetro de massas com fonte ionizadora nano-electrospray (ESI) instalada em um Synapt G2-Si (Waters). Na cromatografia líquida, foi utilizado como solvente A a solução 0,1% de ácido fórmico e a solução de ACN/0,1% ácido fórmico (95/5, v/v) como solvente B. Havendo a eluição dos peptídeos, que foram analisados on-line em ESI-MS e ESI-MS/MS em modo positivo. Os espectros de fragmentação (modo MS/MS) foram obtidos através do modo data independent e a identificação das proteínas foi realizada por meio do MASCOT (Matrix Sciences) e PLGS (Waters).

3.6 Análise dos dados

Para analisar os dados obtidos foram analisados no Progenesis para identificar as proteínas presentes e ferramentas como Ingenuity Pathways, DAVID - Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis - e String para correlacionar as proteínas encontradas com as vias metabólicas a que elas pertencem. Ademais, a identificação das proteínas secretadas foi realizada pelo SecretomeP 2.0 Server.

4.Resultados e Discussão

Conforme mencionado no Relatório Parcial, houve dificuldades para realizar as análises dos exossomos, uma vez que não foram detectadas proteínas nas amostras avaliadas por espectrometria de massas. Para obter uma quantificação significativa que permitisse a análise proteômica dos exossomos, seria necessário maior material em cultura. Em função da necessidade de um elevado volume de meio de cultura que possibilitasse a concentração e o isolamento das vesículas. De modo a inviabilizar a execução desta tarefa no tempo restante do projeto.

Diante dessas limitações e da possibilidade de quantificação e análise dos secretomas das NPCs, que requerem menor volume de material de cultura, focamos nas análises destes.

Primeiramente, realizamos a análise do secretoma de NPCs derivadas de pacientes com esquizofrenia (GM23760B e GM23762B) e de controles (CF1 clone10 e GM23679A). A análise qualitativa e quantitativa foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, sendo utilizado o método de *high definition data-independent mass spectrometry* (HDMS^E). Para realizar a análise dos dados obtidos, foram processados com a utilização do programa Progenesis for Proteomics 2.0 e em seguida analisados utilizando a ferramenta DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, a fim de investigar as proteínas quantificadas.

