UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL APLICADA PARA O ESTUDO DA
MORTE SÚBITA DOS CITROS**

Marcelo Delmar Cantú

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2007

À DEUS, pela vida

À minha mãe Ana e ao meu pai Naldo (in memoriam)
pelo amor, compreensão e apoio incondicional em
todos os momentos

Novamente à minha mãe, a maior graça que Deus me deu

À tuquinha, minha irmãzinha querida

Ao meu padrasto Genoíno pelo apoio, carinho e
consideração

À Valéria, pelo companherismo e amor

AGRADECIMENTOS

👉 Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho pela admirável capacidade de agir como orientador e amigo, simultaneamente. Além disso, muitíssimo obrigado por um dia ter me dado a honra de ser seu aluno.

👉 Ao meu “co-orientador”, e acima de tudo amigo, Dr. Nelson Arno Wulff (Fundecitrus) pela incrível oportunidade de trabalhar ao seu lado. Agradeço também a todo o pessoal do laboratório do Fundecitrus pelo excelente convívio.

👉 Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade de trabalhar no CROMA.

👉 Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Palma (Unesp – Rio Claro) pela oportunidade de realizar os experimentos de eletroforese em seu laboratório.

👉 Aos orientadores e amigos William S. Lane e John M. Neveu (*Microchemistry&Proteomics Analysis Facility – Harvard University*), minha imensa gratidão pelos ensinamentos e acima de tudo pelo prazer de tê-los conhecido. Agradeço também a todos os funcionários do *Microchemistry Lab*.

👉 Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do LNLS pela oportunidade de realizar os experimentos de MALDI-TOF-TOF.

👉 Aos amigos do Grupo de Bioanalítica, Microfabricação e Separações (BioMicS): Ana Paula (Jaboticabal), Ana Paula Formenton, Célia, Evandro, Flávia, Gabriela, Jonatan, Juliana, Karina Fraige, Karina Lupetti, Leandro,

Maribel, Nilson, Regiane, Renê, Rosilene, Sheila, Valéria e Wendell. Meu sincero muito obrigado pelos momentos compartilhados.

👉 Aos funcionários do CROMA: Alcimar, Elaine, Ígor, Luís, Marcão, Odete e Vítor. Obrigado pela ajuda e atenção.

👉 Ao Guilherme e Wendell pela amizade que permitiu que convivessemos num ambiente recheado de alegria e descontração.

👉 Ao Evandro (partner) pelo apoio, grande amizade e verdadeira confiança.

👉 Ao Sandro: Em uma oportunidade no passado, agradei esse meu grande amigo referenciando um de seus pensamentos com a seguinte frase: “ao enfrentar uma situação adversa procure visualizar os pontos positivos, mesmo que eles não existam”. Hoje, indiscutivelmente mais maduro, afirmo que ele estava certo, ou seja, os pontos positivos sempre existem. Agora, meu próximo desafio é aprender (novamente com o Sandro) a ter a lucidez necessária para enxergá-los.

👉 Aos funcionários do IQSC – graduação, pós-graduação, biblioteca.

👉 À FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo: 03/13423-5).

👉 À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Do what you can, with what you have, where you are”

Theodore Roosevelt

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância econômica da citricultura brasileira.....	1
1.2 Características que aumentam a vulnerabilidade da citricultura brasileira à pragas e doenças.....	2
1.3 Morte súbita dos citros (MSC)	2
1.4 Biomarcadores.....	9
1.5 Análise proteômica.....	10
1.5.1 Estratégias para abordar um estudo proteômico: Bottom-up vs Top-Down.....	11
1.5.2 Detalhamento de um estudo proteômico empregando a abordagem Bottom-up.....	14
1.6 Eletroforese bidimensional.....	16
1.6.1 Primeira Dimensão: Focalização Isoelétrica (IEF)	17

1.6.2 Segunda Dimensão: Separação por Tamanho (SDS-PAGE)	21
1.6.3 Métodos de detecção de proteínas em géis	23
1.6.4 Eletroforese bidimensional Diferencial (2D-DIGE)	24
1.7 Espectrometria de massas	29
1.7.1 Técnicas de ionização	30
1.7.1.1 Ionização por Electrospray (ESI)	30
1.7.1.2 Ionização/desorção a laser assistida assistida por matriz (MALDI)	31
1.7.2 Analisadores de massas	32
1.7.2.1 Tempo de voo (TOF)	32
1.7.2.2 Ion Trap	34
1.7.3 Instrumentos híbridos	40
1.7.3.1 TOF-TOF	40
1.7.3.2 LTQ-orbitrap	41
1.8 Cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)	44
1.9 Softwares de busca de proteínas em bancos de dados: Sistemática de busca	47
1.10 Fragmentação e sequenciamento de peptídeos	50
1.11 Análise proteômica aplicada a plantas	57
2. OBJETIVOS	59
3. EXPERIMENTAL	61

3.1 Materiais.....	61
3.2 Solventes e Reagentes (listados em ordem alfabética).....	61
3.3 Amostras de plantas sadias e infectadas.....	63
3.4 Equipamentos.....	67
3.4.1 Moinho Criogênico.....	67
3.4.2 Eletroforese bidimensional.....	67
3.4.3 Espectrometria de Massas – MALDI-TOF-TOF.....	68
3.4.4 Cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)	69
3.5 Preparo das amostras.....	70
3.5.1 Moagem em moinho criogênico.....	70
3.5.2 Métodos de extração de proteínas.....	71
3.5.3 Quantificação das proteínas totais.....	75
3.6 Método de separação: Eletroforese Bidimensional.....	76
3.6.1 Focalização Isoelétrica (IEF)	76
3.6.2 SDS-PAGE.....	78
3.7 Excisão dos spots selecionados e digestão enzimática.....	80
3.8 Dessalinização das amostras usando Zip Tip (lab-made)	81
3.9 Espectrometria de Massas.....	82
3.9.1 MALDI-TOF-TOF	82
3.10 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (LC/MS) e interpretação dos resultados obtidos.....	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85

4.1 Avaliação dos métodos para extração de proteínas e otimização das condições de separação (Eletroforese Bidimensional)	85
4.2 Análise comparativa de géis obtidos para amostras sadias e infectadas pela MSC.....	102
<i>4.2.1 Análise comparativa empregando fitas IPG de 24 cm (pH 3-10 NL) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e sadias.....</i>	105
<i>4.2.2 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10 L) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) e copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles.....</i>	110
<i>4.2.3 Análise comparativa e semi-quantitativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 4-7) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles.....</i>	115
<i>4.2.4 Análise comparativa e semi-quantitativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles.....</i>	120
<i>4.2.5 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e assintomáticas.....</i>	123
<i>4.2.6 Análise temporal comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 6-11) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) e de plantas doentes e sadias.....</i>	125
<i>4.2.7 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de porta-enxerto (limão volkameriano) de plantas doentes e sadias.....</i>	127
4.3 Análise dos spots por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) e LC-ESI-MS/MS: Identificação das proteínas.....	129
<i>4.3.1 Análise dos spots por MALDI-TOF-TOF.....</i>	131

4.3.2 Análise dos spots por LC-ESI-MS/MS.....	156
4.3.2.1 Spots analisados por LC-ESI-MS/MS – busca em banco de dados usando o Mascot.....	164
4.3.2.2 Spots analisados por LC-ESI-MS/MS – busca em banco de dados usando o Sequest.....	184
4.3.3 Comparação dos resultados obtidos por MALDI-TOF-TOF E LC-ESI-MS/MS.....	201
4.3.4 Avaliação comparativa da performance do Mascot e do Sequest para a identificação de proteínas submetidas à análise por LC-ESI-MS/MS.....	203
4.4 Interpretação do significado biológico relacionado a supressão de chitinases e miraculin like em amostras de plantas doentes.....	206
5. CONCLUSÕES.....	211
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	215
 APÊNDICE I.....	 228
APÊNDICE II.....	229

LISTA DE FIGURAS

	<i>pág.</i>
Figura 1. Três diferentes plantas representam a evolução da MSC..	3
Figura 2. Alguns sintomas da característicos da MSC: Perda generalizada do brilho das folhas e apodrecimento de raízes e radículas.....	4
Figura 3. Amarelecimento interno da casca do porta-enxerto (limão cravo e limão volkameriano) na região abaixo da enxertia. Único sintoma específico da MSC, usado portanto para o diagnóstico da doença.....	5
Figura 4. Levantamento, realizado pelo Fundecitrus, sobre a disseminação da MSC nos estados de São Paulo e Minas Gerais.....	6
Figura 5. Foto ilustrativa de uma planta com MSC subenxertada com duas novas plantas.....	8
Figura 6. Esquema comparando as estratégias <i>Bottom-up</i> e <i>Top-Down</i> , empregadas em análise proteômica.....	13
Figura 7. Esquema ilustrativo das seis etapas que comumente integram um estudo proteômico empregando espectrometria de massas.....	15
Figura 8. Esquema mostrando as etapas envolvidas no processo de separação de uma mistura de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão a separação ocorre de acordo com o pI, enquanto que a massa molecular relativa das proteínas é a propriedade usada para a separação na segunda dimensão.....	17
Figura 9. Estrutura hipotética de um gel de poliacrilamida representando o gradiente de pH imobilizado.....	20
Figura 10. Esquema geral apresentando as etapas da análise por 2D-DIGE.....	28

Figura 11.	Representação esquemática da ionização por <i>electrospray</i> . Descrição das duas teorias de transferência dos íons para a fase gasosa atualmente aceitas.....	31
Figura 12.	Técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz.....	32
Figura 13.	Esquema geral de um analisador de massas do tipo TOF (linear). Equação descrevendo a relação entre o tempo de voo e a relação m/z de um determinado íon.....	33
Figura 14.	Esquema geral de um analisador de massas do tipo TOF com refletor.....	34
Figura 15.	Esquema de um analisador de massas do tipo íon trap tridimensional.....	36
Figura 16.	Diagrama que apresenta as regiões de estabilidade de um íon trap parametrizado em termos das voltagens e frequências de operação, também conhecido como diagrama de estabilidade de Mathieu.....	37
Figura 17.	Representação esquemática de um íon trap linear.....	39
Figura 18.	Esquema detalhado do instrumento MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems).....	40
Figura 19.	Representação esquemática do LTQ-orbitrap. Nesse instrumento, os íons são transmitidos através do íon trap linear para o C-trap e então para o orbitrap.....	42
Figura 20.	Esquema de uma coluna capilar de sílica fundida do tipo <i>PicoFrit</i> [®] (New Objective). Tipicamente essas colunas são empacotadas por 10 cm com partículas de de C-18 (5 μ m).....	45
Figura 21.	Configuração de uma fonte de nanoelectrospray num arranjo empregando uma coluna de aprisionamento em linha.....	45

Figura 22.	Esquema ilustrativo da sistemática de busca de proteínas em bancos de dados empregadas pelos softwares de busca Mascot e Sequest.....	50
Figura 23.	A) Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann dos fragmentos formados devido a transferência de energia para o peptídeo; B) Os íons formados são enumerados a partir do aminoácido N-terminal; C) a fragmentação das porções amino e carboxi terminal de um mesmo aminoácido produz os íons imônio.....	54
Figura 24.	Esquema ilustrativo das amostras/controles empregadas nesse estudo.....	64
Figura 25.	Moinho criogênico (SPEX CertiPrep).....	67
Figura 26.	Instrumentação empregada para a realização dos experimentos de eletroforese bidimensional, obtenção e análise das imagens.....	68
Figura 27.	Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF-TOF, modelo 4700 Proteomics Analyser – Applied Biosystems.....	69
Figura 28.	Sistemas de LC-MS empregados. A) Cromatógrafo a líquido convencional (Agilent Technologies), auto-injetor (Famos) e ion trap linear (Thermo Electron); B) Cromatógrafo a líquido com auto-injetor integrado (Waters) e LTQ-orbitrap (Thermo).....	70
Figura 29.	Esquema dos métodos de extração de proteínas avaliados (I a IV). Para tais procedimentos fez-se uso de amostras da casca da região do porta-enxerto de plantas sadias (laranja valência enxertada sobre limão cravo; Plantio: 1995).....	72
Figura 30.	Esquema dos métodos de extração de proteínas avaliados V a IX). Para tais procedimentos fez-se uso da mesma amostra descrita na Error! Reference source not found.	73

Figura 31.	Procedimentos para a re-hidratação das fitas IPG.....	76
Figura 32.	Posicionamento do strip holder com a fita IPG no equipamento IPGphor.....	78
Figura 33.	Procedimento utilizado para o preparo das ponteiros <i>Zip Tip</i>	82
Figura 34.	A) Clivagem das pontes de dissulfeto com DTT; B) Reação de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas com IAA.....	90
Figura 35.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração I (Error! Reference source not found.). Amostra de casca do porta-enxerto (limão cravo) de uma planta sadia. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Error! Reference source not found. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie Blue coloidal (Apêndice I). Voltagem Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.....	92
Figura 36.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração II (Error! Reference source not found.). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Error! Reference source not found.	93
Figura 37.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração III (Error! Reference source not found.). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Error! Reference source not found.	94
Figura 38.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração IV (Error! Reference source not found.). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Error! Reference source not found. ..	95
Figura 39.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração V (Error! Reference source not found.). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Error! Reference source not found.	96
Figura 40.	Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VI (Error! Reference source not found.). As	97

demais condições experimentais estão descritas na
legenda da **Error! Reference source not found.....**

- Figura 41.** Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VII (**Error! Reference source not found.**). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da **Error! Reference source not found.**..... 98
- Figura 42.** Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VIII (**Error! Reference source not found.**). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da **Error! Reference source not found.**..... 99
- Figura 43.** Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração IX (**Error! Reference source not found.**). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da **Error! Reference source not found.**..... 100
- Figura 44.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e sadias. IEF: fita IPG 3-10 NL (24 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found.**. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie. Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2..... 108
- Figura 45.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found.**. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2..... 112
- Figura 46.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas da copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found.**. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2..... 113
- Figura 47.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias 117

e controles. IEF: fita IPG 4-7 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found..** SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.....

- Figura 48.** “Zoom” de uma região específica dos géis 2D obtidos para amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. É possível verificar claramente que 13 proteínas constituem a região estudada do gel. Além disso, o gráfico apresentado mostra o volume relativo médio dos 13 spots em cada condição..... 119
- Figura 49.** “Zoom” de uma região específica dos géis 2d obtidos para amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. Assim, é possível verificar claramente que 9 proteínas constituem a região estudada do gel. Além disso, o gráfico apresentado mostra o volume relativo médio dos 9 spots em cada condição..... 122
- Figura 50.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de uma planta doente e uma planta assintomática. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found..** SDS-PAGE 10%. Coloração: Prata (Apêndice II). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2. 124
- Figura 51.** Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de uma mesma planta doente coletadas em diferentes tempos (6 meses entre as coletas). IEF: fita IPG 6-11 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found..** SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2..... 126
- Figura 52.** Géis bidimensionais obtidos para amostras proteínas do porta-enxerto (limão volkameriano) de plantas doentes e sadias. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na **Error! Reference source not found..** SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie blue coloidal. Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2. 128
- Figura 53.** Spots (1 a 12) submetidos à análise por MALDI-TOF- 132

TOF.....

Figura 54.	Spots (13 a 33) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	133
Figura 55.	Spots (34 a 52) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	133
Figura 56.	Spots (53 a 63) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	134
Figura 57.	Espectro de PMF e três espectros de MS/MS automaticamente obtidos para o spot 6.....	135
Figura 58.	Página da web de acesso ao Mascot. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI-TOF-TOF.....	136
Figura 59.	Gráfico de barras que expressa o resultado obtido pelo Mascot para o spot 6.....	139
Figura 60.	Comparação entre os espectros teórico e experimental obtidos para o íon com m/z 1177,63 referente ao spot 61. Sequenciamento <i>de novo</i> do íon em questão e apresentação dos íons referentes às séries <i>-b</i> e <i>-y</i> identificados.....	153
Figura 61.	Comparação entre os espectros teórico e experimental obtidos para o íon com m/z 1623,90 referente ao spot 61. Sequenciamento <i>de novo</i> do íon em questão e apresentação dos íons referentes às séries <i>-b</i> e <i>-y</i> identificados.....	154
Figura 62.	Spots (64 a 76) submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.	157
Figura 63.	Spots (77 a 95) submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.	158
Figura 64.	Cromatograma do pico base obtido para o spot 94 usando o LTQ. Um “zoom” na região do cromatograma referente ao tempo 25,1 min ilustra o espectro de MS referente ao íon com m/z 503,5 sendo apresentado ainda seu espectro de MS/MS.....	160

- Figura 65.** Página da web de acesso ao Mascot. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por LC-ESI-MS/MS..... 163
- Figura 66.** Página de acesso ao Sequest. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por LC-ESI-MS/MS..... 163

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Monômeros ácidos e básicos usados para a fabricação das fitas IPG.....	19
Tabela 2. Fitas IPG comercializadas pela GE Healthcare. NL indica que o gradiente de pH é não linear.....	20
Tabela 3. Relação entre a concentração de acrilamida e a faixa de separação do gel obtido. C = 2,6%.....	22
Tabela 4. Lista dos 20 resíduos de aminoácidos mais comuns.....	56
Tabela 5. Dados relativos às amostras de casca de plantas sadias e infectadas pela MSC.....	66
Tabela 6. Método de digestão trípica empregado.....	81
Tabela 7. Quantidade de proteínas extraídas pelos métodos de extração avaliados. Para cada procedimento de extração, empregou-se 1 g de amostra moída.....	87
Tabela 8. Quantidades de amostra e reagentes usados para a re-hidratação das fitas IPG pH 3-10L de 13 cm. O volume total da solução de re-hidratação (incluindo a amostra) indicado para fitas IPG de 13 cm é 250 µL. A quantidade total de proteínas adicionais por fita foi igual a 800 µg.....	88
Tabela 9. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG referentes aos métodos de extração I a IX.....	89
Tabela 10. Código das amostras, quantidade de proteínas extraídas e eficiência do método de extração. Em todos os casos partiu-se de 500 mg de amostra moída.....	103
Tabela 11. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG de 24 cm.....	106
Tabela 12. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG de 13 cm.....	111

Tabela 13.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 6, 7, 8, 53, 54 e 55, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	141
Tabela 14.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 12 e 40, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	143
Tabela 15.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 24, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.	144
Tabela 16.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	145
Tabela 17.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 34, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.....	146
Tabela 18.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 36, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.....	147
Tabela 19.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 56, 57, 58, 59 e 60, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	149
Tabela 20.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 61, 62 e 63, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.....	151
Tabela 21.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 65, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	165
Tabela 22.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 66 e 82, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS....	166
Tabela 23.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 67, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	167
Tabela 24.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 68, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	168
Tabela 25.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 69, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	169

Tabela 26.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 70, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	170
Tabela 27.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 71, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	171
Tabela 28.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 72 e 88, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS...	172
Tabela 29.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 74 e 75, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS...	173
Tabela 30.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 76, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	174
Tabela 31.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 78, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	175
Tabela 32.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 80, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	176
Tabela 33.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 81, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	177
Tabela 34.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 83, 90, 91, 92, 93 e 94, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.....	178
Tabela 35.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 84, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	179
Tabela 36.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 85, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	180
Tabela 37.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 86, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	181
Tabela 38.	Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 87, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	182
Tabela 39.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 64, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	185

Tabela 40.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 65, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	186
Tabela 41.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente aos spots 66 e 82, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.....	187
Tabela 42.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 69, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	188
Tabela 43.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 70, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	189
Tabela 44.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 71, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	190
Tabela 45.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente aos spots 72 e 88, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.....	191
Tabela 46.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 78, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	192
Tabela 47.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 80, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	193
Tabela 48.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 83, 90, 91, 92, 93 e 94, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	194
Tabela 49.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 84, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	195
Tabela 50.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 85, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	196
Tabela 51.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 86, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	197
Tabela 52.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 87, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	198

Tabela 53.	Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 95, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.....	199
Tabela 54.	Spots com valores de pI em MM coincidentes recortados de diferentes géis e submetidos a análise por MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS.....	201
Tabela 55.	Comparação dos resultados obtidos para os spots analisados por LC-ESI-MS/MS usando o Mascot e o Sequest.....	204

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-E	Two-dimensional electrophoresis (Eletroforese bidimensional)
CAD	Collision activation dissociation (Dissociação ativada por colisão)
CID	Collision induced dissociation (Dissociação induzida por colisão)
CO	Copa
CSDaV	Citrus Sudden Death-associated Virus (virus associado a morte súbita dos citros)
ESI	Electrospray ionization (Ionização por electrospray)
DIGE	Differential Gel Electrophoresis (Eletroforese bidimensional diferencial)
FTICR	Fourier transform ion cyclotron resonance (Ressonância ciclônica de íons com transformada de Fourier)
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico)
IEF	Isoelectric focalization (Focalização isoelétrica)
IPG	Immobilized pH gradiente (gradiente de pH imobilizado)
LarVal	laranja valência
LC	Liquid chromatography (Cromatografia líquida)
LimCra	Limão cravo
LimVolk	Limão volkameriano
LIT	Linear Ion Trap
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization (Ionização/desorção a laser assistida por matriz)

MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massas
MSC	Morte súbita dos citos
PAGE	Poliacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
PE	Porta-enxerto
pI	Ponto isoelétrico
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
SLCC	Suco de laranja concentrado congelado
TIS	Timed ion selector (Selector temporal de íons)
TOF	Time-of-flight (Tempo de voo)

RESUMO

Este projeto teve como objetivo principal realizar um estudo proteômico diferencial aplicado às amostras de casca do caule de plantas cítricas sadias e infectadas pela morte súbita dos citros. Subsequentemente, a identificação de proteínas diferentemente expressas será de grande importância, uma vez que estas poderão servir não somente como candidatos a biomarcadores para a doenças, mas também auxiliarão no melhor compreensão da doença.

