

ABENOR MOREIRA MINARÉ FILHO

**DETECÇÃO DE PROTEASSOMA LIVRE EM HUMOR AQUOSO DE
COELHOS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Áudio-vestibular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

Ribeirão Preto

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abenor Moreira Minaré Filho

Detecção de Proteassoma Livre em Humor Aquoso de Coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos dos Sistemas Visual e Áudio-vestibular.

Aprovado em _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Erasmo Romão

FMRP-USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria de Lourdes Veronese Rodrigues

FMRP-USP Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Rosa Bet de Moraes Silva

FMB-UNESP Assinatura: _____

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior

CCA-UFES Assinatura: _____

Profa. Dra. Renata Guerra de Sá

ICEB-UFOP Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Para Sandra, amada esposa, fiel companheira e mãe exemplar, cuja compreensão e incentivo tornaram o caminho mais fácil.

Aos meus filhos, Netinho e Renan, as coisas mais maravilhosas da minha vida, pelos quais todos os esforços valem a pena.

Aos meus pais, que entenderam que o conhecimento é o melhor caminho e que transmitiram isto aos seus filhos.

Ao meu Professor Erasmo, brilhante mestre, por ter me iniciado tanto no raciocínio oftalmológico quanto na ciência.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, a Deus, por ter me dado tantas oportunidades e ter me protegido por todo esse caminho.

À minha Professora Maria de Lourdes, excelente médica, por ter sido mais que orientadora e pelo incentivo, sem o qual este trabalho não seria possível.

Ao meu Professor Vanderlei, cientista inspirador, por ter me permitido utilizar seu laboratório e por ter sido tão incentivador e compreensivo com esse aluno, que mora em outra cidade.

Ao meu amigo William, companheiro leal e esforçado, por ter dedicado tantas horas a me ajudar e ensinar. Sem sua ajuda e seu superior conhecimento, tenho plena ciência de que nada disso seria possível.

Ao meu amigo Rodrigo, fiel e verdadeiro, cuja companhia e filosofia tornava as viagens menos cansativas.

Ao amigo Olavo, por ter dividido comigo seu inestimável conhecimento bioquímico.

Aos colegas de laboratório, Lizandra, Enyara, Fernanda, Cláudia, Carla, Érika, Camila, Sérgio, Helenice e Mara, por terem colaborado comigo nos experimentos.

A Cecília, por ter sempre me ajudado nas horas difíceis.

Ao Sr. Paulo Alves, por ter sido prestativo e nunca ter se negado a me ajudar, mesmo em horários pouco usuais.

Aos coelhos, que cederam a vida em nome da ciência.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O Proteossoma	19
1.2. O Sistema Ubiquitina.....	34
1.3. Anatomia Ocular.....	39
1.3.1. A Camada Externa	40
1.3.1.1. A córnea.....	40
1.3.1.2. A esclera	42
1.3.1.3. O limbo e o seio camerular.....	43
1.3.2. A Úvea	44
1.3.2.1. A íris.....	44
1.3.2.2. O corpo ciliar	27
1.3.2.3. A coróide.....	45
1.3.3. O Cristalino e a Zônula.....	45
1.3.4. O Corpo Vítreo	46
1.3.5. Retina.....	47
1.4. O Humor Aquoso.....	48
1.5. O Proteossoma em Patologias Oculares e Sistêmicas.....	51
2. OBJETIVOS	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1. Os Animais e a Técnica de Coleta do Material	60
3.2. Investigação de celularidade	62
3.3. A Dosagem de Proteínas	63
3.4. A Eletroforese	63
3.4.1. Tampões e Corante.....	66
3.4.1.1. Tampão de corrida	66
3.4.1.2. Tampão da amostra	66
3.4.1.3. Comassie.....	67
3.4.1.4. Descorante (de géis corados com Comassie)	67
3.5. O Immunoblotting.....	67
3.5.1. A Transferência	67
3.5.2. Coloração com Ponceau	67
3.5.3. Bloqueio	68

3.5.4. Incubação com o Anticorpo Primário	68
3.5.5. Incubação com o Anticorpo Secundário	69
3.5.6. Revelação	69
3.5.7. Tampões	70
3.5.7.1. <i>Tampão de transferência</i>	70
3.5.7.2. <i>Tampão de bloqueio</i>	70
3.5.7.3. <i>Tampão de lavagem</i>	70
3.5.7.4. <i>Tampão de immunoblotting</i>	70
3.6. Ensaio de atividade	70
4. RESULTADOS	72
4.1. Investigação de Celularidade	73
4.2. Dosagem de Proteínas.....	76
4.3. SDS-PAGE 12%.....	77
4.4. <i>Western Blotting</i> com Anticorpo Primária Anti-subunidade Alfa do Proteassoma.....	78
4.5. <i>Western Blotting</i> com Anticorpo Primário Anti-ubiquitina	79
4.6. Ensaio de Atividade	81
5. DISCUSSÃO.....	83
5.1. A Relevância do Proteassoma	84
5.2. A Localização do Proteassoma	85
5.3. A Demonstração do Proteassoma Ativo em um Meio Acelular	86
5.4. A Presença do Proteassoma no Humor Aquoso Refeito	88
5.5. A Presença do Proteassoma no Humor Vítreo	90
5.6. As Possíveis Aplicações.....	91
5.6.1. Catarata	91
5.6.2. Glaucoma.....	91
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
8. ANEXO DE PUBLICAÇÃO.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

µg-	Microgramas
µl-	Microlitros
µm-	Micrômetros
Å-	Ângstrons
ATP-	Adenosina Tri-fosfato
BCA-	Ensaio do Ácido Bicinchonínico
ELISA-	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA-	Food and Drugs Administration
HECT-	Homologous to E6-associated Protein C Terminus
JNKs-	c-jun N-terminal quinases
KDa-	Quilodaltons
MAPK-	Mitogen-Activated Protein Kinase
MHC1-	Major Histocompatibility Complex Type One
MDa-	Megadaltons
Mv-	Milivolts
nm-	Nanômetros
NBT/BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine / Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
°C-	Graus Celsius
RING-	Really Interesting New Gene
SDS PAGE-	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SLLVY-AMC-	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC
UPS-	Ubiquitin Proteasome System

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A organização estrutural do Proteassoma 20S.....	20
Figura 2- Visão longitudinal do Proteassoma 20S.....	21
Figura 3- Visão superior do Proteassoma 20S.....	22
Figura 4- Imuno-Proteassoma.....	25
Figura 5- O Complexo 26S.....	27
Figura 6- Regulador 11S acoplado ao Proteassoma.....	31
Figura 7- Proteína Regulatória 11S, um anel alfa e um anel beta do Proteassoma.....	31
Figura 8- Regulador 11S, visão inferior.....	32
Figura 9- Reguladores da atividade do Proteassoma	33
Figura 10- A molécula de Ubiquitina	35
Figura 11- A) A seqüência de reações no sistema proteolítico. B) Possíveis mecanismos de transferência da Ubiquitina para a proteína-alvo.....	36
Figura 12- Todos os aminoácidos da Ubiquitina	38
Figura 13- Apenas os resíduos de Lisina da imagem anterior	39
Figura 14- A projeção de duas esferas dando o formato do globo ocular	40
Figura 15- As camadas da córnea.	42
Figura 16- As estruturas do seio camerular.....	44
Figura 17- O segmento anterior do olho.....	47
Figura 18- aspecto do pólo posterior e sua relação com o segmento anterior.....	48
Figura 19- Aumento semi-quantitativo do Proteassoma em pacientes com Glaucoma de Pressão Normal (NTG) e de Pressão Alta (HTG), comparados com indivíduos normais (Healthy control)	56
Figura 20- Padrão do peso molecular	66
Figura 21- Citocentrifugado de Humor Aquoso Refeito corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 200X.....	74

Figura 22- Citocentrifugado de Humor Aquoso Refeito corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 400X	74
Figura 23- Citocentrifugado de Humor Vítreo corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 200X	75
Figura 24- Citocentrifugado de Humor Vítreo corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 400X	75
Figura 25- Eletroforese de proteínas em duplicatas. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo.....	77
Figura 26- A mesma imagem anterior, colorida. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo	77
Figura 27- Eletroforese de proteínas em duplicatas. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo.....	78
Figura 28: <i>Western Blotting</i> evidenciando a subunidade alfa do Proteassoma. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo	78
Figura 29: <i>Western Blotting</i> evidenciando a subunidade alfa do Proteassoma. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo	79
Figura 30: <i>Western Blotting</i> evidenciando compostos ubiquitinados. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo.....	80
Figura 31: <i>Western Blotting</i> evidenciando compostos ubiquitinados. Os números são referentes aos pesos moleculares. HA: Humor Aquoso. R: Humor Aquoso Refeito. V: Humor Vítreo.....	80
Figura 32: A produção do humor aquoso. Imagem adaptada de Forrester et al. (2002).....	89

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: As subunidades do Proteassoma	23
Tabela 2: As subunidades da PA700	29
Tabela 3: Eletrólitos e solutos orgânicos no humor aquoso e plasma.....	49
Tabela 4: Gel de Concentração.....	64
Tabela 5: Gel de Separação.....	64
Tabela 6: Comparação da atividade do Proteassoma, em escala arbitrária.	81
Gráfico 1: Comparação da atividade do Proteassoma, em escala arbitrária.(gráfico).....	82

RESUMO

Introdução: Algumas atividades fundamentais que possibilitam a vida, como a apresentação de antígenos, apoptose, reciclagem de proteínas e controle de fatores transcricionais, dependem de atividade proteolítica. O Proteassoma é o mais importante agente proteolítico dos organismos eucarióticos já estudados e é normalmente descrito como sendo intracelular. **Objetivos:** Determinar se o Proteassoma está presente e ativo no humor aquoso (um meio acelular com concentração protéica em torno de 500 vezes menor que o plasma) e no humor vítreo. **Material e Métodos:** Utilizamos coelhos da raça Nova Zelândia, de ambos os sexos, que eram anestesiados e submetidos à paracentese para aspiração do humor aquoso. Após 15 minutos, nova amostra era colhida, do mesmo olho (humor aquoso feito, que tem concentração protéica em torno de 15 vezes maior que o humor aquoso normal). O olho contralateral era submetido à punção via pars plana, para aspiração do humor vítreo. As amostras eram então armazenadas em *ependorfs*, com adição de glicerol (para preservar a atividade do Proteassoma), em gelo. Em seguida, era realizada eletroforese (SDS PAGE), com 20µg de proteínas por coluna e finalmente, *Western Blotting*, para identificar as subunidades alfa do proteassoma e compostos ubiquitinados. O ensaio de atividade era realizado por espectrofluorimetria, com o substrato fluorogênico Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC. O inibidor MG132 era utilizado para controle. **Resultados:** Identificamos as subunidades alfa do Proteassoma e compostos ubiquitinados em todas as amostras. A atividade foi demonstrada e pôde ser inibida com o uso de MG132. **Conclusão:** O Proteassoma está presente de forma livre e ativo no humor aquoso.

SUMMARY

Introduction: Some fundamental activities that make life possible, as antigen presentation, apoptosis, protein turnover and regulation of transcriptional factors, depend on proteolytic activity, which main component is the ATP-Dependent Proteolytic System (Proteasome). It has been found in cells and is described as an intracellular complex. **Purpose:** We aimed to determine if Proteasome is present within an acellular environment (aqueous humor, whose protein content is about 500 times lesser than that in plasma) and in vitreous body. **Methods:** We used young and healthy New Zealand rabbit specimens of both sex. They were anesthetized and submitted to paracentesis of the anterior chamber, with subsequent aspiration of the aqueous humor. Then we waited for about 15 minutes and got a new sample of aqueous humor in the same eye (called "renewed aqueous humor", which has 15 times more protein than the normal aqueous humor) the other eye was submitted to aspiration of vitreous humor via the pars plana. Following this, the samples were stored in eppendorfs and glycerol was added (in order to keep proteasome activity intact) and finally inserted in ice. The samples were then centrifuged, analyzed by SDS PAGE (20µg protein/column) and submitted to Western blotting to link proteasome alpha subunits and ubiquitinated conjugates. The proteasome activity was evaluated using a spectrofluorimeter method with fluorogenic substrates (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). A proteasome activity inhibitor (MG132) was used in the control samples. **Results:** We could identify alpha subunits of the proteasome and ubiquitinated conjugates. Activity was preserved and could be inhibited by MG132. **Conclusion:** the proteasome is do present in "free state" in the aqueous humor, within an active form.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Proteassoma

Diversas atividades intracelulares que possibilitam a vida, tais como: apresentação de antígenos, apoptose, diferenciação celular, reciclagem de proteínas degeneradas (por mutação ou dano pós-sintético), degradação de enzimas com atividade auto-limitada e reguladores transcricionais, são dependentes de proteólise.

Existem diversos mecanismos de proteólise conhecidos, no entanto, o Sistema Proteolítico ATP-Dependente Proteassoma (Complexo Proteassoma) é o principal atuante intracelular extra-lisossomal nos organismos eucarióticos. Está presente em grande quantidade, principalmente nos tecidos de grande metabolismo, como o fígado. Pode constituir até 1% do total de proteínas da célula, podendo variar grandemente de acordo com sua atividade metabólica, estando em maior quantidade nos hepatócitos (TANAKA et al., 1986).

O Proteassoma foi originalmente descoberto de forma independente em diversos laboratórios. A existência de uma protease de 700 kDa em fígado de ratos (DEMARTINO; GOLDBERG, 1979) e reticulócitos (GOLDBERG; STRNAD; SWAMY, 1979) foi descrita e já se imaginava que desempenhava um papel crítico na via proteolítica ATP-dependente. Em 1983, um complexo “grande e multicatalítico” com atividades semelhantes à quimiotripsina e à tripsina foi isolado da hipófise (WILK; ORLOWSKI, 1983), onde acreditava-se estar envolvido com o metabolismo de neuro-transmissores. Outros laboratórios também descreveram o complexo, que chegou a ser nomeado de 21 formas diferentes (incluindo Macropaína e Megapaína), até que em 1988

(COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996) foi proposto o nome Proteassoma, sugerindo sua natureza proteolítica e dimensão.

Nas diversas publicações, este complexo proteolítico é descrito de duas formas: “20S” (ou “700 kDa”) e “26S” (ou “2000 kDa”).

O Proteassoma 20S consiste de uma molécula de aproximadamente 700 a 750 kilodaltons, composta de quatro anéis, com sete subunidades cada um, sobrepostos, com lúmen comum e formato que lembra um “barril”, cujas paredes são formadas pelas subunidades alfa e beta e o centro é vazio (KOPP et al., 1997) (Figura 1).

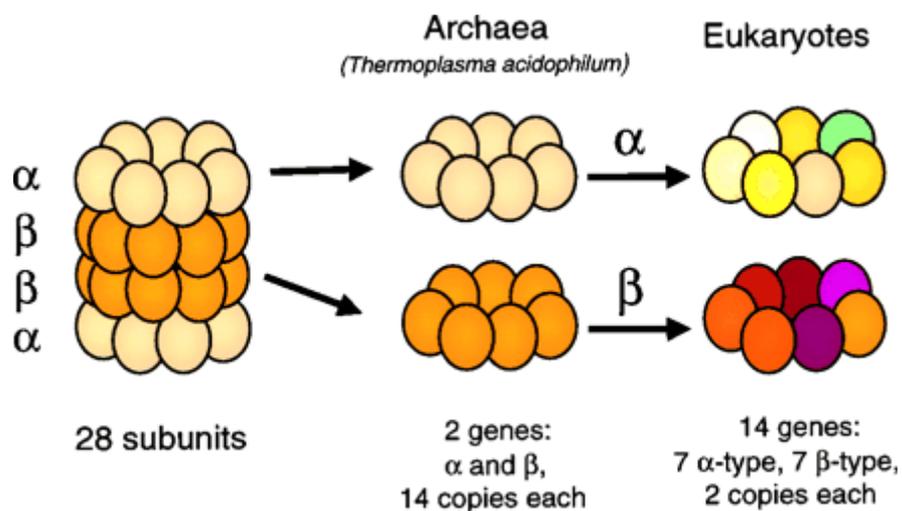


Figura 1: A organização estrutural do Proteassoma 20S

**Figura de DeMartino e Slaughter (1999)*

O “barril” tem em torno de 12nm de diâmetro e 17nm de altura. Os anéis superior e inferior são formados por subunidades alfa, enquanto os dois anéis centrais são formados por subunidades beta (Figuras 2 e 3). Cada uma destas

subunidades tem tamanho que pode variar entre 20 e 31 kDa (COUX et al., 1992). As primeiras (alfa) têm como função primordial manter o formato do complexo (ZWICKL; KLEINZ; BAUMEISTER, 1994), enquanto às subunidades beta está conferida a atividade proteolítica (BAUMEISTER et al., 1998). A proteólise ocorre no “centro” do barril (Figura 3), o que previne a digestão generalizada e conseqüente dano à célula.

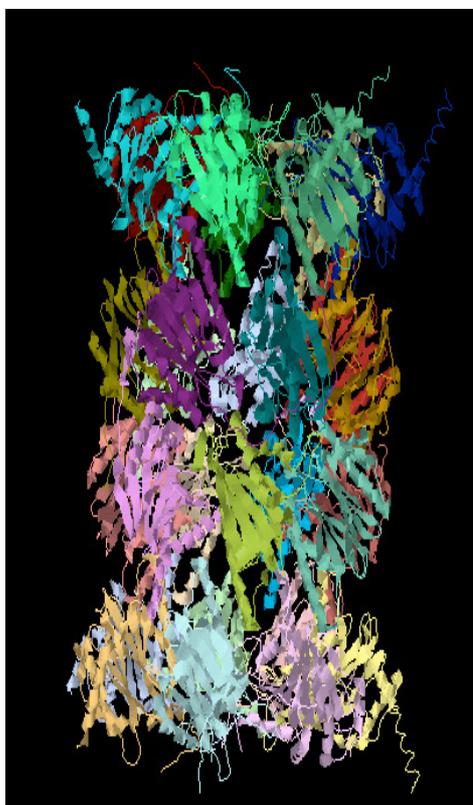


Figura 2: Visão longitudinal do Proteassoma 20S

** Imagem com resolução de 2,75Å visualizada pelo aplicativo java JMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Unno et al. (2002)*

Quando expressadas isoladamente, as subunidades alfa são capazes de se organizar no formato de anel com sete componentes, sendo que o mesmo não ocorre com as subunidades beta (ZWICKL; KLEINZ; BAUMEISTER, 1994). Isto parece ser devido ao fato de que as subunidades alfa possuem uma seqüência N-terminal altamente conservada, tanto na mesma espécie quanto entre espécies, que é essencial para esta organização (COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996). Mutação ou deleção neste motif impede esta organização.

As subunidades componentes podem variar grandemente, tanto entre espécies quanto no próprio indivíduo. Na arqueobact ria *Thermoplasma acidophilum*, por exemplo, cont m anéis externos com apenas um tipo de subunidade alfa e anéis internos com apenas um tipo de subunidade beta ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) (DAHLMANN et al., 1989).

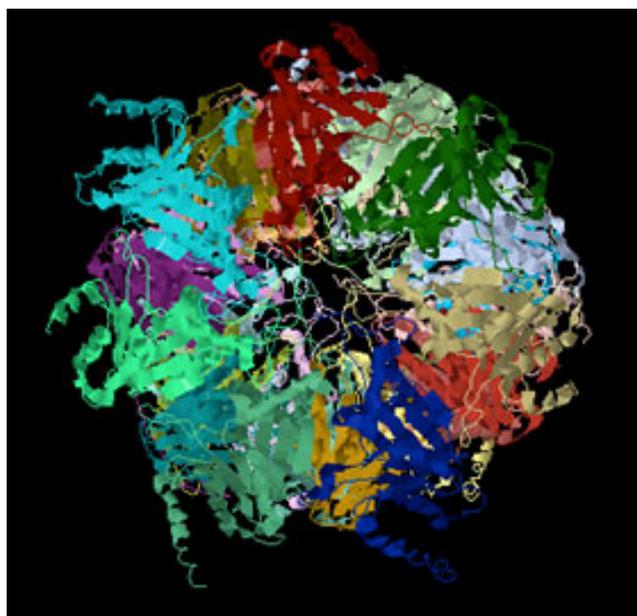


Figura 3: Visão superior do Proteassoma 20S

* Imagem com resolução de 2,75  visualizada pelo aplicativo java JMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Unno et al. (2002)

Nos seres eucarióticos, a composição do Proteassoma é ainda mais complexa, devido ao número de possíveis subunidades que se desenvolveram durante a evolução das espécies (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1: As subunidades do Proteassoma.

