

ANÁLISE PROTEÔMICA DE FIBROBLASTOS EMBRIÔNICOS DE CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM FIBRILINA-1.



Dellariva, T. C. [1], Braga, G. G. [2], Werneck, C. C. [3], Novello, J. C. [3]

[1] Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas. (e-mail: talitadellariva@gmail.com)

[2] Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas. (e-mail: bragarando@yahoo.com.br)

[3] Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Campinas. (e-mail: cwerneck@unicamp.br e jcn@unicamp.br)



Palavras-chave: Fibrilina-1 - Fibras elásticas - Proteômica

Introdução

As fibrilinas são glicoproteínas de alto peso molecular (~340kDa) que, compõem majoritariamente as redes de microfibrilas constituintes das fibras elásticas e, apresentam uma grande complexidade de domínios. Sabe-se que mutações no gene da fibrilina-1 estão relacionadas com a Síndrome de Marfan, uma doença autossômica dominante que compromete o desenvolvimento e/ou formação dos sistemas esquelético, respiratório e cardiovascular. Estudos têm relacionado a maioria dos sintomas com uma hiper-ativação do fator TGF- β e demonstrado que, com o tratamento com o anti-hipertensivo Losartan, há uma melhora significativa nos sinais clínicos, devido a diminuição no nível de TGF- β .

O objetivo desse projeto é estudar o efeito da deficiência de fibrilina-1, analisando o perfil de expressão de proteínas, no processo de formação da fibra elástica.

Metodologia

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em períodos de 0, 1, 2, 3 e 4 dias de confluência de cada uma das culturas celulares dos fibroblastos embriônicos de camundongos deficientes em fibrilina-1: selvagem(+/+), heterozigoto ($mg\Delta/-$) e homozigoto ($mg\Delta/mg\Delta$).

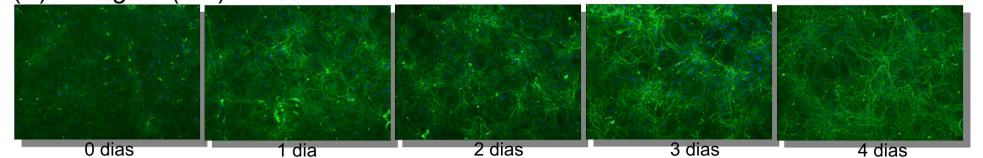
A etapa de análise do perfil de expressão de proteínas foi padronizada a partir de células da linhagem celular RFL6 (células mesenquimais de pulmão de feto de rato).

Ao atingir o período de confluência, as células foram lisadas [7M uréia, 2M tiouréia, 4% (w/v) CHAPS, 100mM DTT e Inibidores de protease e fosfatase] e dosadas através do método de Bradford (1976). Cerca de 500 μ g de proteínas foram necessários para a focalização isoeletrica (IEF) da eletroforese 2D, seguida pela separação das proteínas de acordo com seu respectivo peso molecular, segunda dimensão (SDS-Page).

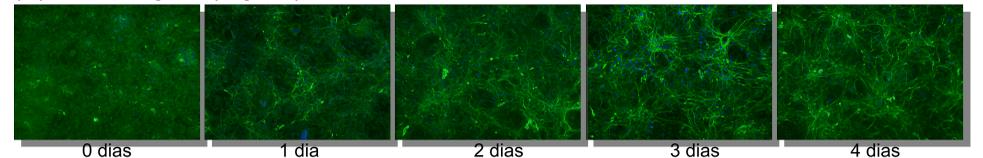
Os géis foram corados com Coomassie Blue-G durante três dias e depois scaneados por transmitância a 300dpi .

Resultados e Discussão

(A) Selvagem (+/+)



(B) Heterozigoto ($mg\Delta/-$)



(C) Homozigoto ($mg\Delta/mg\Delta$)

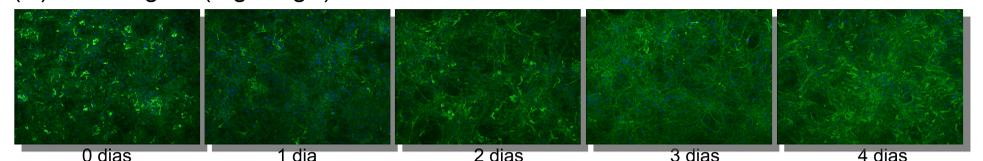


Figura 1: Deposição de tropoelastina analisada através de imunofluorescência da cultura de fibroblastos embriônicos deficientes em fibrilina-1 (A) Selvagem (+/+), (B) Heterozigoto ($mg\Delta/-$) e (C) Homozigoto ($mg\Delta/mg\Delta$) em confluências de 0, 1, 2, 3 e 4 dias.

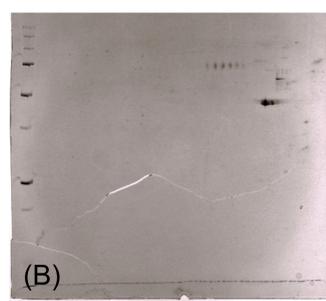
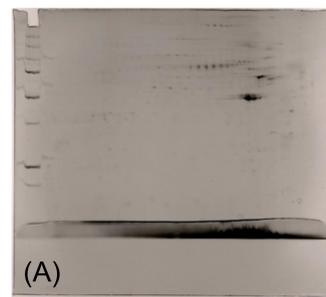


Figura 2: Eletroforese bidimensional de RFL6. (A) Corrida com duração de 9 horas a 17,5mA/gel e (B) Corrida com duração de 4 horas e 30 minutos a 40mA/gel.

Nota-se que a deposição de tropoelastina tem início a partir do primeiro dia de confluência em células selvagens e heterozigotas, enquanto que nas homozigotas torna-se maior no segundo dia. Entre os três tipos ocorre uma diminuição na quantidade de fibras e que nos homozigotos essas fibras estão bastante fragmentadas, quando comparados aos tipos selvagens.

A eletroforese bidimensional das células RFL6 apresentou um determinado perfil de spots como mostra a Figura 2. O que difere entre as duas corridas é a duração e a amperagem utilizada que permite, assim, visualizar maior quantidade de spots quando a amperagem é menor.

Conclusão

Existem diferenças na deposição de tropoelastina entre os três tipos trabalhados de fibroblastos embriônicos de camundongos deficientes em fibrilina-1, quanto ao tempo de deposição e a morfologia da fibra.

A partir das células RFL6 pode-se aprimorar a metodologia proposta para a realização da análise proteômica possibilitando, então, o uso do respectivo tipo celular proposto pelo projeto.