ARTIGO DE REVISÃO

Abordagens proteômicas e suas aplicações no campo da hematologia

Weber, Simone Schneider*

∗ Farmacêutica-Bioquímica, Doutora em Medicina Tropical e Saúde Pública e aluna do curso de Pós-graduação em Hematologia Laboratorial da Academia de Ciência e Tecnologia.

E-mail*: swbiotecnologia@yahoo.com.br*

Resumo

Técnicas proteômicas estão cada vez mais sendo empregadas na descoberta de biomarcadores, para a definição e caracterização de ambos os processo, fisiológico normal e o patológico. Os recentes progressos de metodologias empregadas nas abordagens proteômicas têm aberto novas oportunidades de aplicação médica, inclusive no campo das doenças hematológicas e medicina transfusional. No presente artigo é feita uma revisão das aplicações das proteômica no campo da hematologia, incluindo os resultados obtidos nas áreas da proteômica clínica, medicina transfusional e farmacoproteômica.

Palavras-chaves: proteômica; hematologia; medicina transfusional e farmacoproteômica

Abstract

Proteomic techniques are increasingly being employed for biomarker discovery, to the definition and characterization of both, physiological normal and the pathological processes. Recent progresses of methodology used in proteomic approaches have been open new opportunities for medical application, including in the field of hematological diseases and transfusion medicine. In the current report, the clinical application of proteomics in the field of hematology is reviewed, including the results obtained in the clinical proteomics, transfusion medicine and farmacoproteomic.

Keywords*: proteomic; hematology; transfusion medicine and farmacoproteomic*

INTRODUÇÃO

O termo `proteoma´ foi descrito pela primeira vez por Marc Wilkins em 1994 (Wilkins et al 1994) e refere-se ao conjunto de todas as proteínas que intervêm nos processos biológicos, as quais são produzidas com base no genoma. Enquanto o genoma é essencialmente estático e não muda de uma célula para outra de um mesmo organismo, o proteoma é altamente dinâmico e dependente do estado da célula [1]. Entretanto, a complexidade do proteoma não se explica apenas pelo número de proteínas, mas também, devido às inúmeras possibilidades de interações proteína-proteína e as modificações pós-traducionais (PTMs), as quais apresentam um papel importante na função das proteínas [2]. Tal complexidade, fez necessário a introdução de outros processos, como sub-fracionamento da amostra ou imunoprecipitação de proteínas, dando origem ao termo - subproteoma -

[3], o qual descreve um grupo específico de proteínas de um proteoma total, por exemplo: fosfoproteoma (conjunto de proteína fosforiladas); glicoproteoma (proteínas glicosiladas), ou ainda o proteoma de organelas celulares de interesse, tais como: núcleo, membrana, mitocôndria e outros.

Atualmente, denominações com o sufixo - ômica - têm proliferado para designar a descrição em larga escala de um grupo de diferentes moléculas, tais como: metaboloma, usado para uma coleção de metabólitos produzidos em um determinado momento fisiológico [4]; interactoma, que descreve as interações de uma proteína com as demais [5] e secretoma, para proteínas secretadas [6].

Muitas técnicas empregadas em proteômica têm como foco a identificação de biomarcadores, outras têm potencial para automação e utilização na rotina clínica com propósito diagnóstico e permitem a análise de inúmeros tipos de amostras e de alterações no perfil de expressão proteica associada a uma doença. De maneira geral, as metodologias empregadas em proteômica (**Figura 1**) envolvem a extração das proteínas da amostra, separação por eletroforese uni (SDS-PAGE) ou bidimensional (2D-PAGE) e/ou cromatografia liquida (LC), seguida de análise por espectrometria de massas (MS). A MS é uma técnica analítica que permite separar partículas de diferente relação massa-carga (m/z) em uma mistura complexa, muito utilizada em abordagens proteômicas, aplicadas em larga escala, para identificar proteínas expressas por um genoma, célula, tecido ou organismo [7].

Nos últimos anos, muitas questões importantes, referentes aos processos biológicos e mecanismos bioquímicos, têm sido respondidas com auxílio da proteômica e centenas de biomarcadores candidatos já foram descritos [8-14]. Assim, a aplicação das técnicas proteômicas representa uma importante etapa na expansão do conhecimento sobre a fisiopatologia das alterações hematológicas [15], bem como dos processos e vias metabólicas [16, 17].

No presente artigo é feita uma revisão das aplicações das proteômica no campo da hematologia, incluindo os resultados obtidos nas áreas da proteômica clínica, medicina transfusional e farmacoproteômica.