Proteasome 20S										
Baumeister et al. (1998)	Old human	Coux et al. (1994)	Groll et al. (1997)	Miscellaneous	UniProtKb4	Human	Yeast (S.c)	Human	Amino acids	Da
20S α-type subunits										
$\alpha 1$	iota	Pro- $\alpha 6$	$\alpha 1_{sc}$	Pros27, p27k, C7, Prs2, Y8, Prc2, Scl1	$\alpha 6$	PSMA6	PRS2	P60900	246	27399
$\alpha 2$	C3	Pro- $\alpha 2$	$\alpha 2_{sc}$	Pre8, Prs4, Y7	$\alpha 2$	PSMA2	PRS4	P25787	233	25767
$\alpha 3$	C9	Pro- $\alpha 4$	$\alpha 3_{sc}$	Pre9, Prs5, Y13	$\alpha 4$	PSMA4	PRS5	P25789	261	29484
$\alpha 4$	C6	Pro- $\alpha 3$	$\alpha 4_{sc}$	XAPC-7, Pre6	$\alpha 7$	PSMA7	PRE6	O14818	248	27887
$\alpha 5$	zeta	Pro- $\alpha 1$	$\alpha 5_{sc}$	Pup2, Doa5	$\alpha 5$	PSMA5	PUP2	P28066	241	26411
$\alpha 6$	C2	Pro- $\alpha 5$	$\alpha 6_{sc}$	nu, Pros30, p30k, Pre5	$\alpha 1$	PSMA1	PRE5	P25786	263	29556
$\alpha 7$	C8	Pro- $\alpha 7$	$\alpha 7_{sc}$	Pre10, Prs1, C1, Prc1	$\alpha 3$	PSMA3	PRS1	P25788	254	28302
20S β-type subunits										
$\beta 1$	Y	Pro- $\beta 3$	$\beta 1_{sc}$	delta, Lmp9, Pre3	$\beta 6$	PSMB6	PRE3	P28072	239/205	25358/21904
$\beta 1i$	Lmp2	Pro- $\beta 3$	-	Ring12	$\beta 9$	PSMB9	-	P28065	219/199	23264/21276
$\beta 2$	Z	Pro- $\beta 2$	$\beta 2_{sc}$	Lmp19, MC14, Pup1	$\beta 7$	PSMB7	PUP1	Q99436	277/234	29965/25218
$\beta 2i$	MECL-1	Pro- $\beta 2$	-	Lmp10	$\beta 10$	PSMB10	-	P40306	273/234	28936/24648
$\beta 3$	C10	Pro- $\beta 6$	$\beta 3_{sc}$	theta, Pup3	$\beta 3$	PSMB3	PUP3	P49720	205	22949
$\beta 4$	C7	Pro- $\beta 4$	$\beta 4_{sc}$	Pre1, C11	$\beta 2$	PSMB2	PRE1	P49721	201	22836
$\beta 5$	X	Pro- $\beta 1$	$\beta 5_{sc}$	epsilon, Lmp17, MB1, Pre2, Doa3, Prg1	$\beta 5$	PSMB5	PRE2	P28074	208/204	22897/22458
$\beta 5i$	Lmp7	Pro- $\beta 1$	-	Ring10, Y2, C13	$\beta 8$	PSMB8	-	P28062	276/204	30354/22660
$\beta 6$	C5	Pro- $\beta 5$	$\beta 6_{sc}$	gamma, Pre7, Prs3, C5, Pts1	$\beta 1$	PSMB1	PRS3	P20618	241	26489
$\beta 7$	N3	Pro- $\beta 7$	$\beta 7_{sc}$	beta, Pros26, Pre4	$\beta 4$	PSMB4	PRE4	P28070	264/219	29192/24380

O Proteassoma de células eucarióticas é capaz de realizar diferentes atividades proteolíticas (DEMARTINO; SLAUGHTER, 1999):

1. **Atividade “quimiotripsina-símile”:** atua preferencialmente em tirosina e fenilalanina, na posição P1;

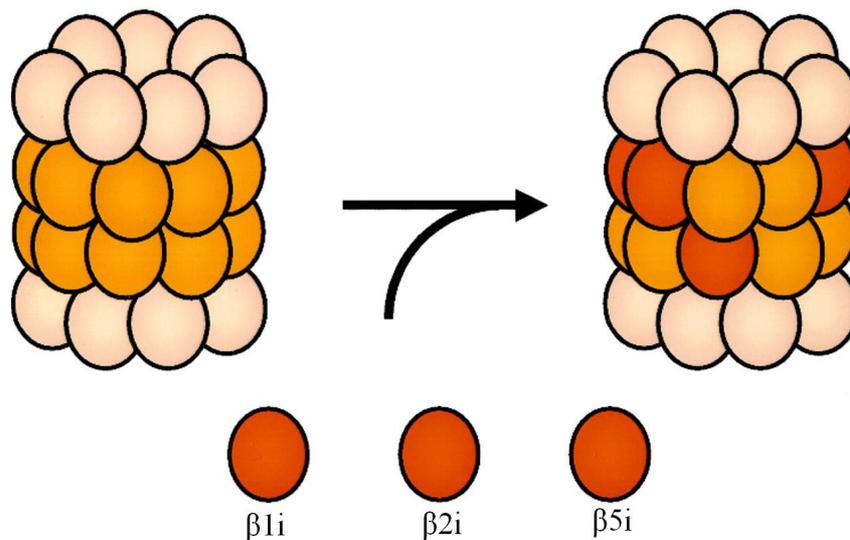
2. **Atividade “tripsina-símile”**: atua preferencialmente para arginina e lisina, na posição P1;
3. **Atividade hidrolisante “pós-glutamil”**: tem afinidade por glutamato ou outros resíduos acídicos na posição P1.

Estudos em leveduras sugerem que cada diferente atividade proteolítica parece esta associada a apenas um subtipo de subunidade beta. Assim, para cada atividade, cada molécula de proteassoma teria apenas duas moléculas catalisantes (uma em cada anel beta). A função das demais quatro unidades permanece não esclarecida.

Nos seres eucarióticos superiores, cada uma das três subunidades catalíticas ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) podem ser substituídas por uma subunidade muito semelhante ($\beta 1i$, $\beta 2i$ e $\beta 5i$, respectivamente). Quando isto ocorre, ele passa a chamar-se “imuno-proteassoma” (Figura 4) (JAYARAPU; GRIFFIN, 2007), cujo nome foi dado pela estreita relação com a apresentação de antígenos do sistema MHC1 (Major Histocompatibility Complex Type One) (STREHL et al., 2005). Diversas condições fisiológicas podem induzir estas mudanças transcricionais (KUCKELKORN et al., 1995). *In vitro*, pode obter-se o imuno-proteassoma através de tratamento de culturas celulares com Interferon Gamma (GROETTRUP et al., 1995). *In vivo*, esta indução pode se dar através de infecção viral (com conseqüente aumento da produção local de Interferon Gamma) (SHIN et al., 2006).

Este complexo é capaz de hidrolisar peptídeos com aminoácidos básicos e hidrofóbicos na posição P1 mais rapidamente que o Proteassoma

“constitutivo” (nome dado à molécula 20S com as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$). Em compensação, a atividade sobre os peptídeos com aminoácidos acídicos na posição P1 ocorre com menor intensidade (GACZYNSKA et al., 1996).



inducible catalytic subunits

Figura 4: Imuno-Proteassoma

* Figura adaptada de DeMartino e Slaughter (1999)

Devido à relativamente estreita “luz” do Proteassoma, apenas pequenos peptídeos conseguem ser catalizados pela estrutura 20S, pois somente estes conseguem penetrá-la naturalmente (o diâmetro do cilindro da cavidade é de aproximadamente 13Å) (LOWE et al., 1995). *In vitro*, consegue degradar proteínas grandes apenas se estas estiverem muito desnaturadas, concomitantemente ao uso de alguns artifícios para ativá-lo, tais como exposição a baixas concentrações de SDS, Glicerol, calor (incubação a 37°C

ou aquecimento a 55°C) ou sob certas condições iônicas (COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996). As bases moleculares exatas para explicar esta ativação sugerem que ocorre uma mudança conformacional no proteassoma, com conseqüente aumento da luz, bem como mudanças alostéricas nos sítios catalíticos das subunidades beta).

Em condições fisiológicas, no entanto, o aumento na atividade do Proteassoma ocorre através de proteínas reguladoras. Através da interação entre as moléculas envolvidas, o Proteassoma passa a ser capaz de degradar grandes proteínas.

A mais importante destas proteínas reguladoras é conhecida como PA700 (também citada como “Bola”, “Chapéu 19S” ou ainda “Partícula μ ”). Através da interação entre o Proteassoma 20S e a proteína regulatória PA700, tem-se o Complexo Proteolítico Proteassoma 26S (Figura 5) (CHU-PING et al., 1994). Esta é, portanto, a diferença entre os Proteassomas 20S e 26S, que citamos no início do texto.

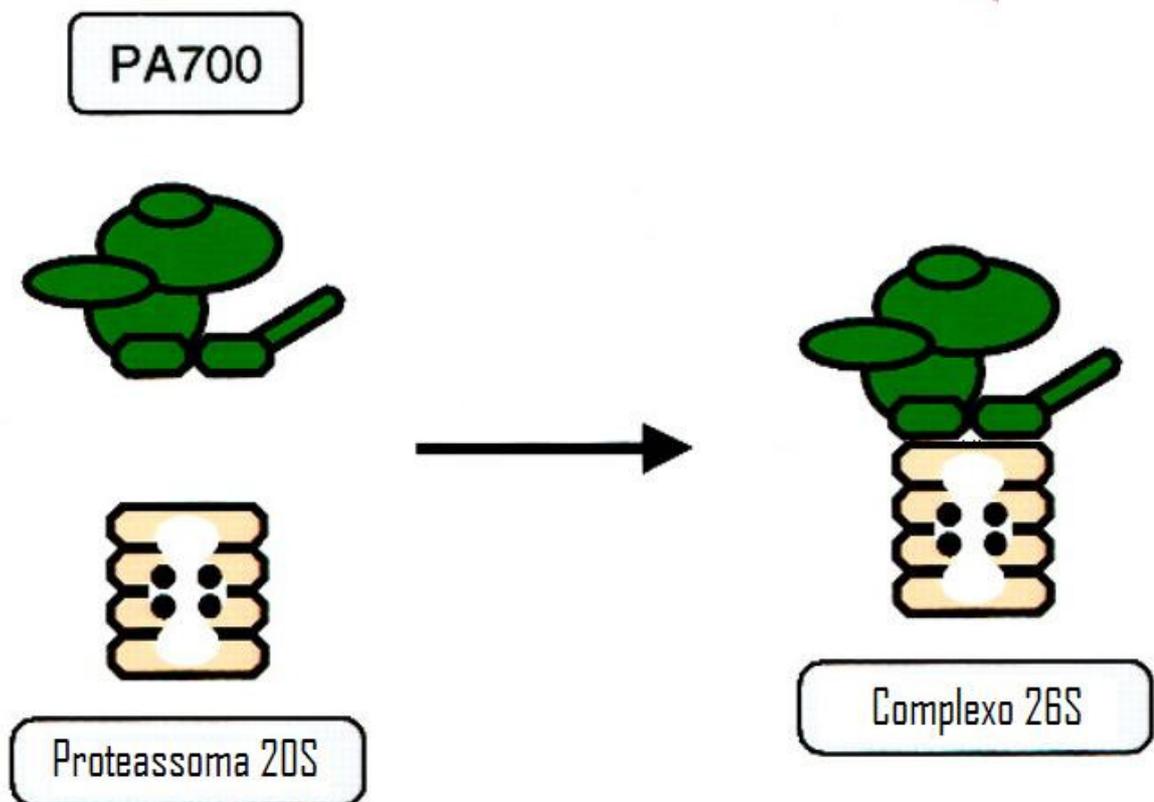


Figura 5: O Complexo 26S

** Figura adaptada de DeMartino e Slaughter (1999)*

Como o proteassoma forma complexos com diversas proteínas regulatórias ele é considerado centro de um sistema no qual as diferentes ligantes são capazes de lhe conferir características únicas.

A molécula regulatória PA700 tem 700kDa e é constituída por 17 diferentes tipos de subunidades (Tabela 2). Através do Complexo 26S, grandes moléculas protéicas conseguem ser hidrolisadas pelo Proteassoma. Inicialmente, ocorre acoplamento da proteína reguladora PA700, que se conecta a um anel heptamérico constituído pelas subunidades alfa

(DEMARTINO et al., 1994). Pode ocorrer acoplamento de uma PA700 em cada anel alfa, simultaneamente, bem como ocorrer o acoplamento de uma reguladora diferente (por exemplo, PA700 e PA28 ou PA700 e uma molécula inibidora) em cada um dos anéis, também simultaneamente (DEMARTINO, 2005). Esta molécula (PA700) é capaz de reconhecer as proteínas-alvo a serem clivadas pelo complexo, e, à custa de ATP, promover desenovelamento das proteínas, induzir o posicionamento das cadeias nos sítios catalíticos e ainda causar mudanças conformacionais no Proteassoma 20S, aumentando o tamanho da cavidade. Ocorre então multi-hidrólise até resultarem pequenos peptídeos (em torno de oito aminoácidos), que podem se tornar alvo de outros sistemas proteolíticos, até a clivagem a aminoácidos (GROLL; HUBER, 2003).

Parece ocorrer também, durante este processo, mudanças alostéricas nos sítios catalíticos das subunidades beta, aumentando a capacidade proteolítica. A molécula PA700 tem diversas subunidades com capacidade de hidrólise de ATP, podendo esta atividade variar entre uma e sete subunidades, dependendo do processo a ser ativado.

Tabela 2: As subunidades da PA700.

19S Regulator								
Nomenclature			Gene			1 ^o Acc #	Seq. Length	MW
Finley et al. (1998) ₅	Dubiel et al. (1995)	Miscellaneous	UniProtKB ₄	Human	Yeast (S.c.)	Human	Aminoacids	DA
19S (PA700) regulator ATPase subunits								
Rpt1	S7	p48, Mss1, Yta3, Cim5	Subunit 7	PSMC2	CIM5	P35998	432	48503
Rpt2	S4	p56, Yhs4, Yta5, Mts2	Subunit 4	PSMC1	YTA5	P62191	440	49185
Rpt3	S6b	p48, Tbp7, Yta2, Ynt1, MS73	Subunit 6b	PSMC4	YTA2	P43686	418	47336
Rpt4	S10b	p42, Sug2, Pcs1, Crl13, CADp44	Subunit 10b	PSMC6	SUG2	P62333	389	44173
Rpt5	S6a	p50, Tbp1, Yta1	Subunit 6a	PSMC3	YTA1	P17980	439	49204
Rpt6	S8	p45, Trip1, Sug1, Cim3, Crl3, Tby1, Tbp10, m56	Subunit 8	PSMC5	SUG1	P62195	406	45626
19S (PA700) regulator non-ATPase subunits								
Rpn1	S2	p97, Trap2, Nas1, Hrd2, Rpd1, Mts4	Subunit 2	PSMD2	HRD2	Q13200	908	100200
Rpn2	S1	p112, Sen3	Subunit 1	PSMD1	SEN3	Q99460	953	105836
Rpn3	S3	p58, Sun2	Subunit 3	PSMD3	SUN2	O43242	534	60978
Rpn4		Son1, Ufd5			RPN4	Q03465(Sc)	531	60153
Rpn5		p55, Nas5	Subunit 12	PSMD12	YDL147W	O00232	455	52773
Rpn6	S9	p44.5, Nas4/6?	Subunit 11	PSMD11	YDL097C	O00231	421	47333
Rpn7	S10a	p44, HUMORF07	Subunit 6	PSMD6		Q15008	389	45531
Rpn8	S12	p40, Mov-34h, Nas3	Subunit 7	PSMD7	YOR261C	P51665	324	37025
Rpn9	S11	p40.5, Les1, Nas7	Subunit 13	PSMD13		Q9UNM6	376	42918
Rpn10	S5a	p54, ASF1, Sun1, Mcb1, Mbp1	Subunit 4	PSMD4	SUN1	P55036	377	40736
Rpn11	S13	Poh1, Mpr1, Pad1h	Subunit 14	PSMD14	MPR1	O00487	310	34577
Rpn12	S14	p31, Nin1, Mts3	Subunit 8	PSMD8	NIN1	P48556	257	30005
Rpn13		YLR421C			RPN13	O13563(Sc)	156	17902
	S5b	p50.5	Subunit 5	PSMD5		Q16401	503	56065
	S15	p27-L	Subunit 9	PSMD9	NAS2	O00233	223	24654
		p28, Gankyrin, Nas6	Subunit 10	PSMD10		O75832	226	24428

Estas moléculas-alvo, acima citadas, são “marcadas” com um pequeno peptídeo, chamado Ubiquitina. Esta é a molécula verdadeiramente reconhecida pelo Complexo 26S, ocorrendo ligação covalente nos compostos poli-ubiquitinados (DEVERAUX et al., 1994). Um sistema independente faz o

reconhecimento das moléculas a serem marcadas pela Ubiquitina. Falaremos a respeito deste sistema no próximo capítulo.

Alternativamente, a PA700 também é capaz de induzir hidrólise de algumas moléculas não-ubiquitinadas, como a enzima Ornitina Descarboxilase, mas também de forma dependente de ATP, porém com outros fatores reguladores (neste caso específico, uma anti-enzima inibidora de “reconhecimento”) (ASHER; REUVEN; SHAUL, 2006).

Outra importante proteína regulatória do Proteassoma 20S é a PA28 (ou Reguladora 11S), que possui 28 kDa (DUBIEL et al., 1992) e é constituída por duas subunidades (KANDIL et al., 1997), sendo uma alfa e outra beta, que são idênticas em 50% de suas seqüências de aminoácidos. Associa-se ao proteassoma (Figuras 6, 7 e 8) de forma não-covalente e sem necessidade de hidrólise de ATP, podendo ser dissociada deste em baixas concentrações salinas ou ainda com uso de anticorpos anti-subunidade alfa. É capaz de aumentar drasticamente a hidrólise de peptídeos pelo Proteassoma (10 a 50 vezes), não afetando a proteólise de cadeias maiores (MASTERS et al., 2005). Sua função fisiológica é pouco compreendida, visto que peptídeos livres são raros no meio intracelular, entretanto, sua produção é aumentada sob a influência de interferon gama, sugerindo que possa também ter importância nos processos imunológicos (RECHSTEINER; REALINI; USTRELL, 2000)

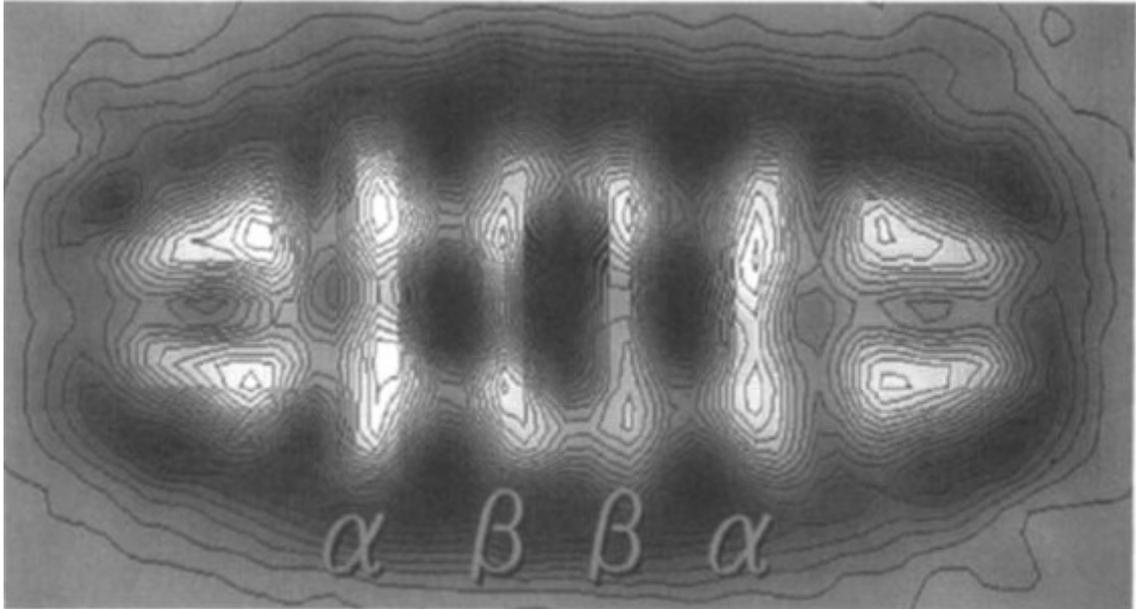


Figura 6: Regulador 11S acoplado ao Proteassoma
** Imagem de Coux, Tanaka e Goldberg (1996)*

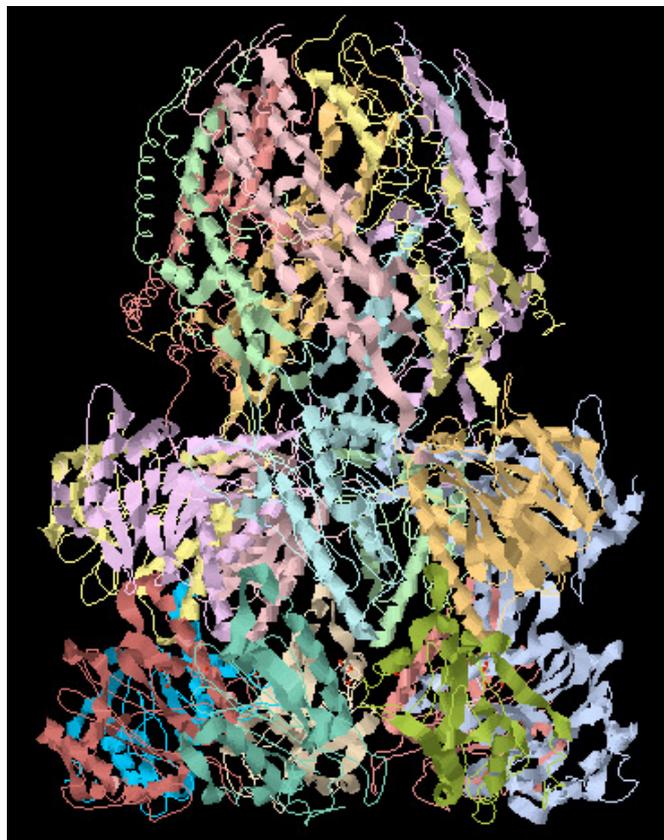


Figura 7: Proteína Regulatória 11S, um anel alfa e um anel beta do Proteassoma

* Imagem com resolução de 1,90Å visualizada pelo aplicativo java JMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Forster et al. (2005)

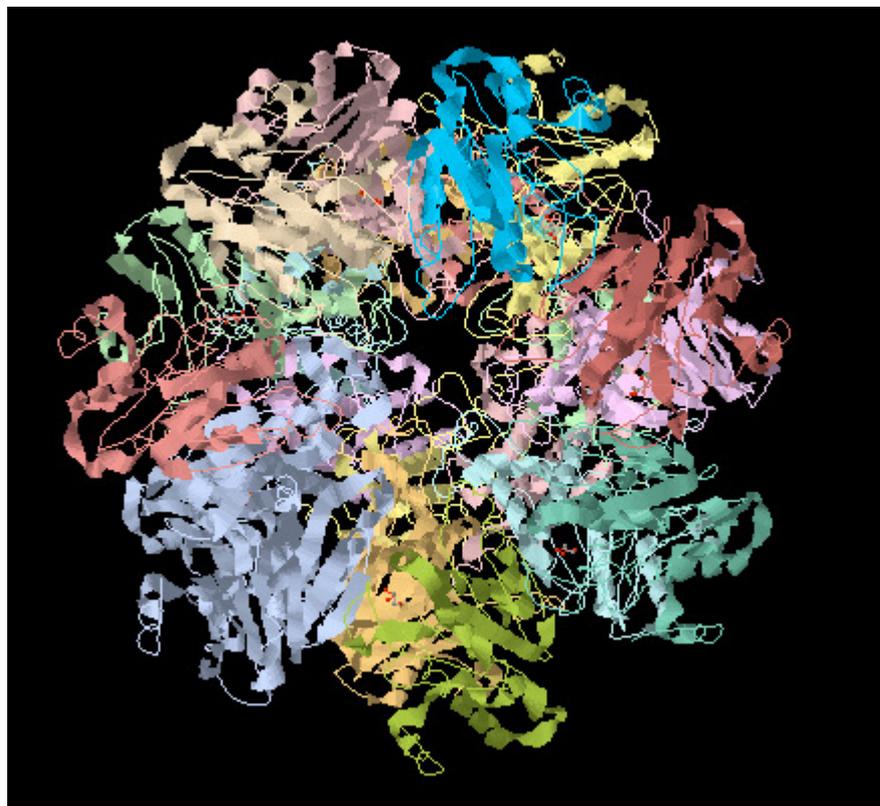


Figura 8: Regulador 11S, visão inferior

* Imagem com resolução de 1,90Å visualizada pelo aplicativo java JMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Forster et al. (2005)

Também foram descritos inibidores da atividade do Proteassoma (RECHSTEINER; HILL, 2005) (Figura 9), como o fisiológico CF2 (ou inibidor de 240kDa) e os utilizados *in vitro* incluindo dicloroisocumarina (bloqueia os três tipos de proteólise), e peptídeos aldeídicos (VINITSKY et al., 1994) (quimostatina e MG101 inibem reversivelmente a atividade quimiotripsina-símile; leupeptina inibe a atividade tripsina-símile; MG132 inibe as atividade

quimiotrípica e posglutamil). No entanto, alguns inibidores da família das proteases cisteínicas (eg, Papaína), como E-64, não atuam sobre o Proteassoma.