À partir dos géis bidimensionais obtidos para amostras de porta-enxerto (limão cravo e limão volkameriano) e copa (laranja valência) foi possível verificar que existem dois conjuntos de proteínas sensivelmente sub-expressas em plantas doentes. Um desses conjuntos, constituído por 13 spots, apresenta valores de pI entre 4,5 e 5,2 e MM aproximadamente igual a 30 kDa. No outro conjunto, esse composto por 9 spots, valores de pI variando entre 6,1 e 9,6 e MM em torno de 20 kDa são observados.

Por meio das técnicas de MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS, inúmeros spots foram inequivocamente identificados, incluindo os spots correspondentes às regiões diferentemente expressas. Os 13 spots correspondentes a região com valores de pI entre 4,5 e 5,2 e MM $\approx$ 30 kDa foram todos identificados como sendo constituídos por três isoformas de quitinases. Por outro lado, os spots referentes a região com pI entre 6,1 e 9,6 e MM $\approx$ 20 kDa foram identificados como proteína putativa similar a miraculina 2. A justificativa para o fato de diversos spots terem recebido a mesma identificação é atribuída às inúmeras e diferentes modificações pós-traducionais, comumente verificadas em plantas. Entretanto, o aspecto mais relevante relacionado a essas identificações é o fato de que ambas as proteínas são conhecidas marcadoras de resistência de defesa em plantas e assim sendo, a priori, espera-se-ia que estivessem sendo super expressas em plantas doentes. Porém, um comportamento inverso foi verificado, o que reforça as evidências de que as quitinases não agem apenas como marcadores de defesa em plantas, possuindo assim outras funções. Além disso, no total, outras 19 proteínas puderam ser identificadas.

ABSTRACT

The main goal of this project was to perform a differential proteomic analysis of bark tissues of healthy and CSD (citrus sudden death)-affected citrus plants. Subsequently, the identification of differently expressed proteins will be of great importance since they can be used not only as biomarkers for CSD but also as basic information for improving the knowledge about the disease.

According to the 2D gels, obtained for bark tissues of both rootstock (rangpur lime and volkamerian lemon) and scion samples, there are two sets of proteins remarkably under expressed in CSD-affected samples. One of these sets is composed by 13 proteins, which presents MW around 30 kDa and pI ranging from 4.5 to 5.2. The other set includes 9 proteins with pI ranging from 6.1 to 9.6 and MW around 20 kDa.

By using two mass spectrometry approaches (MALDI-TOF-TOF and LC-ESI-MS/MS), several proteins have been unequivocally identified, including the differentially expressed ones. Thirteen spots have been identified as a mixture of three chitinase isoforms. These spots are relative to the region with pI ranging from 4.5 to 5.2 and MW $\approx$ 30 kDa. On the other hand, the 9 spots referent to the region with MW $\approx$ 20 kDa and pI between 6.1 and 9.6 were identified as putative miraculin-like 2 protein. Several spots have been identified as the same protein most probably due to the occurrence of different post-translational modifications.

The most valuable point regarding the identity of these proteins is the fact that they are well-known plant pathogen-related proteins and then they should be over expressed in affected plants. However, the opposite behavior was verified, which may indicate that chitinases and putative miraculin-like 2 protein perform unknown functions, besides the established ones. In addition, other 19 constitutive proteins have been identified.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância econômica da citricultura brasileira

A citricultura brasileira destaca-se por ser a maior do mundo tanto em relação ao número de plantas quanto em importância econômica. Trata-se de um setor no qual o Brasil é muito competitivo, pois possui condições ideais de solo e temperatura, abundância de água para uso de irrigação, laranjas com qualidade superior, além de baixos custos de produção e colheita.⁽¹⁾

Atualmente o Brasil produz cerca de 50% do suco de laranja consumido no mundo, além de se tratar do maior exportador mundial de suco de laranja concentrado congelado (SLCC), com 83% das exportações totais. SLCC ocupa o décimo terceiro lugar no *ranking* dos produtos de exportação brasileiros, representando 2,6% de todos os produtos exportados e 9% dos produtos oriundos do *agrobusiness*.^(1,2)

Principal produtor nacional, o estado de São Paulo é responsável por aproximadamente 84% da produção brasileira de frutos cítricos e por 95% do total de SLCC. Esses números fazem com que o SLCC seja o segundo produto de exportação paulista mais rentável (perdendo apenas para os aviões). A citricultura paulista é formada por 652.600 hectares de plantações e possui em torno de 200 milhões de plantas cítricas que nas últimas cinco safras produziram, em média, 340 milhões de caixas de laranja (40,8 kg) por safra. Hoje, o setor conta com 10 indústrias, é a principal atividade econômica de mais de 330 municípios, emprega cerca de 400 mil pessoas (diretamente) e gera exportações anuais da ordem de US\$ 1,5 bilhão.^(2,3)

1.2 Características que aumentam a vulnerabilidade da citricultura brasileira à pragas e doenças

As plantas cítricas são perenes e portanto estão expostas durante todo o ano e por vários anos ao ataque de pragas e doenças, sem um período de ausência do hospedeiro tal como ocorre com culturas anuais. Além dessa característica intrínseca, a citricultura brasileira, de uma forma geral, possui algumas particularidades que aumentam sua vulnerabilidade à ocorrência de epidemias de doenças conhecidas bem como de novas doenças, tal como a morte súbita dos citros. Tais características são: i) enorme continuidade espacial, uma vez que os pomares ocupam uma área quase contínua, sem grandes variações de relevo ou barreira físicas e com extensa malha rodoviária, com intenso tráfego de veículos e pessoas; ii) os pomares apresentam uma variabilidade genética muito baixa. Apenas quatro variedades de laranjeiras doces (*C. sinensis* - Valência, Pera-Rio, Natal e Hamlin), propagadas vegetativamente por enxertia, representam 92% das todas as plantas. Em relação ao porta-enxerto empregado a situação é ainda mais delicada uma vez que o limão cravo (*C. limonia*) é o porta-enxerto utilizado em aproximadamente 85% das plantas destinadas à indústria.^(3,4)

1.3 Morte súbita dos citros (MSC)

Uma nova doença, afetando pomares de laranjeiras doces (Valência, Hamlin, Natal, Westin e Pera) e tangerineiras (*C. reticulata* Blanco - Cravo e Ponkan) enxertadas sobre limoeiro cravo, foi descrita pela primeira vez no início de 2001 no município de Comendador Gomes (MG).⁽⁴⁾ Devido à rapidez com que as plantas afetadas declinam, definham e morrem, a

denominação morte súbita dos citros (MSC) foi atribuída a esta doença. O tempo decorrente desde o surgimento dos primeiros sintomas até a morte da planta é bastante variável, podendo variar entre algumas semanas e um ano, dependendo da época do ano e da variedade, sendo mais rápido na primavera e nas variedades tardias, tais como, valência e natal.^(3,5) Em geral, observa-se que as mortes mais abruptas (súbitas) ocorrem em plantas com bastante copa, grande quantidade de frutos e no início do período chuvoso.⁽⁵⁾ A Figura 1 ilustra os estágios de evolução da MSC apresentando uma planta sadia, uma doente e uma terceira já morta.

Figura 1. Três diferentes plantas representam a evolução da MSC.

A MSC é uma doença da combinação de laranjeiras-doces ou tangerineiras (copas) enxertadas sobre limoeiro cravo e limoeiro volkameriano (*C. Volkameriana*) (porta-enxertos). Outras combinações de laranjeiras-doces sobre porta-enxertos de tangerineiras ainda não apresentaram sintomas da doença. Nas plantas infectadas pela MSC, os vasos do floema do porta-enxerto, que transportam os produtos da

fotossíntese para as raízes, degeneram-se e ficam bloqueados. Deste modo, sem alimento, as raízes apodrecem e a planta morre.^(3,6,7)

Os principais sintomas apresentados pelas plantas com MSC são perda de brilho das folhas, que inicialmente murcham e ficam amareladas, queda das folhas, retenção de frutos, redução do volume dos frutos e morte do sistema radicular do porta-enxerto (Figura 2).⁽⁵⁾

Figura 2. Alguns sintomas da característicos da MSC: Perda generalizada do brilho das folhas e apodrecimento de raízes e radicelas.

No entanto, todos os sintomas descritos são pouco específicos para serem usados como diagnóstico da MSC, uma vez que tais características também são sintomas de outras doenças de citros. Assim, o único sintoma específico, que permite o correto diagnóstico da MSC, é o amarelecimento da região interna da casca abaixo da região da enxertia (Figura 3). Em função dos sintomas somente terem sido observados em

plantas com pelo menos vinte e dois meses de idade, acredita-se que o período de incubação da MSC, ou seja, o tempo decorrente desde o momento da infecção até o aparecimento dos primeiros sintomas, seja de aproximadamente dois anos.⁽⁵⁻⁷⁾

Figura 3. Amarelecimento interno da casca do porta-enxerto (limão cravo e limão volkameriano) na região abaixo da enxertia. Único sintoma específico da MSC, usado portanto para o diagnóstico da doença.

Em um meticuloso e extenso levantamento realizado pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura), até o mês de junho de 2004 a doença havia sido registrada em pomares de 30 municípios, sendo 18 no norte do estado de São Paulo e 12 do sul de Minas Gerais (Figura 4).

Os dados mais recentes a quem se têm acesso, dados esses que monitoraram a evolução da MSC até abril de 2006, indicam que aproximadamente 4 milhões de plantas tenham sido perdidas em função da MSC.^(§) Esse enorme número inclui plantas que morreram devido a MSC e

§ BASSANEZI, R. B. – comunicação pessoal – dados não publicados.

plantas que por estarem com sintomas da MSC foram erradicadas. No entanto, mais assustador que o grande número de plantas já perdidas é o potencial de destruição desta doença, uma vez que, conforme já apontado, mais de 85% de todas as plantas comerciais brasileiras são enxertadas sobre porta-enxertos intolerantes a MSC (limão cravo e limão volkameriano).

Figura 4. Levantamento, realizado pelo Fundecitrus, sobre a disseminação da MSC nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Ao longo da história, por diversas vezes a citricultura brasileira enfrentou dificuldades com pragas e doenças. Nas décadas de 40 e 50, uma doença que ficou conhecida como "tristeza dos citros" dizimou quase 10 milhões de plantas enxertadas sobre laranja azeda (*Citrus aurantium* L.), o que na época representava mais de 80% do parque citrícola. Cabe ainda ressaltar que em termos mundiais a "tristeza dos citros" proporcionou a morte de mais de 100 milhões de plantas. O agente causador da doença é um vírus classificado como *Citrus Tristeza Virus* (CTV), membro da família

Closteroviridae o qual é transmitido por diversos tipos de pulgões. No Brasil, o principal vetor da CTV é o pulgão preto (*Toxoptera citricida*).^(3,7) Na ocasião, a solução do problema deu-se pela troca do porta-enxerto laranja azeda (predominantemente usado na época) pelo limão cravo, coincidentemente (ou não) um dos porta-enxerto atingidos pela MSC.

Dada a velocidade de progresso e disseminação, suspeita-se que a MSC seja causada por um vírus, transmitido de forma bastante eficiente por um vetor aéreo. Assim, especula-se que o vetor de transmissão da MSC seja o mesmo da “tristeza dos citros”, ou seja, o pulgão preto.⁽⁷⁾

Em concordância com as evidências, pesquisas recentes indicam que uma nova espécie de vírus é provavelmente a causa da MSC. Os pesquisadores identificaram em plantas com os sintomas da doença um vírus até então desconhecido, da família *Tymoviridae*, que parece ser o agente responsável pelo surgimento da MSC. Embora ainda não haja certeza absoluta da associação da morte súbita com tal vírus, esse vírus foi batizado como Vírus associado a Morte Súbita dos Citros (*Citrus Sudden Death-associated Virus* - CSDaV). Um experimento realizado com 351 plantas (enxertadas sobre limão-cravo) com sintomas de MSC verificou a presença do CSDaV em 350 delas. Ainda, neste mesmo estudo 161 plantas assintomáticas (presentes em regiões não afetadas pela doença) foram avaliadas, sendo que nenhuma delas apresentou o CSDaV.⁽⁸⁾ Outro indicador da possível patogenicidade do CSDaV é o fato de que os demais vírus da família *Tymoviridae* atacam vegetais (milho, grama, aveia e uva). No caso da uva, um desses vírus causa um problema nas raízes da planta, semelhante ao ocorrido em decorrência da MSC. Entretanto, ainda não é

possível correlacionar de maneira conclusiva o CSDaV com a MSC. Para que isso ocorra, entre outros experimentos, é necessário realizar um ensaio de transmissão, no qual o vírus é inoculado em plantas sadias com o objetivo de confirmar se elas desenvolvem a MSC ou não. Experimentos nesse sentido estão sendo realizados por pesquisadores da *Alellyx Applied Genomics* de modo que em breve essa dúvida será esclarecida.

Entretanto, uma vez infectada, em algumas situações a planta ainda pode ser salva. Para isso, o Fundecitrus tem recomendado a técnica de enxerto chamada subenxertia para prevenir e isolar o agente etiológico da MSC. A técnica consiste em plantar uma ou duas mudas de outra variedade de limão ou tangerina (tolerante a MSC) a cerca de dez centímetros do pé de laranja. Posteriormente, a copa dessas mudas é enxertada no pé de laranja infectado, por onde passa a circular a seiva da planta (Figura 5). Entretanto, a subenxertia é uma técnica que apresenta um custo relativamente alto, além do que ao contrário do limão cravo, as outras mudas não são tão resistentes à seca e precisam ser irrigadas.^(5,7)

Figura 5. Foto ilustrativa de uma planta com MSC subenxertada com duas novas plantas.

1.4 Biomarcadores

Biomarcadores podem ser definidos como uma característica que é objetivamente medida e avaliada como indicador de um processo biológico normal, um processo patogênico, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica.⁽⁹⁾ Espera-se que um biomarcador seja capaz de precocemente prover respostas definitivas ou ao menos aumentar a probabilidade de acerto para questões como: O determinado indivíduo está doente? A doença está evoluindo? A terapia aplicada está apresentando efeitos satisfatórios? Assim, estudos envolvendo biomarcadores são extremamente importantes uma vez que podem não só auxiliar na detecção precoce de doenças mas também monitorar sua evolução frente a um determinado tratamento.⁽¹⁰⁾

O estudo clássico sobre biomarcadores envolve a comparação do padrão de proteínas constituinte de uma amostra sadia com o de uma amostra doente. Desta forma, pode-se determinar quais os compostos que estão associadas com a doença em questão.⁽¹¹⁾ Interesse especial é prestado às proteínas uma vez que essas espécies são responsáveis pelas principais funções celulares promovendo o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a morte celular. Diferenças não só nos níveis de expressão bem como nas estruturas proteicas geralmente indicam a ocorrência de doenças, sendo que tais proteínas podem ser usadas como biomarcadores para a referida doença.⁽¹²⁾

1.5 Análise proteômica

Por definição, proteoma é o conjunto de proteínas codificadas e expressas por um genoma, sob determinadas condições. A análise proteômica, definida como sendo o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um proteoma, trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática. O sinergismo oriundo de tamanha interdisciplinaridade faz-se necessário num cenário onde pretende-se estudar a função / comportamento dos genes com base nas identificações das proteínas por eles codificadas e expressas. Neste contexto, muitas vezes é necessário não somente determinar o conjunto de proteínas presentes em uma amostra e seus níveis, o que por si só apresenta um alto grau de dificuldade, mas também caracterizar as inúmeras e comumente presentes isoformas das proteínas, produtos de modificações pós-traducionais sofridas pelas mesmas, e por fim, como essas proteínas interagem entre si.^(13,14,15) Tais estudos são tipicamente bastante desafiadores devido ao alto grau de complexidade das amostras bem como às baixíssimas concentrações de determinadas proteínas, o que requer o uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis. Assim, a espectrometria de massas (MS) trata-se da ferramenta ideal para aplicações proteômicas, fato esse atribuído à sua capacidade de analisar proteínas e peptídeos com alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade. Apesar da MS ser um técnica centenária, sua aplicabilidade na área biológica tornou-se notória e praticamente imprescindível somente depois do desenvolvimento das técnicas brandas de ionização (ESI – *Electrospray* e MALDI – *Matrix-*

Assisted Laser Desorption Ionization), ocorridas no final dos anos 80. A importância desses avanços foi reconhecida pelo mundo científico e seus inventores (John B. Fenn e Koichi Tanaka, pelas técnicas de ESI e MALDI respectivamente) agraciados com o Prêmio Nobel de Química de 2002.⁽¹⁶⁾ Deste modo, não importa a abordagem empregada na análise proteômica, essa sempre empregará MS em uma etapa determinante do processo.⁽¹⁴⁾

1.5.1 Estratégias para abordar um estudo proteômico: *Bottom-up* vs *Top-Down*

Existem basicamente duas maneiras de se abordar um estudo proteômico no que diz respeito à estratégia empregada para analisar a amostra por MS, sendo essas classificadas como *Bottom-up* e *Top-Down*.^(17,18) No caso do *Bottom-up* é necessário isolar a(s) proteína(s) de interesse, realizar um procedimento de clivagem enzimática e então submeter os peptídeos formados à análise por MS. Em posse desses resultados, ferramentas de busca procuram correlacionar os dados obtidos com as informações contidas em bancos de dados de proteínas, permitindo assim sua identificação (Figura 6). Essa abordagem é a mais comumente empregada uma vez que mesmo espectrômetros de massas relativamente simples e de baixo custo são capazes de fornecer resultados satisfatórios para a análise de peptídeos. No entanto, um arranjo do tipo *Bottom-up* empregando uma única enzima apresentará a desvantagem de tipicamente proporcionar uma baixa cobertura da sequência de aminoácidos constituinte da proteína (todavia, algo em torno de 50% já é considerado bastante positivo).^(19,20) Ou seja, apenas uma parte dos peptídeos originados pela

clivagem enzimática são analisados ou fornecem dados confiáveis para interpretação. Tal ocorrência pode ser atribuída, em parte, ao fato de que alguns peptídeos formados não ionizam-se adequadamente devido ao fenômeno de supressão iônica. Além disso, peptídeos constituídos por determinados aminoácidos ou sequências de aminoácidos produzem espectros de fragmentação com poucos íons o que dificulta em muito sua interpretação.⁽²¹⁾ Ambos os efeitos descritos são ocasionados em virtude da natureza química dos aminoácidos constituintes dos peptídeos bem como do tamanho dos peptídeos formados. Além disso, muitos peptídeos não são detectados, ou por serem muito pequenos (massa molecular (MM) inferior a 500 Da), ou por serem muito grandes (MM superior a 5000 Da), exigindo nesse último caso que a resolução provida pelo espectrômetro seja superior a 25000 para a correta atribuição de sua massa monoisotópica.⁽²²⁾ Em decorrência da baixa taxa de cobertura inerente ao arranjo experimental do tipo *Bottom-up*, surge outra limitação desta estratégia que é a limitada capacidade de prover informações inerentes às modificações pós-traducionais. É bastante intuitivo concluir que se uma baixa cobertura de aminoácidos é obtida, a chance de não analisar aminoácidos que por ventura estejam modificados seja maior (Figura 6).⁽²⁰⁾

Figura 6. Esquema comparando as estratégias *Bottom-up* e *Top-Down*, empregadas em análise proteômica.

Por outro lado, no *Top-Down* a amostra de proteína(s) é submetida diretamente à análise por MS, ou seja, intacta(s). Primeiramente, deve-se determinar a MM da proteína em questão com grande exatidão e posteriormente realizar estágios de fragmentação da proteína proporcionando a identificação de pequenos trechos de sequência que permitem a identificação da proteína (Figura 6). Nessa abordagem a cobertura da sequência é total. No entanto, essa estratégia requer o uso de espectrômetros de massas de altíssima resolução e exatidão de massa (e por consequência, de altíssimo custo) e que até pouco tempo eram sequer comercialmente disponíveis.⁽¹⁸⁾

Assim sendo, o altíssimo custo dos equipamentos requeridos para a abordagem *Top-Down* faz com que a abordagem mais tradicional ganhe espaço e mesmo que com limitações seja a mais largamente empregada.