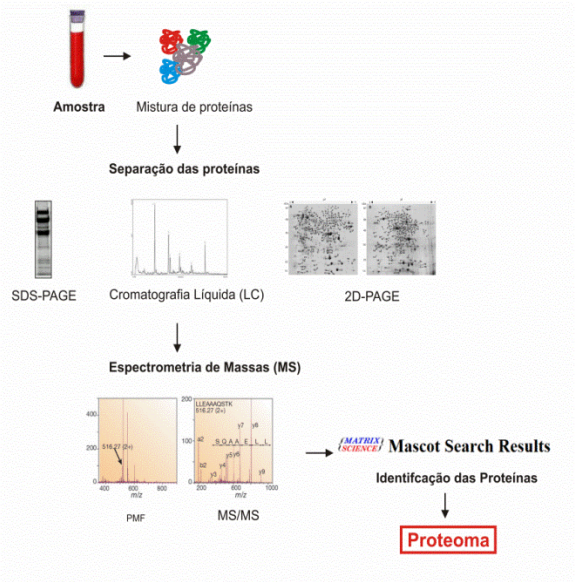

Figura 1- ***Visão geral das metodologias empregadas em proteômica.*** A separação das proteínas de uma amostra complexa pode ser realizada por diferentes técnicas acopladas a espectrometria de massas (MS). As técnicas mais comumente utilizadas envolvem separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE) ou bidimensional (2D-PAGE), bem como a cromatografia líquida (LC). A identificação das proteínas pode ser realizada pelo software Mascot, através de dois métodos: o PMF (do inglês: *peptide mass fingerprint*) ou o MS/MS. No PMF, o Mascot compara o padrão de digestão ou PMF da proteína que queremos identificar com os gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados disponíveis *on line*. Enquanto que, o MS/MS realiza o sequenciamento e identificação dos aminoácidos que compõem pequenas regiões dos peptídeos detectados. O conjunto de todas as proteínas identificadas constitui o Proteoma da amostra analisada.

Proteômica Clínica

A busca por marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico e tratamento de doenças

humanas, incluindo as neoplasias hematológicas, tem focado na análise proteômica de amostras biológicas, objetivando identificar alterações no padrão proteico associado a uma doença. Esse novo ramo da medicina foi recentemente denominado de Proteômica Clínica [18-20].

Biomarcador ou marcador biológico foi definido como uma característica que pode ser medida experimentalmente e indica a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica de um organismo ou uma resposta a um agente farmacológico [21]. Em suma, existem três tipos de biomarcadores: tipo zero, biomarcadores de doenças, que indicam determinadas patologias; tipo 1, biomarcadores usados pra detectar o efeito de uma droga; e o tipo 2, com aplicação em ensaios clínicos [22]. Dentre as abordagens proteômicas utilizadas na busca de biomarcadores, podemos citar um trabalho realizado por Bassim et al [23], o qual utilizando LC-MS/MS, os autores avaliaram amostras de saliva de pacientes com Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro, também conhecida como DECH ou GVHD (do inglês: *graft-versus-host disease*), uma complicação comum após o transplante de medula óssea (TMO) alogênico. Esse estudo permitiu a identificação de um padrão proteíco na DECH, caracterizado pela redução na expressão de duas proteínas, a lactotransferrina e a lactoperoxidase. Os autores sugerem que essa metodologia pode ser aplicada como um teste não invasivo para detecção precoce, rastreamento e acompanhemento da DEHC, em larga escala, nos pacientes após TMO alogênico. Uma abordagem semelhante já havia sido descrita para detecção de DEHC em amostras de urinas [24], onde um modelo de painel com múltiplos marcadores foi sugerido como um método eficiente e sensível de aplicação da proteômica clínica para o diagnóstico hematológico. Recentemente, foi publicada uma revisão mostrando um grupo de 21 proteínas candidatas a biomarcadores da DECH, identificadas por metodologias proteômicas ou imunooensaios [22], chamando a atenção para a importância das pesquisas nessa área. Outro exemplo importante, foi a descrição de um biomarcador para o diagnóstico diferencial do Linfoma de Hodgkin Clássico dos demais linfomas, a proteína ligadora de galactina 1 (Gal-1) [20]. Os autores descrevem que a superexpressão da Gal-1 está também associada ao mal prognóstico, bem como na refratariedade ao tratamento, nessa doença.

Os eritrócitos (do inglês: RBC, *red blood cells*) circulam no sangue, durante 120 dias, em contato com uma variedade de outras células e substâncias. Portanto, muitas alterações nos RBC podem resultar da interação dos RBCs com proteínas plasmáticas, drogas ou substâncias secretadas por células ativadas. A membrana eritrocitária contém proteínas do citoesqueleto e proteínas integrais, imersas na bicamada lipídica, todas importantes para a manutenção da integridade e forma celular. Defeitos nas proteínas do citoesqueleto levam a alterações na forma e fragilidade osmótica dos RBCs [25-27]. O primeiro estudo envolvendo proteoma dos eritrócitos foi realizado por Low et al [28] e descreveram 84 diferentes proteínas de membrana dos RBCs por MALDI TOF MS/MS. Atualmente, o proteoma das células vermelhas do sangue humano apresenta aproximadamente 750 proteínas descritas [29]. A partir da descrição do proteoma dos eritrócitos normais, é possível avaliar as alterações que ocorrem nas proteínas de membrana dos eritrócitos nas doenças hematológicas, como por exemplo, na anemia falciforme [19] ou na esferocitose hereditária [30]. Um revisão dos artigos publicados sobre proteômica envolvendo os eritrócitos e plasma de paciente com doença falciforme, descreve a ativação de proteínas antioxidantes, aumento dos