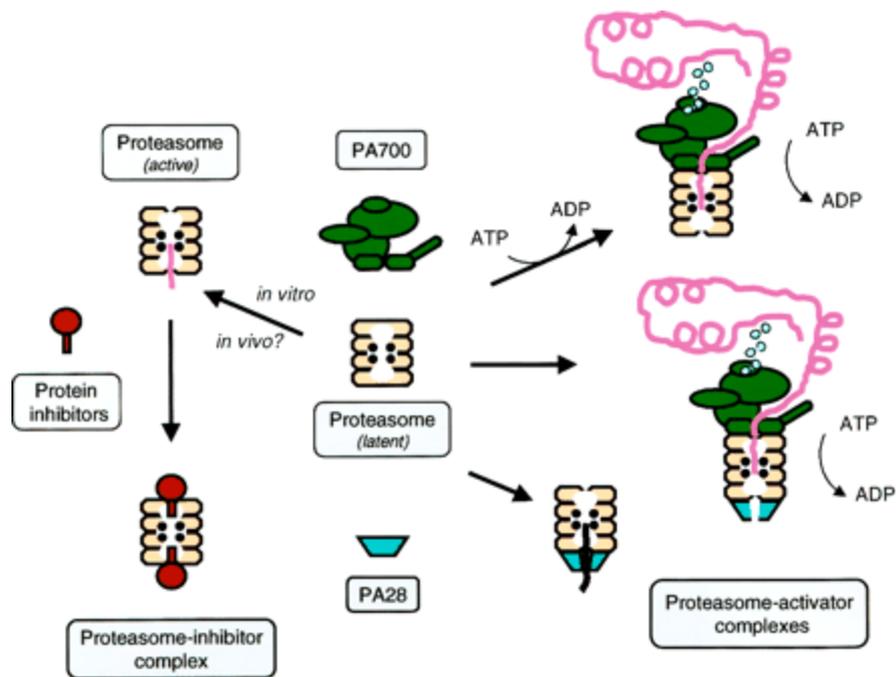


Figura 9: Reguladores da atividade do Proteassoma

* Figura de DeMartino e Slaughter (1999)

Além de reciclagem de proteínas, o Proteassoma também desempenha funções em diversos outros processos celulares (DEMARTINO; GILLETTE, 2007), como modelamento proteolítico de precursores de proteínas, transcrição, reparo de DNA e remodelamento de cromatina. Isto pode ser devido às subunidades não-proteolíticas, bem como à associação com a PA700, que também apresenta funções não-proteolíticas.

1.2. O Sistema Ubiquitina

Em 1974, um peptídeo de 8,5kDa (Figura 10) foi pela primeira vez purificado de timo bovino, onde acreditava-se que ele era capaz de induzir diferenciação de linfócitos B e T e que era expresso em praticamente todos os tipos de células. Ganhou o nome de “Ubiquitous Immunopoietic Polypeptide” (Polipeptídeo Imunopoiético Ubíquo) (CIECHANOVER, 2005). Estudos posteriores evidenciaram que na verdade ele não possuía a função inicialmente atribuída, sendo aquela atividade relacionada a linfócitos B e T causada por uma endotoxina contaminante. No entanto, notou-se que este polipeptídeo (Ubiquitina) tinha importante papel na proteólise intracelular ATP-dependente (CIECHANOVER, 2005). Apesar de não estar presente em todas as formas de vida (incluindo a bactéria *Escherichia coli*), o nome “ubiquitina” foi preservado, talvez por razões históricas (WILKINSON, 2005). O sistema proteolítico tornou-se mais conhecido e bastante estudado, sendo conhecido como “Sistema Ubiquitina-Proteassoma” (UPS, da sigla original em inglês).

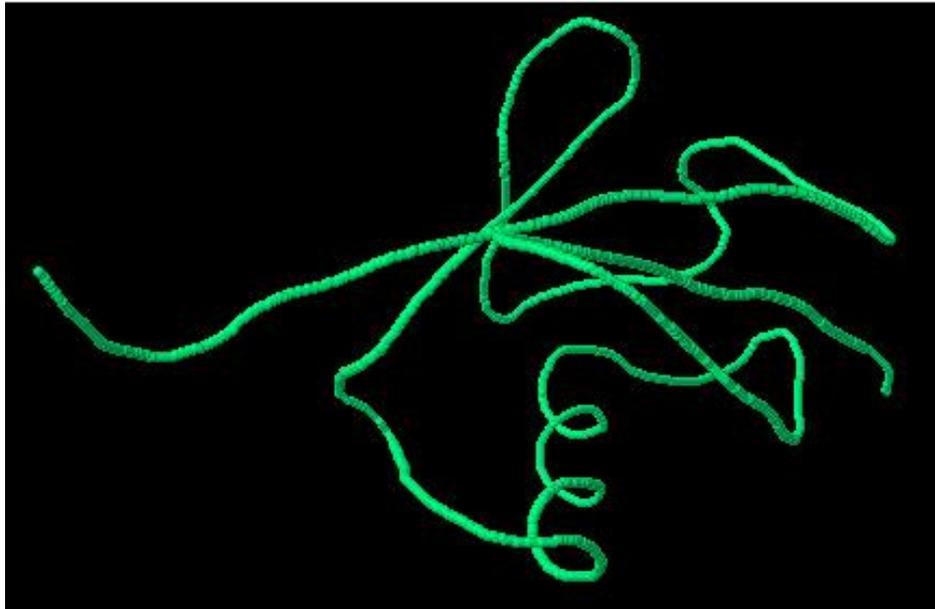


Figura 10: A molécula de Ubiquitina

** Imagem com resolução de 1,8Å, visualizada pelo aplicativo java WebMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Vijay-Kumar, Bugg e Cook (1987)*

A degradação de proteínas pelo sistema UPS envolve dois passos: 1) o sistema ubiquitina ativa transfere e liga moléculas de ubiquitina a proteínas celulares, sendo catalizado pelas enzimas E1, E2 e E3, seqüencialmente (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998); 2) os compostos ubiquitinados (poli-ubiquitinação K48, como veremos adiante) são reconhecidos pela molécula PA700 do proteassoma 26S, dando início ao processo proteolítico.

As enzimas E1 consomem ATP para causar adenilação da ubiquitina em sua extremidade C. Em seguida, ocorre o mesmo processo com outra molécula de ubiquitina, promovendo a transferência da primeira molécula a uma enzima E2. Então, pelo fato de as E3 terem grande afinidade pelas E2 ligadas a ubiquitina, elas interagem entre si e com a proteína-alvo (selecionada por

afinidade com uma das E3), possibilitando então a transferência da enzima para a proteína-alvo (Figura 11) (KERSCHER; FELBERBAUM; HOCHSTRASSER, 2006).

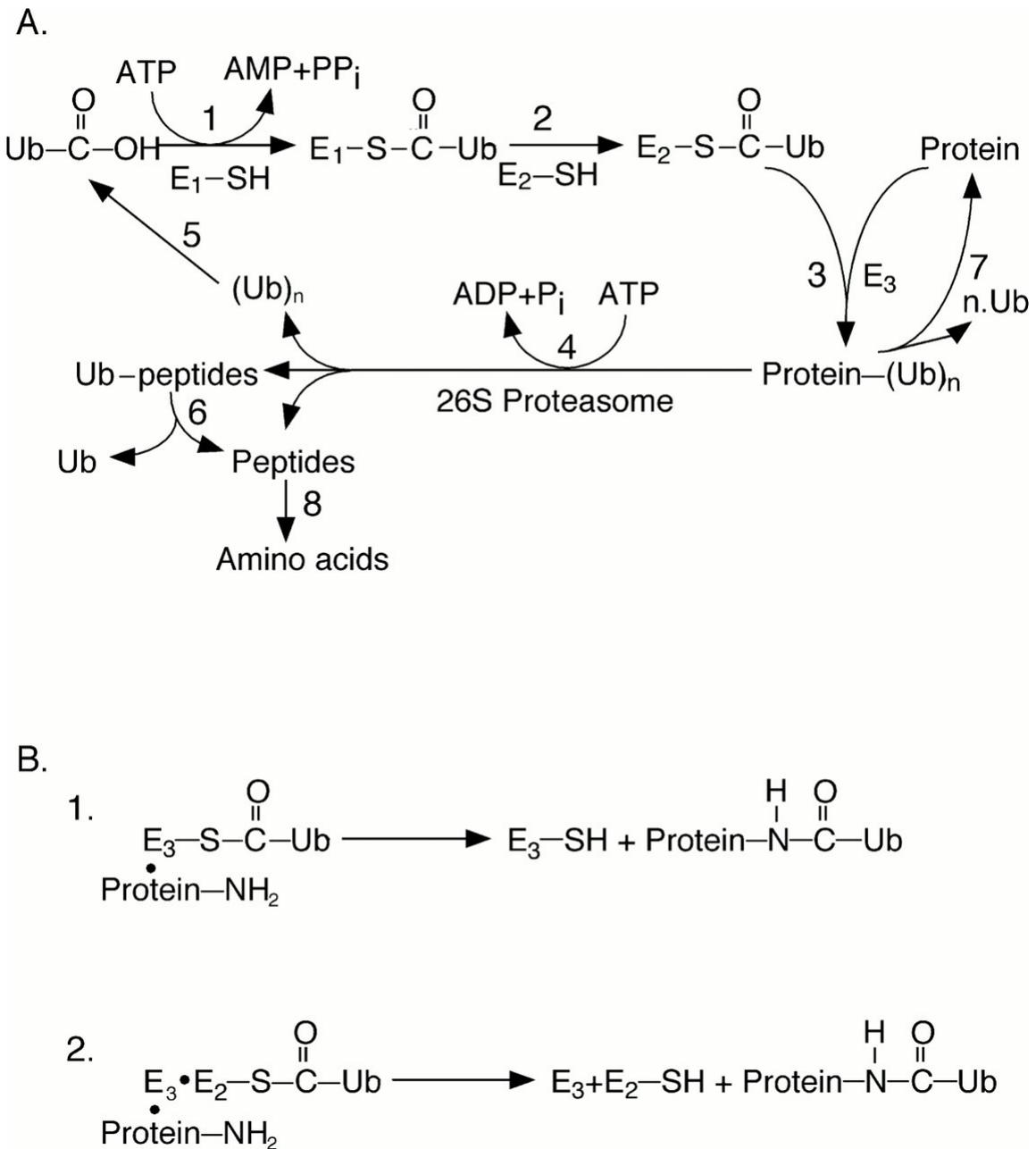


Figura 11: **A)** A seqüência de reações no sistema proteolítico. **B)** Possíveis mecanismos de transferência da Ubiquitina para a proteína-alvo.

*Imagem de Hershko e Ciechanover (1998)

Pelo fato de haverem diversas proteínas a serem reconhecidas no final da mesma cascata de reações, existe um número crescente de moléculas diferente com o decorrer da reação: uma molécula de ubiquitina, duas isoformas de uma enzima E1, algumas enzimas E2, diversas E3 e inúmeras proteínas-alvo (hierarquia do sistema de ubiquitinação).

As E3 ligam-se a proteínas-alvo através de certas pistas para reconhecimento, tais como a presença de um aminoácido N-terminal desestabilizante ou estruturas fosforiladas ou hidroxiladas (CIECHANOVER; BEM-SAADON, 2004). Por outro lado, acetilação inibe a ubiquitinação.

São dois os principais grupos de E3 (HATAKEYAMA; NAKAYAMA, 2003): o primeiro grupo é constituído pelas RING (Really Interesting New Gene) e pelas estruturalmente relacionadas a U-Box e o segundo pelas HECT (Homologous to E6-associated Protein C Terminus). A diferença principal entre elas está no modo de interação com as proteínas-alvo: o primeiro grupo liga-se simultaneamente à E2 e à proteína-alvo, promovendo transferência direta da molécula de ubiquitina de E2 para a proteína-alvo. No segundo grupo, a transferência de Ubiquitina ocorre inicialmente para o domínio HECT deste grupo de E3 e, em seguida, deste domínio para a proteína-alvo (WANG; PICKART, 2005).

O passo enzimático promovido pelas E3 consiste na formação de um isopeptídeo entre um resíduo de lisina da molécula de ubiquitina (Figuras 12 e 13) ao grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina do substrato ou de uma molécula de ubiquitina já previamente conjugada ao substrato. Algumas vezes, um grupo

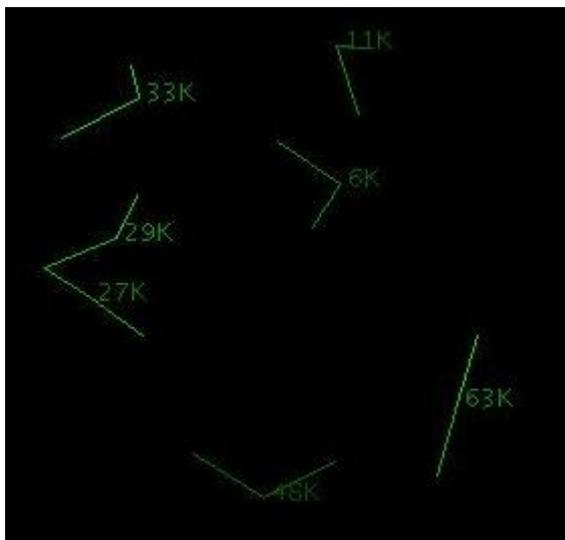


Figura 13: Apenas os resíduos de Lisina da imagem anterior

* Imagem com resolução de 1,8Å, visualizada pelo aplicativo java WebMol, em RCSB PROTEIN DATA BANK, através de dados obtidos por Vijay-Kumar, Bugg e Cook (1987)

1.3. Anatomia Ocular

Uma visão detalhada do Sistema Visual e suas estruturas é muito complexa e está além do escopo desta introdução, no entanto, para podermos compreender o desenvolvimento do projeto, realizaremos uma breve descrição.

O olho tem o formato aproximado de uma esfera, com 25mm de diâmetro e com um volume de 6,5ml. No entanto, numa descrição mais próxima do real, pode-se considerar como duas esferas interseccionadas (Figura 14), uma com um raio variando em torno de 7,8mm e outra com raio variando em torno de 11,5mm, sendo que a primeira posiciona-se anteriormente e cobre 1/6 da superfície ocular (córnea).

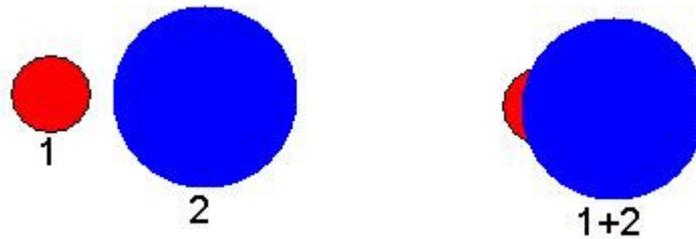


Figura 14: A projeção de duas esferas dando o formato do globo ocular

Sua parede é constituída de três camadas (túnicas), sendo uma fibrosa (córneo-escleral), uma intermediária, altamente vascularizada (úvea) e a camada neural (retina). Nem todas as camadas estão necessariamente presentes em todas as partes da parede. Por exemplo, a retina está presente somente no segmento posterior, enquanto a córnea é a única parede do pólo anterior. As túnicas envolvem os “meios transparentes”, que consistem no humor aquoso, cristalino e humor vítreo.

1.3.1. A Camada Externa (Figuras 15 e 17)

1.3.1.1. A Córnea

Além da função mecânica (dar formato ao globo ocular, proteger contra traumas mecânicos e infecção), a córnea é responsável por grande parte da refração da luz no sistema ocular (poder refrativo próprio e pela interface ar-tecido). A transparência é propriedade de suma importância, sendo obtida através de uma diversidade de fatores, como a regularidade do epitélio, sua

avascularidade e o arranjo regular dos componentes intra e extracelulares, que por sua vez são dependentes do estado de hidratação, nutrição e metabolismo. Embora seu diâmetro vertical seja menor que o horizontal (10,6x11,7mm), aparenta ter circunferência regular, a olho nu. Seu poder de convergência dá-se por dois motivos, sendo o mais importante deles a diferença de refração dos meios ar-tecido, além de ser uma lente positiva (o centro é mais fino que a periferia: 0,67 x 0,52mm). É composta de cinco camadas, sendo a mais superficial o epitélio (do tipo pavimentoso não-queratinizado), com aproximadamente 50-60µm de espessura. Logo abaixo, está a camada de Bowman, uma região acelular do estroma, com 8-12µm de espessura, composta por fibrilas de colágeno (tipos I, III, V e VI). Em seguida, está o estroma, a mais espessa das camadas da córnea, composta de 200 a 250 lamelas de 2µm cada, orientadas paralelamente à superfície da córnea. Abaixo desta, está a Descemet, que é uma fina e homogênea camada com 8-12µm de espessura e representa a membrana basal do endotélio corneano. O endotélio corneano é do tipo escamoso simples, tendo como principal papel manter o estado ideal de hidratação da córnea e, conseqüentemente, sua transparência. Suas células formam mosaicos, têm 5-6µm de altura e 18-20µm de diâmetro, em situações fisiológicas. Têm baixa capacidade regenerativa e quando ocorre perda endotelial por adversidades ou patologias, as células adjacentes se redistribuem e aumentam de tamanho para cobrir a área falha. Quando a perda se torna muito severa (do normal 3-4000 células/mm² para menos de 800 células/mm²), o estroma fica hiper-hidratado e, conseqüentemente, opaco

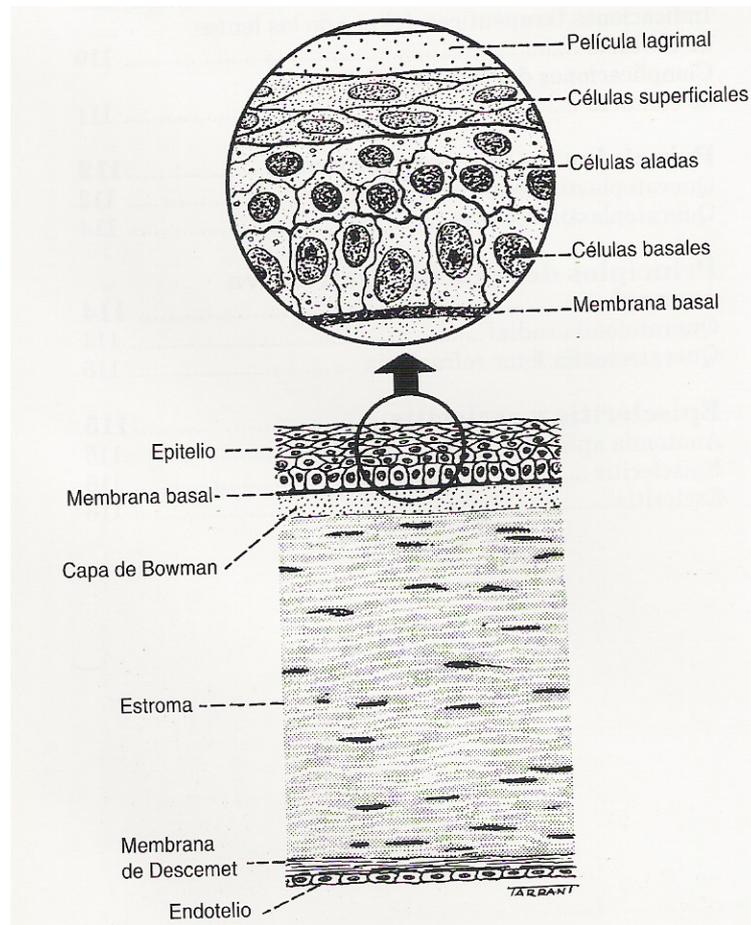


Figura 15: As camadas da córnea. * Imagem de Kanski (1996)

1.3.1.2. A esclera

A esclera compõe a maior parte da túnica externa do olho (5/6 da superfície ocular), tendo como funções proteção mecânica (a traumas e infecções) e manter a estrutura ocular mesmo sob variação de pressão ou sob ação dos músculos adjacentes (internos ou externos).

Tem espessura variável, sendo mais fina na área de inserção da musculatura extrínseca (0,3-0,4mm) e mais espessa no pólo posterior do olho (1mm) e é de origem fibrosa, constituída principalmente de colágeno (tipos I e

III), que se organiza de forma desarranjada, causando opacidade, além de ser bem hidratada.

1.3.1.3. O limbo e o seio camerular

Anatomicamente falando, o limbo é a transição entre a córnea e a esclera, no entanto, é na área de projeção do limbo, envolvendo a úvea, que está o Seio Camerular, onde estão importantes estruturas relacionadas à drenagem do humor aquoso e à manutenção da pressão intra-ocular nos níveis adequados (Figura 16).

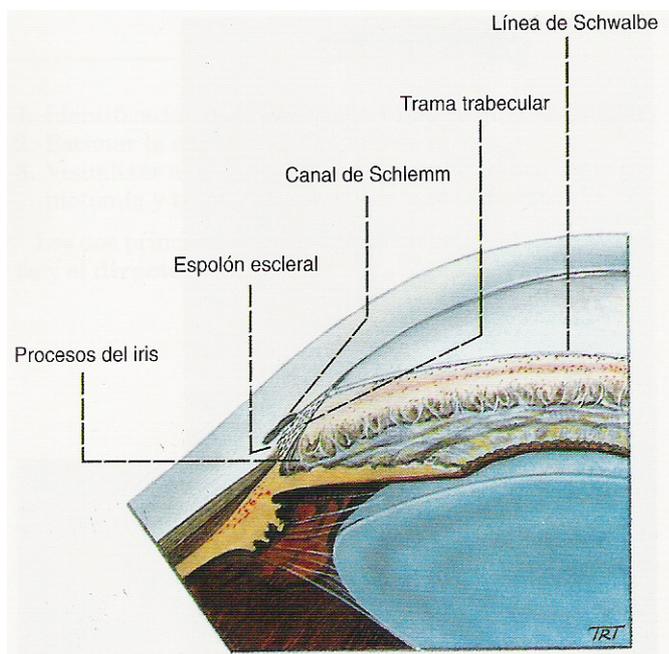


Figura 16: As estruturas do seio camerular. *Imagem de Kanski (1996)

1.3.2. A Úvea

A úvea é a camada intermediária entre a córneo-escleral e a camada nervosa (retina). É ricamente vascularizada e dividida em três componentes, o mais anterior a íris, a mais posterior a coróide e o corpo ciliar entre elas.

1.3.2.1. A íris

A íris (Figura 17) é a parte mais anterior da úvea e consiste numa estrutura com duas disposições diferentes de musculatura, com capacidade de contração dos tipos radial e esfínteriana, conseqüente capacidade diafragmática sobre seu orifício central (pupila), causando sua diminuição (miose) ou aumento (midríase). Com esta capacidade, a íris é capaz de controlar a quantidade de luz que penetra dentro do globo ocular.