1.5.2 Detalhamento de um estudo proteômico empregando a abordagem *Bottom-up*

Em linhas gerais é possível descrever um estudo proteômico usando a estratégia *Bottom-up* em seis etapas (Figura 7), sendo elas descritas a seguir: i) as proteínas a serem analisadas devem ser primeiramente extraídas de lisados celulares ou tecidos e submetidas a etapas de separação (eletroforese uni ou bidimensional, cromatografia líquida); ii) Após a etapa de obtenção/purificação, o próximo passo é converter a(s) proteína(s) isolada(s) em um conjunto de peptídeos. Isso é feito com o uso de enzimas que promovem a clivagem das proteínas em pontos específicos; iii) Os peptídeos obtidos podem ser separados por meio da técnica de cromatografia líquida (uni ou multidimensional), ionizados e transferidos (usando as técnicas de ESI ou MALDI) para o analisador de massas; iv) Nesta etapa, o espectro de massas dos peptídeos oriundos da digestão enzimática é adquirido. Este resultado indica a relação m/z e consequentemente a massa molecular dos peptídeos. Para esse tipo de dado experimental dá-se o nome de “*peptide mass fingerprint*” (PMF); v) Os peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamados de íons precursores) são isolados e submetidos a fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tais como: argônio, nitrogênio ou hélio. Os fragmentos formados são então analisados e o espectro obtido é chamado

espectro de fragmentação ou MS/MS; vi) Ao final do processo, os resultados inerentes a MM dos peptídeos, obtida à partir do PMF, bem como a informação relativa a sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (MS/MS), são usados pelos softwares de busca para “localizar” as proteínas nos bancos de dados. Os softwares mais conhecidos e comumente empregados são o Sequest⁽²³⁾ e o Mascot.⁽²⁴⁾

Figura 7. Esquema ilustrativo das seis etapas que comumente integram um estudo proteômico empregando espectrometria de massas.

Separação das proteínas por meio da técnica de eletroforese bidimensional e subsequente identificação por MS trata-se da estratégia mais empregada em análise proteômica.⁽²⁵⁾ A união dessas tecnologias mostra-se ainda mais interessante quando se pretende realizar análises comparativas entre amostras em diferentes condições. Isso inclui, por exemplo, a comparação entre amostras saudáveis e doentes quando objetiva-se encontrar proteínas diferentemente expressas, as quais podem servir como

biomarcadores. Além da informação qualitativa a eletroforese bidimensional é capaz de prover resultados quantitativos, possibilitando o monitoramento dos níveis de expressão das espécies de interesse. Nesse quesito, a tecnologia DIGE (Differential Gel Electrophoresis) trata-se do estado da arte.

Apesar dos recentes e promissores avanços de tecnologias alternativas e complementares (principalmente cromatografia multidimensional), a eletroforese bidimensional é atualmente a única técnica que pode ser rotineiramente aplicada para a separação de misturas verdadeiramente complexas de proteínas, tais como, lisados celulares.

1.6 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-E), desenvolvida independentemente por O'Farrell ⁽²⁶⁾ e Klose ⁽²⁷⁾, é uma técnica de separação largamente usada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares relativas (Figura 8).⁽²⁸⁾

Figura 8. Esquema mostrando as etapas envolvidas no processo de separação de uma mistura de proteínas por eletroforese bidimensional. Na primeira dimensão a separação ocorre de acordo com o pI, enquanto que a massa molecular relativa das proteínas é a propriedade usada para a separação na segunda dimensão.

1.6.1 Primeira Dimensão: Focalização Isoelétrica (IEF)

Proteínas são moléculas anfóteras, ou seja, podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou zero, dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que a compõe) e do pH do meio.⁽²⁹⁾ Desta forma, em um gradiente de pH, sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do gradiente na qual sua carga líquida é zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI. Recentemente, o uso de anfólitos carreadores geradores de gradientes de pH foi substituído por fitas com gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient* - IPG).^(30,31,32) O uso de fitas IPG apresenta

diversas vantagens em relação aos carreadores anfólicos, tais como: a) permite uma comparação rigorosa entre resultados de diferentes laboratórios (devido à disponibilidade de fitas IPG comerciais); b) as fitas de IPG possuem maior capacidade que os géis anfólicos; c) possibilidade de separação em intervalos estreitos de pI (o comprimento total de uma fita pode abranger somente 1 unidade de pH), ou seja, maior resolução.^(28,30,31,32)

Para a fabricação destas fitas, realiza-se uma reação de copolimerização fazendo uso de monômeros de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$), acrilamida modificadas ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NHR}$) e bis-acrilamida. Os monômeros de acrilamida modificadas possuem em suas estruturas grupamentos **R**, os quais podem ser ácidos ou bases fracas com valores de pKa bem estabelecidos. Assim, a combinação destes vários monômeros em concentrações adequadas define o intervalo e a forma do gradiente de pH produzido.⁽³³⁾ A Tabela 1 apresenta os monômeros modificados comumente usados para o estabelecimento dos IPG.

Tabela 1. Monômeros ácidos e básicos usados para a fabricação das fitas IPG.⁽³³⁾

	Nome	Fórmula	pKa
monômeros ácidos	2-acrilamida-2-ácido metilpropanosulfônico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} - \text{SO}_3\text{H} \end{array}$	1,0
	Ácido 2-acrilamidoglicólico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	3,1
	N-acriloglicina	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$	3,6
	Ácido 4-acrilamidobutírico	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{COOH}$	4,6
monômeros básicos	2-morfolinoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \end{array}$	6,2
	3-morfolinopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \end{array}$	7,0
	N,N-dimetilaminoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$	8,5
	N,N-dimetilaminopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N}(\text{CH}_3)_2$	9,3
	N,N-dietilaminopropilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N}(\text{CH}_2\text{H}_5)_2$	10,3
	N,N,N-trietilaminoetilacrilamida	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N}(\text{CH}_2\text{H}_5)_3$	> 12

A Figura 9 mostra um esboço da estrutura do gel de poliacrilamida com os monômeros modificados, os quais estabelecem o gradiente de pH imobilizado.

Figura 9. Estrutura hipotética de um gel de poliacrilamida representando o gradiente de pH imobilizado.

Assim sendo, a etapa de IEF pode ser realizada fazendo uso de fitas IPG de diferentes comprimentos e com diversas faixas de pH. A Tabela 2 apresenta as diversas fitas IPG comercializadas pela empresa GE Healthcare.

Tabela 2. Fitas IPG comercializadas pela GE Healthcare.⁽²⁸⁾ NL indica que o gradiente de pH é não linear.

Intervalo de pH	comprimento (cm)	Intervalo de pH	comprimento (cm)
3,0 – 5,6 NL	7; 11; 13; 18, 24	4 – 7	7; 11; 13; 18; 24
3,5 – 4,5	18; 24	5,0 – 6,0	18; 24
3 – 7 NL	24	5,3 – 6,5	7; 11; 13; 18; 24
3 – 10	7; 11; 13; 18; 24	5,5 – 6,7	18; 24
3 – 10 NL	7; 13; 18; 24	6 – 9	18; 24
3 – 11 NL	11; 13; 18; 24	6 – 11	7; 11; 13; 18
4,0 – 5,0	18; 24	6,2 – 7,5	7; 11; 13; 18; 24
4,5 – 5,5	18; 24	7 – 11 NL	7; 11; 13; 18, 24

1.6.2 Segunda Dimensão: Separação por Tamanho (SDS-PAGE)

Após a IEF, as proteínas são transferidas para a segunda dimensão, onde são separadas de acordo com suas massas moleculares relativas em um gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Os compostos usados para formar o gel são os monômeros de acrilamida e bis-acrilamida. A composição da mistura destes monômeros é definida pelas letras T e C de acordo com Hjerten.⁽³⁴⁾ Brevemente, T representa a concentração percentual total dos monômeros acrilamida e bis-acrilamida em gramas por 100 mL, enquanto C denota a porcentagem em massa de bis-acrilamida em relação à quantidade total dos dois monômeros. O tamanho dos poros no gel é determinado principalmente pela quantidade total de acrilamida usada e pelo grau de entrecruzamento, proporcionado pela bis-acrilamida. Assim, a escolha da concentração do gel é um parâmetro de extrema importância para que uma boa separação seja obtida. Na prática, a concentração de C (bis-acrilamida) usada é de 2,6%, enquanto as faixas de concentração total de acrilamidas (T) comumente empregadas em géis com concentração uniforme e gradientes de concentração são respectivamente 5–20% e 3–30%. A Tabela 3 apresenta a relação existente entre a concentração de acrilamidas constituintes do gel e a faixa de massa molecular que pode ser separada.

O SDS é um tensoativo aniônico que, em meio aquoso, forma micelas compostas por 70-80 moléculas. SDS e proteínas formam complexos nos quais grandes quantidades de SDS associam-se às proteínas (aproximadamente 1,4 g de SDS por grama de proteína). Desta forma, o complexo tem carga líquida altamente negativa fazendo com que a

separação eletroforética no gel de poliacrilamida dependa basicamente da massa molecular da proteína.⁽²⁸⁾ A carga elétrica das proteínas não é um fator determinante na separação uma vez que SDS está presente em todo o sistema.

Tabela 3. Relação entre a concentração de acrilamida e a faixa de separação do gel obtido. C = 2,6%.

	acrilamida + bis-acrilamida (%)	Faixa de separação (kDa)
Concentração uniforme	5	36 – 200
	7,5	24 – 200
	10	14 – 200
	12,5	14 – 100
	15	14 – 60
Gradiente de concentração	5 – 15%	14 – 200
	5 – 20%	10 – 200
	10 – 20%	10 – 150

O sistema tampão mais comumente usado em SDS-PAGE é o tris-glicina, descrito por Laemmli.⁽³⁵⁾ Este tampão proporciona uma mínima agregação de proteínas e uma separação limpa, mesmo em condições onde grandes quantidades de proteínas precisam ser separadas. Outro tampão comumente empregado é o tris-tricina,⁽³⁶⁾ o qual apresenta melhores resultados para a separação de proteínas com massa molecular inferior a 10 kDa.

1.6.3 Métodos de detecção de proteínas em géis

Uma vez realizada a separação eletroforética bidimensional é necessário fazer a coloração do gel a fim de visualizar o resultado obtido. A seleção do procedimento de visualização apropriado é tão importante quanto à técnica de análise de proteínas empregada. Sensibilidade, simplicidade, velocidade e integração do procedimento com etapas futuras (por exemplo: análise sub-seqüente de um spot por MS) são critérios importantes para a escolha do método de coloração. Os métodos mais comumente empregados são a coloração com prata e corantes orgânicos, tais como o Comassie Blue.⁽³⁷⁾

Os corantes orgânicos constituem os métodos mais simples de detecção de proteínas, porém a sensibilidade da detecção varia de coloração para coloração bem como de proteína para proteína. A maior parte dos corantes orgânicos são eletrostaticamente atraídos pelos grupamentos carregados das proteínas, formando fortes complexos corante:proteína. Esses complexos são ainda estabilizados por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Os corantes orgânicos mais comumente usados são o Comassie Blue G-250 e R-250. A letra G indica que o corante apresenta uma coloração esverdeada (R indica que uma coloração avermelhada) enquanto o número 250 é um indicador da força do corante. Aminoácidos básicos apresentam particular influência na interação entre moléculas de Comassie Blue e proteínas, uma vez que existe uma correlação proporcional entre a intensidade da coloração e o número de resíduos de lisinas, histidinas e argininas na proteína.⁽³⁸⁾ De modo geral, Comassie Blue é suficientemente sensível para detectar 38 ng de uma

proteína genérica em um spot.⁽³³⁾ A coloração com Comassie Blue é comumente realizada em soluções contendo metanol (ou etanol) e ácido acético. A solução acida é necessária para facilitar a atração eletrostática entre as moléculas do corante e a proteína. Uma vez ocorrida a coloração, o excesso de corante é retirado por meio de processo de descoloração.

Outro método de coloração largamente empregado para a detecção de proteínas é a coloração com prata.⁽³⁹⁾ Todos os métodos envolvendo este tipo de coloração dependem da redução do íon Ag^+ a prata metálica (Ag^0). A redução seletiva dos íons Ag^+ em regiões específicas do gel, ocupadas por proteínas, depende das diferenças dos potenciais de oxidação das regiões ocupadas pelas proteínas comparadas com regiões vizinhas, onde não há proteína. Tal como ocorre com o Comassie Blue, a intensidade da coloração com prata está relacionada à quantidade de aminoácidos básicos presentes na cadeia polipeptídica.⁽³⁸⁾ A sensibilidade do método de coloração usando prata é bastante maior que o método que emprega Comassie, uma vez que quantidades inferiores a 1 ng podem ser detectadas por spot.

1.6.4 Eletroforese bidimensional diferencial (2D-DIGE)

Recente evolução da tradicional técnica de 2D-E, 2D-DIGE (Two dimensional difference gel electrophoresis), primeiramente descrita por Unlu *et al.*,⁽⁴⁰⁾ permite que múltiplas amostras de proteína sejam separadas no mesmo gel (multiplexação). O princípio dessa técnica envolve uma etapa, prévia a separação eletroforética, na qual cada amostra de proteína a ser analisada é marcada com um corante fluorescente. As diferentes amostras

de proteínas são marcadas com corantes fluorescentes espectralmente distintos, classificados como CyDye DIGE. Uma vez marcadas, as amostras são então misturadas e separadas no mesmo gel. Concluída a etapa de separação, a fluorescência de cada amostra pode ser visualizada separadamente por meio da emissão de fluorescência do corante empregado de acordo com seu comprimento de onda de excitação. Isso é possível pela utilização de um scanner especial, o qual possui um laser que emite radiação monocromática nos comprimentos de onda específicos dos corantes.⁽⁴¹⁾

A empresa GE healthcare possui a licença exclusiva para comercialização dessa tecnologia e dessa maneira disponibiliza dois conjuntos de corantes fluorescentes, *minimal* (mínima) e *saturation* (saturação), para serem aplicados de acordo com a aplicação requerida. O conjunto de marcação classificado como **mínima**, que é por muito o mais largamente empregado, possui três corantes (Cy2, Cy3 e Cy5), o que permite que até três amostras sejam separadas no mesmo gel. Esses corantes apresentam em sua estrutura um grupamento NHS-éster que liga-se covalentemente ao ϵ -amino da cadeia lateral de lisinas. Esse conjunto recebe tal denominação pois estudos indicam que nas condições experimentais otimizadas indicadas pela GE Healthcare apenas uma molécula de corante liga-se a cada molécula de proteína, mesmo nos casos onde a proteína em questão apresenta múltiplas lisinas. Assim, esse conjunto é indicado para detectar diferenças em situações nas uma quantidade total de 50 μ g de proteína são empregadas por gel. Por outro lado, o conjunto de marcação denominado **saturação** possui dois corantes

(Cy3 e Cy5), permitindo a separação de até duas amostras no mesmo gel. Esse conjunto de corantes possui em sua estrutura um grupamento maleimida, o qual forma uma ligação covalente com o grupamento tiol dos resíduos de cisteína via uma ligação tioéter. Saturação é o nome dado a esse conjunto uma vez que todas as cisteínas disponíveis irão se ligar ao corante, sendo então indicado em condições nas quais reduzidas quantidades de proteínas são disponíveis (em torno de 5 µg por gel).^(42,43)

A possibilidade de separar mais de uma amostra em uma mesma corrida aliada ao uso de um padrão interno (aplicado ao conjunto de marcação **mínimo**) nas análises aumenta consideravelmente a reprodutibilidade da separação. O conceito e as vantagens inerentes ao uso de um padrão interno nas análises por 2D-DIGE foram primeiramente verificadas e reportadas por Alban *et al.*⁽⁴⁴⁾ O padrão interno é preparado misturando quantidades iguais de proteínas de cada amostra a serem analisadas (no máximo duas amostras) e marcando essa mistura resultante com um corante fluorescente. Isso significa que todas as proteínas constituintes de cada amostra estarão representadas no padrão interno. A amostra do padrão interno é então submetida a separação eletroforética no mesmo gel que as amostras de interesse.

A possibilidade de correlacionar cada amostra presente nos géis a um padrão interno comum apresenta inúmeras vantagens. Primeiramente, cada amostra pode ser normalizada em relação ao padrão interno. Além disso, a abundância de cada spot pode ser medida como uma razão entre o spot em questão e seu correspondente padrão interno.

Assim, as típicas variações nos níveis de proteínas constituintes dos spots que ocorrem entre géis, fato que dificulta muito a quantificação em 2D-E, são eliminadas ou pelo menos bastante minimizadas, aumentando a confiança para afirmar que a diferença entre a quantidade de fluorescência entre dois spots é devida a uma variação biológica e não simplesmente a uma variação experimental. Somada a esse significativo aumento da reprodutibilidade (gerado pela multiplexação e pelo uso de padrão interno), a sensibilidade, linearidade e grande faixa dinâmica desses corantes definitivamente tornou a 2D-DIGE uma metodologia quantitativa.

As sensibilidades dos corantes fluorescentes Cy2, Cy3 e Cy5 são respectivamente 0,075, 0,025 e 0,025 ng. Esses valores são extremamente satisfatórios uma vez que as metodologias de coloração com prata e comassie blue coloidal apresentam sensibilidades típicas em torno de 1 e 38 ng, respectivamente. Além disso, a faixa dinâmica destes corantes estende-se por 3.6 ordens de magnitude.

Experimentalmente, 2D-DIGE difere muito pouco da tradicional 2D-E. Basicamente, as únicas diferenças são a etapa de marcação (anterior a re-hidratação das fitas IPG) e a visualização das imagens (Figura 10).

Figura 10. Esquema geral apresentando as etapas da análise por 2D-DIGE.

A maior limitação associada com a técnica 2D-DIGE está relacionada as reações químicas requeridas para ligar o corante à molécula de proteína. Assim, obviamente, essa técnica não se aplica às proteínas que não possuem lisinas (no caso de marcação com corantes mínimos) ou cisteínas (marcação com corantes de saturação) em suas sequências.⁽⁴⁵⁾

1.7 Espectrometria de massas

Desde seu surgimento, no início do século XX, a espectrometria de massas (MS) tem sido largamente empregada para a análise de compostos orgânicos de baixa massa molecular. No entanto, apenas na última década tornou-se uma técnica analítica valiosa em pesquisas biológicas, fornecendo de maneira rápida, precisa e sensível informações inerentes à massa molecular de biomoléculas como proteínas, peptídeos, açúcares, ácidos nucleicos, lipídios entre outros.⁽⁴⁶⁾

A MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa. De uma maneira geral, um espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de ionização as moléculas são ionizadas e transferidas para a fase gasosa. No analisador de massas os íons formados são separados de acordo com suas relações m/z e posteriormente detectados (usualmente por elétron multiplicadoras).

Até a década de 80, a necessidade de ionizar as moléculas para obter um espectro de massas era um grande obstáculo enfrentado no caso de moléculas biológicas de alta massa molecular. Nos métodos de ionização disponíveis na época, as moléculas a serem ionizadas deveriam estar em fase gasosa, sob alto vácuo e a altas temperaturas, condições incompatíveis com biomoléculas. Esse problema foi resolvido com o surgimento de técnicas brandas de ionização, *electrospray* (ESI)⁽⁴⁷⁾ e *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI)⁽⁴⁸⁾, ocorridas no final daquela década.

Outro avanço tecnológico relevante que contribuiu para o desenvolvimento da MS foi a conjugação de analisadores de massa em sequência (MS/MS). Tal arranjo aumentou muito o poder de resolução e a sensibilidade da técnica, tornando-a praticamente obrigatória nas análises de moléculas biológicas. Com esta técnica é possível fragmentar uma molécula ionizada pela colisão com um gás inerte (argônio, hélio, nitrogênio). A análise das massas dos fragmentos obtidos fornece informações sobre a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração de algum resíduo de aminoácido.⁽⁴⁹⁾

1.7.1 Técnicas de ionização

1.7.1.1 Ionização por Electrospray (ESI)

Em ESI todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosférica. Uma solução levemente ácida (ou básica) contendo a amostra é bombeada a uma vazão de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico submetido a uma alta diferença de potencial (3 - 5 kV) em relação ao eletrodo cilíndrico que circunda a saída do capilar. Assim, forma-se um *spray* com gotículas carregadas que passam através de um gás secante, ocorrendo a evaporação do solvente. Como consequência da evaporação do solvente as gotículas carregadas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que e as moléculas carregadas aprisionadas nas gotículas são “ejetadas” para a fase gasosa, seguindo para o analisador de íons.⁽⁵⁰⁾ Um esquema geral do processo de ionização por *electrospray* bem como uma detalhada descrição

das duas teorias de transferência dos íons para a fase gasosa atualmente aceitas são apresentados na Figura 11.

Figura 11. Representação esquemática da ionização por *electrospray*. Descrição das duas teorias de transferência dos íons para a fase gasosa atualmente aceitas.