defeitos nas proteínas do citoesqueleto, bem como aumento das proteínas do reparo e desregulação das apolipoproteínas, como achados importantes e associados aos portadores de hemoglobina S (HbS) [19]. Um estudo realizado por Yuditskaya et al [31] mostrou evidências que a deficiência nos níveis de ApoA-1 predispõe o desenvolvimento da hipertensão pulmonar arterial (HPA) em pacientes com doença falciforme. Esse achado representa um possível alvo terapêutico, onde o aumento nos níveis de ApoA-1 poderiam prevenir complicações e aumentar a qualidade de vida desses pacientes. Os autores sugerem ainda, que os níveis baixos de ApoA-1 possam predispor outras complicações vasculares comuns na doença falciforme, como o priapismo e a úlcera cutânea de perna. Com relação à esferocitose hereditária, o defeito mais comum observado num grupo de 300 pacientes, foi a deficiência de uma proteína transmembrana, denominada de proteína banda-3 [30].

Atualmente, já existe descrição de 1.200 proteínas plaquetárias [32-35]. Zahedi et al. (2008) recentemente identificaram um novo sítio de fosforilação na GPIα (24), a qual juntamente com GPIβ são covalentemente ligadas por pontes dissulfetos a glicoproteína GPIb, um componente central do complexo GPIb-IX-V, receptor do Fator de von Willebrand (FVW) que medeia à ativação e adesão plaquetária. Embora, sabe-se que GPIβ é regulada negativamente por quinases A e G (PKA e PKG), não havia sido descrito que GPIα pudesse ser alvo de fosforilação. O processo de inibição da GPIα não é regulado pelas PKA e PKG, assim os autores supõem que outro tipo de quinase possa desempenhar um papel importante no processo de regulação da adesão plaquetária. Vários autores têm dispensado esforços no sentido de entender como os mecanismos de modificações pós-traducionais (PTMs) tais como fosforilações [36] e glicosilações [37] podem modular as funções das proteínas eritrocitárias e plaquetárias [29, 38].

A púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) é uma patologia adquirida que leva à redução da contagem de plaquetas, mediada por mecanismo imunológico. O tratamento inicial é a corticoterapia e, se caracterizada a falência ou dependência desta, a esplenectomia é a segunda opção. Zheng et al [11] analisaram amostras de soro de pacientes com PTI, os resultados indicaram que o nível de haptoglobina sérica pode ser utilizado como um indicador da eficácia da esplenectomia nesses pacientes.

Medicina Transfusional na era da Proteômica

Esse tópico descreve como as abordagens proteômicas têm contribuído na questão do controle de qualidade dos processos de obtenção e estocagem de hemocomponentes e hemoderivados. O concentrado de hemácias (CH) é o hemocomponente mundialmente mais transfundido, seguido do concentrado de plaquetas (CP) e plasma fresco congelado (PFC) [39].

Alguns trabalhos aplicando metodologias proteômicas no controle de qualidade de hemocomponentes têm sido publicados, incluindo plasma [40], hemácias [41] e plaquetas [42, 43]. Um estudo coordenado por Springer et al (2009) mostrou uma diferença marcante no perfil proteômico das plaquetas de pacientes com Diabetes tipo II em relação às plaquetas de doadores de sangue saudáveis, bem como diferentes efeitos da estocagem. Foram descritas 122 proteínas diferencialmente expressas (do total de 844 analisadas) no grupo de pacientes diabéticos. Os autores sugerem que os achados indicam a necessidade de aprofundar as análises de adequabilidade da doação de plaquetas pelos diabéticos, uma vez que essas plaquetas

envelhecem e ativam mais rapidamente durante a estocagem [44]. A detecção da ativação plaquetária pode avaliar precocemente as alterações que irão influir na viabilidade das plaquetas durante o período de estocagem [45]. Resultados semelhantes têm sido descritos para plaquetas doadas por voluntários hipertensos tratados com antagonista do receptor de angiotensina II [46]. Esses achados são de extrema importância, uma vez que esses pacientes, diabéticos e hipertensos, quando oportunamente tratados são aceitos como doadores de plaquetas, embora a função hemostática possa estar comprometida [39].