O espaço compreendido entre a íris e a córnea denomina-se **câmara anterior** e o espaço compreendido entre a íris e o cristalino, é chamado de **câmara posterior**. Ambas são preenchidas pelo **humor aquoso**.

1.3.2.2. O corpo ciliar (Figura 17)

É a parte intermediária da úvea, consistindo num anel com aproximadamente 5mm de largura. É dividido em três partes, sendo o epitélio ciliar, o estroma do corpo ciliar e a musculatura ciliar. Suas principais funções

são: acomodação, produção do humor aquoso e produção da zônula, glicosaminoglicanas do vítreo e colágeno do vítreo.

1.3.2.3. A coróide

É a parte posterior da camada vascular do olho e tem importantes funções, como a nutrição parcial das demais camadas, absorção da luz e a influência na produção do humor aquoso.

1.3.3. O Cristalino e a Zônula*(Figura 17)

O cristalino é uma estrutura altamente organizada, cuja principal função é a refração da luz. Fica suspenso atrás da íris através das fibras do aparato zonular, que o ligam ao corpo ciliar. Mecanismos complexos dão ao cristalino capacidade de acomodar-se (mudar seu formato, de acordo com o tônus da musculatura ciliar), causando mudanças na capacidade refracional do olho (permite focalizar para longe, perto ou distâncias intermediárias). É essencialmente transparente nas fases iniciais da vida, mas em algumas espécies (como o homem, mas não o coelho), torna-se opacificado e sem capacidade de acomodação, com o decorrer da idade, levando ao que se chama de “Catarata”.

1.3.4. O Corpo Vítreo

A cavidade vítrea é a maior cavidade do olho, ocupando aproximadamente um terço do volume total do globo. É preenchido pelo corpo vítreo (ou humor vítreo). É delimitada anteriormente pela face posterior do cristalino e posteriormente pela retina e nervo óptico.

O humor vítreo consiste num gel transparente com hidratação de aproximadamente 98%, é duas a quatro vezes mais viscoso que a água e este índice é diretamente dependente da concentração de hialuronato de sódio. Seus principais componentes são as fibras de colágeno do tipo II (8 a 12nm de diâmetro).

O vítreo é essencialmente acelular, mas células isoladas podem ser encontradas no córtex (parte mais periférica do vítreo), principalmente perto da base vítrea, nervo óptico e vasos retinianos. Quando encontradas, sua maioria é composta de hialócitos. O vítreo tem função estrutural, para manter o formato do olho e dificultar o descolamento de retina.

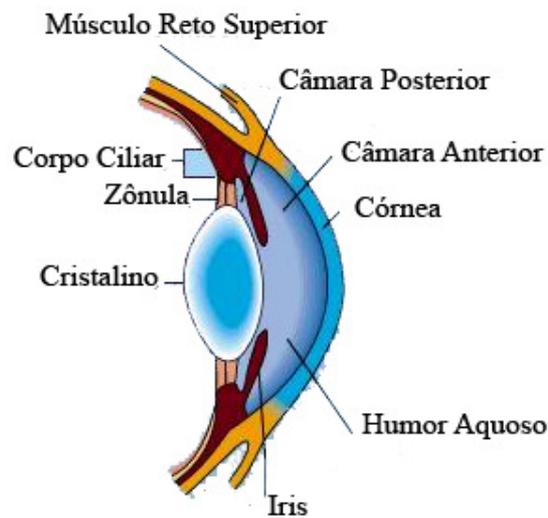


Figura 17: O segmento anterior do olho. *Imagem de Alcon (2000)

1.3.5. Retina (Figura 18)

É a estrutura nervosa justaposta ao pólo posterior do olho, capaz de transformar impulsos luminosos em impulsos nervosos, que são então direcionados ao córtex occipital, onde ocorre a decodificação. Os humanos possuem uma região central, chamada Mácula, onde a visão de detalhes é melhor. Na sua região anterior, a retina torna-se contígua a uma estrutura resistente e não-nervosa, chamada pars plana, por onde é feito o acesso no caso de injeções intra-vítreas ou cirurgias.

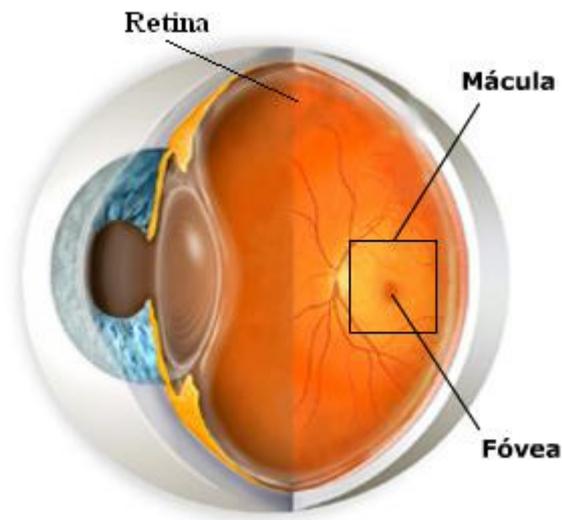


Figura 18: Aspecto do pólo posterior e sua relação com o segmento anterior.
* Imagem de Novartis (2007)

1.4. O Humor Aquoso

Humor aquoso é o nome dado ao fluido transparente que preenche as câmaras anterior e posterior do olho (Figura 17). É produzido pelo epitélio não-pigmentado do corpo ciliar e absorvido pelo trabeculado (Figura 16). Ele banha o cristalino, a face posterior da córnea e a malha trabecular, que são estruturas avasculares, proporcionando a eles nutrientes essenciais e removendo seus metabólitos. Dada à importância da transparência para o sistema visual, é de suma importância que se mantenha essencialmente livre de proteínas refringentes e células. Através da zônula (fibras descontínuas que mantêm o cristalino suspenso em contato com o corpo ciliar), o humor aquoso atinge também a câmara vítrea.

A Tabela 3 mostra as concentrações relativas de eletrólitos, solutos orgânicos de baixo peso molecular e proteínas, no humor aquoso e plasma de coelhos e humanos.

Tabela 3: Eletrólitos e solutos orgânicos no humor aquoso e plasma. (RILEY, 1983¹ apud HARDING, 1997).

	Coelho		Homem	
	<i>Aquoso</i>	<i>Plasma</i>	<i>Aquoso</i>	<i>Plasma</i>
Eletrólitos (mM)				
Na ⁺	143.0	146.0	142.0	137.5
K ⁺	4.7	4.8	4.0	4.3
Ca ²⁺	1.7	3.1	1.2	2.3
Mg ²⁺	0.7	0.9	1.0	1.2
Cl ⁻	105.0	112.0	131.0	108.5
HCO ₃ ⁻	27.7	24.0	20.0	27.0
H ₂ PO ₃ ⁻	0.9	1.5	0.6	1.1
Solutos Orgânicos (mM)				
Lactato	12.10	8.20	4.50	0.65
Ascorbato	0,96	0,02	1.10	0.05
Glutationa	17.0	2.0	2.0	4.0
Glicose	6.7	8.3	3.3	6.0
Inositol	0.110	0.010	0.035	0,026
Citrato	0.4	0.3	0.1	0.1
Uréia	6.3	7.3	4.1	4.9
Proteínas Totais	28,0	5700	12,4	7000

Em coelhos, a concentração de Na⁺, K⁺, Cl⁻ e HCO₃⁻ nos dois fluidos é semelhante, enquanto a de Ca²⁺ no aquoso é aproximadamente 50% a do plasma. Dos ânions inorgânicos, o Lactato é o mais abundante no humor

¹ RILEY; M. V. The chemistry of aqueous humor, in ANDERSON; R. E. **Biochemistry of the eye**, Primeira Edição, American Academy of Ophthalmology, 1983, San Francisco, p. 79-95

aquoso, estando quase 50% mais concentrado que no plasma. O Ácido Ascórbico é o único que tem concentração muito desproporcional entre os dois fluidos, em favor do humor aquoso (48x).

Além destes, também foram descritos acetato, acetoacetato, alanina, ascorbato, citrato, creatina, glicose, glutamina-glutamato, β -hidroxibutirato, lactato, treonina e valina (BROWN et al, 1986).

A Glutathione, um tripeptídeo, contendo um grupo sulfidril, também está presente no humor aquoso em concentrações consideravelmente maiores que no plasma de coelhos, no entanto, nos eritrócitos, a concentração é em torno de 1000 vezes maior que no plasma. Sua função orgânica é atuar como tampão sulfidril e transportar aminoácidos, além de ser capaz de proteger contra danos oxidativos, reagindo com peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos. Em coelhos, o peróxido de hidrogênio é gerado constantemente, de maneira fisiológica não-enzimática (HARDING, 1997).

A quantidade total de proteínas no aquoso, tanto de coelhos quanto de humanos é muito baixa, em torno de 1/200 e 1/500 do nível plasmático, respectivamente. A albumina corresponde a aproximadamente metade do total de proteínas, mas também foram identificados transferina, IgG, IgM, fragmentos de cadeia pesada destes anticorpos e γ -cristalina e diversos polipeptídeos, de 170, 130, 110, 80, 67, 60, 42, 34, 28, 25, 22, 16 e 14 kDa.

Nos nossos levantamentos bibliográficos, não notamos nenhuma menção a respeito do Proteassoma, especificamente falando.

1.5. O Proteassoma em Patologias Oculares e Sistêmicas

Até a década de 1970, a idéia de um sistema proteolítico que fosse dependente de gasto de energia (ATP) era visto com certo ceticismo, até que diversos laboratórios identificaram o Proteassoma de formas e origens diferentes, chegando à conclusão de que este processo não somente existia como era de suma importância para a viabilidade celular (COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996).

As pesquisas iniciais concentraram-se em descrever a morfologia, funções, interações e ubiquidade da molécula, no entanto, numa segunda fase, grande esforço tem sido aplicado para desvendar seus mistérios dentro do próprio organismo humano e possivelmente a aplicação destes conhecimentos na medicina.

Assim, nos últimos anos, diversos trabalhos têm investigado suas variações em situações patológicas, com resultados muitas vezes surpreendentes. Inicialmente, foram demonstrados altos níveis de Proteassoma em células leucêmicas (KUMATORI et al., 1990). Em seguida, alterações de seus níveis em tumores sólidos (LENZ, 2003) e outras patologias sistêmicas não-tumorais, como doença de Alzheimer (DING; KELLER, 2003), Doença de Parkinson (MOORE; DAWSON, V.; DAWSON, T., 2003; OLANOW; MCNAUGHT, 2006) e ao próprio envelhecimento (HUSOM et al., 2004) (neste, há redução da quantidade de Proteassoma) ou auto-imunes (WANG; MALDONADO, 2006) bem como analisada a variação tecidual normal deste complexo (o fígado, por exemplo, possui, normalmente, altos níveis de

proteassoma se comparados com a musculatura esquelética) (FUJIWARA et al., 1989).

Pela grande variedade de funções do UPS e por ocorrerem modificações em estados patológicos, imaginou-se que talvez sua modulação pudesse implicar possibilidades terapêuticas (TEICHER et al., 1999; ROBERTS; GORES, 2006; BOCCADORO; MORGAN; CAVENAGH, 2005; HERRMANN; LERMAN, L.; LERMAN, A., 2007). Assim, constatou-se que linhagens de células tumorais eram suscetíveis à indução de apoptose em concentrações muito menores de inibidores do Proteassoma do que linhagens de células normais.

Desenvolveram-se então diversos estudos experimentais para avaliar a possibilidade do uso destes inibidores em animais e se poderia haver uma janela terapêutica na qual uma dose tóxica a células tumorais pudesse ser relativamente bem suportada pelas demais células (LIGHTCAP et al., 2000; MONTAGUT et al., 2005; KONSTANTINOPOULOS; PAPAVALASSILIOU, 2006). Assim, constatou-se que os peptídeos aldeídicos (VINITSKY et al., 1994) capazes de inibir o Proteassoma poderiam ser promissores (CHAUHAN; HIDEHIMA; ANDERSON, 2006; FRIBLEY et al., 2006). O Bortezomib consiste em um peptídeo borônico (peptídeo aldeídico cujo aldeído foi substituído por ácido borônico, para diminuir a estabilidade da ligação com a subunidade-alvo do Proteassoma e, conseqüentemente, sua toxicidade) que está em uso clínico, após aprovação pelo “Food and Drugs Administration” (FDA) e tem demonstrado resultados promissores no tratamento de Mieloma Múltiplo (KROPFF et al., 2006).

A indução de apoptose pela inibição do Proteassoma não é bem compreendida e não existe consenso quanto ao seu mecanismo (ou mecanismos) de ação, no entanto, cinco hipóteses são plausíveis:

- 1. Inibição do NF- κ B:** O fator transcricional NF- κ B é necessário para expressão de diversas proteínas relacionadas a respostas imunes e inflamatórias, incluindo citocinas e moléculas para adesão celular. Normalmente, permanece no citoplasma em uma forma inativa, uma pró-proteína de 105kDa que fica acoplada a um fator inibitório, o I- κ B. Fatores inflamatórios, como o TNF- α , estimulam a ubiquitinação e conseqüente completa degradação do inibidor I- κ B, bem como a degradação parcial da cadeia de 105kDa do NF- κ B para uma de 50kDa, a forma ativa, que se transloca para o núcleo celular, ativando genes que, entre outros fatores, inibem a apoptose e promovem a proliferação celular. A inibição do Proteassoma mostrou-se capaz de bloquear o processo (VODANOVIC-JANKOVIC et al., 2006);
- 2. Apoptose induzida por stress do retículo endoplasmático:** Com a inibição do proteassoma, ocorre rápido e intenso acúmulo de proteínas não-maturadas no retículo endoplasmático, além de ocorrer desequilíbrio no mecanismo de compensação (UPR- Unfolded Protein Response) (OBENG et al., 2006), mas o mecanismo não está esclarecido.
- 3. Via Dependente de p53:** A proteína do gene supressor de tumores p53 promove alongamento do ciclo celular até a estabilização do

DNA. Quando esta estabilização não é possível, induz à apoptose. Normalmente, tem meia vida breve, principalmente inativado pelo UPS. A inibição do Proteassoma promove aumento do seu tempo de ação, com conseqüente indução de apoptose (CHEN et al., 2000).

- 4. Via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase):** As MAPK constituem uma família de proteína-quinases que transduzem sinais da membrana celular ao núcleo por fosforilação de resíduos específicos serina/treonina das proteínas substrato alvo. Existem três sub-famílias: Quinases extracelulares sinal-reguladas (ERKs), c-jun N-terminal quinases (JNKs) e p38 MAPKS. As ERKs são ativadas em resposta a estímulos de crescimento e diferenciação. As JNKs e p38 são ativadas por diversos tipos de stress. O tratamento com inibidores do Proteassoma induzem a ativação das JNKs em células tumorais (SHI; SMALL; ORLOWSKI, 2006). Além disso, o bloqueio das JNKs é capaz de reverter o estímulo de apoptose causado pelos inibidores do Proteassoma.
- 5. Via dependente da subfamília Pró-Apoptótica das Bcl-2:** As proteínas da família Bcl-2 são reguladoras centrais da apoptose. Podem ser da família pró-apoptótica ou anti-apoptótica. O controle da degradação de diversos membros da família pró-apoptótica, como Bid, Bax, Bak, Bik e Bim é realizada pelo UPS. Assim, a inibição da atividade do Proteassoma causa desequilíbrio no sistema das Bcl-2, em favor do aumento da subfamília pró-apoptótica (DEMARCHI; BRANCOLINI, 2005).

Todas as células do indivíduo são suscetíveis a serem afetadas pelos inibidores do Proteassoma, no entanto, pelo fato de as células tumorais estarem em alto catabolismo e divisão acelerada, são mais propensas a responderem ao tratamento (ADAMS, 2003), que tem dado resultados como monoterapia ou como adjuvante de outros quimioterápicos (KONSTANTINOPOULOS; PAPAVALASSILIOU, 2006).

Com relação ao sistema visual, diversos trabalhos têm estudado tecidos específicos do globo ocular, relacionando, por exemplo, a redução da quantidade e atividade do Proteassoma com envelhecimento retiniano (LOUIE; KAPPAHN; FERRINGTON, 2002), a atividade deste complexo proteolítico *in vitro* sobre proteínas do cristalino degradadas por radiação ultravioleta (SOMMERBURG et al., 1998) e até sobre a presença das diversas isoformas do Proteassoma nas diferentes fases de desenvolvimento do cristalino (CAI; SINGH; WAGNER, 1998).

Em 2002, Wunderlich et al. realizaram um estudo no qual demonstraram que pacientes com diagnóstico de glaucoma primário de ângulo aberto e glaucoma de pressão normal, firmados com critérios baseados em escavação do nervo óptico, defeitos característicos de campo visual e pressões intra-oculares características (alta no primeiro grupo, porém controlada e nunca maior que 21mmHg no segundo grupo) possuem aumento nos níveis de proteassoma nos leucócitos sistêmicos, se comparados com indivíduos não glaucomatosos (método semi-quantitativo, Figura 19).

Baseados nestes resultados, sugerem que a morte das células ganglionares poderia estar relacionada não somente à compressão física, mas

também à ativação do fator transcricional NF- κ B por estímulo isquêmico, o que induziria apoptose (KARIN;BEN-NERIAH, 2000).

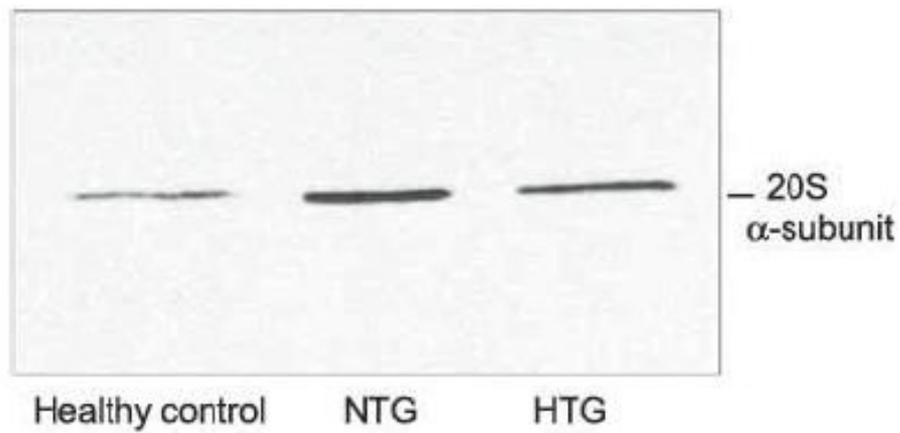


Figura 19: Aumento semi-quantitativo do Proteassoma em pacientes com Glaucoma de Pressão Normal (NTG) e de Pressão Alta (HTG), comparados com indivíduos normais (Healthy control). *Figura de Wunderlich et al. (2002)

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

1. Investigar se o Proteassoma 20S está presente no humor aquoso;
2. Determinar se o Proteassoma encontrado tem capacidade proteolítica preservada;
3. Investigar se estão presentes compostos que possam ser alvo do Proteassoma, no mesmo meio;
4. Eliminar a possibilidade de o Proteassoma encontrado ser de origem celular, comprovando a acelularidade do meio através de citocentrifugação e análise das lâminas obtidas;
5. Investigar se o Proteassoma pode ser reencontrado no mesmo meio após sua eliminação (verificar se o meio é capaz de repor o Proteassoma presente).
6. Investigar a presença de Proteassoma no humor vítreo;
7. Investigar se o Proteassoma encontrado no humor vítreo está ativo;
8. Investigar a presença de possíveis substratos do Proteassoma no humor vítreo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Os Animais e a Técnica de Coleta do Material

Foram colhidas amostras de humor aquoso de ambos os olhos, sem distinção, de 20 coelhos albinos jovens, com peso entre 2 e 2,5kg, raça Nova Zelândia, de ambos os sexos.

Os coelhos foram sempre pedidos com um dia de antecedência ao Biotério Central da Cidade Universitária do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, encaminhados ao Setor de Cirurgia Experimental do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, onde eram normalmente cuidados e alimentados até o momento do procedimento.

Através de punção venosa em uma das orelhas de cada animal, foram ministradas drogas anestésicas (Quetamina e Xilasina) em quantidade suficiente para causar sedação. Anestesia tópica com colírio (proximetacaína) ajudava a minimizar a dor ao procedimento.

Em geral, procuramos realizar a coleta de quatro olhos (dois animais) por vez, da seguinte forma:

1. Paracentese do primeiro olho do primeiro coelho e estocagem do material;
2. Paracentese do segundo olho do primeiro coelho e estocagem do material;
3. Paracentese do primeiro olho do segundo coelho e estocagem do material;

4. Aspiração parcial do corpo vítreo do segundo olho do segundo coelho e estocagem do material;
5. Pausa por 15 minutos;
6. Nova paracentese do primeiro olho do primeiro coelho e estocagem do material;
7. Nova paracentese do segundo olho do primeiro coelho e estocagem do material;
8. Nova paracentese do primeiro olho do segundo coelho e estocagem do material;
9. Sacrifício dos animais, através de aumento da dose injetada de sedativos.

A paracentese consiste em acessar o humor aquoso presente na câmara anterior do olho através de punção com agulha fina (28 gauge) através da córnea, em inclinação tão tangencial quanto possível com relação ao plano da face interna da córnea, com o objetivo de realizar drenagem, o menos traumática possível, e com pertuito auto-selante, evitando tocar nas estruturas sólidas internas (íris e cristalino). A drenagem do humor aquoso era realizada através de punção do olho, via pars plana, com agulha grossa (20 gauge). A estocagem do material era realizada em *eppendorfs* e imediatamente acondicionada em meio isolado com flocos de gelo.

No decorrer dos experimentos, notamos que 15 minutos é o tempo em que ocorre a mais rápida reposição do humor aquoso drenado na primeira

punção. Com este tempo, o olho permanece hipotônico, mas já é possível fazer a segunda coleta.

Amostras semelhantes eram acondicionadas conjuntamente, isto é, um *ependorf* com humor aquoso poderia conter amostras de diversos olhos de diversos coelhos, mas nunca um humor aquoso de segunda coleta. Estes, por sua vez, também eram acondicionados em tubo único, independentemente de quais olhos foram os doadores. Quanto ao humor vítreo, era sempre proveniente de um único olho.

3.2. Investigação de Celularidade

Com o material recolhido (em média 0,3 ml de humor aquoso de cada olho, 0,1ml de humor aquoso “refeito” (ou secundário) e 0,3ml de humor vítreo) e acomodado em gelo, seguia-se centrifugação com técnica de citologia médica, para evitar dano celular (1500rpm por 5 minutos, em centrífuga refrigerada). As amostras de humor aquoso não formam *pellet* (*grânulos*), enquanto as de humor aquoso refeito e humor vítreo o fazem. Utilizamos apenas o sobrenadante, que era separado e armazenado a -70°C. O processo todo, do início da coleta até a estocagem final durou, em geral, menos de uma hora.