1.7.1.2 Ionização/desorção a laser assistida assistida por matriz (MALDI)

Na ionização do tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada à uma solução super-saturada de matriz orgânica, a qual absorve fortemente radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda. A solução resultante dessa mistura é então aplicada a uma placa metálica de MALDI (volumes da ordem de poucos microlitros). Após alguns minutos o solvente terá evaporado e ocorrerá a cristalização da amostra juntamente com o excesso de matriz. A placa é então transferida para dentro do espectrômetro e o cristal formado bombardeado por um feixe de laser de alta potência com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da matriz. Essa energia é absorvida em grande parte pela matriz, a

qual está em excesso, e transferida de maneira branda para a amostra, de modo que ocorre a sublimação do analito e da matriz, resultando em íons em fase gasosa que seguirão para o analisador de massas ⁽⁵¹⁾ (Figura 12).

Ionização por Maldi

Figura 12. Técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz.

1.7.2 Analisadores de massas

Em relação aos analisadores de massas, existem diversos tipos com diferentes princípios, vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação pretendida. Esse texto prestará atenção somente aos analisadores empregados nesse estudo: Tempo de voo (TOF), íon trap e orbitrap.

1.7.2.1 Tempo de voo (TOF)

Os analisadores do tipo TOF (*Time-of-Flight*) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, os mais simples. Eles baseiam-se na separação dos íons de diferentes m/z porém, com a mesma quantidade de energia cinética. Após desorvidos da matriz, os íons são acelerados em direção ao detector através de um tubo de voo, mantido

sob alto vácuo, por meio da aplicação de uma alta diferença de potencial (entre 15-30 kV). Assim, o tempo necessário para atingir o detector é proporcional a tensão aplicada e a relação m/z dos íons (Figura 13).⁽⁵²⁾

Figura 13. Esquema geral de um analisador de massas do tipo TOF (linear). Equação descrevendo a relação entre o tempo de vôo e a relação m/z de um determinado íon.

Com o objetivo de aumentar a resolução e exatidão de massas providas pelos analisadores dos tipo TOF, dois avanços tecnológicos, denominados extração atrasada de íons (*delay extraction*)⁽⁵³⁾ e modo de operação com refletor (*reflectron*)⁽⁵⁴⁾, têm sido incorporados aos novos instrumentos. A extração atrasada, específica para situações nas quais a ionização por MALDI é empregada, consiste única e exclusivamente em introduzir um tempo de atraso entre o momento da ionização e a aplicação do potencial de extração. O tempo de atraso e o potencial de extração podem se ajustados de modo que todos os íons de mesma m/z “focalizem-se” numa posição coincidente antes da aplicação do potencial de extração.

No modo de operação com refletor, uma série de eletrodos espaçados é introduzida no final do tubo de vôo linear. Aplicando-se um campo elétrico nos eletrodos constituintes do refletor, os íons que estiverem entrando no refletor serão desacelerados até o momento que eles irão parar, sendo reacelerados para fora do refletor (Figura 14). Assim, como primeira consequência o tamanho do tubo de vôo será consideravelmente aumentado, o que por consequência dará aos íons um maior caminho para separação. Além disso, o refletor focaliza os íons com a mesma m/z porém diferentes energias cinéticas de modo que esses íons serão focalizados no detector aumentando a resolução da medida.

Figura 14. Esquema geral de um analisador de massas do tipo TOF com refletor.

1.7.2.2 Ion Trap

Atualmente dois tipos de ion traps são comercialmente disponíveis, os convencionais íon traps tridimensionais ⁽⁵⁵⁾ e os íon traps lineares (Linear Ion Trap – LIT).⁽⁵⁶⁾ Tratam-se de equipamentos robustos, altamente sensíveis, seletivos e podem ser facilmente interfaceados com diversas fontes de ionização, principalmente ESI. Não são instrumentos que

propiciam altas resoluções e exatidão de massas e em geral limitam-se a análise de espécies com relação m/z inferior a 2000, porém alguns modelos estendem esse valor até 16000. No entanto, possuem como característica diferencial a capacidade de realizar múltiplos estágios de fragmentação (MS^n).⁽⁵⁷⁾

Nesses instrumentos, um potencial eletrostático que pulsa entre os valores de $-V$ (posição aberta quando electrospray positivo é empregado) e $+V$ (posição fechada em electrospray negativo) controla a entrada de “pacotes” de íons dentro do analisador. O tempo para a entrada dos íons no trap é ajustado de modo a simultaneamente maximizar o sinal e minimizar o efeito de carga/espço. Esse efeito é resultado do acúmulo de uma quantidade excessiva de íons no *trap*, o que causa uma distorção no campo elétrico proporcionando uma redução geral na performance do instrumento.⁽⁵⁸⁾

A Figura 15 apresenta o esquema básico de um íon trap tridimensional. Os íons transferidos para o *trap* são aprisionados por meio da ação de três eletrodos hiperbólicos (um eletrodo tipo *ring* e dois tipo *endcap*). As voltagens aplicadas à esses eletrodos governam a formação de uma cavidade eletrostática na qual os íons são aprisionados. O potencial RF (rádio frequência) aplicado ao eletrodo *ring*, potencial de corrente alternada com frequência constante porém amplitude variável, produz um potencial de campo quadrupolar dentro do *trap*. Esse potencial aprisiona os íons numa trajetória oscilatória estável. O *trap* é tipicamente preenchido com gás hélio a pressão de 1 mtorr. As colisões com as moléculas de hélio “amortecem” a energia cinética dos íons e ajuda a centralizar a trajetória dos íons

(reduzindo a dispersão espacial), permitindo seus aprisionamentos de maneira mais eficiente.⁽⁵⁹⁾

Figura 15. Esquema de um analisador de massas do tipo íon trap tridimensional.

O movimento exato dos íons é dependente das amplitude e da frequência do potencial RF aplicado, do tamanho do *trap* e obviamente de suas relações m/z . Assim, a exata correlação entre a estabilidade da trajetória do íon e esses parâmetros é descrito pelo parâmetro adimensional qz (Equação 1).⁽⁵⁸⁾

$$qz = \frac{4 e V}{m r^2 w^2} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: qz : parâmetro adimensional que determina a estabilidade da trajetória de um íon dependendo de sua relação m/z , tamanho do trap (r), frequência

de oscilação do potencial RF (w), amplitude da voltagem aplicada ao eletrodo *ring* (V) e carga do elétron (e).

A Figura 16 apresenta o diagrama de estabilidade dos íons submetidos a campo quadupolar (diagrama de Mathieu), uma região na qual as estabilidades radial (r) e axial (z) se sobrepõem. Dependendo da amplitude da voltagem aplicada no eletrodo *ring*, um íon de determinada relação m/z apresentará um valor de q_z inserido na região de estabilidade do diagrama (hachurado) sendo portanto aprisionado. Por outro lado, se o valor de q_z estiver além das fronteiras de estabilidade, o íon atingirá os eletrodos e será perdido.⁽⁵⁸⁾

Figura 16. Diagrama que apresenta as regiões de estabilidade de um íon trap parametrizado em termos das voltagens e frequências de operação, também conhecido como diagrama de estabilidade de Mathieu.

Para a detecção desses íons, os potenciais são alterados de modo a desestabilizar o movimento dos íons, resultando na ejeção desses através do eletrodo *endcap* de saída. Assim, um espectro de massas é gerado pela ejeção sequencial dos íons em ordem crescente de m/z proporcionada pela mudança gradual nos potenciais. Por fim, os íons são ejetados através de fendas nos eletrodos endcaps e detectados, geralmente por um elétron multiplicadora.⁽⁵⁸⁾

A física que rege o funcionamento, aprisionamento e ejeção dos íons de um íon trap permite que esses equipamentos sejam extremamente adequados para a realização de experimentos em sequência (MS^n). É possível seletivamente isolar íons de uma determinada m/z no *trap*, promovendo a ejeção de todos os outros íons presentes. A fragmentação desse íon precursor (isolado) pode então ser induzida pela aplicação de potencial auxiliar de corrente alternada de baixa amplitude entre os eletrodos *endcaps*. Isso causa um aumento da energia cinética dos íons provocando a sua dissociação. Os íons fragmento gerados são sequencialmente ejetados em ordem crescente de m/z e detectados. O isolamento e fragmentação são etapas que podem ser repetidas diversas vezes sendo limitada somente devido a eficiência de aprisionamento do instrumento (Figura 15).⁽⁵⁸⁾

Evolução do íon trap tridimensional, o íon trap linear é constituído por quatro barras hiperbólicas que, permitem o aprisionados dos íons numa posição axial ao longo das barras (Figura 17). Assim, a diferença básica entre esses instrumentos é a maneira que os íons são aprisionados, sendo o acúmulo dos íons e controle dos potenciais aplicados, parâmetro que

determina como os íons são ejetados e fragmentados, bastante semelhantes.⁽⁵⁶⁾

Figura 17. Representação esquemática de um íon trap linear.

Inúmeros estudos foram realizados a fim de comparar a performance dos íon traps tridimensionais e lineares em aplicações proteômicas.^(60,61) Diversas melhorias funcionais inerentes a evolução para íon traps lineares podem ser citadas, dentre elas: i) maior capacidade de acúmulo de íons, devido principalmente a geometria do íon trap linear e consequentemente a maneira que os íons são aprisionados; ii) maior velocidade de varredura; iii) até 100% de eficiência na detecção (resultados extremamente satisfatório quando comparado aos 50% dos íon traps tridimensionais); iv) até 70% de eficiência de aprisionamento (oposto aos 5% dos tridimensionais). A soma de todas essas melhorias faz com que os íon traps lineares apresentem uma capacidade muito maior para identificação de peptídeos em comparação ao íon traps tridimensionais.⁽⁵⁶⁾

Mais recentemente, os íon traps lineares tem sido usados em espectrometria de massas como parte de sistemas híbridos (que associam

mais de um analisador de íons num mesmo instrumento) tais como: Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FTICR) ⁽⁶²⁾ e orbitrap.^(63,64)

1.7.3 Instrumentos híbridos

1.7.3.1 TOF-TOF

Na verdade o TOF-TOF não se trata de um instrumento híbrido propriamente dito uma vez que não é constituído por mais de um analisador de massas. No entanto, o “status” de equipamento híbrido lhe é atribuído devido ao fato de que com esse instrumento é possível a realização de experimentos de MS/MS (*tandem*) . A Figura 18 apresenta um esquema detalhado de um instrumento do tipo MALDI-TOF-TOF.⁽²⁵⁾ Este instrumento integra ionização do tipo MALDI, possibilidade de fragmentação de um íon selecionado por colisão com um gás inerte (CID – *Collision Induced Dissociation*) e análise dos íons/fragmentos usando um TOF. Inclusive, as análises podem ser realizadas usando o modo TOF linear, ou TOF refletor.

Figura 18. Esquema detalhado do instrumento MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems).

Este instrumento pode realizar medidas de MS triviais, sendo que para isso basta que a câmara de colisão seja desligada. Assim sendo, uma vez ionizada e transferida para a fase gasosa, a amostra é acelerada em direção ao detector. No entanto, se deseja-se realizar a fragmentação de um determinado íon, basta selecionar o íon e acionar a câmara de colisão. Neste caso, o íon escolhido será selecionado temporalmente pelo sistema TIS (*Timed Ion Selector*), desacelerado e fragmentado pela colisão com um gás inerte (N_2). Os fragmentos formados (carregados) serão então novamente acelerados em direção ao detector.

1.7.3.2 LTQ-orbitrap

Um novo espectrômetro de massas híbrido, que combina um íon trap linear, um módulo destinado a armazenagem e transferência dos íons, (chamado C-trap) e um novo tipo de analisador de massas denominado orbitrap foi recentemente introduzido comercialmente pela Thermo Electron com o nome de LTQ-orbitrap[®] (Figura 19).⁽⁶⁴⁾

A prova de princípio de funcionamento do orbitrap foi descrita por Makarov e colaboradores.⁽⁶⁵⁾ O orbitrap consiste de dois eletrodos concêntricos, sendo um interno ao outro que são usados para aprisionar os íons sob a influência de um potencial eletrostático quadro-logaritmico. Os íons movimentam-se em torno do eletrodo central e oscilam harmonicamente ao longo do seu eixo com uma frequência dependente de suas relações m/z . O sinal de corrente gerado por essas oscilações são convertidas em frequências usando transformada de Fourier. A frequência

dessas oscilações harmônicas dependem, em linhas gerais, somente da m/z dos íons e da curvatura do campo (k) (Figura 19).

Assim, um íon trap linear foi acoplado ao orbitrap, interfaceamento possibilitado pelo uso do C-trap. Dessa maneira, obteve-se um equipamento capaz de combinar a capacidade do íon trap de realizar experimentos em sequência, com a alta resolução (até 100000) e exatidão de massas (inferior a 1 ppm) providas pelo orbitrap. No LTQ-orbitrap, o íon trap linear tem as funções de acumular, isolar e fragmentar os íons. Embora seja possível promover a fragmentação dos íons no próprio orbitrap, é muito mais prático e fácil manipulá-los no ion trap ou então no C-trap.⁽⁶⁶⁾

Figura 19. Representação esquemática do LTQ-orbitrap. Nesse instrumento, os íons são transmitidos através do íon trap linear para o C-trap e então para o orbitrap.

No orbitrap, os íons são aprisionados por meio da aplicação de uma alta voltagem ao eletrodo concêntrico interno enquanto o eletrodo externo é mantido aterrado. Como resultado, esse sistema permite uma altíssima performance no quesito resolução e exatidão de massa porém exige que os íons sejam transferidos para dentro do orbitrap em “pacotes” minimamente dispersos, sendo para isso usado o C-trap. O C-trap focaliza

os feixes de íons em “pacotes” extremamente estreitos e os transfere de maneira muito rápida para dentro do orbitrap por meio de pulsos. O C-trap é constituído por uma barra com superfície hiperbólica que possui duas lentes planas com aberturas pelas quais os íons são transportados. O interior do C-trap é preenchido com N_2 a pressão de 1 mtorr com o objetivo de amortecer a energia cinética dos íons.

Antes de descrever o modo de funcionamento do LTQ-orbitrap é importante deixar claro que os dois analisadores de massas constituintes do equipamento podem ser usados isoladamente, ou seja, cada um deles pode operar simultaneamente sem prejudicar o funcionamento do outro. Na verdade, essa trata-se de mais uma grande vantagem desse instrumento uma vez que em aplicações proteômicas este é geralmente operado de modo que o espectro de massas da amostra em questão é adquirido no orbitrap, ou seja, com altíssima resolução e exatidão de massas, enquanto que os espectros de MS/MS dos íons selecionados são adquiridos simultaneamente no ion trap. Tendo isso em mente, o modo de funcionamento do LTQ-orbitrap pode ser descrito resumidamente da seguinte maneira: Os íons oriundos da fonte de electrospray são transferidos para dentro do ion trap linear onde eles são analisados e ejetados radialmente em direção aos detectores. Alternativamente, os íons podem ser transferidos para o orbitrap a fim de submetê-los a determinações com alta resolução e exatidão.

1.8 Cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A união entre as técnicas de cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massas (MS), possibilitada pelo uso de uma interface adequada, permite a separação, ionização e análise das amostras de interesse *on-line*. Esse arranjo é bastante útil para a análise de peptídeos e portanto tem sido largamente empregado em estudos proteômicos. Assim, uma vez separadas/fracionadas (geralmente por eletroforese uni e bidimensional ou cromatografia líquida preparativa), as proteínas de interesse são submetidas a proteólise com enzimas específicas e os peptídeos obtidos são analisados por LC-ESI-MS/MS.⁽⁶⁷⁾

Um recente avanço em relação a esse acoplamento trata-se do uso de colunas capilares de sílica fundida (diâmetro interno da ordem de 50 – 100 μm) empacotadas com diferentes materiais para a separação dos peptídeos, sendo nesses casos empregadas vazões de fase móvel da ordem de 100 – 500 nL min^{-1} , o que caracteriza um sistema tipicamente classificado como *nanoflow*. Vazões de fase móvel dessa ordem são providas de uma maneira direta (sem divisão) por cromatógrafos a líquido de última geração. Alternativamente, equipamentos convencionais podem ser configurados de maneira que ocorra um *split* da fase móvel.⁽⁵⁰⁾

Uma grande variedade dessas colunas são comercialmente disponíveis. Dentre essas, as colunas denominadas *PicoFrit*[®] (New Objective, Woburn, MA, USA) apresentam um interesse especial uma vez que essas possuem um *frit*, permitindo que o usuário empacote a coluna de acordo com suas necessidades, e um *tip* (Figura 20). Essas colunas

possuem volume morto zero, impedindo assim o alargamento de picos e consequente perda de eficiência e resolução da separação.

Figura 20. Esquema de uma coluna capilar de sílica fundida do tipo *PicoFrit*® (New Objective). Tipicamente essas colunas são empacotadas por 10 cm com partículas de de C-18 (5 μm).

A aplicabilidade das colunas capilares apresentadas está condicionada ao uso de uma interface do tipo *nanoelectrospray*. Nesse tipo de interface, a qual não emprega tipo algum de líquido auxiliar, o potencial do electrospray (tipicamente entre 2 e 5 kV) é aplicado anteriormente a coluna analítica. A Figura 21 apresenta esquematicamente os componentes constituintes de uma interface *nanoelectrospray*. A interface apresentada possui uma coluna de aprisionamento (*trap column*) alocada anteriormente à coluna analítica, a qual permite a dessalinização e concentração das amostras de peptídeos *on-line*.

Figura 21. Configuração de uma fonte de nanoelectrospray num arranjo empregando uma coluna de aprisionamento em linha.

Nesses sistemas, tipicamente 1 μL de amostra é injetada, ficando retida na coluna de aprisionamento. Com a válvula de descarte na posição aberta, a amostra pode ser concentrada e/ou dessalinizada por um determinado tempo pela passagem de fase móvel (constituída essencialmente de solvente aquoso levemente acidificado). Após essa etapa, a válvula de descarte é fechada e um gradiente crescente de solvente orgânico na fase móvel transfere os analitos para a coluna analítica, iniciando assim a separação.

É importante ressaltar que em condições de *nanoflow*, ou seja, com vazões de fase móvel da ordem de nanolitros por minuto, as gotículas formadas no electrospray (as quais contém os analitos) possuem tipicamente diâmetros da ordem de 200 nm, valores que são entre 100 e 1000 vezes menores que os formados quando electrospray convencional é empregado. Assim, as gotículas apresentam altas relações superfície/volume e carga/massa, sendo dessa maneira razoável supor que cada gotícula possui apenas uma (ou algumas poucas) moléculas do analito. Considerando ainda que essa molécula estará bastante próxima a superfície da gotícula, a eficiência do processo de ionização será de aproximadamente 100%. Portanto, nessas condições (*nanoflow*), o sistema irá se comportar como um detector sensível a variações de massa, isso é, a intensidade do sinal será proporcional a quantidade (em massa) de analito constituinte da amostra, diferentemente do que ocorre em sistemas convencionais onde a detecção é sensível a concentração.^(50,68)

1.9 Softwares de busca de proteínas em bancos de dados: Sistemática de busca

Os softwares de busca mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de dados de MS são o Sequest⁽²³⁾ e o Mascot (www.matrixscience.com).⁽²⁴⁾ Ambos os programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados.^(69,70) Além disso, esses softwares também têm a capacidade de usar sequências de nucleotídeos para fazer tal correlação. Para tal, eles primeiramente simulam as seqüências primária das proteínas correspondentes àquelas seqüências de nucleotídeos encontradas nos bancos de genes, utilizando-se do código genético universal; posteriormente eles simulam a fragmentação destas seqüências primárias. De uma forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar a sequência aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro. As sequências “candidatas” são procuradas nos bancos de dados de acordo com a massa molecular do peptídeo (informação adquirida na etapa do PMF) e com o espectro de fragmentação (MS/MS) obtido para cada peptídeo.