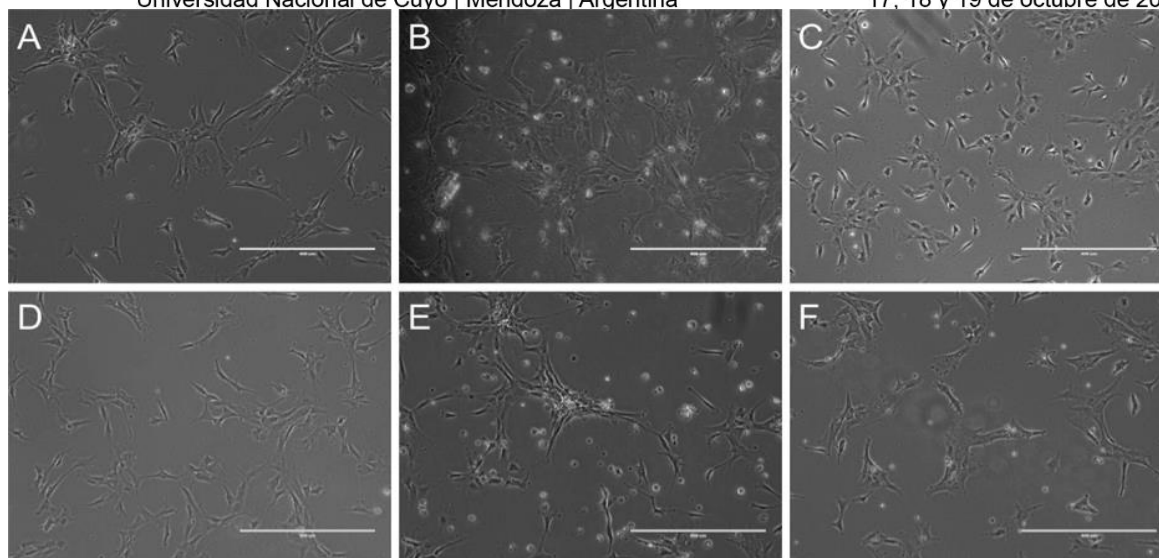


Figura 1. Células progenitoras neurais (NPCs) humanas (A) CF1CL10, (B) CF2CL2, (C) GM23679A, controles; e de pacientes (D) GM23760B, (E) GM23761B, (F) GM23762B.

Nas análises iniciais, foram quantificadas aproximadamente 1154 proteínas (com ao menos 1 peptídeo único), das quais 362 proteínas estavam diferencialmente expressas (teste t de Student $p < 0.05$) entre controle e pacientes com esquizofrenia. Em relação aos processos biológicos associados com essas proteínas, podemos citar a comunicação e sinalização celular, que envolvem liberação e secreção de moléculas no meio extracelular. Além de transporte mediado por vesículas, desenvolvimento cerebral, transdução de sinal, organização da matriz extracelular e direcionamento de proteínas para a membrana plasmática.

Já em relação aos compartimentos celulares, tais proteínas se originam de organelas e compartimentos celulares relacionados com a liberação e secreção de substâncias pelas células, destacando citoplasma, nucleoplasma e complexo de Golgi. Bem como, membrana pré sináptica e densidade pós sináptica, que consistem em regiões envolvidas com a transmissão de informações por sinapses em células progenitoras neurais.

Dando sequência aos experimentos e às análises, foram identificadas e quantificadas 804 proteínas (com ao menos 1 peptídeo único), sendo 409 diferencialmente expressas (teste t de Student $p < 0.05$) entre pacientes com esquizofrenia e controle.

A partir do SecretomeP 2.0 Server, analisamos quais das proteínas diferencialmente expressas se relacionavam com vias de secreção, como mostra a Figura 2. Obtivemos 34 proteínas com score maior do que 0.6, indicando que são proteínas secretórias. Ademais, foram identificadas mais 52 proteínas, que apesar de não apresentarem score > 0.6, possuíam um peptídeo sinal relacionado com secreção.

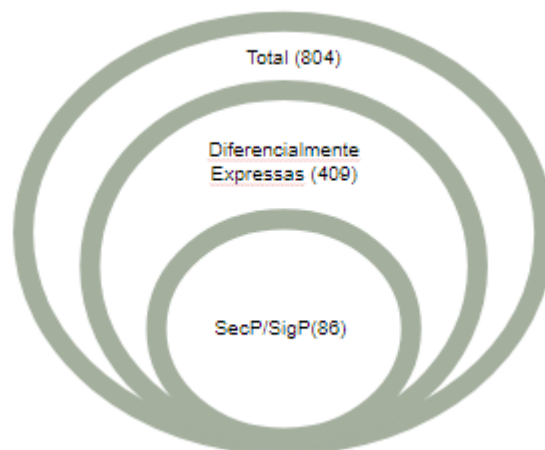


Figura 2. Diagrama de Venn das proteínas identificadas no secretoma. As proteínas secretadas foram identificadas pela presença de peptídeo sinal em sua sequência pelo SecretomeP (SecP) ou SignalP (SigP).

Desse modo, dentre as proteínas diferencialmente expressas, 86 proteínas se relacionam propriamente com vias de secreção. Para investigar as relações entre as proteínas e as vias às quais essas proteínas pertencem, utilizamos ferramentas como o String e o DAVID. Identificando os principais processos biológicos e os compartimentos e componentes celulares associados com as proteínas, como mostram as Figuras 3 e Figura 4, respectivamente.

Em relação ao processos biológicos, as proteínas diferencialmente expressas identificadas se relacionam com processos como desenvolvimento do córtex cerebral, transporte de proteínas do retículo endoplasmático para a membrana, organização do citoesqueleto, transdução de sinal e desenvolvimento cerebral.