Obtivemos, portanto, três tipos de amostras:

1. Humor aquoso (primeira paracentese);
2. Humor aquoso “refeito” (segunda paracentese);
3. Humor vítreo (punção única).

3.3. A Dosagem de Proteínas

Utilizamos o ensaio de ácido bicinchonínico (Perbio BCA Protein Assay Kit), da seguinte forma:

1. Cálculo da quantidade de solução reagente;
2. Preparo da solução reagente A+B, na proporção 50A:1B;
3. Preparo das amostras em duplicatas, na proporção 19 reagente:1 amostra;
4. Preparo dos pontos da curva de espectrofotometria em duplicata (albumina previamente dosada, nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e os pontos brancos, também na proporção 19:1;
5. Incubação em estufa (37°C) por 30 minutos;
6. Interrupção da reação com álcool absoluto;
7. Leitura em espectrofotômetro;
8. Cálculo final das concentrações.

3.4. A Eletroforese

Utilizamos a técnica SDS PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) sob condições desnaturantes, com concentração de bis-acrilamida a 12% (Tabelas 4 e 5), conforme princípios da

técnica descrita por Laemmli² (1970 apud BOLLAG; ROZYCKI; EDELSTEIN, 1996).

Tabela 4: Gel de Concentração

Concentração	3%	4%	5%
Água MilliQ	1,0ml	1,8ml	1,7ml
Tris pH6,8 0,5M	0,75ml	0,75ml	0,75ml
Acrilamida/Bis	0,30ml	0,40ml	0,48 ml
SDS 10%	30µl	30µl	30µl
Persulfato de Amônio 10%	16µl	16µl	16µl
Temed	3µl	3µl	3µl

Tabela 5: Gel de Separação

Concentração	5%	7,5%	10%	12%	15%
Água MilliQ	5,70	4,85	3,95	3,4	2,4
Tris pH 8,8 1,5M	2,5ml	2,5 ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
Acrilamida/Bis	1,7ml	2,5ml	3,4ml	4,0ml	5,0ml
SDS 10%	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
Persulfato de Amônio 10%	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
Temed	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl

A técnica consiste em preparar inicialmente o gel de separação (optamos pela concentração 12%), aplicar nas placas, nivelar com água saturada com sec-butamol e manter em estufa (36°C) até a polimerização. Finalmente, adicionar o segundo nível de gel (gel de concentração 5%) e manter em estufa até a polimerização. Após o gel pronto, era imerso em tampão de corrida na cuba (aparato minigel), onde distribuimos as amostras

2 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Inglaterra, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 15 de agosto de 1970.

em duplicatas em seus devidos “poços”, no volume máximo de 14 μ l, com quantidade total de proteínas de 20 μ g.

Conforme discutido no próximo capítulo (resultados), a concentração de proteínas do humor aquoso é muito baixa (em torno de 0,7 μ g/ μ l), havendo a necessidade, portanto, de concentrar amostras maiores em centrífugas a vácuo, para desidratação. As demais amostras (humor aquoso feito e humor vítreo) eram mais concentradas e não exigiam o mesmo procedimento. Todas as amostras eram diluídas em tampão específico (tampão da amostra) e desnaturadas através de calor (mergulhadas em água fervente por 5 minutos). A amostra referente ao “peso molecular” já era pré-preparada (Multimark, Invitrogen) e dispensava estes tratamentos (Figura 20). Os géis eram submetidos à tensão de 97-98mV por tempo variável e o processo interrompido quando a linha de corrida encontrava-se a aproximadamente meio a um centímetro do final da placa. A revelação do gel réplica era realizada através de coloração com Coomassie.

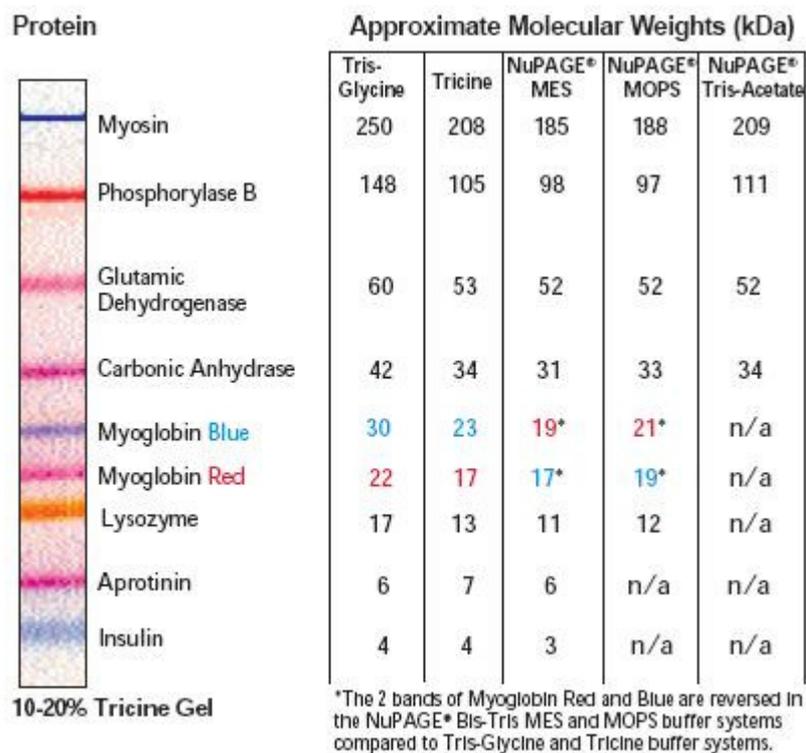


Figura 20: Padrão de peso molecular

3.4.1. Tampões e Corante

3.4.1.1. Tampão de corrida

Tris	3,0g
Glicina	14,4g
SDS	1g
Água MilliQ	Até completar 1 litro

3.4.1.2. Tampão da amostra

Água MilliQ:	3,8ml
Tris-HCl pH 6,8 0,5M:	1,0ml
Glicerol:	0,8ml
SDS 10%:	1,6ml
2-Mercaptoetanol:	0,4ml
Azul de Bromofenol:	0,4ml

3.4.1.3. Coomassie

Brilhante Blue R 250 2%	45ml
Etanol Absoluto	45ml
Ácido Acético Glacial	10ml

3.4.1.4. Descorante (de géis corados com Coomassie)

Etanol absoluto:	250ml
Ácido Acético Glacial:	100ml
Água destilada:	650ml

3.5. O Immunoblotting

3.5.1. A Transferência

Os géis submetidos ao processo de Western-Blotting (*Immunoblotting*) possuem duplicatas, que foram previamente coradas com Coomassie. Para realizar a transferência, utilizamos membrana de nitrocelulose Hybond P, específica para proteínas. O processo ocorre com um gel por vez na cuba (aparato electroblotting), a uma voltagem de 90 mW, pelo período de noventa minutos.

3.5.2. Coloração com Ponceau

Após decorrido o tempo adequado para completar a etapa anterior, isolamos a membrana e realizamos coloração da mesma com Ponceau, para verificar se houve transferência das proteínas do gel para essa membrana. Esta coloração, somada à verificação das bandas naturalmente coloridas na coluna de identificação do peso molecular, indica boa evolução até o momento.

Para descoloração, utilizamos água MilliQ.

3.5.3. Bloqueio

Pelo fato de a membrana ter alta afinidade por proteínas, é necessário saturá-la com proteínas inespecíficas para a reação. No caso, utilizamos as proteínas do leite bovino (cuja mais abundante é a caseína).

O bloqueio ocorre através da imersão da membrana em Tampão de Bloqueio (20ml), numa placa de Petri e deixando em ambiente resfriado (geladeira) por um período de 10 a 14 horas (“overnight”).

3.5.4. Incubação com o Anticorpo Primário

Após o período de bloqueio, é necessário retirar o excesso de proteínas do leite da membrana, com tampão de lavagem. Inicialmente, desprezamos o tampão de bloqueio contido na placa de Petri, seguida de nova imersão, com o novo tampão (10ml), mantendo em temperatura ambiente, sob agitação, por 5 minutos. O processo é repetido mais duas vezes (lavagem 3x/5min/10ml).

1. Desta vez, a membrana permanece imersa em tampão de Immunoblotting (6ml), sendo adicionado a quantidade ideal de anticorpos, que é indicada pelo fabricante. Para identificação do Proteassoma, utilizamos anticorpo monoclonal anti-subunidades alfa 1, 2, 3, 5, 6 e 7 (Biomol Affiniti), na proporção 1:1000, ou seja, 6 μ l da amostra com o anticorpo para os 6ml de tampão. Para identificação da

molécula de ubiquitina, utilizamos anticorpos oriundos de coelhos (Sigma), na proporção 1:200, ou seja, 30µl de amostra contendo anticorpos para os 6ml de tampão. Este processo de incubação é realizado por 3 horas, em temperatura ambiente, sob agitação.

3.5.5. Incubação com o Anticorpo Secundário

Desprezamos o tampão contendo o anticorpo primário da placa de Petri e realizamos nova lavagem com tampão de lavagem, seguindo a mesma técnica descrita anteriormente, para retirada do tampão de bloqueio (3x/5min/10ml).

O tampão de incubação é o mesmo tampão de *Immunoblotting* descrito acima, com diferença apenas do anticorpo utilizado, que desta vez é específico ao anticorpo primário. A proporção utilizada foi 1:2000 em todos os casos. Esta etapa durou 90 minutos e ao seu término, realizamos nova lavagem (3x/min/10ml).

3.5.6. Revelação

Em câmara escura, mergulhamos a membrana em 6ml de NBT/BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine / Nitro-Blue Tetrazolium Chloride), mantendo sob agitação por 10 minutos. Ao fim do prazo, a membrana foi lavada com água destilada, desidratada e registrada.

3.5.7. Tampões

3.5.7.1. Tampão de transferência

14,4g de glicina
3,0g de tris
200ml de etanol
Água MilliQ até completar 1 litro

3.5.7.2. Tampão de bloqueio

1,25ml de Tris-HCl pH 7,5 1M
1,25g de leite desnatado
75µl de Tween20
Água MilliQ até completar 25ml

3.5.7.3. Tampão de lavagem

10ml de Tris-HCl pH 7,5 1M
990ml de Água MilliQ

3.5.7.4. Tampão de immunoblotting

2,5ml de Tris-HCl pH 7,5 1M
2,5g de leite desnatado
1,5ml de NaCl 5M
25µl de Tween20
Água MilliQ até completar 50ml

3.6. Ensaio de atividade

Para verificar se o Proteassoma das amostras colhidas tinha atividade, utilizamos o substrato Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC, PM 763.9), que é passível de degradação pelo Proteassoma 20S, gerando resíduo fluorogênico. Foi adquirido da empresa Biomol em forma liofilizada, sendo então diluído em solução dimetil sulfóxido (DMSO) a 10mM.

Para o preparo de cada *eppendorf*, utilizamos:

- Tris-HCl pH 7,5 1M:	12µl
- DTT 0,1M:	2,4µl
- MgCl ₂ :	2,4µl
- Suc-LLVY-AMC:	1,2µl
- MG132 (nas amostras inibidas)	0,6µl
- Proteínas (volume necessário para):	100µg
- Água MilliQ:	Completar até 240µl de solução total

Amostras utilizadas:

A1	Humor Aquoso
A2	Humor Aquoso
A3	Humor Aquoso com Inibidor do Proteassoma
A4	Humor Aquoso com Inibidor do Proteassoma
R1	Humor Aquoso Refeito
R2	Humor Aquoso Refeito
R3	Humor Aquoso Refeito com Inibidor do Proteassoma
R4	Humor Aquoso Refeito com Inibidor do Proteassoma
V1	Humor Vítreo
V2	Humor Vítreo
V3	Humor Vítreo com Inibidor do Proteassoma
V4	Humor Vítreo com Inibidor do Proteassoma
B1	Branco*
B2	Branco*
PM1	Ponto Máximo**
PM2	Ponto Máximo**

As amostras “brancas” não contêm nenhuma das soluções protéicas testadas, apenas água e demais reagentes.

As amostras foram deixadas em incubação à estufa (temperatura de 37°C) por um período de 30 minutos e as reações foram então interrompidas com etanol absoluto, exceto as do Ponto Máximo, que continham 100µg de proteínas do humor aquoso refeito e foi mantida ativa até o momento anterior à leitura.

4. RESULTADOS

4.1. Investigação de Celularidade

Embora o humor aquoso seja um componente sabidamente sem componentes celulares em situações fisiológicas, realizamos centrifugação das amostras com a técnica de citologia clínica (1500g, 5min), onde não notamos formação de *pellet* no humor aquoso, mas sim nas amostras de humor aquoso refeito e humor vítreo. Foram preparadas lâminas com o citocentrifugado das amostras (humor aquoso, humor aquoso refeito e humor vítreo), corando com hematoxilina e eosina (H&E):

- a) Citocentrifugado de Humor Aquoso: Nada foi visualizado nas lâminas referentes;
- b) Citocentrifugado de Humor Aquoso Refeito: Presença de material proteináceo, com algumas células grandes de núcleo oval (Figuras 21 e 22);
- c) Citocentrifugado de Humor Vítreo: Visualizam-se fibrilas e algumas hemácias (Figuras 23 e 24).

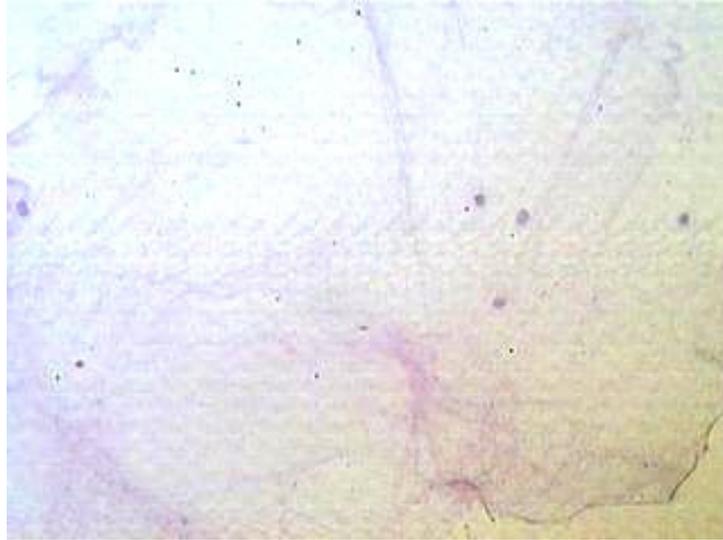


Figura 21: Citocentrifugado de Humor Aquoso Refeito corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 200X

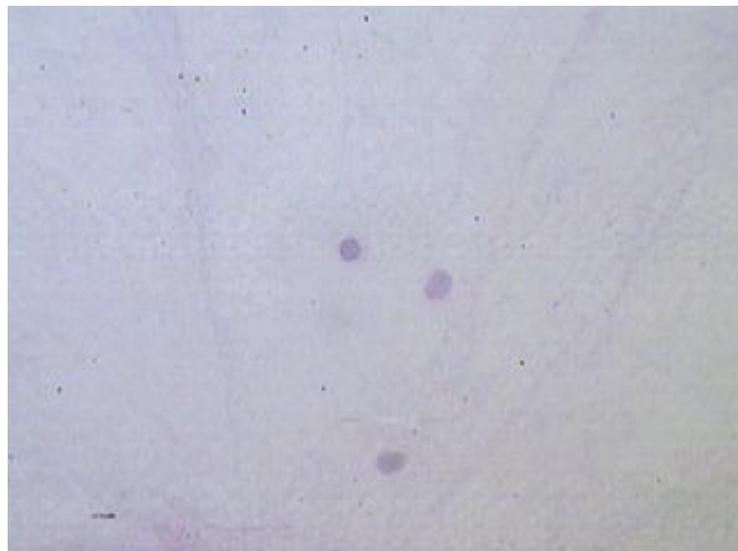


Figura 22: Citocentrifugado de Humor Aquoso Refeito corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 400X



Figura 23- Cito-centrifugado de Humor Vítreo corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 200X

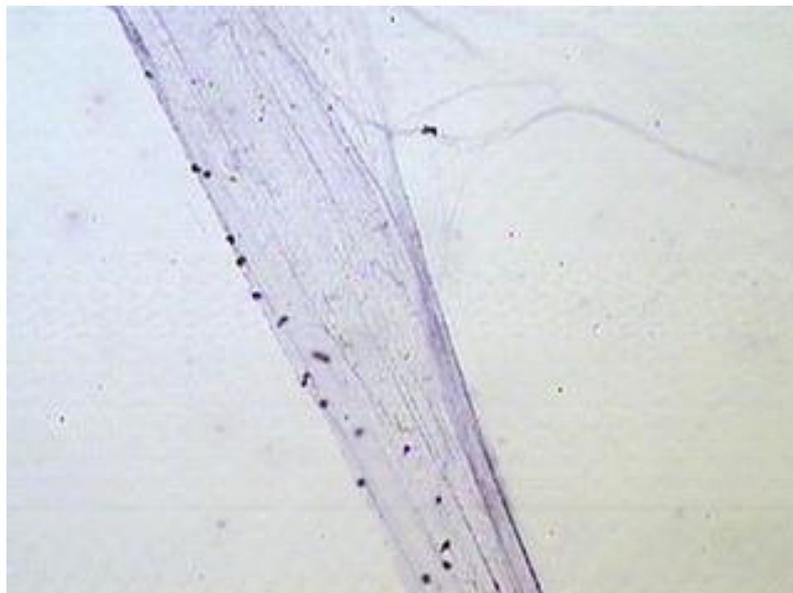


Figura 24- Cito-centrifugado de Humor Vítreo corado com hematoxilina e eosina, em aumento de 400X

4.2. Dosagem de Proteínas

Através do método BCA (Ensaio do Ácido Bicinchonínico), obtivemos dosagens que normalmente eram bastante semelhantes nas diferentes amostras de humor aquoso, mas com grande variação nas demais. Assim, a quantidade de proteínas utilizadas nas eletroforeses e *Western Blottings* era sempre a mesma (20 μ g), mas a quantidade necessária de fluidos era variável.

Humor aquoso:

Com ou sem centrifugação: 0,6 a 0,7 μ g/ μ l

Humor aquoso refeito:

Sem centrifugação: 9 a 15 μ g/ μ l

Com centrifugação: 2,5 a 3,5 μ g/ μ l

Humor Vítreo:

Sem centrifugação: 15 a 80 μ g/ μ l

Com centrifugação: 4 a 7 μ g/ μ l

4.3. SDS-PAGE 12%

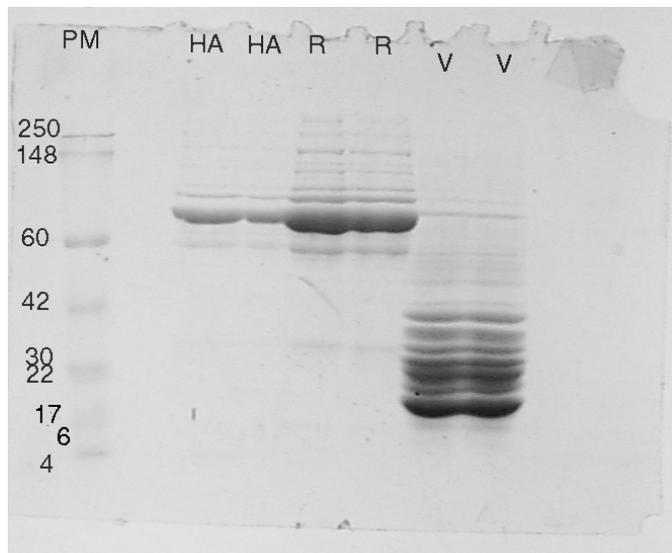


Figura 25: Eletroforese de proteínas em duplicatas. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo. Coloração: Coomassie.

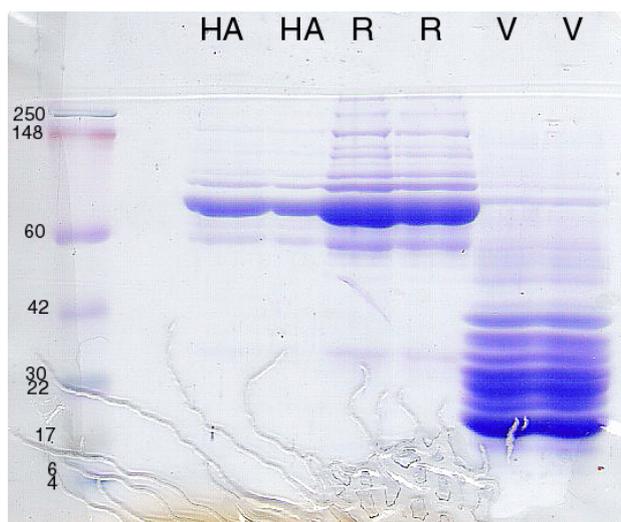


Figura 26: A mesma imagem anterior, colorida. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo. Coloração: Coomassie

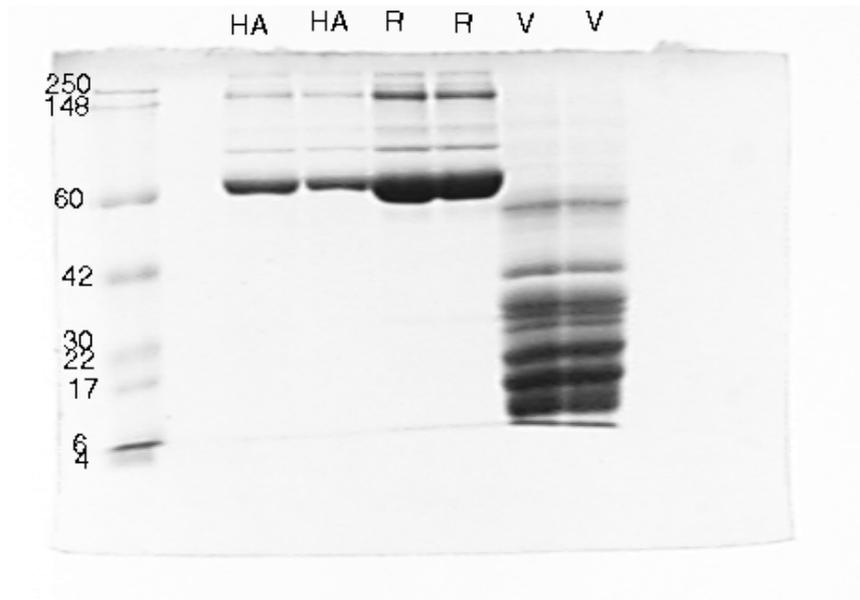


Figura 27: Eletroforese de proteínas em duplicata. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo. Coloração: Coomassie

4.4. *Western Blotting* com Anticorpo Primária Anti-subunidade Alfa do Proteassoma

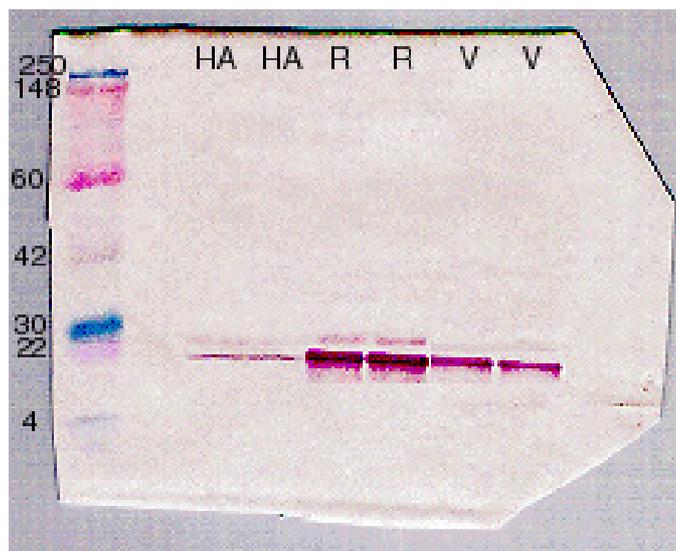


Figura 28: *Western Blotting* evidenciando a subunidade alfa do Proteassoma. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo

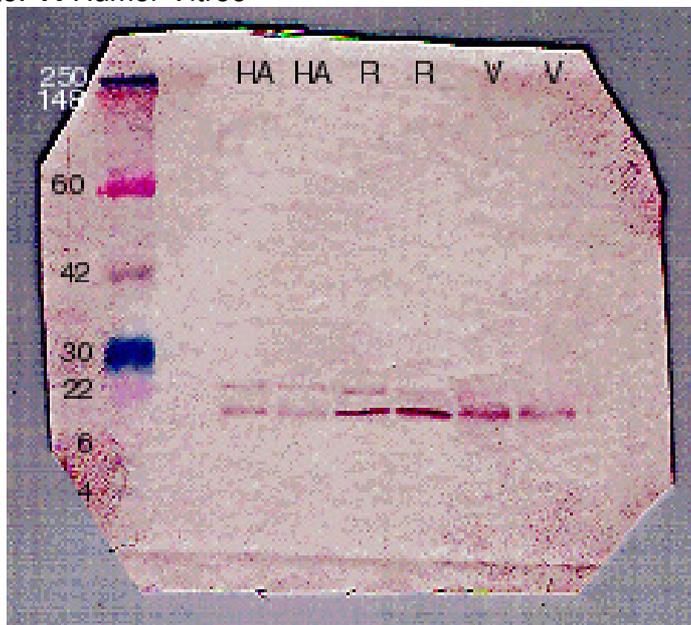


Figura 29: *Western Blotting* evidenciando a subunidade alfa do Proteassoma. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo

4.5. *Western Blotting* com Anticorpo Primário Anti-ubiquitina

Pelo grande número de bandas visualizáveis com esta técnica e por sua intensidade, tivemos certa dificuldade para reproduzir a imagem. Assim, parte dela foi captada com modo leve (evidenciar as bandas) e a segunda parte foi captada com modo intenso (evidenciar o peso molecular). As figuras seguintes consistem, portanto, numa intersecção de ambas.