No Sequest, uma técnica de processamento do sinal chamada autocorrelação é usada a fim de determinar matematicamente a sobreposição entre o espectro teórico, derivado de cada sequência obtida no banco de dados em questão, e o espectro experimentalmente obtido. O resultado de tal sobreposição é expressa quantitativamente em termos de um *score* para cada peptídeo (X_{corr}). O X_{corr} é um parâmetro que depende de

diversos fatores, tais como: estado de carga do peptídeo e tamanho do banco de dados que está sendo usado para a busca. Assim, a avaliação de um segundo *score*, classificado como ΔC_n faz-se necessário para que a confiabilidade do resultado obtido seja aumentada. Esse parâmetro é definido como sendo a diferença entre os valores de X_{corr} obtidos para a sequência de aminoácidos que obteve o maior X_{corr} e a sequência subsequente. Na literatura, diferentes critérios são usados para classificar uma determinação como satisfatória ou não. De um forma geral, estes valores são: $X_{corr} > 3,75$ para peptídeos com carga +3; $X_{corr} > 2,2$ para peptídeos com carga +2 e $X_{corr} > 1,9$ para peptídeos com carga +1. Em todos os casos descritos, $\Delta C_n > 0,10$ é exigido para que a determinação seja considerada suficientemente confiável.^(71,72) O Sequest tem se mostrado uma ferramenta bastante robusta, inclusive quando espectros com baixa relação sinal ruído são submetidos à análise.^(23,71)

O Mascot também envolve o cálculo de fragmentos teoricamente preditos para todos os peptídeos de um banco de dados de acordo com a massa do íon precursor, previamente determinada. Os valores de m/z dos fragmentos preditos são comparados com os fragmentos experimentais sendo que neste caso a comparação inicia-se com base nos íons **-b** e **-y** mais intensos (vide item 1.10). A probabilidade de que o valor de m/z de um fragmento teoricamente obtido coincidir, de maneira randômica com o valor de m/z de um fragmento obtido experimentalmente é calculado e expresso como sendo o negativo do logaritmo desse número (*score*). Assim, quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que este resultado seja fruto de uma “coincidência”. Esse software fornece para cada busca

submetida um valor limite (dependendo das condições usadas para a busca) à partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico.⁽⁷³⁾

A Figura 22 mostra um esquema detalhado da sistemática de busca empregado pelos principais softwares de busca de proteínas em bancos de dados (Mascot e Sequest).

Uma vez entendida a sistemática aplicada pelos softwares para a identificação de proteínas em bancos de dados usando dados de espectrometria de massas, faz-se extremamente necessário e de suma importância o completo entendimento de como ocorre a fragmentação dos peptídeos. Além disso, a interpretação manual de espectros de MS/MS é recomendada em todos os casos e indispensável em algumas situações. Por exemplo, quando o genoma de uma determinada espécie ainda não está completamente sequenciado ou disponível é necessário derivar a sequência primária de aminoácidos de um determinado peptídeo baseado somente nos dados obtidos por espectrometria de massas, isto é, sem recorrer a banco de dados (sequenciamento “*de novo*”).⁽⁴⁹⁾

Figura 22. Esquema ilustrativo da sistemática de busca de proteínas em bancos de dados empregadas pelos softwares de busca Mascot e Sequest.

1.10 Fragmentação e sequenciamento de peptídeos

A fragmentação de peptídeos por MS para a posterior análise de sua sequência de aminoácidos é comumente realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão (collision induced dissociation

– CID),⁽⁷⁴⁾ também referida por alguns autores como dissociação ativada por colisão (collision activation dissociation – CAD). Apesar de outras metodologias para a fragmentação de peptídeos, tais como: Electron Capture Dissociation (ECD); Electron Transfer Dissociation (ETD)⁽⁷⁵⁾ terem sido desenvolvidas, CID é sem dúvida o mais largamente empregado. Usando uma descrição simplista e abrangente, cabível para a maior parte dos equipamentos comercialmente disponíveis, os peptídeos ionizados (ESI ou MALDI) são acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (hélio, argônio ou nitrogênio) proporcionando assim a colisão entre os peptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão é convertida em energia interna. O modelo da mobilidade do próton⁽⁷⁶⁾ descreve como a energia interna adquirida induz a transferência intramolecular dos prótons em cada peptídeo culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico. Por consequência, essa desestabilização induz a formação de dois íon-fragmentos⁽⁷⁷⁾ (Figura 23), que são classificados como: i)) íons que retêm a carga residual (próton) no lado N-terminal (gerando fragmentos **-a**, **-b** e **-c**, dependendo da ligação que é fragmentada); ii)) íons que retêm a carga residual (próton) na região C-terminal (gerando os fragmentos **-x**, **-y** e **-z**, dependendo da ligação que é fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann (Figura 23A).⁽⁷⁸⁾ É importante enfatizar que os pares de íons **-a/-x**, **-b/-y** e **-c/-z** serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas menos energéticas, espera-se que a formação do par de fragmentos **-b / -y** seja

mais freqüente que os demais pares de fragmentos, facilitando muito a interpretação dos espectros.

Apesar de diversos estudos no sentido de compreender o mecanismo de fragmentação de peptídeos usando CID terem sido realizados, esse ainda não foi completamente entendido.^(74,79,80)

Como resultado da fragmentação das ligações peptídicas mencionado acima, uma série de íons **-b** e **-y** complementares é obtida, de modo que a diferença de valores de m/z entre dois íons consecutivos do mesmo tipo pode revelar a identidade do resíduo de aminoácido em questão (Figura 23B). Enquanto as séries **-b** e **-y** resultam diretamente da clivagem das ligações peptídicas, os íons **-a** são formados pela perda neutra de monóxido de carbono dos íons **-b** (diferença de 27.9949 u relativo ao íon **-b** correspondente).^(74,76) Considerando todos os íons que teoricamente podem ser produzidos em condições de CID, os íons **-b** e **-y** correspondem a grande maioria dos íons observados, enquanto os íons **-a** são menos comuns. Vale ainda dizer que para as situações mais comumente enfrentadas em um estudo proteômico, ou seja, a análise de peptídeos oriundos de digestão triptica (**R** ou **K** na posição C-terminal) a formação da série de íons **-y** é favorecida (em relação a série **-b**) devido à elevada basicidade desses resíduos de aminoácidos.⁽⁷⁴⁾ A energia comumente usada para induzir a fragmentação dos peptídeos em CID, geralmente é insuficiente para romper as ligações entre o carbono- α e o carbono da carbonila, bem como entre o nitrogênio e o carbono- α adjacente, de modo que os íons **-c**, **-x** e **-z** são tipicamente não observados no espectro.⁽⁷⁴⁾

Quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos (Figura 23C e Tabela 4). Esses íons servem como íons diagnóstico, podendo indicar a presença ou ausência de determinados aminoácidos na sequência em estudo. Em certos resíduos de aminoácidos, perdas neutras de moléculas de H_2O e NH_3 são frequentemente verificadas. Por exemplo, **S**, **T** e **E** são aminoácidos que quando presentes em peptídeos submetidos à fragmentação por CID apresentarão perda neutra de H_2O bastante pronunciada. Por outro lado, **R**, **K**, **Q** e **N** são exemplos de aminoácidos que apresentam pronunciada perda neutra de NH_3 . Além disso, determinadas modificações pós-traducionais ocorridas nas cadeias laterais de certos aminoácidos, tais como: i) fosforilação de **S** e **T**; ii) glicosilação e/ou oxidação de **M**; tornam tais grupos laterais lábeis de modo que a perda neutra destes íons pode ser observada. Como exemplo, pode-se verificar se a **S** ou **T** constituinte de um determinado peptídeo apresenta ou não uma fosforilação; para isso, deve-se verificar se há um íon com valor de m/z igual ao íon correspondente (**-b** ou **-y**) menos 98 (ou 49 se o íon **-b** ou **-y** for duplamente carregado), sendo esse íon classificado como íon satélite.⁽⁷⁸⁾

Figura 23. A) Estrutura química geral de um peptídeo apresentando a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann dos fragmentos formados devido a transferência de energia para o peptídeo; B) Os íons formados são enumerados a partir do aminoácido N-terminal; C) a fragmentação das porções amino e carboxi terminal de um mesmo aminoácido produz os íons imônio.

No entanto, apesar da determinação da sequência de aminoácidos em um peptídeo ser possível por meio do simples cálculo da diferença de massa entre picos vizinhos em uma série de íons, tal trabalho é bastante difícil devido a uma série de fatores dentre os quais pode-se citar: i) o conjunto de íons fragmento esperado pode não estar presente na íntegra, ou em outras palavras, pode haver a ausência de alguns íons das séries **-b** e **-y**; ii) alguns fragmentos podem sofrer rearranjos internos e subsequente

fragmentação; iii) os íons podem estar presente com diferentes estados de carga, dificultando a correta atribuição dos íons (tal dificuldade aplica-se na interpretação de espectros que não são deconvoluídos); iv) alguns fragmentos podem sofrer rearranjo neutro de hidrogênios durante a fragmentação. Assim, o somatório destes fatores pode induzir a atribuição errada das séries de íons, tornando assim a interpretação do espectro bastante desafiadora.

Tabela 4. Lista dos 20 resíduos de aminoácidos mais comuns.⁽⁸¹⁾

Aminoácido			Massa média	Massa monoisotópica	Íon imônio	Íon relacionados
Glicina	Gly	G	57,052	57,02146	30	
Alanina	Ala	A	71,079	71,03711	44	
Serina	Ser	S	87,078	87,03203	60	
Prolina	Pro	P	97,117	97,05276	70	
Valina	Val	V	99,133	99,06841	72	
Treonina	Thr	T	101,105	101,04768	74	
Cisteína	Cys	C	103,145	103,00919	76	
Leucina	Leu	L	113,160	113,08406	86	72
Isoleucina	Ile	I	113,160	113,08406	86	72
Asparagina	Asn	N	114,104	114,04293	87	70
Ácido aspártico	Asp	D	115,089	115,02694	88	
Glutamina	Gln	Q	128,131	128,05858	101	84, 129
Lisina	Lys	K	128,174	128,09496	101	70, 84, 112, 129
Ácido glutâmico	Glu	E	129,116	129,04259	102	
Metionina	Met	M	131,199	131,04048	104	61
Histidina	His	H	137,141	137,05891	110	82, 121, 123, 138, 166
Fenilalanina	Phe	F	147,177	147,06841	120	91
Arginina	Arg	R	156,188	156,10111	129	59, 70, 73, 87, 100, 112
Tirosina	Tyr	Y	163,176	163,06333	136	91, 107
Triptofano	Trp	W	186,213	186,07931	159	117, 130, 170, 171

1.11 Análise proteômica aplicada a plantas

A análise do proteoma de plantas está em um estágio bastante inicial de desenvolvimento, como prova desta afirmação o número de publicações relacionadas a este tema é relativamente pequeno.⁽⁸²⁾ Como prova disso, uma busca realizada no WEB OF SCIENCE (<http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Frame>) no dia 09 de março de 2007 com as palavras de busca PLANT and PROTEOMICS, teve como resultado 367 artigos. A título de comparação, uma outra busca com as palavras HUMAN and PROTEOMICS foi realizada sendo obtidos 2354 artigos. Entretanto, apesar do discreto número de artigos publicados nessa área, a aplicabilidade das análises proteômicas para o estudo de plantas fica evidente em situações nas quais deseja-se correlacionar os níveis de proteínas expressas em condições de estresse. Como exemplo, pode-se citar o trabalho publicado por Salekdeh *et al.*⁽⁸³⁾, no qual eles analisaram o proteoma das folhas de arroz após submetê-las a um estresse por falta de água (seca) e acompanharam sua recuperação quando a irrigação foi retomada. A seca foi simulada em plantas cultivadas em laboratório por um período de 23 dias. As proteínas foram extraídas das folhas e separadas por eletroforese bidimensional e analisadas por MS. Quarenta e duas proteínas dentre as 1000 examinadas apresentaram mudanças em seus níveis de expressão com resposta gradual ao estresse por falta de água. Além disso, foi verificada que as mudanças na expressão foram revertidas quando a planta foi irrigada.

A interação entre planta e patógeno trata-se de outra área da ciência que tem se beneficiado muito com o avanço das técnicas de análise

proteômica. Tal benefício deve-se principalmente a necessidade que esse ramo da ciência (interação planta-patógeno) tem de estudar o conjunto envolvido na interação sendo em muitas situações, inclusive impossível isolar as espécies envolvidas. Nesse sentido, expressivos resultados foram obtidos no estudo da interação entre trigo e *Puccinia triticina*, a qual desencadeia uma doença que provoca a ferrugem nas folhas de trigo.⁽⁸⁴⁾ De maneira semelhante, fazendo uso da análise proteômica, importantes conclusões ajudaram a esclarecer uma doença classificada como “explosão” do arroz, causado pela *Magnaporthe grisea*.⁽⁸⁵⁾

Assim, o trabalho aqui apresentado trata-se de um exemplo típico de estudo que exige uma avaliação conjunta da planta e patógeno. Dessa maneira, a análise proteômica será empregada a fim de avaliar o perfil de proteínas presentes em amostras de plantas sadias e infectadas pela MSC.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho consiste em comparar o perfil de proteínas presentes em amostras de casca do caule de plantas sadias e infectadas pela MSC. Uma vez constatadas diferenças, essas proteínas serão identificadas a fim de avaliar suas aplicabilidades como biomarcadores para a doença. Para a análise comparativa, eletroforese bidimensional será empregada enquanto a identificação das proteínas ficará a cargo das técnicas de MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS.

No entanto, para atingir o objetivo principal do projeto, uma série de etapas intermediárias devem ser realizadas, desde o preparo das amostras até análise por espectrometria de massas. Essas etapas, ou em outras palavras, os objetivos parciais do projeto são descritos a seguir:

- ✓ Coleta e preparo das amostras de casca do caule de plantas sadias e doentes.
- ✓ Avaliação do melhor método para extração de proteínas para as amostras em questão.
- ✓ Otimização das condições eletroforéticas de separação, tanto da focalização isoeletrica quanto separação por tamanho.

Uma vez determinada a metodologia de extração de proteínas mais adequada e as melhores condições eletroforéticas, experimentos comparativos empregando amostras de plantas sadias e doentes serão realizados. Uma vez verificadas proteínas diferentemente expressas em

plantas sadias e doenças, submetê-las a digestão enzimática com tripsina e analisar os peptídeos obtidos por MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS.

Em posse desses resultados, e com o auxílio de ferramentas de busca em bancos de dados, identificar as proteínas. Confirmar os resultados obtidos via sequenciamento *de novo*.

Por fim, objetiva-se correlacionar às funções das proteínas identificadas com os aspectos fisiológicos da MSC.

3. EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

- Vidraria de uso comum em laboratório: balão volumétrico, béquer, erlenmeyer, espátula, funil, micropipeta, pipetador, proveta.
- Mixer: Mistral Lab-Line Instruments (modelo 1190)
- Mesa agitadora Tecnal[®] (modelo TE-141)
- Agitador magnético Fisatom[®] (modelo 752-A)
- Centrífuga refrigerada Sorvall (RC-28S SUPRASpeed[®])
- Microcentrífuga Eppendorf (5415 D)
- Tubos cônicos de 15 mL
- Tubos eppendorff de 0,5 , 1,5 e 2 mL (Life Technologies)
- Membranas para filtração: hidrofílica (Millipore) 0,22 µm – 47 mm

3.2 Solventes e Reagentes (listados em ordem alfabética)

Solventes/Reagentes	Procedência
Acetato de sódio	J T Baker
Acetona	Mallinckrodt
Acetonitrila	Mallinckrodt
Ácido acético	Mallinckrodt
Ácido fosfórico	J T Baker
Ácido Trifluoracético (TFA)	Mallinckrodt
Acrilamida	Pharmacia Biotech
Agarose	Life Technologies
Azul de Bromofenol (ABF)	Pharmacia Biotech
Bicarbonato de Amônio	Synth
Bis-Acrilamida	Bio-Rad
C-18 (40-65 µm)	Alltech

Carbonato de sódio	J T Baker
Cloreto de cálcio	Mallinckrodt
3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS)	Pharmacia Biotech
Comassie Brilliant Blue G-250	Pharmacia Biotech
Ditiotreitol (DTT)	Pharmacia Biotech
EDTA	Merck
Formaldeído	Merck
Glutaraldeído	Merck
Iodoacetamida (IAA)	Pharmacia Biotech
Isopropanol	J T Baker
Mercaptoetanol	Pharmacia Biotech
Metanol	J T Baker
Nitrato de prata	Mallinckrodt
Persulfato de amônio (APS)	Mallinckrodt
Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF)	Mallinckrodt
Polivinilpolipirrolidona (PVPP)	Mallinckrodt
Sulfato de amônio	Mallinckrodt
N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	Bio-Rad
Tiosulfato de sódio	Mallinckrodt
Tiouréia	Riedel-de Haën
TRIS-HCl	Life Technologies
Triton X-100	Pharmacia Biotech
Uréia	Pharmacia

➡ H₂O purificada por um sistema Milli-Q (Resistividade = 18,2 MΩ cm).

➡ Membrana para diálise SnakeSkin® – PIERCE

Part number: 68700

➡ Tripsina – Sequencing Grade Modified Trypsin – PROMEGA

Part number: V511C

➡ Cover Fluid – GE Healthcare – GE Healthcare

Code number: 17-1335-01

➡ **Fitas IPG – GE Healthcare**

☒ pH 3-10 L (13 cm)

Code number: 17-6001-14

☒ pH 3-10 NL (24 cm)

Code number: 17-6002-45

☒ pH 4-7 L (13 cm)

Code number: 17-6001-13

☒ pH 6-11 L (13 cm)

Code number: 17-6001-96

➔ IPG buffer – GE Healthcare

☒ pH 3-10 L

Code number: 17-6000-87

☒ pH 3-10 NL

Code number: 17-6000-88

☒ pH 4-7 NL

Code number: 17-6000-86

☒ pH 6-11

Code number: 17-6001-78

➔ Marcadores de Massa Molecular

✓ Bench Marker[®] Protein Ladder – INVITROGEN

(15 proteínas recombinantes com MM variando entre 14 e 220 kDa)

Cat. Number: 10747-012

✓ Low Marker Weight SDS Marker Kit – GE Healthcare

(5 proteínas recombinantes com MM variando entre 14,4 e 97 kDa)

Part Number: 17-0446-01

3.3 Amostras de plantas sadias e infectadas

As amostras de casca do caule de plantas sadias, doentes e controles (combinações de copa/porta-enxerto tolerantes a MSC) foram coletadas, rotuladas e ainda no campo armazenadas em caixas de isopor com gelo. Um corte de aproximadamente 10 cm de altura e 2 cm de largura

foi feito no caule das árvores de modo a incluir áreas acima e abaixo da enxertia. Ao chegar no laboratório, todas as amostras foram lavadas com água corrente e armazenadas em freezer à temperatura de -80°C . Anteriormente às análises, as amostras de casca foram cortadas com o objetivo de separar as partes acima (copa) e abaixo (porta-enxerto) do ponto de enxertia (Figura 3). Desse modo, às análises foram realizadas individualmente em ambas as partes, copa e porta-enxerto. No caso dos controles, serão analisadas a parte do porta-enxerto das plantas de limão tahiti enxertado sobre limão cravo (ou seja, limão cravo como porta-enxerto numa combinação resistente a MSC) e a parte da copa das plantas de laranja valência enxertada sobre tangerina cleópatra (ou seja, laranja valência como copa numa combinação resistente a MSC) (Figura 24).

Figura 24. Esquema ilustrativo das amostras/controles empregadas nesse estudo.

A Tabela 5 apresenta uma série de informações inerentes as amostras coletadas, tais como: combinação de copa e porta-enxerto da planta, propriedade rural, localização e datas de plantio e coleta. Devido a excelente estrutura organizacional das fazendas, cada árvore possui um coordenada, permitindo assim que essas sejam facilmente rastreadas. É importante re-enfatizar que a MSC é uma doença que ainda está restrita a uma área específica dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Assim, amostras de plantas sadias foram coletadas em regiões onde casos de MSC nunca foram registrados. As amostras de controles foram coletadas em regiões afetadas pela MSC, ou seja, embora a planta não desenvolva a doença, essa está submetida a pressão exercida pelo patógeno. Amostras classificadas como assintomáticas representam plantas com combinação intolerante a MSC, que estão plantadas em regiões afetadas porém ainda não apresentaram os sintomas específicos da doença.

Tabela 5. Dados relativos às amostras de casca de plantas sadias, doentes, assintomáticas e controles.

Plantas	Propriedade / Localidade	Variedade		Plantio	Coleta
		<i>copa</i>	<i>porta- enxerto</i>		
Sadias	Fazenda Pedro Tadeu / Gavião Peixoto, SP	Laranja valência	Limão cravo	1995	Jun / 2004
	Fazenda Campo Largo / Itapetininga, SP	Laranja valência	Limão cravo	1991	Jul / 2004
	Fazenda Nascentes / Cesário Lange, SP	Laranja valência	Limão cravo	1998	Jun / 2004
	Fazenda Campo Largo / Itapetininga, SP	Laranja valência	Limão volkameriano	1991	Out / 2004
Doentes	Fazenda São José / Frutal, MG	Laranja valência	Limão cravo	1995	Jun/Dez 2004
	Fazenda São José / Frutal, MG	Laranja valência	Limão cravo	1991	Jun / 2004
	Fazenda Astúrias / Frutal, MG	Laranja valência	Limão cravo	1998	Jun / 2004
	Fazenda Vale Verde / Comendador Gomes, MG	Laranja valência	Limão volkameriano	1992	Ago / 2004
Controles	Fazenda Rio das Pedras / Prata, MG	Laranja valência	Tangerina Cleópatra	1987	Dez / 2004
	Fazenda Rio das Pedras Prata, MG	Limão Tahiti	Limão cravo	1997	Dez / 2004
Assintomáticas	Fazenda São José / Frutal, MG	Laranja valência	Limão cravo	1995	Dez / 2004

3.4 Equipamentos

3.4.1 Moinho Criogênico

O equipamento para moagem criogênica utilizado, SPEX CertiPrep (Figura 25), pertence ao Grupo de Análise Instrumental aplicada da EMBRAPA Pecuária Sudeste (CPPSE – São Carlos/SP) e permite o processamento de apenas uma amostra por vez.