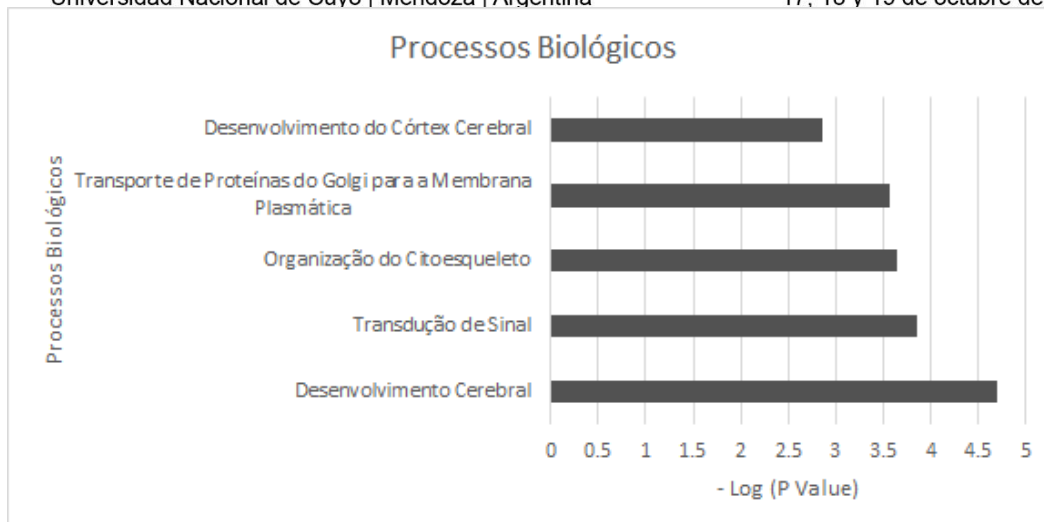


Figura 3. Principais processos biológicos associados com as proteínas secretadas obtidos pelo software String.

Já em relação aos componentes celulares, as proteínas encontradas são oriundas da região extracelular, do sistema de endomembranas, do retículo plasmático e da periferia celular. Além disso, também identificamos proteínas originadas por diferentes tipos de vesículas, como vesículas citoplasmáticas, endocíticas, bem como, nanovesículas como os exossomos.

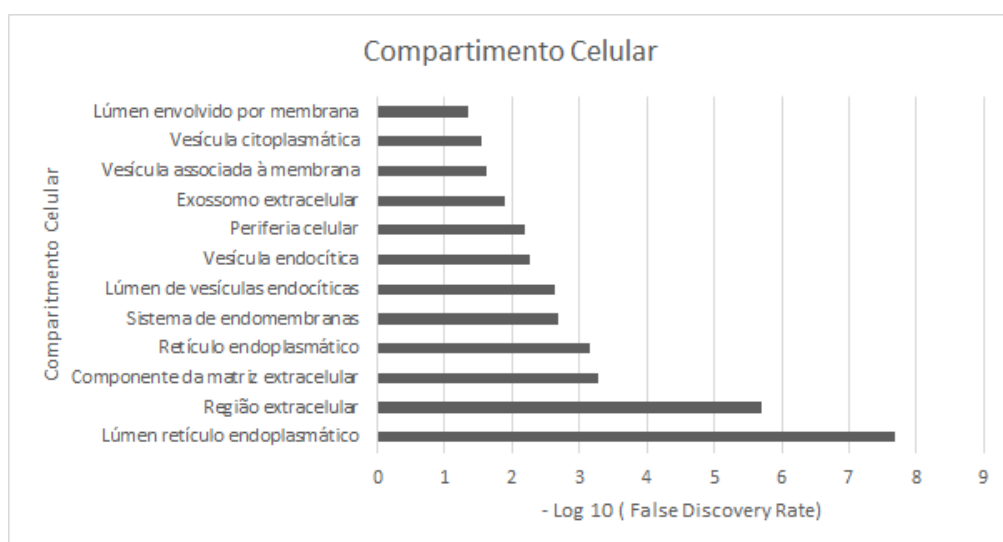


Figura 4. Principais compartimentos celulares associados com as proteínas secretadas (SecP/SigP) obtidos pelo software String.