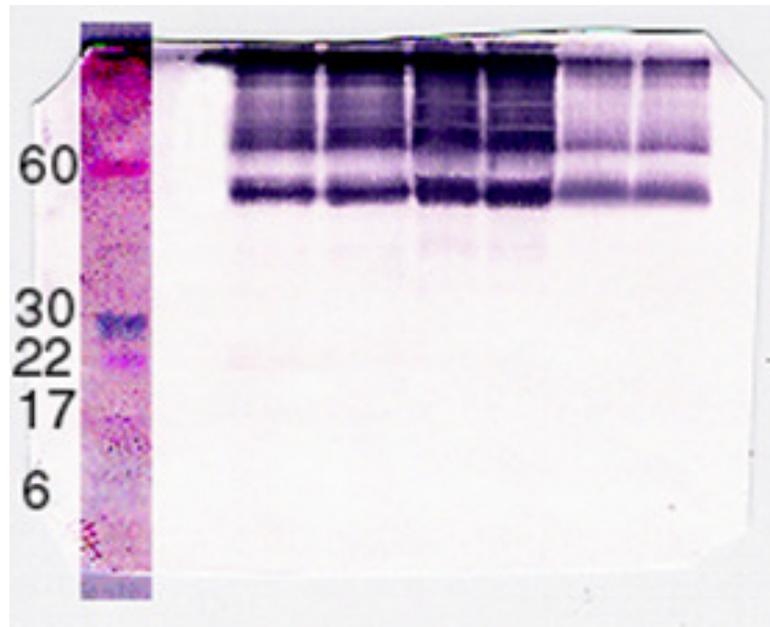


Figura 30: *Western Blotting* evidenciando compostos ubiquitinados. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo

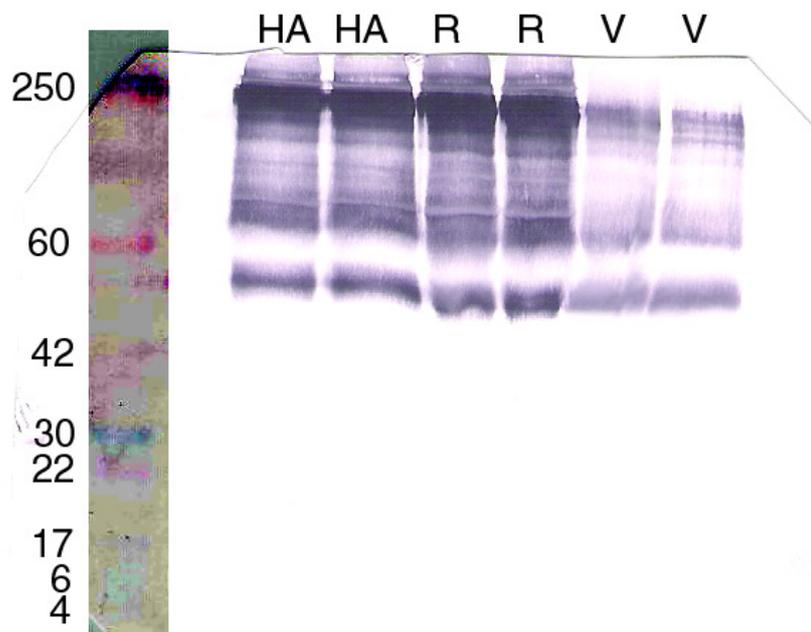


Figura 31: *Western Blotting* evidenciando compostos ubiquitinados. Os números são referentes aos pesos moleculares. **HA:** Humor Aquoso. **R:** Humor Aquoso Refeito. **V:** Humor Vítreo

4.6. Ensaio de Atividade

Este ensaio foi realizado utilizando-se o substrato fluorogênico *N*-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) em todas as amostras, incluindo as brancas e pontos máximos.

Tabela 6: Comparação da atividade do Proteassoma, em escala arbitrária

Amostra	Leitura
Humor Aquoso	145
Humor Aquoso (Duplicata)	160
Humor Aquoso com Inibidor MG132	10
Humor Aquoso com Inibidor MG132 (Duplicata)	0
Humor Aquoso Refeito	110
Humor Aquoso Refeito (Duplicata)	105
Humor Aquoso Refeito com Inibidor MG132	5
Humor Aquoso Refeito com Inibidor MG132 (Duplicata)	7
Humor Vítreo	600
Humor Vítreo (Duplicata)	470
Humor Vítreo com Inibidor MG132	12
Humor Vítreo com Inibidor MG132 (Duplicata)	20
Branco	0
Branco (Duplicata)	0
Ponto Máximo	440
Ponto Máximo (Duplicata)	432

Gráfico1: Comparação da atividade do Proteassoma, em escala arbitrária

5. DISCUSSÃO

5.1. A Relevância do Proteassoma

O Proteassoma é componente do principal sistema proteolítico intracelular extra-lisossomal conhecido dos organismos eucarióticos (DeMARTINO & STAUGHTER, 1999) e sua atividade está correlacionada, não somente à clivagem de proteínas ubiquitinadas e reciclagem de aminoácidos, mas também com diversos outros processos celulares, como interação com fatores transcricionais (hidrolisando o I- κ B e ativando o NF- κ B, por exemplo), remodelamento proteolítico de precursores de proteínas, transcrição, reparo de DNA e remodelamento de cromatina (DEMARTINO; GILLETTE, 2007).

Dada à sua importância, crescente atenção vem sendo dirigida ao seu estudo, tanto para determinação de sua estrutura quanto para analisar seu comportamento nos processos fisiológicos e patológicos. Uma das mais importantes conseqüências disto foi melhor compreensão dos mecanismos intracelulares de apoptose, juntamente com o desenvolvimento do conhecimento sobre a Ubiquitina e suas interações com o Proteassoma, com a descoberta do UPS. Outra conseqüência importante foi a descoberta de níveis anormalmente altos de Proteassoma em medula óssea e leucócitos de pacientes leucêmicos (KUMATORI et al., 1990, DUTAU et al., 2002) e o desenvolvimento de inibidores de sua atividade proteolítica (em especial os peptídeos aldeídicos), o que resultou na descoberta de importantes agentes anti-tumorais. Inicialmente, foram utilizados *in vitro*, sendo em seguida testados em tumores sanguíneos, com principal destaque ao Mieloma Múltiplo, com a

droga Bortezomib (Velcade for Injection; Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, and Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C.), já disponível para prática clínica, após aprovação pelo FDA em 2006 (KANE et al., 2006).

Estes fatos ilustram a importância do conhecimento nesta área.

5.2. A Localização do Proteassoma

Alguns trabalhos têm demonstrado a presença extra-celular do Proteassoma, como Morales, Pizarro e Kong (2004), que descreveram a presença deste na membrana celular de espermatozóides, em forma ativa, acreditando estar no acrossoma e com função na fertilização (Morales et al. 2003).

Dutau et al. (2002) descreveram Proteassoma no plasma sanguíneo em um método para quantificar a atividade do Proteassoma presente no plasma através da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). No entanto, embora a descrição do procedimento pareça ser bastante reproduzível, é preciso considerar que o processo descrito de obtenção do plasma, que consiste na coleta do sangue em seringa com anticoagulante (citrato de sódio) e estocagem a -80°C , pode causar lise celular, por vários fatores, como a turbulência gerada pelo fluxo de grande quantidade de células sanguíneas na agulha de aspiração, pelo uso de anticoagulantes (HARR, RASKIN; HEARD, 2005) e pelo congelamento.

Assim, em ambos os estudos citados, não é possível caracterizar o Proteassoma como componente livre, no primeiro caso porque está fixo na membrana plasmática dos espermatozoides e, no segundo, porque provavelmente, ocorre lise celular no processo de coleta e armazenamento do material.

5.3. A Demonstração do Proteassoma ativo em um meio acelular

Embora o humor aquoso seja essencialmente acelular em situações fisiológicas, ainda realizamos centrifugação das amostras com técnica de citologia clínica (1500g, 5 minutos), onde não observamos precipitados. O mesmo não ocorre com o humor aquoso refeito (Figuras 21 e 22), que forma *pellet* misto de proteínas e algumas células. Quanto ao humor vítreo, notamos leve celularidade, inclusive com presença de hemácias (provável artefato de coleta, Figuras 23 e 24).

Os Western Blots demonstrados (Figuras 28 e 29) nos resultados indicam a presença do anticorpo anti-subunidade alfa, com decoração pela fosfatase aproximadamente na altura das bandas de Mioglobina azul (20 kDa) e vermelha (22 kDa), sendo portanto, compatível com o peso molecular destas subunidades (20-30 kDa).

Para comprovar a presença dos conjugados ubiquitinados, utilizamos anticorpo primário “anti-ubiquitina” produzido em coelhos e anticorpo secundário anti-coelho, por consequência. Notamos a presença de diversas bandas (Figuras 30 e 31), que são mais ou menos semelhantes nas três

amostras, apenas com menor concentração no humor vítreo. Precisamos lembrar, nesta altura, que conforme discutido no item Bioquímica do Humor Aquoso (Introdução), já foi confirmada a presença de cadeias de IgG neste fluido. Assim, provavelmente, uma ou duas das diversas bandas que foram evidenciadas com compostos ubiquitinados talvez sejam correspondentes à reação inespecífica.

Notamos, pelos géis-réplica corados com Coomassie (Figuras 25, 26 e 27), que o padrão de bandas é semelhante em ambas as amostras de humor aquoso (normal e refeito), mas diferente do padrão do humor vítreo. Isso pode ser explicado por diversos fatores, incluindo a diferente natureza de ambos os componentes, sendo que o humor vítreo é preenchido por, além do mesmo fluido que compõe o humor aquoso, fibras de colágeno e células.

Além da detecção do Proteassoma e compostos ubiquitinados, realizamos também ensaio de atividade, com o substrato fluorogênico para proteases com atividade quimiotripsina-símile. Demonstramos atividade com as amostras testadas, quando estas eram estocadas com glicerol 2%, bem como a inibição causada pelo MG132, descrito como potente inibidor das atividades quimiotripsina e pós-glutamil do Proteassoma (COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996) (Tabela 6).

Para experimentos de registro de atividade em gel, a quantidade mínima de proteína observada como necessária para obter resultados satisfatórios era muito superior ao que era disponível (100µg de proteína equivalem a aproximadamente 150µl de humor aquoso, que é quase o total obtido de um olho de coelho).

Dada a estrutura essencialmente avascular da córnea (não havendo possibilidade, portanto, de extravasamento sanguíneo no momento da coleta de material por paracentese) e a comprovação fotográfica da acelularidade, podemos concluir que com os resultados obtidos através das técnicas de *Western Blotting* para subunidade alfa do Proteassoma, da identificação de compostos ubiquitinados e pelo ensaio de atividade e inibição, o Proteassoma encontra-se livre e ativo no humor aquoso de coelhos raça Nova Zelândia.

5.4. A Presença do Proteassoma no Humor Aquoso Refeito

A taxa normal de produção do humor aquoso é em torno de 2 a 3 μ l por minuto, podendo variar grandemente de acordo com diversos fatores, tais como a pressão intra-ocular, influências neurais, hormonais, ciclo circadiano, etc.

Notamos, em nossos experimentos, que com a hipotonia severa do olho, ocorre grande aumento neste fluxo de produção. Assim, com tempo de espera de apenas 15 minutos da primeira paracentese, realizávamos nova punção com coleta de aproximadamente 150 μ l (=10 μ l/min). Constatamos também que essa nova amostra, o humor aquoso refeito, é em torno de 15 vezes mais protéica que o humor aquoso original. No entanto, após realizar a centrifugação, fica apenas seis a sete vezes mais concentrado.

Para contribuir na manutenção dos meios transparentes, o olho conta com um sistema de impermeabilização relativa ao seu suprimento sanguíneo, que permite a passagem apenas de pequenas moléculas para dentro deste

órgão (barreira hemato-ocular). O Proteassoma 20S sendo, portanto, uma proteína de grandes dimensões (700 kDa, aproximadamente 12x17 nm), só pode estar presente e ativo no humor aquoso se for ativamente secretado.

A produção do humor aquoso ocorre no corpo ciliar ativamente. Inicialmente, ocorre extravasamento de líquido através dos capilares adjacentes aos processos ciliares para o sincício epitelial e através da membrana plasmática do epitélio não-pigmentado (Figura 32), em processo ativo, com participação da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+ ATPase) e anidrase carbônica tipo II.

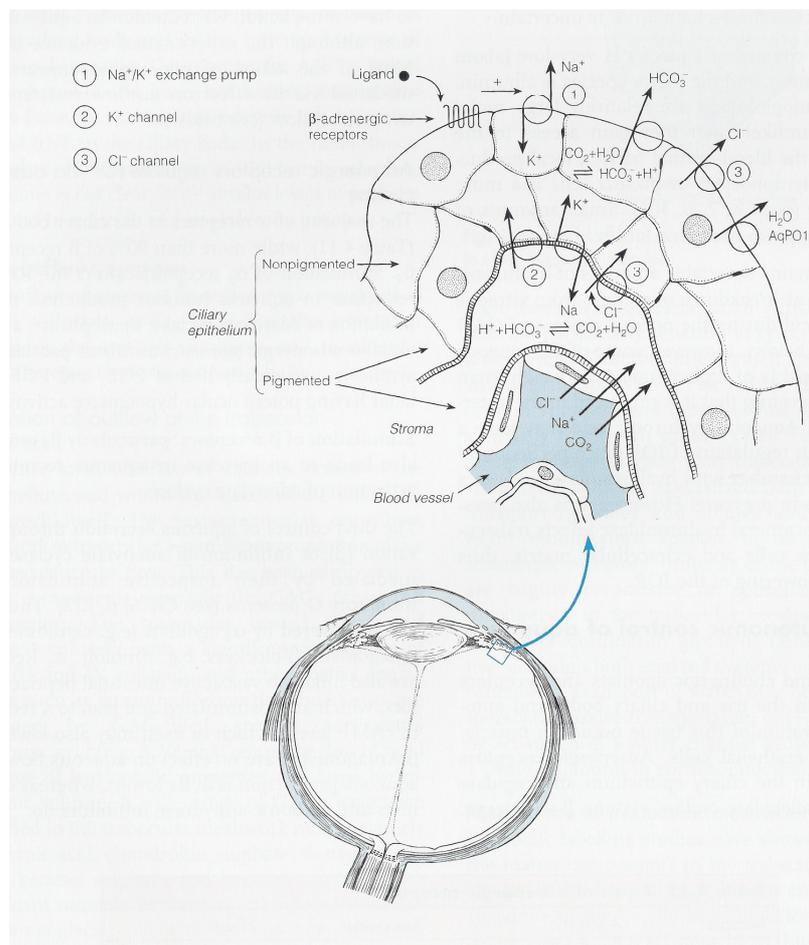


Figura 32- A produção do humor aquoso. Imagem de Forrester et al. (2002)

Analisando os Western Blots onde é evidenciada a subunidade alfa do Proteassoma, notamos que eles estão presentes também no humor aquoso refeito, que é secretado de forma rápida. No entanto, não podemos afirmar que o Proteassoma presente nesta amostra seja essencialmente de origem extracelular, visto que notamos celularidade nesta amostra (provavelmente células endoteliais que se desprenderam durante o quase colapamento da câmara anterior).

5.5. A Presença do Proteassoma no Humor Vítreo

Através das áreas descontínuas da zônula (Figuras 16 e 17), ocorre contato entre a câmara posterior (preenchida por humor aquoso) e a câmara vítrea (preenchida pelo humor vítreo). Além disso, o humor vítreo possui celularidade, mas estas células não se transportam para as câmaras anterior e posterior, visto que são aderidas à matriz do corpo vítreo. No entanto, os componentes do humor aquoso podem se transportar para a câmara vítrea. Assim, é esperado que nos géis de eletroforese contendo humor vítreo, ocorram diversas bandas semelhantes às do humor aquoso, mas o contrário não é verdadeiro (conforme comprovamos nos géis-réplica corados com Coomassie e nos *Western Blots* para compostos ubiquitinados).

Portanto, embora tenhamos demonstrado a presença de Proteassoma ativo no humor vítreo, este ensaio não permite sugerir que seja acelular, embora parte dele talvez seja, pela presença de componentes do humor aquoso, neste fluido.

5.6. As Possíveis Aplicações

5.6.1. Catarata

A catarata é a opacificação patológica do cristalino e pode ocorrer por diversas causas, como o próprio envelhecimento (catarata senil), após doenças inflamatórias, após cirurgia ou ainda por efeito de doenças sistêmicas, como diabetes e hipergalactosemia ou por efeito do glaucoma (glaucoma é o aumento da pressão intra-ocular de forma patológica, causando dano na retina e no nervo óptico, com conseqüente perda visual e até cegueira).

Pereira et al. (2003) descreveram que o UPS está presente e funcionando nas células do cristalino, desde as superficiais até o núcleo e correlacionam seus achados de diminuição dos componentes do sistema na parte central (núcleo) com o desenvolvimento de catarata senil.

Podemos imaginar, então, que talvez ocorra alteração nos níveis de Proteassoma em função desta patologia, talvez com aumento nos seus níveis para tentar reparar os danos iniciais nas cristalinas (principais proteínas que compõe o cristalino) ou ainda poderia ocorrer seu declínio, facilitando a opacificação do Cristalino (Catarata).

Pretendemos desenvolver um experimento que correlacione os níveis quantitativos de Proteassoma e sua atividade no humor aquoso de coelhos com catarata patológica (hipergalactosêmica).

5.6.2. Glaucoma

Glaucoma é uma patologia ocular que se caracteriza por perda progressiva da visão como decorrência de dano a estruturas nervosas, como o nervo óptico, células ganglionares e camada de fibras nervosas. Está normalmente relacionada ao aumento da pressão intra-ocular, havendo também possibilidade de ocorrer em pessoas com pressão intra-ocular normal, porém “hipersensíveis” estas pressões, mesmo em nível normal.

O diagnóstico nas fases iniciais é bastante complicado e impreciso, visto que a atual metodologia de exames é bastante eficiente para diagnóstico apenas nas fases moderadas ou avançadas.

Baseados em nossos achados (presença de Proteassoma livre no humor aquoso) e naqueles publicados por Wunderlich et al (2002), que descreve o aumento do nível de Proteassoma em leucócitos do sangue periférico, em pacientes glaucomatosos, podemos supor que talvez possa ocorrer uma correlação entre os níveis tópicos de Proteassoma no humor aquoso e o Proteassoma nos leucócitos, a nível sistêmico, como ocorre com os anti-corpos contra *toxoplasma gondii*, durante a toxoplasmose ocular ativa (Coeficiente de Witmer-Desmonts -ou Goldmann-Witmer), que consiste em comparar os níveis locais (no humor aquoso) de anti-IgG ao protozoário com os níveis sanguíneos. Nesta correlação, se a proporção for maior que 4:1, é considerada positiva para toxoplasmose ocular (DE GROOT-MIJNES et al, 2006).

7. CONCLUSÕES

1. O Proteassoma 20S está presente no humor aquoso;
2. Neste meio (humor aquoso), sua capacidade proteolítica quimiotripsina-símile está preservada;
3. Existem compostos ubiquitinados no humor aquoso;
4. A citocentrifugação confirmou a acelularidade do humor aquoso;
5. Quando aspiramos o humor aquoso por paracentese, ele é capaz de se refazer em alguns minutos. Neste novo fluido, também há presença do Proteassoma, mas não foi possível determinar se está presente devido à secreção ativa pelo corpo ciliar ou secundário a contaminação por lise celular (das células desprendidas do endotélio corneano durante o colabamento da câmara anterior após a paracentese);
6. O Proteassoma está presente no corpo vítreo e este meio contém células, além de se contaminar com sangue pela coleta;
7. O Proteassoma encontrado no humor vítreo está com sua capacidade proteolítica quimiotripsina-símile preservada;
8. Existem compostos ubiquitinados no humor vítreo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. **Cancer Treat Rev**, Inglaterra, v. 29, n. 1, p. 3-9, maio de 2003.

ALCON, Atlas de Oftalmologia Básica. Volume 1: Alcon, 2000. 1 CD-ROM.