Figura 25. Moinho criogênico (SPEX CertiPrep).

3.4.2 Eletroforese bidimensional

As análises eletroforéticas (primeira e segunda dimensões) bem como a obtenção (Image Scanner – GE Healthcare) e tratamento das imagens dos géis (Image Master 2D – GE Healthcare) foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica (Instituto de Biociências – Unesp/Rio Claro), o qual possui toda a infra-estrutura necessária para a execução destas análises. Alternativamente, em algumas oportunidades realizou-se a etapa de focalização isoeletrica em Rio Claro enquanto a segunda dimensão foi realizada no laboratório científico do Fundecitrus (Araraquara/SP), que dispõe do sistema da BIO-RAD® para o SDS-PAGE (Figura 26).

PRIMEIRA DIMENSÃO (IEF) **IPGPhor – GE Healthcare****SEGUNDA DIMENSÃO (SDS-PAGE)** **Ettan Dalt six Electrophoresis
GE Healthcare** **Protean II Ready Gel System
Bio-Rad****OBTENÇÃO E ANÁLISE
DAS IMAGENS** **Image Scanner
GE Healthcare**

Software de análise das imagens:
Image Master 2D
GE Healthcare

Figura 26. Instrumentação empregada para a realização dos experimentos de eletroforese bidimensional, obtenção e análise das imagens.

3.4.3 Espectrometria de Massas – MALDI-TOF-TOF

Para essas análises fez-se uso do equipamento (Figura 27) instalado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP), o qual funciona no sistema de laboratório multi-usuário. O uso do referido equipamento é condicionado a aprovação de uma proposta de pesquisa enviada dentro do prazo das chamadas. Assim, uma proposta (Proposta: 3213 - Busca de biomarcadores para a morte súbita dos citrus) foi elaborada, submetida e aprovada, tendo sido concedidos sete dias de uso do instrumento. No entanto, devido a uma série de problemas técnicos ocorridos com o equipamento em questão, apenas dois dias foram

disponibilizados para as análises. Obviamente, isso prejudicou o desenvolvimento do trabalho proposto.

Figura 27. Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF-TOF, modelo 4700 Proteomics Analyser - APPLIED BIOSYSTEMS.

3.4.4 Cromatografia líquida capilar acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)

Às análises por LC-MS/MS foram realizadas em dois diferentes sistemas. Um deles é constituído por um cromatógrafo a líquido convencional, um auto injetor e um espectrômetro de massas do tipo ion trap linear (LTQ.-Thermo) (Figura 28A). A fim de prover as vazões requeridas por um sistema cromatográfico capilar, ou seja, algo entre 100 e 500 nL min⁻¹, um split de vazão foi adaptado ao cromatógrafo. O outro sistema usado constitui-se de um cromatógrafo e um espectrômetro de massas do tipo LTQ-orbitrap (Figura 28B). O cromatógrafo em questão é capaz de fornecer vazões de fase móvel da ordem de nanolitros por minuto e conta com um auto injetor

integrado. Ambos os sistemas pertencem ao *Microchemistry & Proteomics Analysis Facility – Harvard University*.

Figura 28. Sistemas de LC-MS empregados. **A)** Cromatógrafo a líquido convencional (Agilent Technologies), auto-injetor (Famos) e ion trap linear (Thermo Electron); **B)** Cromatógrafo a líquido com auto-injetor integrado (Waters) e LTQ-orbitrap (Thermo).

3.5 Preparo das amostras

3.5.1 Moagem em moinho criogênico

Para a moagem das amostras de casca do caule foi usado um moinho criogênico (Figura 25). Neste equipamento, as amostras, previamente cortadas em pequenos pedaços (aproximadamente 1 cm²), são transferidas para dentro de um tubo plástico (policarbonato) juntamente com uma barra magnética metálica. Esse tubo é fechado em ambas as extremidades com peças de aço e submerso em N₂ líquido, sendo que a baixa temperatura proporcionada pelo N₂ líquido (-196 °C) previne a degradação dos componentes da amostra. A moagem dá-se por meio do choque entre a amostra e a barra magnética que é movimentada por um agitador magnético. Ao final do processo, amostras finamente pulverizadas e

com aspecto bastante homogêneo são obtidas e imediatamente armazenadas em freezer à temperatura de -80 °C.

Para essa aplicação, o tempo necessário para o processamento de cada amostra, realizado individualmente, foi de aproximadamente 7 minutos. O programa de moagem empregado está descrito a seguir:

$$\frac{2 \text{ min}}{\text{congelamento}} \Rightarrow \frac{2 \text{ min}}{\text{moagem}} \Rightarrow \frac{1 \text{ min}}{\text{congelamento}} \Rightarrow \frac{2 \text{ min}}{\text{moagem}}$$

Alternativamente, na impossibilidade de fazer uso do moinho criogênico, pode-se moer as amostras usando almofariz e pistilo. No entanto, tal procedimento não produz amostras tão homogeneamente pulverizadas em comparação às amostras obtidas com o uso do moinho, além de ser despendioso em relação ao tempo gasto e menos prático quando grandes quantidades de amostras precisam ser processadas.

3.5.2 Métodos de extração de proteínas

As figuras 29 e 30 descrevem com detalhes os métodos de extração empregados. Para cada procedimento, 1 g de amostra moída foi usada.

Figura 29. Esquema dos métodos de extração de proteínas avaliados (I a IV). Para tais procedimentos fez-se uso de amostras da casca da região do porta-enxerto de plantas sadias (laranja valência enxertada sobre limão cravo; Plantio: 1995).

Figura 30. Esquema dos métodos de extração de proteínas avaliados V a IX). Para tais procedimentos fez-se uso da mesma amostra descrita na Figura 29.

Ao avaliar ou implementar um determinado procedimento de extração é extremamente importante compreender a função de cada reagente constituinte do método. Assim sendo, uma breve descrição acerca da função dos principais reagentes empregados será dada. O PVPP foi adicionado com o objetivo de remover compostos fenólicos, comumente

presentes em tecidos de plantas, os quais podem provocar modificações nas proteínas por meio de reações oxidativas.^(86,87) Para a mesma finalidade, mercaptoetanol também pode ser usado, porém com a desvantagem de que geralmente grandes quantidades deste reagente são necessárias e portanto impurezas eventualmente podem contaminar a amostra.⁽⁸⁸⁾ PMSF trata-se de um inibidor de serino-proteases e algumas cisteíno-proteases.⁽²⁸⁾ Metaloproteases são inibidas por meio do uso de EDTA, que é um agente quelante de alguns íons metálicos livres (tais como: cálcio e magnésio).

A precipitação de proteínas é um procedimento geralmente empregado com o objetivo de separar as proteínas de espécies contaminantes tais como, ácidos nucleicos, lipídeos, surfactantes e sais. A elevada quantidade de sal presente nas amostras pode ser sensivelmente reduzida de uma maneira muito prática empregando-se o processo de diálise, que permite inclusive um aumento da concentração das proteínas na amostra.

A uréia é um reagente desnaturante, que rompe os elementos de estruturas secundárias de modo que os grupos ionizáveis fiquem completamente expostos a solução. Por esse motivo, quando usado em altas concentrações (comumente 8 mol L^{-1}) esse reagente facilita a solubilização das proteínas. Função semelhante a uréia é também exercida pela tiouréia, que tem se mostrado bastante eficaz para a solubilização tanto de proteínas de alta massa molecular quanto de proteínas mais hidrofóbicas, como proteínas de membrana.^(89,90) Detergentes não iônicos (Triton X-100) ou zwitteriônicos (CHAPS) são comumente empregados pois além de auxiliar

a solubilização das proteínas previnem a agregação através de interações hidrofóbicas. SDS é um detergente aniônico que pode ser usado em casos onde há dificuldade de solubilização das proteínas. Essa alta eficiência para solubilizar proteínas deve-se a capacidade que esse detergente possui de formar complexos com as moléculas de proteínas. Porém, exatamente por tratar-se de uma espécie aniônica, a priori SDS não poderia ser usado para a solubilização de proteínas uma vez que sua agregação a essas moléculas resulta em uma alteração da carga da proteína inferindo em problemas na IEF. No entanto, uma estratégia para minimizar esse efeito interferente do SDS é diluir a amostras (que contém SDS) com um excesso de detergentes não iônicos ou zwitteriônicos de modo que a concentração final de SDS seja inferior a 0,25% e a razão entre as concentrações de detergentes não iônicos e SDS seja 8:1.⁽⁹¹⁾ O DTT, que também é um agente desnaturante, tem como função principal clivar as pontes de dissulfeto formadas entre resíduos de cisteínas.

3.5.3 Quantificação das proteínas totais

Uma vez finalizado o processo de extração, a quantidade total de proteínas foi determinada aplicando-se o método de Bradford.⁽⁹²⁾ Brevemente, neste método preparam-se diversas soluções com concentrações conhecidas de uma determinada proteína padrão (albumina não glicosilada é a mais comumente usada). Nestas soluções adiciona-se o corante Coomassie Blue G-250, que em sua forma aniônica liga-se especificamente aos resíduos de arginina, lisina e histidina das proteínas. O

complexo formado por essas ligações tem uma absorbância máxima em 595 nm. Portanto, fazendo uso de um espectrofotômetro, monitora-se o comprimento de onda 595 nm e constrói-se uma curva de calibração com as soluções padrão de proteínas (albumina). Assim, fazendo uso dessa curva de calibração realiza-se a análise quantitativa das amostras de interesse. O restante das amostras foi devidamente acondicionado em freezer à temperatura de -80°C até a realização da focalização isoeletrica.

3.6 Método de separação: Eletroforese Bidimensional

3.6.1 Focalização Isoeletrica (IEF)

Antes de iniciar a etapa de IEF é necessário re-hidratar a fita IPG. A Figura 31 detalha todo o procedimento experimental para a realização da etapa de re-hidratação. A introdução da amostra pode ser realizada na etapa de re-hidratação sendo que para isso basta adicionar a amostra na solução de re-hidratação. O volume de solução de re-hidratação (considerando o volume de amostra) necessário depende do tamanho da fita IPG, sendo que para fitas de 13 e 24 cm são respectivamente 250 e 450 μL . O tempo de re-hidratação sugerido pelo fabricante das fitas IPG é de pelo menos 12 horas e portanto sempre tempos superiores ao recomendado foram empregados.

Figura 31. Procedimentos para a re-hidratação das fitas IPG.

Solução de re-hidratação A: uréia 8 mol L⁻¹; CHAPS 2% (m:v); ABF: 0,002% (m:v); IPG buffer (pH de acordo com a fita): 0,5% (v:v) e DTT 50 mmol L⁻¹.

Solução de re-hidratação B: uréia 7 mol L⁻¹; tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 4% (m:v); ABF: 0,002% (m:v); IPG buffer (pH de acordo com a fita): 0,5% (v:v) e DTT 50 mmol L⁻¹.

Obs.: Tanto o DTT quanto o IPG buffer devem ser adicionados somente antes do uso.

A solução de re-hidratação deve conter IPG buffer, pois este reagente além de aumentar a solubilidade das proteínas, auxilia que a condutividade através do gradiente de pH seja mais uniforme sem afetar a forma do gradiente. Recomenda-se que aproximadamente 0,5% do volume total da solução de re-hidratação seja composta pelo IPG buffer. Por fim, adiciona-se uma quantidade de *dry strip cover fluid* (óleo mineral) suficiente para cobrir a fita IPG. Este líquido tem como objetivo prevenir a secura da amostra.⁽²⁸⁾

Na etapa de IEF a fita é colocada em um *strip holder* de modo que a extremidade ácida fique posicionada no lado anódico (polo positivo) e conseqüentemente o lado básico no lado catódico. Posteriormente colocam-se as pontes de papel (papel de filtro) a fim de estabelecer um contato entre o gel e os eletrodos e adiciona-se aproximadamente 3 mL de *dry strip cover fluid*. Por fim, basta posicionar o *strip holder* no IPGphor respeitando a orientação os polos positivo e negativo e aplicar o programa de potencial desejado.

Figura 32. Posicionamento do strip holder com a fita IPG no equipamento IPGphor.

Geralmente a programação de voltagem inclui uma etapa inicial na qual um potencial constante é aplicado por um determinado tempo. Após esse primeiro passo, inicia-se um gradiente de potencial até o máximo valor desejado. Por fim, esse valor de potencial é mantido pelo tempo necessário para que a quantidade de voltagem acumulada necessária para a IEF da fita em questão seja realizada. Concluída a IEF, as fitas podem ser imediatamente submetidas à análise por SDS-PAGE ou alternativamente serem congeladas e analisadas posteriormente.

3.6.2 SDS-PAGE

Em ambos os sistemas para SDS-PAGE usados (Ettan Daltsix e Protean II) prepararam-se géis de poliacrilamida 10% e 12,5%. No sistema Daltsix os géis possuem dimensões de 240×240×1,5 mm sendo necessário aproximadamente 100 mL de uma solução constituída por: 12,5 g de acrilamida; 0,33 g de bis-acrilamida; 25 mL de TRIS-HCl 1,5 mol L⁻¹ pH 8,80 e 100 mg de SDS. Completa-se o volume para 100 mL e para iniciar a polimerização adiciona-se 100 mg de APS e 13,8 µL de TEMED. Por outro

lado, no sistema da Bio-Rad as dimensões são de 160×160×1,5 mm e portanto aproximadamente 30 mL da mesma solução descrita acima são necessários para cada gel.

Após a polimerização, as fitas IPG previamente focalizadas podem ser alocadas no gel a fim de iniciar a separação na segunda dimensão. Um procedimento adotado antes de posicionar as fitas IPG é equilibrá-las com ditioneitol (DTT) e depois com iodoacetamida (IAA). Neste procedimento, primeiramente cada fita é colocada dentro de um tubo contendo aproximadamente 5 mL de um tampão de equilíbrio (Tris 50 mmol L⁻¹; uréia 6 mol L⁻¹; glicerol 30%; SDS 2%; ABF 0,002%) que contém 50 mg DTT. Após 15-20 min de agitação (mesa agitadora) a solução é descartada e mais 5 mL do tampão de equilíbrio, agora contendo 125 mg de IAA são adicionados. Novamente o tubo é submetido a agitação por 15-20 min sendo que ao final a solução é descartada e as fitas estão prontas para serem submetidas a segunda dimensão.

Após posicionar as fitas no géis, adiciona-se em um papel de filtro aproximadamente 4 µL da solução estoque dos marcadores de massa molecular (Figura 8). Os marcadores usados foram: Bench Marker[®] Protein Ladder (Invitrogen) (220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa) e Low Marker Weight (Ge Healthcare) (94, 67, 43, 30, 20,1 e 14,4 kDa). Uma vez devidamente posicionados, a fita bem como os marcadores, o gel é selado usando uma solução de agarose aquecida e a separação eletroforética é realizada. Ao final, o gel é corado com Comassie

blue coloidal ou Prata, de acordo com os procedimentos detalhados nos Apêndices I e II.

3.7 Excisão dos spots selecionados e digestão enzimática

Após a obtenção das imagens digitais dos géis, os spots selecionados foram recortados dos géis com o auxílio de lâminas cortantes ou ponteiros de pipetadores automáticos, com as quais o procedimento tornou-se mais eficiente. As ponteiros são cortadas transversalmente de acordo com o tamanho de spot, tornando o corte do gel muito mais preciso. Depois de recortado, o gel é transferido para um eppendorf (0,5 mL) previamente lavado com metanol. Esta lavagem serve para que possíveis resíduos de plastificantes sejam eliminados uma vez que esses compostos freqüentemente são verificados em espectros de massas como interferentes. Assim, os spots estão prontos para serem submetidos ao processo de digestão enzimática com tripsina, descrito na Tabela 6. Esse procedimento possui algumas modificações em relação ao método original, descrito por Schevchenko *et al.*⁽⁹³⁾

Tabela 6. Método de digestão trípica empregado.

Descoloração	<p>→ 150 µL de uma solução NH_4HCO_3 50 mmol L⁻¹ / 50% ACN</p> <ul style="list-style-type: none"> - agitar (15 min) - centrifugar (1 min – 5000×g) - remover o líquido (com uma micropipeta) ✓ se necessário, repetir o procedimento (até que o gel esteja completamente descorado)
Desidratação	<p>→ 100 µL de ACN</p> <ul style="list-style-type: none"> - agitar (5 min) - centrifugar (1 min – 5000×g) - remover o líquido (com uma micropipeta) - <i>secar em Speed Vac</i>
Digestão	<p>→ re-hidratar o gel com 20 µL de uma solução de NH_4HCO_3 50 mmol L⁻¹; tripsina 20 µg mL⁻¹</p> <ul style="list-style-type: none"> - Acondicionar as amostras em estufa a 37 °C por 16 horas
	➤ Transferir o sobrenadante (peptídeos) para um eppendorf
Extração dos peptídeos	<p>→ 25 µL de uma solução 60% ACN / 1% TFA</p> <ul style="list-style-type: none"> - agitar (5 min) - centrifugar (1 min – 5000×g) ➤ Transferir o sobrenadante para o eppendorf da etapa anterior
	➡ Reduzir o volume da amostra para 5 – 10 µL usando <i>Speed Vac</i>

3.8 Dessalinização das amostras usando *Zip Tip (lab-made)*

Uma vez digeridas, as amostras foram submetidas a um processo de dessalinização, sendo que para isso ponteiros *Zip Tip* foram preparadas

no próprio laboratório. O procedimento para o preparo destas ponteiros está detalhadamente descrito na Figura 33.

Figura 33. Procedimento utilizado para o preparo das ponteiros *Zip Tip*.

3.9 Espectrometria de Massas

3.9.1 MALDI-TOF-TOF

Para as análises por MALDI-TOF-TOF, fez-se uso da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), solubilizada em uma solução 1% de TFA em ACN com concentração 5 mg mL⁻¹ (solução supersaturada). Em um eppendorf, misturou-se 1 µL de solução de CHCA com 1 µL da amostra, sendo 0,5 µL da mistura adicionada em cada “poçinho” da placa de MALDI. Essas placas são de inox e possuem 192 “pocinhos”. Após a cristalização a placa foi inserida no espectrômetro e a análise iniciada. O equipamento foi

operado no modo positivo e com o refletor ativado. Assim, num primeiro experimento o espectro de MS (PMF) foi obtido. Subsequentemente, os cinco peptídeos mais intensos foram automaticamente selecionados e submetidos à análise por MS/MS. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio de ferramentas de busca em bancos de dados (Mascot), a fim de determinar a identidade das proteínas. A confirmação dos resultados providos pelo Mascot foi realizada via sequenciamento *de novo*.

3.10 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de massas (LC/MS) e interpretação dos resultados obtidos

As análises de todas as amostras obtidas (previamente digeridas) foram realizadas num modo de operação do sistema de LC-MS/MS de maneira que as amostras puderam ser dessalinizadas em linha. Para isso, o instrumento foi configurado com uma pré-coluna (capilar) de aprisionamento (trap column) alocada anteriormente à coluna analítica (também capilar – diâmetro interno típico de 75 μm). Dessa maneira, após a etapa de injeção, os peptídeos constituintes das amostras ficam retidos na coluna de aprisionamento ($\approx 1\text{ cm}$ – empacotada com partículas de C-18 – 10 μm de diâmetro) e são “lavadas” com fase móvel constituída apenas por solvente aquoso levemente acidificado (Solvente A: ácido acético 0,5%). Após devidamente dessalinizadas, os peptídeos da amostra serão transferidos para a coluna analítica ($\approx 10\text{ cm}$ – empacotada com partículas de C-18 – 3 μm de diâmetro) e separados por meio de um lento (60 minutos) gradiente (desde 1 até 60%) de solvente orgânico (Solvente B: ácido acético 0,5%).

solubilizado em acetonitrila). Uma interface do tipo nano electrospray foi empregada de maneira que vazões de fase móvel em torno de 300 nL min⁻¹ foram usadas. De uma maneira geral, o espectrômetro foi programado para realizar uma medida de MS e subsequentemente obter o espectro MS/MS dos quatro peptídeos mais intensos. As medidas realizadas no LTQ-orbitrap, os espectros de MS foram obtidos com alta resolução (60000) e exatidão de massas (medida realizada no orbitrap) enquanto os espectros de MS/MS foram obtidos paralelamente no ion trap linear (baixa resolução e exatidão de massas).