Comparado com os demais hemocomponentes, os CPs apresentam um risco maior de contaminação bacteriana durante a estocagem, uma vez que são mantidos a temperatura ambiente (22°C). Atualmente, o qualidade dos concentrados de plaquetas é determinada *in vitro* pela análise da morfologia plaquetária, *pH* e pelo teste de agregação plaquetária ou citometria de fluxo para avaliar a função [47]. Embora ainda exista limitações com relação às análises de morfologia e função das plaquetas mantidas sob estocagem [48]. Wurtz et al [49] e Glenister et al [50] comparam os efeitos da estocagem em concentrados de plaquetas randomizados e obtidos por aférese. O primeiro grupo descobriu que os níveis de fator plaquetário 4 (PF4) e β-tromboglobulina (β-TG) são maiores nos concentrados de plaquetas obtidos por aférese. Essas proteínas são encontradas nos α-grânulos secretados após ativação plaquetária [51]. Portanto, os autores sugerem que o método de coleta por aférese, o qual apresentou maior quantidade das proteínas plasmáticas PF4 e β-TG, possa produzir uma maior ativação das plaquetas durante a estocagem. No mesmo trabalho, Wurtz et al [49] descrevem a utilização de um teste que combina esferas magnéticas (ClinProt, Bruker Daltonik, Germany) e LC-MS/MS Bruker Daltonik, Germany) para detectar lesões plaquetárias causadas pela estocagem. Os sobrenadantes de plaquetas estocadas foram submetidos ao teste, o qual foi capaz de identificar picos em 7807 e 9347 m/z, correspondentes às proteínas plasmáticas PF4 e a β-TG, respectivamente [49].

Uma vez coletados, os concentrados de plaquetas podem ser submetidos à leucorredução com a finalidade de amenizar a ocorrência de complicações transfusionais, tais como: reação transfusional febril não-hemolítica (RTFNH), aloimunização contra antígenos leucocitários humanos (HLA), refratariedade plaquetária e prevenção de infecções transmitidas por leucócitos (CMV, HTLV e Creutzfeldt Jacob) [52]. Nesse sentido, Ryu et al analisou o filtrado de concentrados de plaquetas após 24 e 120 horas de estocagem. Os resultados mostraram que o número de spots/proteínas, no sobrenadante, aumentou com a estocagem e diminuiu com a filtração. Em particular, a quimiocina CXCL2 (proteína inflamatória α de macrófago), fator estimulador de colônias megacariocítico (Meg-CSF) e IL-22, foram proteínas que exibiram maiores alterações, corroborando com a importância da utilização do procedimento de leucorredução. A leucorredução não é um procedimento valioso apenas para concentrados de plaquetas, mas também durante a preparação de concentrados de hemácias. Resultados similares foram observados por Annis et al [53], onde os autores demonstraram que o sobrenadante de CH não leucorreduzido apresentou um acúmulo de proteínas com atividade imunogênicas e pró-inflamatórias, entre elas um promotor da adesão de neutrófilos e uma proteína de fase aguda.

As condições de estocagem de CHs, sob condições de aerobiose e anaerobiose, foram

avaliados por D'Amici et al [54]. O estresse oxidativo foi a principal causa das alterações nas proteínas das hemácias estocadas. Os achados sugerem que a deprivação de oxigênio durante a estocagem protege as proteínas eritrocitárias contra a degradação.

Outra aplicação da proteômica é no monitoramento dos efeitos da inativação de patógenos sobre a integridade das proteínas plasmáticas, presentes nos Plasmas Frescos Congelados (PFCs). Os príons causadores da variante da Doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) são exemplos que ilustram a necessidade de implantação de medidas de controle que previnam a transmissão de patógenos via transfusão de hemocomponentes [55]. As técnicas disponíveis para inativação de patógenos são: azul de metileno [56], solventes [56], irradiação (pra prevenção de TRALI) [57], incluindo o Intercept blood system [58], e mais recentemente o tratamento com vitamina B12 (riboflavina) [59]. Porém, esses métodos além da redução de agentes patogénicos podem resultar na redução de atividade dos factores da coagulação [56].

Em Medicina Transfusional, incompatibilidades entre doadores e receptores, com relação aos antígenos plaquetários humanos (HPAs), podem causar refratariedade plaquetária e púrpura pós-transfusão [60]. Em 2009, Garritsen et al [61] utilizando metodologia MALDI-TOF-MS (do inglês: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) [62, 63] validaram uma técnica de genotipagem de antígenos plaquetários humanos (HPAs), a qual se mostrou vantajosa em comparação com os métodos convencionais, tais como rapidez, acúmulo de grande quantidade de dados, análise combinada de seis *lócus* (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, e HPA-15) em uma única reação e alta precisão, permitindo o uso desta técnica em larga escala.

Farmacoproteômica

O termo farmacoproteômica engloba ferramentas proteômicas utilizadas para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas e seus mecanismos de ação [64, 65], bem como para avaliar a resposta celular a uma determinada droga ou fármaco [66].