Ademais, com a utilização da ferramenta *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, identificamos alterações na via metabólica relacionada com a orientação axonal. Tal via já foi previamente relacionada com a esquizofrenia, sendo que está associada com alterações nos constituintes do citoesqueleto, também identificadas nos processos biológicos em nossas análises.

5. Conclusões

De acordo com os dados obtidos, observamos em ambas as análises alterações em processos biológicos associados com a comunicação, sinalização celular e transporte de moléculas. Dentre os processos identificados, destaca-se transporte mediado por vesículas, desenvolvimento cerebral, transdução de sinal, organização da matriz extracelular e direcionamento de proteínas para a membrana plasmática.

Ademais, identificamos alterações em proteínas associadas aos componentes do citoesqueleto, que resultam em modificações na estrutura celular, prejudicando processos como o funcionamento axonal e a formação dos prolongamentos neurais (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015). Ademais, também afetam funções e processos como migração celular e crescimento neuronal.

Quanto ao funcionamento axonal, alterações na organização do citoesqueleto já foram previamente relacionadas com esse processo (English et al., 2009; Nascimento & Martins-de-Souza, 2015; Zhao Z et al., 2014). Tais alterações prejudicam a organização axonal, que é um processo essencial para a formação e o estabelecimento dos circuitos neuronais.

Já em relação aos componentes celulares, nas análises identificamos organelas e compartimentos celulares relacionados com a liberação e secreção de moléculas, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, sistema de endomembranas. Além disso, dentre as proteínas identificadas no secretoma, há proteínas que pertencem a diferentes vesículas, incluindo nanovesículas como os exossomos.

Tais nanovesículas que exercem um papel fundamental na comunicação e sinalização celular. Sendo que no sistema nervoso também atuam na comunicação entre neurônios e células da glia e eliminação de componentes desnecessários (Frühbeis & Fröhlich, 2012).

Outrossim, os exossomos secretados a partir tipos celulares distintos possuem algumas proteínas em comum. Dentre estas situam-se proteínas relacionadas com o citoesqueleto, como tubulina e actina; enzimas relacionadas com processos de sinalização intracelular, como quinases; e outras proteínas, como Flottilin-1, que atua no processo de formação de vesículas caveolares; proteínas Rab, envolvidas na fusão e migração celular (Frühbeis & Fröhlich, 2012).

Além dessas proteínas em comum, os exossomos apresentam uma composição dinâmica, apresentando componentes característicos, que se relacionam com a condição fisiológica e com as células que os originaram (Frühbeis & Fröhlich, 2012). Desse modo, o conteúdo dessas vesículas pode apresentar moléculas relacionadas com o desenvolvimento de patologias, sendo possível identificar e buscar por possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos nessas nanovesículas (Tsilioni et al., 2014).

Dessa forma, com as análises do secretoma oriundo das células progenitoras, foi possível identificar alterações nas proteínas transportadas e secretadas pelas células, evidenciando que processos de comunicação e sinalização celular encontram-se alterados na doença. De modo a auxiliar na investigação e na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados com o desenvolvimento da doença.

Ademais, a utilização desse modelo *in vitro*, empregando as hiPSCs, possibilita a investigação de alterações relacionadas com a doença no início do desenvolvimento neural e ao longo de processos de diferenciação das linhagens neurais (Nascimento & Martins-de-Souza, 2015; Vargas, 2014). Sendo uma importante ferramenta na busca por biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico da doença, bem como na busca por alvos de medicamentos mais eficazes para o tratamento dos pacientes.

