

Um dos maiores feitos científicos nos últimos 40 anos foi o seqüenciamento do genoma humano, que contém cerca de 35 mil genes, mas codifica pelo menos dez vezes esse número em proteínas. Então, estudar apenas o genoma humano está longe de ser o suficiente para o entendimento dos processos fisiológicos e patológicos. Considerada o futuro da biologia molecular, a proteômica é o estudo do conjunto total de proteínas encontradas numa célula. Um dos principais métodos do proteoma é baseado na separação protéica por eletroforese bidimensional, que consiste em separar proteínas inicialmente pelo seu ponto isoelétrico (focalização isoelétrica) e depois pela massa molecular (SDS-PAGE), para posterior identificação por espectrometria de massa. O objetivo deste estudo é estabelecer os melhores parâmetros para realização desta técnica, como os procedimentos necessários para a preparação da amostra, seleção de tampões adequados, escolha da voltagem para a focalização e corrida eletroforética, tempo, protocolo de coloração, entre outros. Também objetivamos aplicar a 2D-eletroforese no estudo do redox-proteoma onde, pela reatividade de cisteínas reduzidas com N-etil-maleidamida (NEM) e as oxidadas com 5-iodo-acetamino-fluoresceína (5-AIF), os alvos protéicos de oxidação são marcados e analisados. Utilizamos o método de precipitação protéica com ácido tricloroacético 20% mais três lavagens em acetona para eliminar sais e impurezas das amostras. Optamos por breve incubação da amostra previamente precipitada com hidróxido de sódio 0.2 M para otimizar o processo de ressuspensão no tampão de hidratação. Essas metodologias serão primeiramente aplicadas em células diferenciadas de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) tratadas ou não com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina, sendo este um modelo amplamente utilizado para o estudo in vitro da doença de Parkinson. (CNPq Universal 476114/2008-0)