Um estudo combinando técnicas genômicas e proteômicas avaliou alterações no perfil de proteínas plasmáticas em pacientes tratados com anticoagulante oral [66]. Os autores identificaram altos níveis de transtirretina (TTR) no soro dos pacientes que receberam dosagens baixas de warfarina, mas não aqueles tratados com doses elevadas do anticoagulante.

Na anemia falciforme (AF), as hemácias falciformes, ou drepanócitos, aderem ao endotélio via fosfatidil-serina (PS), aspecto clinicamente relevante, o qual está associado às crises de vaso-oclusivas. Sabemos que os níveis de PS na superfície celular dos drepanócitos são cerca de cinco vezes maior que nos eritrócitos normais, efeito induzido pela liberação de leucotrienos seguido pela ativação da 5-lipoxigenase [67]. A hidroxiuréia, um medicamento utilizado na prevenção das crises vaso-oclusivas da AF, e que induz um aumento nos níveis de Hemoglobina F (HbF), parece atenuar a expressão de PS na superfície das hemácias falcizadas e diminui a adesão ao endotélio vascular [68]. Hidroxiuréia, evidentemente induz outros efeitos, independente do aumento da HbF, tais como aumento da expressão de proteínas envolvidas na proteção contra estresse oxidativo [69, 70] e proteínas da via glicolítica, como GAPDH e aldolase [71]. Enzimas da via glicolítica são conhecidas por

serem reguladas pelo fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1)[72], o qual é um regulador central da resposta à mudanças na concentração de oxigênio.

A proteômica tem sido usada para estudar os mecanismos de resistência em pacientes intolerantes aos inibidores da tirosino-quinase (imatinibe) [73]. A identificação de proteínas expressas no plasma obtido da medula óssea de pacientes não responsivos ao imatinibe, revelou a existência de regulação da via de sinalização WNT, com ativação de Wnt1 e Wnt5a. A ativação constitutiva da sinalização WNT é considerada um evento inicial necessário na gênese da maioria das neoplasias [74]. Portanto, os autores sugerem que esses achados possam estar contribuindo para a resistência ao tratamento com os inibidores da tirosina-quinase no grupo de pacientes avaliados [73].

Recentemente, a proteômica foi também descrita como uma metodologia eficiente para a caracterização do mecanismo de ação dos inibidores da tirosina-quinase, os quais se mostraram capaz de induzir a apoptose das células BCR-ABL positivas [75].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteômica tem provado ser uma ferramenta poderosa para análise de hemocomponentes e derivados do sangue. Portanto, abordagens proteômicas estão cada vez mais sendo aplicadas na medicina transfusional. Os resultados podem fornecer dados clínicos relevantes para o aumento da segurança e eficácia transfusional, bem como, para aprimorar os métodos de estocagem desses produtos. A área da medicina transfusional descata-se como uma das áreas mais promissoras para aplicação da proteômica. Nesse sentido, a proteômica e medicina transfusional aparecem como disciplinas complementares, e uma aliança entre os pesquisadores de ambas as áreas se faz necessário, objetivando aprimorar os métodos de obtenção e manutenção dos hemocomponentes.

Enquanto que, a proteômica clínica introduz uma nova perspectiva na geração de biomarcadores com aplicação diagnóstica ou terapêutica. Embora, a descrição de proteínas diferencialmente expressas nos tecidos doentes possa representar importantes indicadores moleculares, existem vários desafios técnicos para o desenvolvimento de testes clínicos. Portanto, dificilmente um marcador isolado terá sensibilidade e especificidade suficientes para a predição ou diagnóstico, e provavelmente, serão necessários painéis de proteínas associadas a condições específicas. Sendo assim, as pesquisas com objetivo de buscar biomarcadores, ainda precisam percorrer um longo caminho até que possam efetivamente apresentar aplicações clínicas. Entretanto, estudos têm dispensado esforços nesse sentido, e esperamos que no futuro breve, a proteômica possa contribuir para a melhoria do diagnóstico e tratamento dos pacientes hematológicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Prof. Cláudio Brandão* pelas valiosas sugestões na versão final do artigo.

BIBLIOGRAFIA

1. Godovac-Zimmermann J, Brown LR: **Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics**. *Mass Spectrom Rev* 2001, **20**(1):1-57.

2. Jensen LJ, Gupta R, Blom N, Devos D, Tamames J, Kesmir C, Nielsen H, Staerfeldt HH, Rapacki K, Workman C *et al*: **Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features**. *J Mol Biol* 2002, **319**(5):1257-1265.

3. Sem DS: **Spectral techniques in proteomics**. Boca Raton: CRC Press; 2007.

4. Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B *et al*: **The human serum metabolome**. *PLoS One* 2011, **6**(2):e16957.

5. Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, Hill DE: **Interactome: gateway into systems biology**. *Hum Mol Genet* 2005, **14 Spec No. 2**:R171-181.