ASHER G.; REUVEN, N.; SHAUL, Y. 20S proteasomes and protein degradation "by default". **Bioessays**, Estados Unidos da América, v. 28, n. 8, p. 844-9, 22 de agosto de 2006.

BAUMEISTER, W.; WALZ, J.; ZUHL, F.; SEEMULLER, E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell**, Estados Unidos da América, v. 92, n. 3, p. 367-80, 06 de fevereiro de 1998.

BOCCADORO, M.; MORGAN, G.; CAVENAGH, J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. **Cancer Cell Int**, Inglaterra, v. 5, n. 1, p. 18, 01 de junho de 2005.

BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. Gel Electrophoresis Under Denaturing Conditions. In: BOLLAG, D. M.; ROZYCKI, M. D.; EDELSTEIN, S. J. **Protein Methods**. Segunda edição. Estados Unidos da América, Editora Wiley-Liss, 1996, p. 107-54.

BROWN, J. C.; SADLER, P. J.; SPALTON, D. J.; JUUL, S. M.; MACLEOD, A. F.; SÖNKSEN, P. H. Analysis of human aqueous humour by high resolution ¹H NMR spectroscopy. **Exp Eye Res**, Inglaterra, v. 42, n. 4, p. 357-62, abril de 1986.

CAI, H.; SINGH, I.; WAGNER, B. J. Gene Expression of the proteasome in rat lens development. **Exp Eye Res**, Inglaterra, v. 66, n. 3, p. 339-46, março de 1998.

CHAUHAN, D.; HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. **Br J Cancer**, Inglaterra, v. 95, n. 8, p. 961-5, 23 de outubro de 2006.

CHEN, F.; CHANG, D.; GOH, M.; KLIBANOV, S. A.; LJUNGMAN, M. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitors. **Cell Growth Differ**, Estados Unidos da América, v. 11, n. 5, p. 239-46, maio de 2000.

CHU-PING, M.; VU J. H.; PROSKE R. J.; SLAUGHTER C. A.; DEMARTINO, G. N. Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 269, n. 5, p. 3539-47, 04 de fevereiro de 1994.

CIECHANOVER, A.; BEN-SAADON, R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. **Trends Cell Biol**, Inglaterra, v. 14, n. 3, p. 103-6, março de 2004.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Inglaterra, v. 6, n. , p. 79-87, janeiro de 2005.

COUX, O.; NOTHWANG, H. G.; SCHERRER, K.; BERGSMA-SCHUTTER, W.; ARNBERG, A. C.; TIMMINS, P. A.; LANGOWSKI, J.; COHEN-ADDAD, C. Structure and RNA content of the prosomes. **FEBS Lett**, Holanda, v. 300, n. 1, p. 49-55, 23 de março de 1992.

COUX, O.; NOTHWANG, H. G.; SILVA-PEREIRA, I.; RECILLAS-TARGA, F.; BEY, F.; SCHERRER K. Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. **Mol Gen Genet**, Alemanha, v. 245, n. 6, p. 769-80, 15 de dezembro de 1994.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. **Annu Rev Biochem**, Estados Unidos da América, v. 65, p. 801-47, julho de 1996.

DAHLMANN, B.; KOPP, F.; KUEHN, L.; NIEDEL, B.; PFEIFER, G.; HEGERL, R.; BAUMEISTER, W. The multicatalytic proteinase (**prosome**) is ubiquitous

from eukaryotes to archaeobacteria. **FEBS Lett**, Holanda, v. 251, n. 1-2, p. 125-31, 17 de julho de 1989.

DE GROOT-MIJNES, J. D.; ROTHOVA, A.; Van LOON, A. M.; SCHULLER, M.; TEN DAM-VAN LOON, N. H.; De BOER, J. H.; SCHUURMAN, R.; WEERSINK, A. J. Polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis. **Am J Ophthalmol**, Estados Unidos da América, v. 141, n. 2, p. 313-8, fevereiro de 2006.

DEMARCHI, F; BRANCOLINI, C. Altering protein turnover in tumor cells: new opportunities for anti-cancer therapies. **Drug Resist Updat**, Escócia, v. 8, n. 6, p. 359-68, dezembro de 2005.

DEMARTINO, G. N.; GOLDBERG, A. L. Identification and partial purification of an ATP-stimulated alkaline protease in rat liver. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 254, n. 10, p. 3712-5, 25 de maio de 1979.

DEMARTINO, G. N.; MOOMAW, C. R.; ZAGNITKO, O. P.; PROSKE, R. J.; CHU-PING, M.; AFENDIS, S. J.; SWAFFIELD, J. C.; SLAUGHTER, C. A. PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 269, n. 33, p. 20878-84, 19 de agosto 1994.

DEMARTINO, G. N.; SLAUGHTER, C. A. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 274, n. 32, p. 22123-6, 06 de agosto de 1999.

DEMARTINO, G. N. Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. **Methods Enzymol**, Estados Unidos da América, v. 398, p. 295-306, novembro de 2005.

DEMARTINO, G. N.; GILLETTE, T. G. Proteasomes: Machines for All Reasons. **Cell**, Estados Unidos da América, v. 129, n. 4, p. 659-62, 18 de maio de 2007.

DEVERAUX, Q.; USTRELL, V.; PICKART, C.; RECHSTEINER, M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 269, n. 10, p. 7059-61, 11 de março de 1994.

DING, Q.; KELLER, J. N. Does proteasome inhibition play a role in mediating neuropathology and neuron death in Alzheimer's disease? **J Alzheimers Dis**, Holanda, v. 5, n. 3, p. 241-5, junho de 2003.

DUBIEL, W.; PRATT, G.; FERRELL, K.; RECHSTEINER, M. Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 267, n. 31, p. 22369-77, 05 de novembro de 1992.

DUBIEL, W.; FERRELL, K.; RECHSTEINER, M. Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. **Mol Biol Rep**, Holanda, v. 21, n. 1, p. 27-34, fevereiro de 1995.

DUTAU, D.; AUBRY, L.; HENRY, L.; LEVIEUX, D.; HENDIL, K. B.; KUEHN, L.; BUREAU, J. P.; OUALI, A. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. **J Immun Methods**, Holanda, v. 260, p. 183-93, 01 de fevereiro de 2002.

FINLEY, D.; TANAKA, K.; MANN, C.; FELDMANN, H.; HOCHSTRASSER, M.; VIERSTRA, R.; JOHNSTON, S.; HAMPTON, R.; HABER, J.; MCCUSKER, J.; SILVER, P.; FRONTALI, L.; THORSNESS, P.; VARSHAVSKY, A.; BYERS, B.; MADURA, K.; REED, S. I.; WOLF, D.; JENTSCH, S.; SOMMER, T.; BAUMEISTER, W.; GOLDBERG, A.; FRIED, V.; RUBIN, D. M.; TOH-E, A. et al. Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. **Trends Biochem Sci**, Inglaterra, v. 23, n. 7, p. 244-5, 01 de julho de 1998.

FORSTER, A.; MASTERS, E. I.; WHITBY, F. G.; ROBINSON, H.; HILL, C. P. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell*, Estados Unidos da América, v. 18, p. 589-99, 27 de maio de 2005.

FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P.; LEE, W. R. Biochemistry and Cell Biology. In: FORRESTER, J. V.; DICK, A. D.; MCMENAMIN, P.; LEE, W. R. **The Eye: Basic Sciences in Practice**. Segunda Edição Inglaterra, W. B. Saunders, 2002. p. 193.

FRIBLEY, A. M.; EVENCHIK, B.; ZENG, Q.; PARK, B. K.; GUAN, J. Y.; ZHANG, H.; HALE, T. J.; SOENGAS, M. S.; KAUFMAN, R. J.; WANG, C. Y. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma cells by induction of Noxa. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 281, n. 42, p. 31440-7, 20 de outubro de 2006.

FUJIWARA, T.; TANAKA, K.; KUMATORI, A.; SHIN, S.; YOSHIMURA, T.; ICHIHARA, A.; TOKUNAGA, F.; ARUGA, R.; IWANAGA, S., KAKIZUKA, A. Molecular cloning of cDNA for proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) from rat liver: primary structure of the largest component (C2). **Biochemistry**, Estados Unidos da América, v. 28, n. 18, p. 7332-40, 05 de setembro de 1989.

GACZYNSKA, M.; GOLDBERG, A. L.; TANAKA, K.; HENDIL, K. B.; ROCK, K. L. Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 271, n. 29, p. 17275-80, 19 de julho de 1996.

GOLDBERG, A. L.; STRNAD, N. P.; SWAMY, K. H. Studies of the ATP dependence of protein degradation in cells and cell extracts. *Ciba Found Symp.*, (75): 227-51, 1979.

GROETTRUP, M.; RUPPERT, T.; KUEHN, L.; SEEGER, M.; STANDERA, S.; KOSZINOWSKI, U.; KLOETZEL, P. M. The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 270, n. 40, p. 23808-15, 06 de outubro de 1995.

GROLL, M.; DITZEL, L.; LOWE, J.; STOCK, D.; BOCHTLER, M.; BARTUNIK, H. D.; HUBER, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, Inglaterra, v. 386, n. 6624, p. 463-71, 03 de abril de 1997.

GROLL, M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. **Int J Biochem Cell Biol**, Inglaterra, v. 35, n. 5, p. 606-16, maio de 2003.

HARDING, J. J. Iris-Ciliary Body, Aqueous Humor and Trabecular Meshwork. In: HARDING, J. J. **Biochemistry of The Eye**, Primeira Edição, Inglaterra: Chapman & Hall Medical, 1997. Capítulo 3, p. 52-93.

HARR, K. E.; RASKIN, R. E.; HEARD, D. J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood

samples from macaws and Burmese pythons. **Vet Clin Pathol**, Estados Unidos da América, v. 34, n. 4, p. 383-8, dezembro de 2005.

HATAKEYAMA, S.; NAKAYAMA, K. I. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. **J Biochem (Tokyo)**, Japão, v. 134, n. 1, p. 1-8, julho de 2003.

HERRMANN, J.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation. **Circ. Res**, Estados Unidos da América, n. 100: p. 1276-91, 11 de maio de 2007.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The Ubiquitin System. **Annu. Rev. Biochem**, Estados Unidos da América, v. 67, p. 425-79, julho de 1998.

HURLEY, J. H.; LEE, S; PRAG, G.. Ubiquitin-binding domains. **Biochem J**, Inglaterra, v. 399, p. 361-72, 01 de novembro de 2006.

HUSOM, A. D.; PETERS, E. A.; KOLLING, E. A.; FUGERE, N. A.; THOMPSON, L. V.; FERRINGTON, D. A. Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. **Arch Biochem Biophys**, Estados Unidos da América, v. 421, n. 1, p. 67-76, 01 de janeiro de 2004.

JAYARAPU, K.; GRIFFIN, T. A. Differential intra-proteasome interactions involving standard and immunosubunits. **Biochem Biophys Res Commun**, Estados Unidos da América, v. 358, n. 3, p. 867-72, 06 de julho de 2007.

KANDIL, E.; KOHDA, K.; ISHIBASHI, T.; TANAKA, K.; KASAHARA, M. PA28 subunits of the mouse proteasome. **Immunogenetics**, Estados Unidos da América, v. 46, n. 4, p. 337-44, julho de 1997.

KANE, R .C.; FARRELL, A. T.; SRIDHARA, R.; PAZDUR, R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. **Clin Cancer Res**, Estados Unidos da América, v. 12, n.10, p. 2955-60, 15 de maio de 2006.

KANSKI, J. J. **Oftalmología Clínica**. Terceira edição, Espanha: Mosby, 1996, 430p.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappaB Activity. **Annu Rev Immunol**, Estados Unidos da América, v. 18, p. 621-63, abril de 2000.

KERSCHER, O.; FELBERBAUM, R.; HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol**, Estados Unidos da América, v. 22, p. 159-180, novembro de 2006.

KONSTANTINOPOULOS, P. A.; PAPAVALASSILIOU, A. G. The potential of proteasome inhibition in the treatment of colon cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, Inglaterra, v. 15, n. 9, p. 1067-75, setembro de 2006.

KOPP, F.; KLAUS, B. HENDIL, K. B.; DAHLMANN B.; KRISTENSEN, P.; SOBEK, A; UERKVITZ, W. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. **Proc Natl Acad Sci**, Estados Unidos da América, v. 94, n. 7, p. 2939-44, 01 de abril de 1997.

KROPFF, M.; BISPING, G.; WENNING, D.; BERDEL, W. E.; KIENAST, J. Proteasome inhibition in multiple myeloma. **Eur J Cancer**, Inglaterra, v. 42, n. 11, p. 1623-39, julho de 2006.

KUCKELKORN, U.; FRENTZEL, S.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; GROETTRUP, M.; KLOETZEL, P. M. Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. **Eur J Immunol**, Alemanha, v. 9, p. 2605-11, setembro de 1995.

KUMATORI, A.; TANAKA, K.; INAMURA, N.; SONE, S.; OGURA, T.; MATSUMOTO, T.; TACHIKAWA, T.; SHIN, S.; ICHIHARA, A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. **Proc Natl Acad Sci**, Estados Unidos da América, v. 87, p. 7071-5, setembro de 1990.

LENZ, H. J. Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. **Cancer Treat Rev**, Inglaterra, v. 29, n. 1, p. 41-8, maio de 2003.

LIGHTCAP, E. S.; MCCORMACK, T. A.; PIEN, C. S.; CHAU, V.; ADAMS, J.; ELLIOTT, P. J. Proteasome inhibition measurements: clinical application. **Clin Chem**, Estados Unidos da América, v. 46, n. 5, p. 673-83, maio de 2000.

LOUIE, J. L.; KAPPAHN, R. J.; FERRINGTON, D. A. Proteasome function and protein Oxidation in the aged retina. **Exp Eye Res**, Inglaterra, v. 75, p. 271-84, setembro de 2002.

LOWE, J.; STOCK, D.; JAP, B.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W.; HUBER, R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. **Science (New York, N. Y.)**, Estados Unidos da América, v. 268, n. 5210, p. 533-9, 28 de abril de 1995.

MASTERS, E. I.; PRATT, G.; FORSTER, A.; HILL, C. P. Purification and analysis of recombinant 11S activators of the 20S proteasome: *Trypanosoma brucei* PA26 and human PA28 alpha, PA28 beta, and PA28 gamma. **Methods Enzymol**, Estados Unidos da América, v. 398, p. 306-21, novembro de 2005.

MONTAGUT, C.; ROVIRA, A.; MELLADO, B.; GASCON, P.; ROSS, J. S.; ALBANELL, J. Preclinical and clinical development of the proteasome inhibitor

bortezomib in cancer treatment. **Drugs Today (Barc)**, Espanha, v. 41, n. 5, p. 299-315, maio de 2005.

MOORE, D. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. **Neuromolecular Med**, Estados Unidos da América, v. 4, n. 1-2, p. 95-108, outubro de 2003.

MORALES, P.; KONG, M.; PIZARRO, E.; PASTEN, C. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. **Hum Reprod**, Inglaterra, v. 18, n. 5, p. 1010-7, maio de 2003.

MORALES, P.; PIZARRO, E.; KONG, M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. **M. Mol Reprod Dev**, Estados Unidos da América, v. 68, n. 1, p.: 115-24, , maio de 2004.

NOVARTIS, Modelo de Anatomia do Olho. Novartis Biociências S. A., 2000. 1 CD-ROM.

OBENG, E. A.; CARLSON, L. M.; GUTMAN, D. M.; HARRINGTON JR, W. J.; LEE, K. P.; BOISE, L. H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. **Blood**, Estados Unidos da América, v. 107, n. 12, p. 4907-16, 15 de junho de 2006.

OLANOW, C. W.; MCNAUGHT, K. S.; Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. **Mov Disord**, Estados Unidos da América, v. 21, n. 11, p. 1806-23, novembro de 2006.

PENG, J.; SCHWARTZ, D.; ELIAS, J. E.; THOREEN, C. C.; CHENG, D.; MARSISCHKY, G.; ROELOFS, J.; FINLEY, D.; GYGI, S. P. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. **Nat Biotechnol**, Estados Unidos da América, v. 21, p. 921-6, agosto de 2003.

PEREIRA, P.; SHANGA, F.; HOBBS, M.; GIRÃO, H.; TAYLOR, A. Lens fibers have a fully functional ubiquitin-proteasome pathway. **Exp Eye Res**, Inglaterra, v. 76, p. 623-31, maio de 2003.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu Rev Biochem**, Estados Unidos da América, v. 70, p. 503-33, julho de 2001.

RCSB PROTEIN DATA BANK, An Information Portal to Biological Macromolecular Structures. Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em: 05 de março de 2007.

RECHSTEINER, M.; REALINI, C.; USTRELL, V. The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. **Biochem J**, Inglaterra, v. 345, n. 1, p. 1-15, 01 de janeiro de 2000.

RECHSTEINER, M.; HILL, C. P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **Trends Cell Biol**, Inglaterra, v. 15, n. 1, p. 27-33, janeiro de 2005.

ROBERTS, L. R.; GORES, G. J. Emerging drugs for hepatocellular carcinoma. **Expert Opin Emerg Drugs**, Inglaterra, v. 11, n. 3, p. 469-87, setembro de 2006.

SHI, Y. Y.; SMALL, G. W.; ORLOWSKI, R. Z. Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, Holanda, v. 100, n. 1, p. 33-47, novembro de 2006.

SHIN, E. C.; SEIFERT, U.; KATO, T.; RICE, C. M.; FEINSTONE, S. M.; KLOETZEL, P. M.; REHERMANN, B. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. **J Clin Invest**, Estados Unidos da América, v. 116, n. 11, p. 3006-14, novembro de 2006.

SOMMERBURG, O.; ULLRICH, O.; SITTE, N.; VON ZGLINICKI, D.; SIEMS, W.; GRUNE, T. O. Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light – Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. **Free Rad Biol Med**, Estados Unidos da América, v. 9, p. 1369-74, junho de 1998.

STREHL, B.; SEIFERT, U.; KRUGER, E.; HEINK, S.; KUCKELKORN, U.; KLOETZEL, P. M. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. **Immunol Rev**, Dinamarca, v. 207, p. 19-30, outubro de 2005.

TANAKA, K.; LI, K.; ICHIHARA, A.; WAXMAN, L.; GOLDBERG, A. L. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 261, p. 32, p. 15197-203, 15 de novembro de 1986.

TEICHER, B. A.; ARA, G.; HERBST, R.; PALOMBELLA, V. J.; ADAMS, J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. **Clin Cancer Res**, Estados Unidos da América, v. 5, n. 9, p. 2638-45, setembro de 1999.

UNIPROT - The Universal Protein Resource. Disponível em <<http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>>. Acesso em 15 de outubro de 2006

UNNO, M.; MIZUSHIMA, T.; MORIMOTO, Y.; TOMISUGI, Y.; TANAKA, K.; YASUOKA, N.; TSUKIHARA, T. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. **Structure**, Inglaterra, v. 10, n. 5 p 609-18, maio de 2002.

VIJAY-KUMAR, S.; BUGG, C. E.; COOK, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. **J Mol Biol**, Inglaterra, v. 194, n. 3, p. 531-44, 05 de abril de 1987.

VINITSKY, A.; CARDOZO, C.; SEPP-LORENZINO, L.; MICHAUD, C.; ORLOWSKI, M. Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. **J Biol Chem**, Estados Unidos da América, v. 269, n. 47, p. 29860-6, 25 de novembro de 1994.

VODANOVIC-JANKOVIC, S, HARI. P.; JACOBS, P.; KOMOROWSKI, R.; DROBYSKI. W. R. NF-kappaB as a target for the prevention of graft-versus-host disease: comparative efficacy of bortezomib and PS-1145. **Blood**, Estados Unidos da América, v. 107, n. 2, p. 827-34, 15 de janeiro de 2006.

WANG, M.; PICKART C. M. Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. **EMBO J**, Inglaterra, v. 24, n. 24, p. 4324-33, 21 de dezembro de 2005.

WANG, J.; MALDONADO, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. **Cell Mol Immunol**, China, v. 3, n. 4, p. 255-61, agosto de 2006.

WEISSMAN, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Inglaterra, v. 2, p. 169-78, março de 2001.

WILK, S.; ORLOWSKI, M. Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. **J Neurochem**, Inglaterra, v. 40, n. 3, p. 842-9, março de 1983.

WILKINSON, K. D. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Estados Unidos da América, v. 102, n. 43, p. 15280-2, 25 de outubro de 2005.

WUNDERLICH, K.; GOLUBNITSCHAJA, O.; PACHE, M.; EBERLE, A. N.; FLAMMER, J. Increased plasma levels of 20S proteasome alpha-subunit in glaucoma patients: an observational pilot study. **J.Mol Vis**, Estados Unidos da América, v. 8, p. 431-5, 12 de novembro de 2002.

ZWICKL, P.; KLEINZ, J., BAUMEISTER, W. Critical elements in proteasome assembly. **Nat Struct Biol**, Estados Unidos da América, v. 1, n. 11, p. 765-70, novembro de 1994.

ANEXO DE PUBLICAÇÃO

The presence of free proteasome in the aqueous humor of normal and cataractous rabbits

Abenor Moreira Minaré Filho¹, Willian de Castro Borges², Lizandra Guidi Guimarães², Olavo dos Santos Pereira Júnior⁴, Maria de Lourdes Veronese Rodrigues¹, Erasmo Romão¹, Paulo Alves³, Vanderlei Rodrigues²

Departments of ¹Ophthalmology, Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery and; ²Biochemistry and Immunology; ³Surgery and Traumatology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil; ⁴Department of Zootecnics, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Espírito Santo, Brasil

Contact:

Abenor Moreira Minaré Filho: Rua São Paulo, 921, ap 302. Cascavel, PR, Brazil, ZIP Code 85801-020, e-mail: minarefilho@uol.com.br

Erasmo Romão: Avenida dos Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900, e-mail: eromao@fmrp.usp.br. Fone (+55) 16.3602.2523

Lizandra Guidi Guimarães: Avenida dos Banderiantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900, e-mail: lizandraguidi@usp.br Fone (+55) 16.3602.3060

Olavo dos Santos Pereira Júnior: Alto Universitário, s/n. Vitória, ES, Brazil, ZIP Code 29500-000, e-mail: olavospjr@uol.com.br Fone (+55) 28.3552.8947

Maria de Lourdes Veronese Rodrigues: Avenida dos Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900, e-mail: mdlvrodr@fmrp.usp.br. Fone (+55) 16.3602.2863

Paulo Alves: Avenida dos Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900. Fone (+55) 16.3602.3528

Vanderlei Rodrigues: Avenida dos Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900, e-mail: vrodrigu@fmrp.usp.br. Fone (+55) 16.3602.3235

Willian de Castro Borges: Avenida dos Banderiantes, 3900. Ribeirão Preto, SP, Brazil, ZIP Code 14049-900, e-mail: willianusp2003@hotmail.com Fone (+55) 16.3602.3060

Disclosure: None of the authors has any commercial interest in this research.