Os resultados obtidos foram analisados tanto com o auxílio de ferramentas de busca em bancos de dados (Mascot e Sequest), a fim de determinar a identidade das proteínas, quanto manualmente, usando sequenciamento *de novo*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes mesmo de iniciar a apresentação e discussão dos resultados obtidos faz-se necessário esclarecer o motivo pelo qual amostras de casca do caule foram empregadas para as análises. A justificativa para tal escolha deu-se primeiramente porque o único sintoma específico da doença, amarelecimento da região interna da casca abaixo da região da enxertia, manifesta-se nesse tecido (Figura 3). No entanto, é óbvio que essa alteração visual apresentada não implica, de maneira definitiva, que variações no conteúdo proteico ocorrerão e serão mensuráveis nesse tecido. Em outras palavras, isso significa dizer que o fato de um sintoma ser verificado num determinado tecido não significa que esse tecido seja o mais adequado para servir como material de estudo. Entretanto, inegavelmente trata-se de um subsídio para sustentar a escolha do tecido vegetal a ser empregado para o estudo. Além disso, a complexidade da amostra foi levada em consideração, uma vez que amostras de folha (material que alternativamente poderia ser empregado) proporcionariam uma dificuldade maior para análise em virtude da grande quantidade de compostos endógenos (polifenóis, lípídeos, terpenos, pigmentos, etc...) que interferem nas análises.⁽⁹⁴⁾

4.1 Avaliação dos métodos para extração de proteínas e otimização das condições de separação (Eletroforese Bidimensional)

Com o objetivo de avaliar suas aplicabilidades e performances para a extração das proteínas constituintes da casca do caule de plantas

cítricas, nove procedimentos de extração foram avaliados (Figuras 29 e 30). Empregando a mesma amostra e exatamente as mesmas condições experimentais, os extratos proteicos obtidos pelos nove métodos em estudo foram submetidos à análise por eletroforese bidimensional. Assim, as metodologias de extração poderão ser diretamente comparadas por meio da análise das imagens dos géis bidimensionais obtidos.

Para esse conjunto de análises, fez-se uso da amostra do porta-enxerto (limão cravo) de uma planta sadia, plantada em 1995. O primeiro parâmetro avaliado com o objetivo de comparar os métodos em estudo foi o rendimento de cada metodologia de extração. Nesse caso específico, o termo rendimento é empregado para denotar a correlação existente entre a quantidade total de proteínas extraídas em relação a massa de amostra usada em cada método. Para a realização dos procedimentos de extração em estudo, partiu-se de 1 g de amostra moída e a concentração total de proteínas presentes nos extratos obtidos foi determinada por meio do método de Bradford.⁽⁹²⁾ A Tabela 7 apresenta a quantidade de proteínas totais extraídas e o rendimento de cada metodologia avaliada.

Tabela 7. Quantidade de proteínas extraídas pelos métodos de extração avaliados. Para cada procedimento de extração, empregou-se 1 g de amostra moída.

Método	Quantidade extraída (mg)	Rendimento (%)
I	1,8	0,18
II	2,1	0,21
III	8	0,80
IV	8	0,80
V	7	0,70
VI	10	0,10
VII	4	0,40
VIII	37	3,70
IX	31	3,10

Assim, no quesito rendimento de extração de proteínas totais, as metodologias VIII e IX apresentaram resultados consideravelmente mais satisfatórios que os obtidos pelos demais métodos.

Uma vez determinado o rendimento de cada metodologia, as amostras foram submetidas às etapas de separação constituintes da eletroforese bidimensional. Para a IEF fez-se uso de fitas IPG de 13 cm com intervalo de pH linear entre 3 e 10. Antes de iniciar a etapa de IEF, as fitas foram re-hidratadas por 13 horas com a solução de re-hidratação A (vide item **3.6.1**). A introdução da amostra na fita IPG foi realizada adicionando-a à solução de re-hidratação. A quantidade total de proteína adicionada é dependente do método de coloração a ser empregado. Assim, considerando

que os géis bidimensionais resultantes das análises das amostras obtidas pelos procedimentos I a IX serão corados com Comassie blue coloidal, decidiu-se aplicar 800 μg de proteínas totais às fitas correspondentes. A Tabela 8 apresenta um resumo contendo as quantidades de amostra/reagentes usados para re-hidratação das fitas IPG usadas.

Tabela 8. Quantidades de amostra e reagentes usados para a re-hidratação das fitas IPG pH 3-10L de 13 cm. O volume total da solução de re-hidratação (incluindo a amostra) indicado para fitas IPG de 13 cm é 250 μL . A quantidade total de proteínas adicionais por fita foi igual a 800 μg .

Amostra (método de extração)	[Proteína] sol. estoque ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	Volume proteína (μL)	Vol. solução de re- hidratação (μL)	vol. IPG _{buffer} (μL)
I	16,8	47,7	201	1,3
II	9,6	72,7	176	1,3
III	17,3	46,2	203	1,3
IV	8,8	90,9	157,8	1,3
V	10,8	75	175	1,3
VI	6,3	127	123	1,3
VII	4,7	171	79	1,3
VIII	30,9	26	224	1,3
IX	23,6	35	215	1,3

Transcorrido o tempo de re-hidratação, 13 horas nesse exemplo, as fitas foram devidamente transferidas para o *strip holder* e a programação de voltagem descrita na Tabela 9 aplicada.

Tabela 9. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG referentes aos métodos de extração I a IX.

Step	Modo de aplicação de voltagem	Voltagem (V)	Tempo (h:min)
1	Step and Hold	500	1:00
2	Step and Hold	500	1:00
3	Step and Hold	8000	2:00
<i>Voltagem total acumulada</i>			16,5 kWh

Uma vez focalizadas, as fitas foram transferidas para tubos de vidro com tampa rosca e armazenadas em freezer à temperatura de -80 °C. Todas as fitas foram analisadas dentro de um período não superior a 15 dias, o que não ocasionou problema algum quanto aos resultados. Antes de iniciar a segunda dimensão, as fitas foram retiradas do freezer e permaneceram sob a bancada por aproximadamente 20 min a fim de atingirem a temperatura ambiente. Depois disso iniciou-se o processo de equilíbrio das fitas, primeiramente com DTT e por fim com IAA. DTT é adicionado com o objetivo de clivar as pontes de dissulfeto que por ventura existam nas proteínas em questão (Figura 34 A). Porém, a clivagem destas pontes é um processo reversível, ou seja, as pontes de dissulfeto podem ser reestabelecidas. Assim sendo faz-se necessário proteger os grupamentos SH por meio de uma reação química, sendo que para esse fim IAA foi o reagente usado (Figura 34 B).

Figura 34. A) Clivagem das pontes de dissulfeto com DTT; **B)** Reação de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas com IAA.

Uma vez concluídas as etapas de redução e alquilação, as fitas IPG foram devidamente posicionadas em géis de poliacrilamida 12,5%, previamente preparados (16 cm × 16 cm × 1 mm). Géis com a concentração referida podem teoricamente separar espécies com MM entre 14 e 100 kDa (Tabela 3).^(28,33) Além da fita, dois marcadores de MM foram alocados nas extremidades da fita IPG a fim de indicar o início e o final do gradiente, além é claro de servirem de referência para a determinação das massas moleculares das proteínas separadas. No lado esquerdo do gel adicionou-se o marcador Bench Marker[®] Protein Ladder, constituído de proteínas com as seguintes massas moleculares 220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 kDa. No lado direito, Low Marker foi o marcador usado (94,

67, 43, 30, 20,1 e 14,4 kDa). No caso do gel referente ao método de extração III a ordem dos marcadores foi invertida.

Por fim, as fitas e os marcadores foram selados com uma solução de agarose e deu-se início a separação eletroforética. Inicialmente aplicou-se uma diferença de potencial igual a 70 V por 30 min e em seguida aumentou-se para 100 V, permanecendo neste valor até o fim do processo, ou seja, por aproximadamente 12 horas. Durante todo o processo a temperatura foi controlada em 4 °C.

Uma vez encerrada a segunda dimensão, os géis foram submetidos ao processo de coloração com Comassie blue coloidal (Apêndice I). As figuras 35 a 43 apresentam os géis correspondentes as amostras obtidas pelos procedimentos de extração I a IX, respectivamente.

Figura 35. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração I (Figura 29). Amostra de casca do porta-enxerto (limão cravo) de uma planta sadia. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 9. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie blue coloidal (Apêndice I). Voltagem Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Figura 36. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração II (Figura 29). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 37. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração III (Figura 29). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 38. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração IV (Figura 29). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 39. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração V (Figura 30). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 40. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VI (Figura 30). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 41. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VII (Figura 30). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 42. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração VIII (Figura 30). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Figura 43. Gel bidimensional de proteínas obtido pelo processo de extração IX (Figura 30). As demais condições experimentais estão descritas na legenda da Figura 35.

Antes de iniciar a discussão sobre os resultados obtidos referentes aos métodos de extração, cabe enfatizar que o método ideal no atual estágio do trabalho (onde é necessário avaliar o problema de uma maneira geral) é aquele que for o mais abrangente possível. Isto significa que se busca um método que, além de extrair grandes quantidades de proteínas, as extraia de forma homogênea, ou seja, extraia proteínas de baixa e alta massa molecular bem como proteínas ácidas e básicas. Assim, idealmente, o gel obtido deve apresentar spots homogeneamente distribuídas por todo o gel.

O procedimento de extração IX foi considerado o melhor dentre os métodos testados uma vez que além de extrair uma grande quantidade total de proteínas em relação aos métodos avaliados (Tabela 7), extraiu proteínas ácidas, básicas, de baixas e altas massas moleculares. O gel correspondente ao método IX apresentou o maior número de spots dentre todos os avaliados. Usando o programa de análise de imagens Image Master 2D, aproximadamente 400 spots bem definidos foram determinados, sendo que outros inúmeros não puderam ser adequadamente contados pois a separação não apresentou resolução suficiente para separá-los (região de massa molecular $\approx$ 30 kDa e pI em torno de 5). Além disso, outro aspecto favorável a esse método é o fato de que o extrato proteico obtido encontra-se solubilizado numa solução de constituição praticamente igual a solução de re-hidratação empregada na etapa de re-hidratação das fitas.

Assim, o objetivo central almejado com esse primeiro conjunto de análises foi atingido, ou seja, foi determinado o melhor método para a extração de proteínas de casca do caule de plantas cítricas de acordo com os critérios de abrangência requeridos.

Entretanto, tendo claro em mente os parâmetros experimentais aplicados nas etapas de extração, IEF e separação por tamanho e de posse dos resultados obtidos, inúmeras pequenas modificações podem ser implementadas aos procedimentos experimentais com o objetivo de aumentar a qualidade dos resultados obtidos em experimentos subsequentes. Dentre essas alterações, pode-se citar: i) redução da quantidade de amostra aplicada uma vez que os géis apresentaram-se

claramente muito “carregados” (incluindo o próprio gel referente ao método IX); ii) aumento gradativo do potencial aplicado na etapa de IEF aliado a um aumento da quantidade total de kVh acumulados. Essa medida visa reduzir o *streaking* horizontal, verificado em alguns pontos dos géis. Esse problema (*streaking*) pode ser originado por inúmeras causas, dentre as quais, tempo insuficiente para a IEF;⁽²⁸⁾ iii) uso de fitas IPG com intervalos de pH mais condizentes com o perfil de proteínas obtido para o sistema em questão, ou seja, fitas que contemplem a faixa ácida de pH com maior eficiência, por exemplo fitas IPG 3-10 não linear (as quais possuem resolução aumentada entre os valores de pH 5 e 7). Alternativamente, pode-se empregar fitas com intervalos menores de pH (Fitas IPG 4-7 L e 6-11L), os quais além de aumentar a resolução permitem a análise de regiões mais específicas; iv) uso de tiouréia na solução de solubilização das amostras e na solução de re-hidratação. Alguns autores sugerem o uso de uréia e tiouréia ao invés de apenas uréia com a justificativa de que esse sistema misto é capaz de melhorar a solubilização de proteínas, principalmente as mais hidrofóbicas, aumentando assim o número de spots visualizados.^(89,95)

4.2 Análise comparativa de géis obtidos para amostras sadias e infectadas pela MSC

Uma vez decidido que o método de extração IX apresentou os melhores resultados, considerando os critérios adotados nesse estágio de desenvolvimento do trabalho, este foi aplicado para a análise comparativa entre amostras de plantas sadias, doentes e tolerantes a MSC (controles).

A fim de facilitar a identificação das amostras em estudo adotou-se adicionar aos códigos de localização das plantas as letras PE (porta-enxerto) ou CO (copa) além das iniciais das variedades em questão, LimCra para limão cravo, LarVal para laranja valência e LimVolk para limão volkameriano. A Tabela 10 apresenta os códigos de identificação das amostras empregadas nas análises comparativas, as quantidades de proteínas extraídas bem como a eficiência do processo de extração.

Tabela 10. Código das amostras, quantidade de proteínas extraídas e eficiência do método de extração. Em todos os casos partiu-se de 500 mg de amostra moída.

		Amostras	Quantidade extraída (mg)	Rendimento (%)
doentes	porta-enxerto	107 PE LimCra	15	3,0
		108 PE LimCra	14	2,8
		109 PE LimCra	14	2,8
		111 PE LimCra	19	3,8
		112 PE LimCra	17	3,4
		262 PE LimCra	13	2,6
		187 PE LimVolk	15	3,0
	copa	107 CO LarVal	13	2,6
		108 CO LarVal	17	3,4
		109 CO LarVal	16	3,2
		111 CO LarVal	16	3,2
		112 CO LarVal	14	2,8

sadias	porta-enxerto	121 PE LimCra	20	4,0
		122 PE LimCra	14	2,8
		123 PE LimCra	20	4,0
		124 PE LimCra	18	3,6
		126 PE LimCra	17	3,4
		230 PE LimVolk	15	3,0
	copa	121 CO LarVal	16	3,2
		122 CO LarVal	19	3,8
		123 CO LarVal	18	3,6
		124 CO LarVal	17	3,4
		126 CO LarVal	18	3,6
controles	porta-enxerto	190 PE LimCra	15	3,0
		191 PE LimCra	18	3,6
		192 PE LimCra	14	2,8
		193 PE LimCra	19	3,8
		194 PE LimCra	19	3,8
	copa	161 CO LarVal	16	3,2
		163 CO LarVal	15	3,0
		164 CO LarVal	16	3,2
		165 CO LarVal	18	3,6
		166 CO LarVal	16	3,2
assintomática	porta-enxerto	265 PE LimCra	13	2,6

4.2.1 Análise comparativa empregando fitas IPG de 24 cm (pH 3-10 NL)

– Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e sadias

Plantas sadias e doentes com as mesmas variedades de copa (Laranja Valência) e porta-enxerto (Limão-Cravo) e mesmo ano de plantio (1995) foram inicialmente estudadas. As amostras de plantas doentes foram coletadas no mês de junho de 2004 em uma propriedade altamente afetada pela MSC, localizada no município de Comendador Gomes/MG. Por outro lado, amostras de plantas sadias foram obtidas em uma fazenda na cidade de Gavião Peixoto/SP, local onde não há registro da doença. Esse primeiro conjunto de géis contemplou à análise de três amostras de porta-enxerto limão cravo doentes (107, 109 e 111 PE LimCra) e três sadias (112, 122 e 123 PE LimCra). Para tal, foram empregadas fitas IPG de 24 cm com intervalo não linear de pH entre 3 e 10, as quais apresentam aumento de resolução na faixa de pH entre 5 e 7. Cada fita foi re-hidratada por 13 horas com 450 μ L da solução de re-hidratação B (descrita no item 3.6.1) na qual o equivalente a 800 μ g de proteínas foram adicionadas (posterior coloração com Comassie blue).

Na etapa de avaliação dos métodos de extração, verificou-se que a quantidade de proteínas adicionada (800 μ g por fita de 13 cm) gerou géis muito “carregados” de modo que decidiu-se reduzir a quantidade a ser aplicada nos géis subsequentes. No entanto, para esse conjunto a mesma quantidade será empregada uma vez que fitas de 24 cm serão usadas. Após a re-hidratação, as fitas foram submetidas a etapa de IEF sendo aplicado o seguinte programa de potencial (Tabela 11).

Tabela 11. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG de 24 cm.

Etapa	Modo de aplicação de voltagem	Voltagem (V)	Tempo (h:min)
1	Step and Hold	200	0:30
2	Gradient	500	0:30
3	Gradient	1000	1:00
4	Step and Hold	8000	8:00
<i>Voltagem total acumulada</i>			40 kVh

Encerrada a etapa de IEF, as fitas foram equilibradas primeiramente com uma solução contendo DTT e posteriormente com uma contendo IAA. Em seguida, as fitas foram posicionadas nos géis de SDS-PAGE 12,5% (25cm×25cm×1,5mm), previamente preparados, seladas com agarose e iniciada a análise fazendo uso do equipamento Ettan Dalt six - Amersham. As condições eletroforéticas usadas foram as seguintes: 5 W por gel durante 30 min e por fim 17 W por gel durante 3 horas. Por fim, os géis foram cuidadosamente retirados das placas e submetidos ao procedimentos de coloração com comassie blue descrito no Apêndice I sendo às imagem adquiridas e tratadas com o software 2D Image Master. A Figura 44 apresenta os seis géis representativos das plantas sadias e doentes, submetidos exatamente às mesmas condições experimentais. A análise desses géis indica diferenças notórias entre os perfis de proteínas presentes em amostras doentes e sadias. Essas diferenças ficam claras em duas regiões dos géis, de modo que se pode preliminarmente atribuir um perfil proteico às amostras sadias e doentes. Na região com pI em torno entre 6,1

e 9,6 e MM aproximadamente 20 kDa nota-se a supressão de um conjunto de proteínas nos géis de plantas doentes. Tal fato também é verificado para outro conjunto de proteínas, como pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa, ou seja, os géis das plantas doentes possuem estas proteínas em menor quantidade. Deve-se verificar que nestes seis géis os spots referentes aos marcadores de massa molecular não estão nítidos. Ou seja, a transferência dos marcadores do papel para o gel não ocorreu (ou ocorreu apenas parcialmente) de modo que após a coloração eles não ficam evidentes.

Figura 44. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e sadias. IEF: fita IPG 3-10 NL (24 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 11. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie. Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

No entanto, um olhar mais atento aos resultados indica que na verdade o padrão de proteínas preliminarmente descrito no parágrafo anterior para amostras sadias e doentes é verificado em todas as amostras analisadas, menos no caso da amostra com o código 111 PE LimCra. Apesar de se tratar de uma amostra doente, essa possui um padrão de proteínas semelhante ao padrão verificado nas amostras sadias. Uma possível explicação para isso reside no simples fato de que o diagnóstico da doença é realizado por meio de uma avaliação dos sintomas típicos da doença e assim sendo é impossível prever em qual momento a planta foi infectada. Em outras palavras, talvez a planta em questão tenha sido infectada a um determinado período de tempo que ainda não foi suficiente para proporcionar diferenças no perfil de proteínas presentes na amostra coletada. Outra explicação viável para o comportamento desta amostra é que o resultado obtido para um conjunto tão pequeno de amostras não seja suficientemente confiável para afirmar que amostras de plantas sadias e doentes apresentam perfis diferentes de proteínas. Assim, a fim de agregar informações que confirmem ou não a hipótese da existência de padrões específicos de proteínas em amostras sadias e doentes, novos géis foram realizados para outras amostras incluindo inclusive amostras de copa (laranja valência) como o objetivo de verificar se o perfil proteico observado ocorre também em amostras da copa.

4.2.2 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10 L) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) e copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles

Para esse novo conjunto de géis, amostras de porta-enxerto e copa de plantas doentes e sadias (Laranja Valência enxertada sobre Limão-Cravo) e mesmo ano de plantio (1995) foram analisadas. Além disso, amostras de plantas controles foram incluídas na análise. Nesse caso, o controle para o porta-enxerto limão cravo de amostras sadias e infectadas será o limão cravo proveniente da combinação limão tahiti enxertado em limão cravo (ano de plantio 1997). O controle para a copa laranja valência será a laranja valência de uma combinação entre laranja valência e tangerina cleópatra (ano de plantio 1987) (Figura 24).

Para essas análises empregaram-se fitas IPG de 13 cm com intervalo linear de pH entre 3 e 10. As fitas foram re-hidratadas por 13 horas com 250 μ L da solução de re-hidratação B (descrita no item 3.6.1) sendo que o equivalente a 700 μ g de proteínas foram adicionadas em cada fita (coloração com Comassie Blue). A partir dos resultados obtidos na etapa de avaliação dos métodos de extração, onde 800 μ g de proteínas foram aplicadas em cada fita, decidiu-se que para fitas de 13 cm essa quantidade deverá ser reduzida. Assim, 700 μ g de proteínas serão empregadas para todas as análises subsequentes. Após a re-hidratação, as fitas foram submetidas a etapa de IEF sendo aplicado o seguinte programa de potencial (Tabela 12). Nesse caso, a voltagem total acululada foi de 20 kVh ao invés dos 16,5 kVh aplicados às fitas de 13 cm usadas para a avaliação dos

métodos de extração. Esse aumento visa eliminar ou ao menos reduzir o *streaking* horizontal verificado em alguns pontos dos géis.

Tabela 12. Programação de voltagem aplicada para as fitas IPG de 13 cm.