6. Weber SS, Parente AF, Borges CL, Parente JA, Bailao AM, Soares CMA: **Analysis of the secretomes of *Paracoccidioides* mycelia and yeast cells**. *PLoS One* 2012, **7**(12):e52470.

7. Schubert P, Hoffman MD, Sniatynski MJ, Kast J: **Advances in the analysis of dynamic protein complexes by proteomics and data processing**. *Anal Bioanal Chem* 2006, **386**(3):482-493.

8. Kruger T, Lautenschlager J, Grosskreutz J, Rhode H: **Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery**. *Proteomics Clin Appl* 2013, **7**(1-2):123-135.

9. Lee YJ, Choi IK, Sheen YY, Park SN, Kwon HJ: **Identification of EBP50 as a specific biomarker for carcinogens via the analysis of mouse lymphoma cellular proteome**. *Mol Cells* 2012, **33**(3):309-316.

10. Zhang PF, Zeng GQ, Hu R, Li C, Yi H, Li MY, Li XH, Qu JQ, Wan XX, He QY *et al*: **Identification of flotillin-1 as a novel biomarker for lymph node metastasis and prognosis of lung adenocarcinoma by quantitative plasma membrane proteome analysis**. *J Proteomics* 2012, **77**:202-214.

11. Zheng CX, Ji ZQ, Zhang LJ, Wen Q, Chen LH, Yu JF, Zheng D: **Proteomics-based identification of haptoglobin as a favourable serum biomarker for predicting long-term response to splenectomy in patients with primary immune thrombocytopenia**. *J Transl Med* 2012, **10**:208.

12. Chen CP, Chen YH, Chern SR, Chang SJ, Tsai TL, Li SH, Chou HC, Lo YW, Lyu PC, Chan HL: **Placenta proteome analysis from Down syndrome pregnancies for biomarker discovery**. *Mol Biosyst* 2012, **8**(9):2360-2372.

13. Penno M, Ernst M, Hoffmann P: **Comparative 2D DIGE analysis of the depleted serum proteome for biomarker discovery**. *Methods Mol Biol* 2012, **854**:207-220.

14. Wheelock CE, Goss VM, Balgoma D, Nicholas B, Brandsma J, Skipp PJ, Snowden S, D'Amico A, Horvath I, Chaiboonchoe A *et al*: **Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases**. *Eur Respir J* 2013.

15. Liumbruno G, D'Alessandro A, Grazzini G, Zolla L: **Blood-related proteomics**. *J Proteomics* 2010, **73**(3):483-507.

16. May P, Christian N, Ebenhoh O, Weckwerth W, Walther D: **Integration of proteomic and metabolomic profiling as well as metabolic modeling for the functional analysis of metabolic networks**. *Methods Mol Biol* 2011, **694**:341-363.

17. Colland F, Jacq X, Trouplin V, Mougin C, Groizeleau C, Hamburger A, Meil A, Wojcik J, Legrain P, Gauthier JM: **Functional proteomics mapping of a human signaling pathway**. *Genome Res* 2004, **14**(7):1324-1332.

18. Lion N, Tissot JD: **Application of proteomics to hematology: the revolution is starting**. *Expert Rev Proteomics* 2008, **5**(3):375-379.

19. Yuditskaya S, Suffredini AF, Kato GJ: **The proteome of sickle cell disease: insights from exploratory proteomic profiling**. *Expert Rev Proteomics* 2010, **7**(6):833-848.

20. Kamper P, Ludvigsen M, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Rabinovich GA, Moller MB, Nyengaard JR, Honore B, d'Amore F: **Proteomic analysis identifies galectin-1 as a predictive biomarker for relapsed/refractory disease in classical Hodgkin lymphoma**. *Blood* 2011, **117**(24):6638-6649.

21. Follen M, Schottenfeld D: **Surrogate endpoint biomarkers and their modulation in cervical chemoprevention trials**. *Cancer* 2001, **91**(9):1758-1776.

22. Paczesny S: **Discovery and validation of graft-versus-host disease biomarkers**. *Blood* 2013, **121**(4):585-594.

23. Bassim CW, Ambatipudi KS, Mays JW, Edwards DA, Swatkoski S, Fassil H, Baird K, Gucek M, Melvin JE, Pavletic SZ: **Quantitative salivary proteomic differences in oral chronic graft-versus-host disease**. *J Clin Immunol* 2012, **32**(6):1390-1399.

24. Weissinger EM, Hertenstein B, Mischak H, Ganser A: **Online coupling of capillary electrophoresis with mass spectrometry for the identification of biomarkers for clinical diagnosis**. *Expert Rev Proteomics* 2005, **2**(5):639-647.