6. Bibliografía

- Brennand, K.J. et al., (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473(7346), pp.221–225.
- Brennand, K., Savas, J. N., Kim, Y., Tran, N., Simone, A., Hashimoto-Torii, K., ... Gage, F. H. (2014). Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(3), 361–368.
- English, J. A., Dicker, P., Föcking, M., Dunn, M. J., & Cotter, D. R. (2009). 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *PROTEOMICS*, 9(12), 3368–3382.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E.-M. (2012). Emerging Roles of Exosomes in Neuron–Glia Communication. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Gulsuner, S., Walsh, T., Watts, A. C., Lee, M. K., Thornton, A. M., Casadei, S., ... McClellan, J. M. (2013). Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell*, 154(3), 518–529.
- Hyman, S. E. (2014). Perspective: Revealing molecular secrets. *Nature*, 508(7494), S20–S20.
- van Os, J., & Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *The Lancet*, 374(9690), 635–645.
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., ... Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nature Reviews Disease Primers*, 15067.
- Martins-de-Souza, D. (2011). Proteomics as a Tool for Understanding Schizophrenia. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 9(3), 95–101.
- Martins-de-Souza, D. et al (2015). The protein interactome of collapsin response mediator protein-2 (CRMP2/DPYSL2) reveals novel partner proteins in brain tissue. *Proteomics - Clinical Applications*, 9(9-10), 817–831.
- Nascimento, J. M., & Martins-de-Souza, D. (2015). The proteome of schizophrenia. *NPJ Schizophrenia*, 1, 14003.
- Nascimento, J. M. et al., (2016). Proteomics and molecular tools for unveiling missing links in the biochemical understanding of schizophrenia. *Proteomics - Clinical Applications*, 10(12), pp.1148–1158.
- Oliveira, B. M., & Martins-de-Souza, D. (2013). Large-scale analyses of schizophrenia proteome. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 40, 16–19.
- Sullivan, P.F., Kendler, K.S. & Neale, M.C. (2003). Schizophrenia as a Complex Trait

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018
Evidence From a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry*, 60, pp.1187–1192.

- Tsilioni, I., Panagiotidou, S., & Theoharides, T. C. (2014). Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clinical Therapeutics*, 36(6), 882–888.
- Vargas, G. (2014). Biomarkers in schizophrenia. *Biomarkers in Medicine*, 8(1), 1–3.
- Wilkins, M.R. et al., (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1), pp.19–50.
- Wong, A. H. C., & Van Tol, H. H. M. (2003). Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(3), 269–306.
- Zhao, Z., Xu, J., Chen, J., Kim, S., Reimers, M., Bacanu, S.-A., ... Chen, X. (2015). Transcriptome sequencing and genome-wide association analyses reveal lysosomal function and actin cytoskeleton remodeling in schizophrenia and bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(5), 563–572.

7. Financiamento

Este projeto foi desenvolvido com o financiamento dos órgãos de fomento: PIBIC/CNPq e FAPESP.

8. Agradecimentos

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Neuroproteômica (LNP), que me auxiliaram ao longo do desenvolvimento do projeto, enriquecendo meu conhecimento durante a convivência no laboratório. Gostaria de agradecer especialmente ao Prof. Dr. Daniel Martins-de-Souza e à Dr. Juliana Minardi Nascimento, que me orientaram e apoiaram desde meu ingresso no laboratório e ao longo de todo o projeto. Também agradeço às alunas Giuliana S. Zuccoli, aluna de mestrado, e Verônica Saia-Cereda, aluna de doutorado, que me auxiliaram e tiraram muitas dúvidas ao longo da realização dos experimentos e da análise dos dados.

Aprendi e amadureci muito ao longo do desenvolvimento desse projeto, sendo uma experiência fundamental tanto do ponto de vista acadêmico como pessoal. E acredito que a continuação da pesquisa me proporcionará ainda mais conhecimento, contribuindo muito para minha formação.