Abstract

Purpose: We aimed to determine if proteasome, the most important intracellular proteolytic complex in eukaryotes, can be present in an acellular environment such as aqueous humor and if its characteristics could change in pathological situation (galactosemic cataract). **Methods:** We used young healthy New Zealand rabbits for group 1 (healthy) and healthy rabbits treated with hipergalactosemic diet until development of cataract for the group 2 (cataractous). To get the samples, animals of both groups were anesthetized and submitted to anterior eye chamber paracentesis, with subsequent aspiration of aqueous humor. After 15 minutes we obtained a new sample of aqueous humor from the same eye (called “protein-containing aqueous humor”, which we found that has almost 10 times more protein than normal aqueous humor). The samples were then centrifuged, analyzed by SDS-PAGE (20 µg protein/column) and submitted to Western blotting to link proteasome subunits. Proteasome activity was evaluated using a spectrofluorometric method with fluorogenic substrates (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). A specific proteasome activity inhibitor (MG132) was used as control samples of each group. **Results:** We could identify alpha subunits of the proteasome and ubiquitinated conjugates. Activity was preserved and could be inhibited by MG132. The samples submitted to centrifugation and HE staining didn't show cells. We did not find any difference in the samples of both groups. **Conclusions:** The proteasome is presented in an active and “free state” in the aqueous humor as well as in the protein-containing aqueous humor. Otherwise, we did not find any difference between samples of normal or cataractous rabbits.

1. Introduction

Some intracellular activities that make life possible, such as antigen presentation, apoptosis, cell differentiation, protein turnover and transcriptional regulator degradation, are dependent proteolysis.

Many known mechanisms of proteolysis exist; however, the proteolytic system called ATP-dependent proteasome (proteasome complex) is the main intracellular extra-lysosomal complex operating in all eukaryotic organisms¹.

Proteasome consists of a 700 kDa molecule composed of four rings with seven fold subunits each, with a common lumen and a barrel-like shape, whose walls are formed by the alpha and beta subunits and which center is empty (where the proteolytic activity occurs)². The “barrel” is about 12 nm in diameter and 17 nm high. The upper and lower rings are formed by alpha subunits, while the two central rings are formed by beta subunits. The primary function of the alpha subunits is to keep the structure of the complex, while the beta subunits are involved in the proteolytic activity^{1,2}. This molecule can be associated with others such as PA700 and PA28, which permit regulation of its activity¹.

The proteolytic activity of the proteasome can occur in two ways: by breaking down small peptides that spontaneously penetrate the lumen of the “barrel”, or through the ubiquitin system, in which a specialized enzyme series recognizes the molecules that must be eliminated (as anomalous proteins or inhibitory transcriptional factors) and connects markers to them (ubiquitin). The 26S complex (= proteasome + 19S regulator protein) can recognize this marker and can unfold large proteins to the lumen of the complex through an ATP-dependent mechanism, leading to proteolysis.

Several studies have demonstrated a correlation between the tissue levels and activity of proteasome in the presence of local or systemic diseases. High levels of proteasome were first demonstrated in leukemic cells³ and later studies detected alterations of its levels in solid tumors^{4,5} and in other non-tumoral systemic diseases such as Alzheimer's disease⁶, Parkinson's disease⁷ and aging itself⁸. The normal tissue variation of this complex has also been studied. The liver, for example, normally has high levels of proteasome compared with skeletal muscle⁹.

Some investigations of the visual system have studied specific tissues of the ocular globe, showing for example the reduction of the amount and activity of the proteasome with retinal aging¹⁰, the in vitro activity of this proteolytic complex on proteins of the lens degraded by ultraviolet radiation¹¹, and even the presence of different isoforms of the proteasome in the different phases of lens development¹². Wunderlich et al. demonstrated that patients with primary open angle glaucoma and normal tension glaucoma have increased levels of proteasome in systemic leukocytes¹³ and believe that ganglion cell apoptosis is related to these alterations¹⁴. All of these factors show the importance of the study of this complex in different diseases and also the importance of understanding its own molecular biology.

2. Materials and Methods

We studied two groups of rabbits. The first one was composed by normal young albino New Zealand rabbits without any kind of previous treatment. The second group was composed by young albino New Zealand

rabbits treated with dietary intake of increased levels of galactosis (30% food weight) for 6 weeks (until development of subcapsular posterior cataract).

Samples of aqueous humor were obtained from rabbits of both sexes weighing 2 to 2.5 kg. The animals were provided by the Animal House of the Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, and were handled according to international standards for the use of laboratory animals. The rabbits were anesthetized with intravenous ketamine and xylazine, plus topical application of proxymetacaine. Paracentesis of the anterior eye chamber was then performed and the aqueous humor (AH) was drained from both eyes, placed in an Eppendorf tube containing 10% glycerol so that the final concentration of glycerol in the sample would be about 2%, and stored in ice. After 15 minutes, new samples were collected, with the reconstituted aqueous humor, which we called "protein-containing aqueous humor" (PAH). The samples were then centrifuged with citological techniques (1500 cycles per minute, for 5 minutes) and stored at -70°C for 25 to 40 minutes after being obtained. We did not observe pellets in the samples of aqueous humor, but the second one (PAH) developed some deposit. In these, only the soluble supernatant was performed.

Protein determination: was performed using the Pierce-BCA Protein Assay method kit (Pierce, Rockford, USA), with average values of 0.7 µg/µl for AH and 6.2 µg/µl for PAH samples.

Electrophoresis and Immunoblotting: the procedures were carried out using various samples of AH and PAH (20 mg per column) submitted to SDS-PAGE with 5% gel concentration -- and 12% separation gel, in duplicate, with

one of the columns containing the Multi-Mark molecular standard (Invitrogen, Carlsbad, USA). The immunoblotting Hybond-P membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) was used to transferring proteins from the gel. We used the anti-alpha 1,2,3,5,6 & 7 antibody (Biomol International, Plymouth, USA) as primary marker and goat anti-mouse antibody labeled with alkaline phosphatase as the secondary marker, followed by development with NBT-BCIP (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Activity: 20S proteasome activity was determined by detecting the release of the fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) after cleavage from the substrate N-succinyl-Read-Read (Biomol International, Plymouth Meeting, USA). The fluorescence of free AMC was measured using a fluorometer with the filter set at 430 nm. Aqueous humor (or protein-containing aqueous humor), the fluorogenic substrate, DTT, MgCl₂ and 1M Tris, pH7.5, were added to the samples. For controlling, we added the proteasome inhibitor MG132 to some samples.

3. Results

We detected the presence of proteasome in samples of aqueous humor from both group of rabbits by Western Blotting techniques, which is shown in Figure 2. The protein standards indicate that the blot was in the corresponding standards of 20-30 kDa, what is accepted as the Proteasome weight. However, we didn't see any difference among the two groups.

1. SDS-PAGE Coomassie-colored (replica gel) of healthy rabbits: (Figure 1)

2. SDS-PAGE Coomassie-colored (replica gel) of hipergalactosemic rabbits: (Figure 2)
3. Western Blotting of healthy rabbits, showing the detected proteasome: (Figure 3)
4. Western Blotting of hipergalactosemic rabbits, showing the detected proteasome: (Figure 4)
5. The proteasome activity graphic (Figure 5)
6. Pellet of the centrifuged PAH sample, showing only very few cells (Figure 6)
7. Hematoxilin-eosin staining showing few cells on the PAH pellet.

In the activity assay, we have observed more fluorescence in samples where no inhibitor is present.

4. Discussion

It is difficult to determine the presence of free proteasome in plasma because it cannot be guaranteed that blood cells will not be ruptured during the procedure of obtaining the sample. However, the aqueous humor is an acellular environment, produced from plasma ultra-filtration in the ciliary body, with the presence of cells only occurring on pathological situations (e.g., uveitis, trauma, postoperative conditions, etc). In the present study, we demonstrated that proteasome is present in free form in this environment, a fact that can be explained by two possible mechanisms: the proteasome can enter the aqueous humor by being previously diluted in plasma, or can be produced locally by means of some active mechanism. The fact that proteasome is also presented

in protein-containing aqueous humor suggests that the first mechanism is the most likely one. However, we did not find and change in the pathological conditions of hipergalactosemic cataract.

5. References

1. Coux,O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L; Structure and functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annu Ver. Biochem.* (1996) 65:801-47
2. DeMartino G.N., Slaughter C.A.; The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* (1999 Aug) 6;274(32):22123-6.
3. Kumatori, A., Tanaka, K., Inamura, N., Sone, S., Ogura, T., Matsumoto, T., Tachikawa, T. Shin, S., Ichihara, A.; Abnormally high expresion of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci* (1990);87:7071-5
4. Lenz, H. J.; Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* (2003 May);29 Suppl 1:41-8.
5. Adams, J.; The proteasome: structure, function, and role in the cell.*Cancer Treat Rev.* (2003 May);29 Suppl 1:3-9
6. Ding, Q., Keller, J. N.; Does proteasome inhibition play a role in mediating neuropathology and neuron death in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.* 2003 Jun;5(3):241-5
7. Moore, D. J., Dawson, V. L., Dawson, T. M.; Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med.* 2003;4(1-2):95-108

-
8. Husom, A. D., Peters, E. A., et al; Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch Biochem Biophys.* (2004) Jan 1;421(1):67-76
 9. Fujiwara, T., Tanaka, K., et al; Molecular cloning of cDNA for proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) from rat liver: primary structure of the largest component (C2). *Biochemistry.* (1989 Sep) 5;28(18):7332-40.
 10. Louie, J. L., Kappahn, R. J., Ferrington, D. A.; Proteasome function and protein oxidation in the aged retina. *Exp eye res* (2002) 75:271-84
 11. Sommerburg, O., Ullrich, O., et al; Dose- and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light – Selective recognition and degradation by the 20S proteasome. *Free Rad Biol Med*, (1998) 24 vol 9:1369-74
 12. Cai, H., Sing, I., Wagner, B. J.; Gene expression of the proteasome in rat lens development. *Exp Eye Res* (1998) 66:339-46
 13. Wunderlich K, Golubnitschaja O, Pache M, Eberle AN, Flammer; Increased plasma levels of 20S proteasome alpha-subunit in glaucoma patients: an observational pilot study. *J.Mol Vis.* (2002 Nov) herefrom12;8:431-5.
 14. Karin, M., Bem-Neriah, Y.; Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-kappaB Activity. *Annu Ver Immunol* (2000) 18:621-63

Figures Legends

Figure 1: SDS-PAGE Coomassie-colored (replica gel) of healthy rabbits:

Figure 2: SDS-PAGE Coomassie-colored (replica gel) of hipergalactosemic rabbits:

Figure 3: Western Blotting of healthy rabbits, showing the detected proteasome:

Figure 4: Western Blotting of hipergalactosemic rabbits, showing the detected proteasome:

Figure 5: The proteasome activity graphic

Figure 6: Western Blotting of healthy rabbits, showing ubiquitinated substracts

Figure 7: Hematoxilin-eosin staining showing few cells on the PAH pellet.

Figure 1

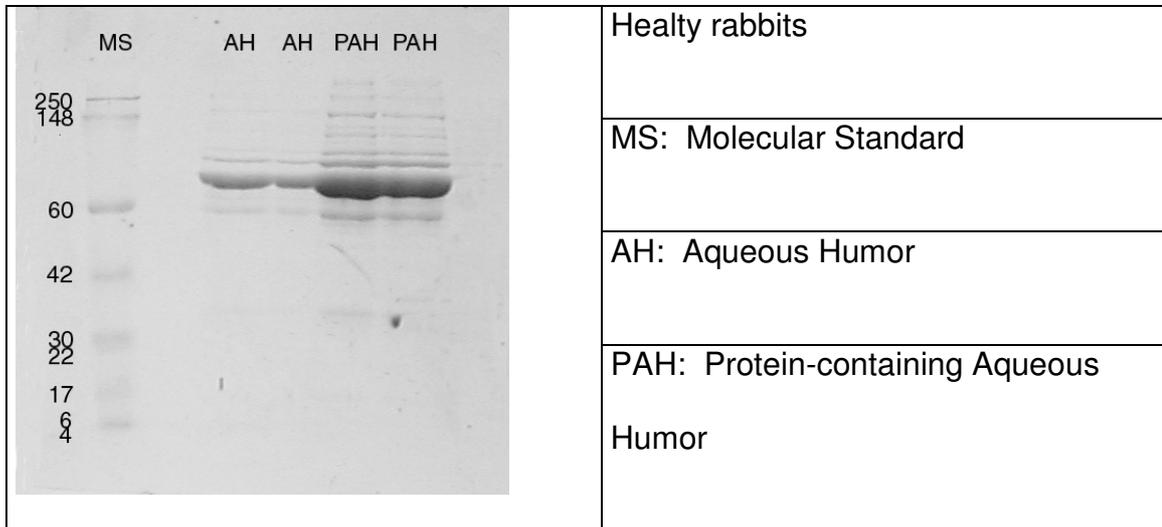


Figure 2

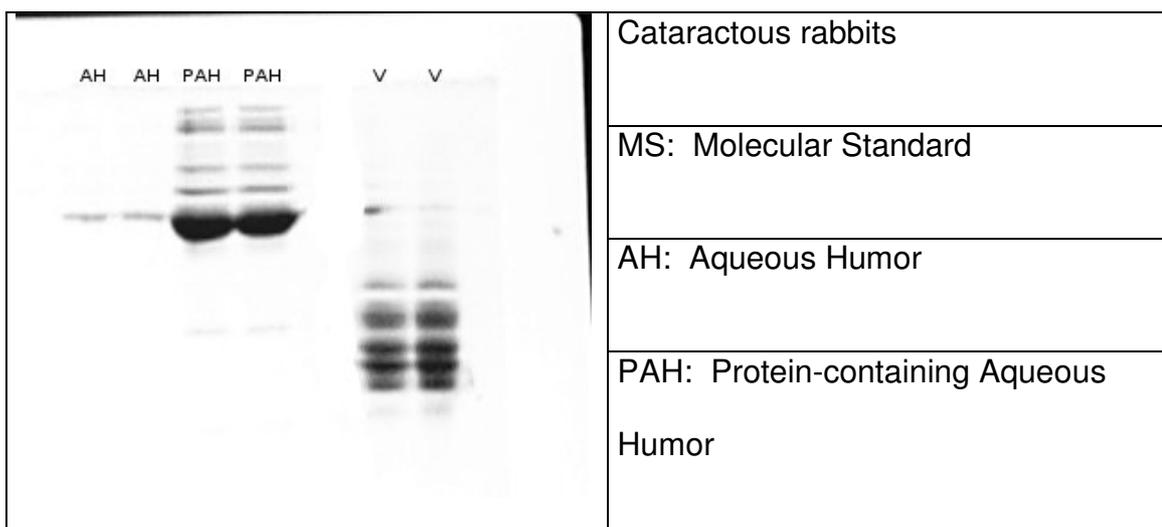


Figure 3

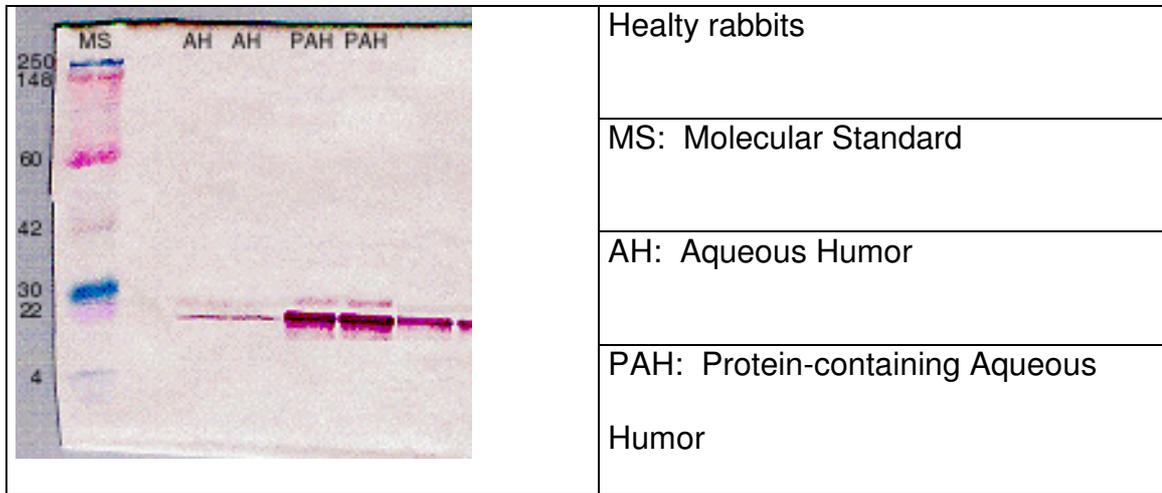


Figure 4

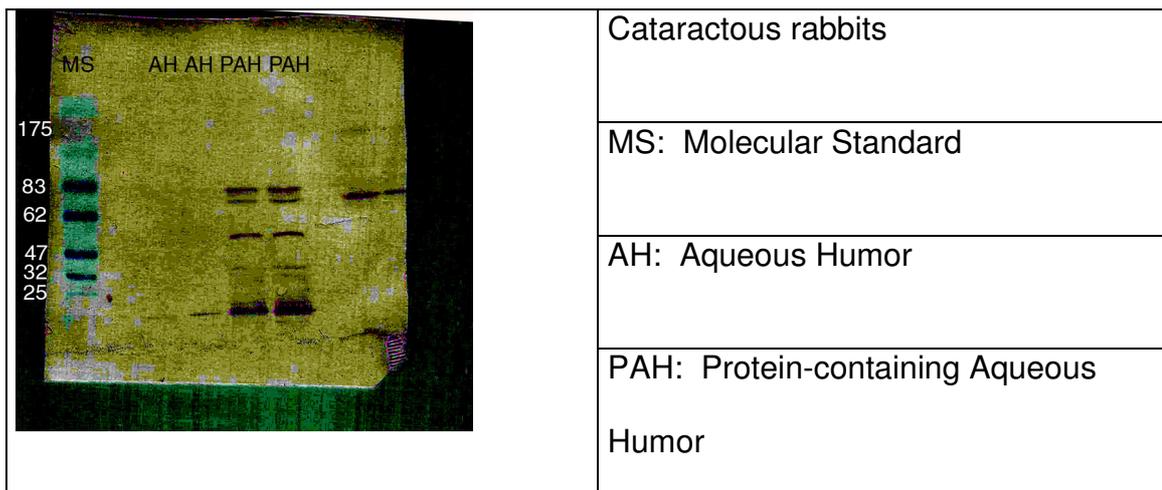


Figure 5

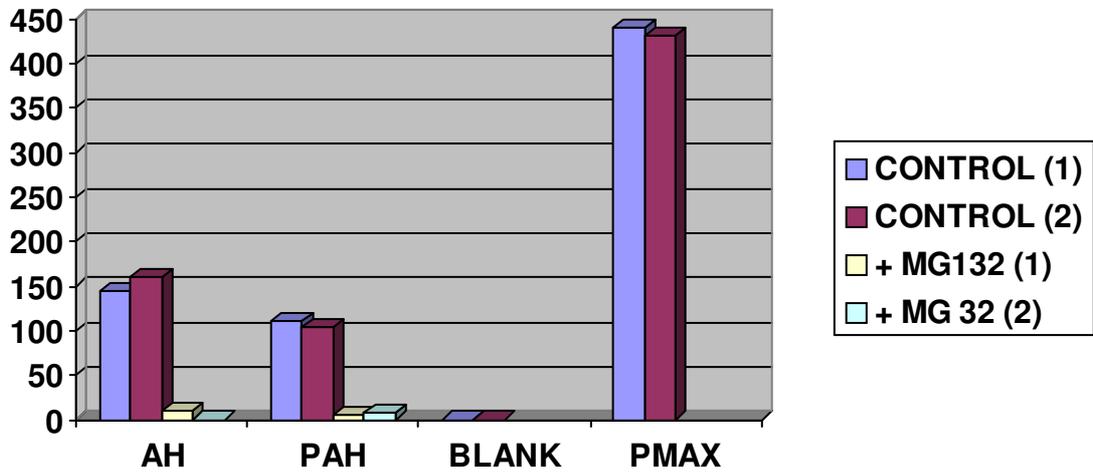


Figure 6

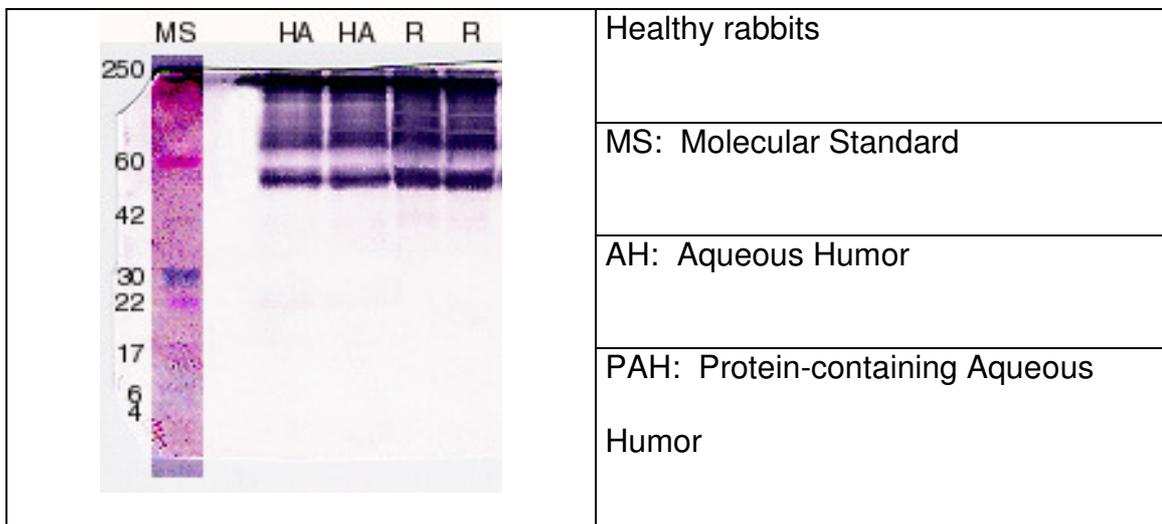
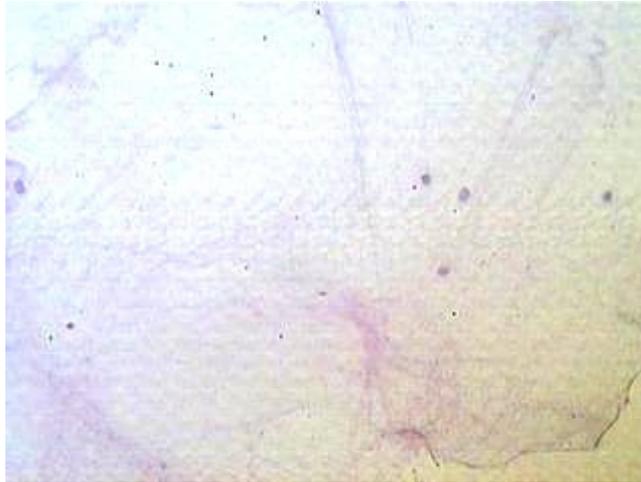


Figure 7



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)