25. Delaunay J: **The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders**. *Blood Rev* 2007, **21**(1):1-20.

26. Perrin J, Marchand-Arvier M, Latger-Cannard V, Vigneron C, Lecompte T: **[Incubated osmotic fragility test does not exclude red blood cell membrane disorders! About a case of hereditary elliptocytosis]**. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006, **64**(5):491-495.

27. Delaunay J: **The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations**. *Semin Hematol* 2004, **41**(2):165-172.

28. Low TY, Seow TK, Chung MC: **Separation of human erythrocyte membrane associated proteins with one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis followed by identification with matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry**. *Proteomics* 2002, **2**(9):1229-1239.

29. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O: **The human red blood cell proteome and interactome**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, **232**(11):1391-1408.

30. Polprasert C, Chiangjong W, Thongboonkerd V: **Marked changes in red cell membrane proteins in hereditary spherocytosis: a proteomics approach**. *Mol Biosyst* 2012, **8**(9):2312-2322.

31. Yuditskaya S, Tumblin A, Hoehn GT, Wang G, Drake SK, Xu X, Ying S, Chi AH, Remaley AT, Shen RF *et al*: **Proteomic identification of altered apolipoprotein patterns in pulmonary hypertension and**

vasculopathy of sickle cell disease. *Blood* 2009, **113**(5):1122-1128.

32. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB: **Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions**. *Blood* 2004, **103**(6):2096-2104.

33. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ: **Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes**. *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**(2):133-144.

34. Gevaert K, Goethals M, Martens L, Van Damme J, Staes A, Thomas GR, Vandekerckhove J: **Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides**. *Nat Biotechnol* 2003, **21**(5):566-569.

35. Moebius J, Zahedi RP, Lewandrowski U, Berger C, Walter U, Sickmann A: **The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins**. *Mol Cell Proteomics* 2005, **4**(11):1754-1761.

36. Zahedi RP, Lewandrowski U, Wiesner J, Wortelkamp S, Moebius J, Schutz C, Walter U, Gambaryan S, Sickmann A: **Phosphoproteome of resting human platelets**. *J Proteome Res* 2008, **7**(2):526-534.

37. Lewandrowski U, Zahedi RP, Moebius J, Walter U, Sickmann A: **Enhanced N-glycosylation site analysis of sialoglycopeptides by strong cation exchange prefractionation applied to platelet plasma membranes**. *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**(11):1933-1941.

38. Dittrich M, Birschmann I, Stuhlfelder C, Sickmann A, Herterich S, Nieswandt B, Walter U, Dandekar T: **Understanding platelets. Lessons from proteomics, genomics and promises from network analysis**. *Thromb Haemost* 2005, **94**(5):916-925.

39. D'Alessandro A, Zolla L: **Proteomics for quality-control processes in transfusion medicine**. *Anal Bioanal Chem* 2010, **398**(1):111-124.

40. Issaq HJ, Xiao Z, Veenstra TD: **Serum and plasma proteomics**. *Chem Rev* 2007, **107**(8):3601-3620.

41. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M: **In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells**. *Blood* 2006, **108**(3):791-801.

42. Perrotta PL, Bahou WF: **Proteomics in platelet science**. *Curr Hematol Rep* 2004, **3**(6):462-469.

43. Thiele T, Steil L, Volker U, Greinacher A: **Transfusion medicine and proteomics. Alliance or coexistence?** *Blood Transfus* 2010, **8 Suppl 3**:s16-25.

44. Springer DL, Miller JH, Spinelli SL, Pasa-Tolic L, Purvine SO, Daly DS, Zangar RC, Jin S, Blumberg N, Francis CW *et al*: **Platelet proteome changes associated with diabetes and during platelet storage for transfusion**. *J Proteome Res* 2009, **8**(5):2261-2272.

45. Tynngard N: **Preparation, storage and quality control of platelet concentrates**. *Transfus Apher Sci* 2009, **41**(2):97-104.

46. Sacristan D, Marques M, Zamorano-Leon JJ, Luque M, Armengol J, Del Castillo J, Martin J, Delpon E, Ramos-Mozo P, de Prada TP *et al*: **Modifications by Olmesartan medoxomil treatment of the platelet protein profile of moderate hypertensive patients**. *Proteomics Clin Appl* 2008, **2**(9):1300-1312.

47. Cardigan R, Turner C, Harrison P: **Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine**. *Vox Sang* 2005, **88**(3):153-163.

48. Thiele T, Steil L, Gebhard S, Scharf C, Hammer E, Brigulla M, Lubenow N, Clemetson KJ, Volker U, Greinacher A: **Profiling of alterations in platelet proteins during storage of platelet concentrates**. *Transfusion* 2007, **47**(7):1221-1233.

49. Wurtz V, Hechler B, Ohlmann P, Isola H, Schaeffer-Reiss C, Cazenave JP, Van Dorsselaer A, Gachet C: **Identification of platelet factor 4 and beta-thromboglobulin by profiling and liquid chromatography tandem mass spectrometry of supernatant peptides in stored apheresis and buffy-coat platelet concentrates**. *Transfusion* 2007, **47**(6):1099-1101.

50. Glenister KM, Payne KA, Sparrow RL: **Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage**. *Transfusion* 2008, **48**(1):99-107.

51. Blair P, Flaumenhaft R: **Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates**. *Blood Rev* 2009, **23**(4):177-189.

52. Sharma RR, Marwaha N: **Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries**. *Asian J Transfus Sci* 2010, **4**(1):3-8.

53. Anniss AM, Glenister KM, Killian JJ, Sparrow RL: **Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products**. *Transfusion* 2005, **45**(9):1426-1433.

54. D'Amici GM, Timperio AM, Zolla L: **Coupling of native liquid phase isoelectrofocusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation**. *J Proteome Res* 2008, **7**(3):1326-1340.

55. Klein HG: **Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply**. *J Intern Med* 2005, **257**(3):224-237.

56. Solheim BG: **Pathogen reduction of blood components**. *Transfus Apher Sci* 2008, **39**(1):75-82.

57. Seltsam A, Muller TH: **UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma**. *Transfus Med Hemother* 2011, **38**(1):43-54.

58. Infanti L, Stebler C, Job S, Ruesch M, Gratwohl A, Irsch J, Lin L, Buser A: **Pathogen-inactivation of platelet components with the INTERCEPT Blood System : a cohort study**. *Transfus Apher Sci* 2011, **45**(2):175-181.

59. Marschner S, Goodrich R: **Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light**. *Transfus Med Hemother* 2011, **38**(1):8-18.

60. Rosenberg N, Dardik R: **Post-transfusion purpura when and why?** *Isr Med Assoc J* 2006, **8**(10):709-710.

61. Garritsen HS, Fan AX, Bosse N, Hannig H, Kelsch R, Kroll H, Holzgreve W, Zhong XY: **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for genotyping of human platelet-specific antigens**. *Transfusion* 2009, **49**(2):252-258.

62. Sauer S, Gelfand DH, Boussicault F, Bauer K, Reichert F, Gut IG: **Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry**. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(5):e22.

63. Sauer S, Gut IG: **Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002, **782**(1-2):73-87.

64. Jain KK: **Role of pharmacoproteomics in the development of personalized medicine**. *Pharmacogenomics* 2004, **5**(3):331-336.

65. Hess S: **The emerging field of chemo- and pharmacoproteomics**. *Proteomics Clin Appl* 2013, **7**(1-2):171-180.

66. Saminathan R, Bai J, Sadrolodabaee L, Karthik GM, Singh O, Subramaniyan K, Ching CB, Chen WN, Chowbay B: **VKORC1 pharmacogenetics and pharmacoproteomics in patients on warfarin anticoagulant therapy: transthyretin precursor as a potential biomarker**. *PLoS One* 2010, **5**(12):e15064.

67. Haynes J, Jr., Obiako B, King JA, Hester RB, Ofori-Acquah S: **Activated neutrophil-mediated sickle red blood cell adhesion to lung vascular endothelium: role of phosphatidylserine-exposed sickle red blood cells**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, **291**(4):H1679-1685.

68. Haynes J, Jr., Obiako B, Hester RB, Baliga BS, Stevens T: **Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, **294**(1):H379-385.

69. Ghatpande SS, Choudhary PK, Quinn CT, Goodman SR: **Pharmaco-proteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008, **233**(12):1510-1517.

70. Ghatpande SS, Choudhary PK, Quinn CT, Goodman SR: **In vivo pharmaco-proteomic analysis of hydroxyurea induced changes in the sickle red blood cell membrane proteome**. *J Proteomics* 2010, **73**(3):619-626.

71. Hryniewicz-Jankowska A, Choudhary PK, Ammann LP, Quinn CT, Goodman SR: **Monocyte protein signatures of disease severity in sickle cell anemia**. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009, **234**(2):210-221.

72. Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ: **Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element**. *Clin Chim Acta* 2008, **395**(1-2):6-13.

73. Pizzatti L, Panis C, Lemos G, Rocha M, Cecchini R, Souza GH, Abdelhay E: **Label-free MSE proteomic analysis of chronic myeloid leukemia bone marrow plasma: disclosing new insights from therapy resistance**. *Proteomics* 2012, **12**(17):2618-2631.

74. Katoh M: **WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)**. *Oncol Rep* 2005, **14**(6):1583-1588.

75. Balabanov S, Wilhelm T, Venz S, Keller G, Scharf C, Pospisil H, Braig M, Barett C, Bokemeyer C, Walther R *et al*: **Combination of a Proteomics Approach and Reengineering of Meso Scale Network Models for Prediction of Mode-of-Action for Tyrosine Kinase Inhibitors**. *PLoS One* 2013, **8**(1):e53668.