Etapa	Modo de aplicação de voltagem	Voltagem (V)	Tempo (h:min)
1	Step and Hold	200	0:30
2	Gradient	1000	0:30
3	Gradient	8000	3:00
4	Step and Hold	8000	1:30
<i>Voltagem total acumulada</i>			20 kVh

Concluída a IEF, as fitas foram submetidas ao processo de redução (DTT) e alquilação (IAA) sendo em seguidas alocadas nos géis de SDS-PAGE 12,5% (16cm×16cm×1,5mm), previamente preparados. Essas análises foram realizadas no equipamento Protean II da Bio-Rad de acordo com as seguintes condições eletroforéticas: 70 V por 1 hora e 100 V por 10 horas. Ao final do processo, os géis foram removidos das placas e submetidos ao procedimentos de coloração com comassie blue descrito no Apêndice I sendo às imagens adquiridas e tratadas com o software Image Master 2D.

As figuras 45 e 46 apresentam respectivamente os géis comparativos obtidos para as amostras de porta-enxerto (limão cravo) e copa (laranja valência).

Figura 45. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Figura 46. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas da copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Os resultados obtidos para os géis apresentados nas figuras 45 e 46 confirmam a hipótese levantada com o primeiro conjunto de géis comparativos. Ou seja, é evidente que existem perfis diferenciados de proteínas para amostras de plantas sadias e doentes. Na região com pI entre 6,1 e 9,6 e MM aproximadamente 20 kDa nota-se uma notória supressão das proteínas nos géis de plantas doentes. Tal fato também é verificado na região de pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa, ou seja, os géis das plantas doentes possuem estas proteínas em menor quantidade. Outra conclusão que pode ser preliminarmente inferida a partir dos resultados obtidos até o presente momento é que cada um dos dois conjuntos de proteínas diferentemente expressas tratam-se na verdade, de inúmeras isoformas e/ou modificações pós-traducionais de uma mesma proteína.⁽⁹⁶⁾ A evidência usada para essa conclusão é a distribuição dos spots em cada uma das regiões, típicos para as situações relatadas acima.⁽⁹⁷⁾ No entanto, a confirmação ou não da possibilidade levantada será definida após a análises dos spots por MS.

À partir dos resultados expressos nesse géis pode-se ainda verificar que conforme esperado, o perfil de proteínas obtido para as amostras de plantas controle foi bastante semelhante ao obtido para as plantas sadias, afinal de contas as plantas controles tratam-se acima de tudo de plantas sadias. Outra conclusão importante é que as diferenças dos perfis de proteínas obtidas entre plantas sadias e doentes é menos evidente em amostras de copa (laranja valência) do que em amostras de porta-enxero (limão cravo). Essa afirmação foi comprovada com a realização de

experimentos adicionais no sentido de confirmar esse comportamento. Os resultados referentes a esses experimentos não serão mostrados aqui mas eles confirmaram que diferenças menos sútils relativas ao perfil de proteínas são observadas em amostras de laranja valência.

Assim, uma vez obtido um resultado bastante satisfatório, ou seja, a descoberta e confirmação de que determinadas proteínas estão extremamente sub-expressas em amostras de plantas doentes em comparação com plantas saudáveis, experimentos com fitas de pH com intervalos mais estreitos (específicos) foram usadas.

4.2.3 Análise comparativa e semi-quantitativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 4-7) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, saudáveis e controles

Vizando avaliar o perfil de proteínas presentes na região ácida dos géis, mais especificamente a série de proteínas com pI entre 4,5 e 5,2 e MM de aproximadamente 30 kDa, uma das séries diferentemente expressas em amostras saudáveis e doentes, fitas de 13 cm com pH variando linearmente entre 4 e 7 foram usadas. Nesse conjunto de análise, um total de quinze amostras de porta-enxerto limão cravo foram analisadas, sendo cinco saudáveis (121, 122, 123, 124 e 126 PE LimCra), cinco doentes (107, 108, 109, 111 e 112 PE LimCra) e cinco controles (190, 191, 192, 193 e 194 PE LimCra). As amostras saudáveis e doentes possuem todas a mesma idade, tendo sido plantadas em 1995 enquanto o ano de plantio dos controles foi 1997. Todas as fitas foram re-hidratadas por 13 horas com 250 µL da solução re-

hidratação B (descrita no item 3.6.1) na qual o equivalente a 700 µg de proteínas foram adicionadas. Após a re-hidratação, as fitas foram submetidas a etapa de IEF sendo aplicado o programa de potencial apresentado na Tabela 12. Uma vez encerrada a IEF, as fitas foram equilibradas com soluções contendo DTT e IAA. Em seguida, as fitas foram posicionadas no gel de SDS-PAGE 12,5% (25cm×25cm×1,5mm) e iniciada a análise fazendo uso do equipamento Ettan Daltsix. As condições eletroforéticas aplicadas para estas análises foram: 5 W por gel durante 30 min e por fim 17 W por gel durante 3 horas.

A Figura 47 apresenta três géis referentes a comparação realizada entre as amostras doentes, sadias e controles.

Figura 47. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, saudáveis e controles. IEF: fita IPG 4-7 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

As análises realizadas com fitas com intervalos de pH mais específicos torna ainda mais evidente a diferença entre os níveis das proteínas presentes em amostras doentes em comparação com as sadias. No caso específico das proteínas com pI variando entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa, agora é possível verificar nitidamente que treze proteínas constituem esse conjunto de proteínas diferentemente expressas.

Assim, os cinco géis referentes a cada condição estudada foram escaneados (fazendo uso dos mesmo parâmetros de tonalidade, contraste e nitidez) e as imagens tratadas com o programa Image Master 2D. As intensidades relativas de cada spot (expressas nesse caso pelo parâmetro volume relativo) foram usadas para construir um gráfico que expressa de uma maneira semi-quantitativa o quanto às proteínas constituintes do conjunto com pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa estão sub-expressas em plantas doentes em relação às plantas sadias. A Figura 48 apresenta um gráfico de barras que expressa o volume relativo médio de cada um dos 13 spots assinalados obtidos à partir dos cinco géis analisados em cada condição. O desvio padrão referente a cada conjunto de dados é apresentado como uma estimativa do erro associado as medidas.

Figura 48. “Zoom” de uma região específica dos géis 2D obtidos para amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. É possível verificar claramente que 13 proteínas constituem a região estudada do gel. Além disso, o gráfico apresentado mostra o volume relativo médio dos 13 spots em cada condição.

A análise da Figura 48 mostra de maneira menos empírica e consequentemente mais quantitativa que esse conjunto de proteínas encontra-se, de uma maneira geral, bastante sub-expresso em amostras de plantas doentes. Com exceção dos spots 1 e 10, nos quais os níveis apresentam-se praticamente iguais em todas as condições, todos os outros spots estão claramente sub-expressos em plantas doentes, sendo que no caso extremo do spot 6 a intensidade dos spots nas plantas doentes é aproximadamente 4 vezes menor em comparação às plantas sadias.

4.2.4 Análise comparativa e semi-quantitativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de copa (laranja valência) de plantas doentes, sadias e controles

Com o intuito de realizar uma análise mais “refinada” do conjunto de proteínas constituintes da região básica (pI entre 6,1 e 9,6 e MM em torno de 20 kDa), fitas de 13 cm com intervalo de pH linear entre 3 e 10 foram empregadas. Para esse conjunto de análises, novamente um total de quinze amostras de porta-enxerto limão cravo foram analisadas, sendo cinco sadias (121, 122, 123, 124 e 126 CO LarVal), cinco doentes (107, 108, 109, 111 e 112 CO LarVal) e cinco controles (161, 163, 164, 165 e 166 CO LarVal). Cada fita foi re-hidratada com 700 µg de proteínas extraídas de amostras de porta-enxerto limão cravo de plantas doentes, sadias e controles. As condições de IEF empregadas para esse conjunto de experimentos estão descritas na Tabela 12. Após a IEF as fitas foram submetidas aos procedimentos de redução e alquilação sendo em seguida posicionadas no gel de SDS-PAGE 12,5% (16cm×16cm×1,5mm) e iniciada a análise fazendo uso do equipamento da Bio-Rad de acordo com as seguintes condições: 70 V por 1 hora e 100 V por 10 horas. A Figura 49 mostra os géis obtidos para as amostras em questão.

As análises realizadas com fitas com intervalos de pH mais específicos torna ainda mais evidente a diferença entre os níveis das proteínas presentes em amostras doentes em comparação com as sadias. No caso específico das proteínas com pI variando entre 6,1 e 9,6 e MM em

torno de 20 kDa, agora é possível verificar nitidamente que nove proteínas constituem esse conjunto de proteínas diferentemente expressas.

Cinco géis referentes a cada condição estudada foram escaneados fazendo uso dos mesmos parâmetros de tonalidade, contraste e nitidez e as imagens tratadas com o programa Image Master 2D. As intensidades relativas de cada spot foram usadas para construir um gráfico que expressa de uma maneira semi-quantitativa o quanto às proteínas constituintes do conjunto com pI entre 6,1 e 9,6 e MM em torno de 20 kDa estão sub-expressas em plantas doentes em relação às plantas saudáveis. A Figura 49 apresenta um gráfico de barras que expressa o volume relativo médio de cada um dos 9 spots assinalados obtidos à partir dos cinco géis analisados em condição. O desvio padrão referente a cada conjunto de dados é apresentado como uma estimativa do erro associado as medidas.

Figura 49. “Zoom” de uma região específica dos géis 2D obtidos para amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes, sadias e controles. Assim, é possível verificar claramente que 9 proteínas constituem a região estudada do gel. Além disso, o gráfico apresentado mostra o volume relativo médio dos 9 spots em cada condição.

A análise da Figura 49 mostra quantitativamente que o conjunto de proteínas com pI entre 6,1 e 9,6 e MM de aproximadamente 20 kDa encontra-se bastante sub-expresso em amostras de plantas doentes. Todos os spots, com exceção do número 8, estão uma intensidade pelo menos duas vezes maior em plantas sadias em comparação às plantas doentes. Outro resultado intrigante inserido na Figura 49 é a maior intensidade dos spots das plantas controles em relação às plantas sadias. A priori, esperar-se-ia que intensidades semelhantes fossem obtidas. Uma das possíveis explicações para esse resultado provém do fato que considerando que a planta controle está sofrendo a pressão do patógeno (mesmo sendo uma

planta resistente a MSC) é razoável propor que a pressão do patógeno induz a expressão dessas proteínas.

4.2.5 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) de plantas doentes e assintomáticas

O próximo conjunto de experimentos foi realizado com o objetivo de esclarecer a dúvida surgida após uma coleta realizada em uma fazenda na cidade de Frutal/MG. Um talhão bastante afetado pela MSC possuía algumas plantas que apesar de constituídas por combinações intolerantes a MSC (laranja valência enxertada em limão cravo) não apresentavam os sintomas típicos da doença, enquanto todas as plantas a sua volta apresentavam. Assim, amostras de porta-enxerto limão cravo de uma planta doente e de uma planta assintomática, que estavam plantadas próximas uma da outra, foram coletadas e submetidas a análise. Para essas análises, 150 µg de proteínas foram aplicadas em cada fita (13 cm pH 3-10) sendo que os géis foram corados com prata (Apêndice II). As condições de IEF aplicadas estão descritas na Tabela 12. Após a IEF as fitas foram submetidas aos procedimentos de redução e alquilação sendo em seguida posicionadas no gel de SDS-PAGE 8% (16cm×16cm×1,5mm) e iniciada a análise fazendo uso do equipamento da Bio-Rad de acordo com as seguintes condições: 70 V por 1 hora e 100 V por 10 horas. A Figura 50 apresenta os géis obtidos para amostras de uma planta doente e uma planta assintomática.

Figura 50. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de uma planta doente e uma planta assintomática. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 10%. Coloração: Prata (Apêndice II). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Fica evidente que a amostra de planta assintomática estudada apresenta perfil de proteínas semelhante ao de amostras sadias. Considerando que essa planta tenha sido infectada a um período de tempo inferior a 22 meses (tempo de incubação atribuído a doença)^(5,6,7) e que portanto, ainda não apresentou os sintomas típicos da MSC, pode-se inferir que a alteração do perfil de proteínas, comprovadamente verificada em plantas doentes, não ocorre, de uma maneira geral, anteriormente ao surgimento dos sintomas visuais típicos da doença. Essa verificação é de certa maneira desapontadora uma vez que caso as alterações nos níveis de proteínas em plantas doentes (verificada em plantas com sintomas) fosse verificada em plantas assintomáticas, seria possível diagnosticar a doença precocemente. Na verdade, é possível sim que as alterações sejam verificadas em plantas assintomáticas, no entanto, se é que isso realmente

ocorre, resta saber a quanto tempo antes do surgimento dos sintomas visuais isso ocorre.

4.2.6 Análise temporal comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 6-11) – Amostras de porta-enxerto (limão cravo) e de plantas doentes e saudáveis

A fim de avaliar a evolução temporal da doença, amostras de uma mesma planta, coletadas em diferentes tempos (6 meses entre as coletas) foram submetidas a análise por eletroforese bidimensional. Para tal, fez-se uso de fitas IPG com intervalo linear de pH entre 6 e 11. Nestas análises 700 µg de proteínas foram aplicadas em cada fita sendo os géis corados com Comassie Blue (Apêndice I). As condições de IEF aplicadas estão descritas na Tabela 12. Após a IEF as fitas foram submetidas aos procedimentos de redução e alquilação sendo em seguida posicionadas no gel de SDS-PAGE 12,5% (16cm×16cm×1,5mm) e iniciada a análise fazendo uso do equipamento da Bio-Rad de acordo com as seguintes condições: 70 V por 1 hora e 100 V por 10 horas. A Figura 50 apresenta os géis obtidos para amostras de uma planta doente e uma planta assintomática.

Figura 51. Géis bidimensionais obtidos para amostras de proteínas do porta-enxerto (limão cravo) de uma mesma planta doente coletadas em diferentes tempos (6 meses entre as coletas). IEF: fita IPG 6-11 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie (Apêndice I). Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Apesar da baixa qualidade dos géis é possível verificar que não houveram variações significativas no perfil das proteínas expressas nas amostras avaliadas. Tal afirmação é válida para a região básica do gel, a qual pôde ser estudada nesse experimento.

4.2.7 Análise comparativa empregando fitas IPG de 13 cm (pH 3-10) – Amostras de porta-enxerto (limão volkameriano) de plantas doentes e sadias

Conforme descrito na introdução desse trabalho, sabe-se que a MSC é uma doença que atinge laranjeiras doces e tangerineiras enxertadas sobre limão cravo e limão volkameriano. Até o presente momento, atenção especial foi prestada à plantas enxertadas sobre limão cravo devido ao fato de que mais de 85% do parque citrícolo nacional ser constituído por esse porta-enxerto. Entretanto, a fim de avaliar o perfil proteico de amostras de porta-enxerto limão volkameriano, um novo conjunto de experimentos foi realizado. Para tal, amostras de porta-enxerto limão volkameriano sadio (ano de plantio 1991) e doente (ano de plantio 1992) foram empregadas (Figura 52). Nessas análises, 700 µg de proteínas foram aplicadas em cada fita (13 cm pH 3 – 10). As condições de IEF empregadas estão descritas na Tabela 12 e a segunda dimensão foi realizada no equipamento Protean II da Bio-Rad de acordo com as seguintes condições eletroforéticas: 70 V por 1 hora e 100 V por 10 horas.

Figura 52. Géis bidimensionais obtidos para amostras proteínas do porta-enxerto (limão volkameriano) de plantas doentes e saudáveis. IEF: fita IPG 3-10 L (13 cm). O programa de voltagem aplicado está descrito na Tabela 12. SDS-PAGE 12,5%. Coloração: Comassie blue coloidal. Demais condições estão descritas nos itens 3.6.1 e 3.6.2.

Os resultados obtidos para os géis apresentados na Figura 52 indicam que o perfil de proteínas em amostras de doentes e saudáveis de porta-enxerto limão volkameriano seguem a mesma tendência verificada para as amostras de porta-enxerto limão cravo. Ou seja, é verificada uma redução de dois conjuntos de proteínas em amostras doentes em relação às amostras saudáveis. No entanto, essa variação não é tão marcante como no caso das amostras de limão cravo.

4.3 Análise dos spots por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) e LC-ESI-MS/MS: Identificação das proteínas

Uma vez estabelecidos os mapas proteômicos referentes às amostras de plantas sadias e infectadas pela MSC, deu-se início a etapa de identificação das proteínas. Inicialmente, uma atenção especial foi prestada aos spots correspondentes às proteínas diferentemente expressas em plantas sadias e doentes. No entanto, inúmeros outros spots foram também submetidos à análise para que o maior número de proteínas fossem identificadas, com o objetivo de agregar informações inerentes ao sistema em estudo. Assim, duas estratégias de análise empregando MS foram usadas para a obtenção das informações necessárias para a identificação das proteínas. Um determinado conjunto de spots foi submetido a análise por MALDI-TOF-TOF, enquanto LC-ESI-MS/MS foi usada para analisar outro conjunto.

Como já discutido anteriormente, *Bottom-up* (Figura 6) foi a estratégia empregada para o estudo proteômico proposto. Assim, os spots foram inicialmente submetidos a digestão enzimática com tripsina (Tabela 6). Essa enzima cliva a cadeia polipeptídica especificamente na região C-terminal dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R), a menos que o aminoácido posterior seja a prolina (P). A fim de garantir a maior eficiência do processo de clivagem, a temperatura e o pH do meio foram ajustados para 37°C e 8,3 (bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹) respectivamente, garantindo a máxima atividade da tripsina. Sob agitação branda, o processo de digestão foi mantido por 16 horas, tempo que, além de garantir a

completa ação da enzima, reduz a clivagem em pontos não específicos da cadeia polipeptídica. Tal fenômeno não é incomum em situações nas quais o procedimento de digestão estende-se por mais de 24 horas.

Para as análises por MALDI-TOF-TOF, as amostras de peptídeos obtidas após o processo de digestão, descrito na Tabela 6, foram submetidas a uma etapa de dessalinização de acordo com o procedimento apresentado na Figura 33. Esse *clean-up* das amostras garante a maior eficiência do processo de ionização/transferência dos íons para a fase gasosa. Uma vez que MALDI trata-se de um processo competitivo, é sensato imaginar que a presença de espécies iônicas nas amostras poderão inibir a ionização das moléculas de interesse, nesse caso os peptídeos. Ao final da etapa de *clean-up*, amostra e matriz foram misturadas, adicionadas na placa de MALDI e submetidas à análise.

Por outro lado, para as análises por LC-ESI-MS/MS, após concluída a etapa de digestão (Tabela 6), as amostras foram diretamente injetadas no sistema sendo dessalinizadas *on-line* graças a configuração do sistema cromatográfico com uma coluna de aprisionamento (*trap column*) (Figura 21).

Em posse dos dados obtidos para cada spot (espectros de PMF e MS/MS), fez-se uso de ferramentas de busca em bancos de dados para a identificação das proteínas. Para correlacionar os dados obtidos por MALDI-TOF-TOF com a informação depositada nos bancos de dados fez-se uso do Mascot. No caso dos dados obtidos por LC-ESI-MS/MS, tanto o Mascot quanto o Sequest foram empregados.

4.3.1 Análise dos spots por MALDI-TOF-TOF

Essas análises foram realizadas no equipamento Proteomics 4700 (Applied Biosystems) usando MALDI em seu modo positivo de operação e o TOF no modo *reflectron*. A matriz empregada foi o CHCA (solução saturada 5 mg mL⁻¹) na proporção 1:1 com a amostra. Diferentes matrizes (ácido sinápico e ácido nicotínico) e relações entre amostra e matriz foram testadas usando amostras padrões de peptídeos, tendo os melhores resultados sido obtidos com a matriz CHCA na proporção 1:1. Ajustou-se a potência do laser (Nd:Yag – 355 nm) e calibrou-se o espectrômetro, tanto o modo MS quanto o MS/MS, por meio da análise de espécies com massas moleculares e padrão de fragmentação conhecidos. Assim, espectros de MS com resolução superior a 13000 e exatidão de massas da ordem de 10 ppm foram obtidos. No caso dos espectros de MS/MS, resolução e exatidão de massas de 2500 e 40 ppm, respectivamente, foram tipicamente obtidas.

Então, em uma placa de MALDI de 192 poçinhos, adicionaram-se todas as amostras (em duplicata) sendo que em cada análise, fez-se um total de 1000 disparos do laser. Ao final, os espectros obtidos para cada disparo foram acumulados de modo que o espectro final fosse obtido. Inicialmente, com a câmara de colisão (TIS – *Timed Ion Selector*) desativada, realizaram-se as análises do PMF, ou seja, varrendo o intervalo de relação de m/z entre 980 e 4000 obtiveram-se os picos relativos aos peptídeos formados na digestão trípica. Como MALDI é uma técnica de ionização que produz predominantemente espécies monocarregadas (carga +1)⁽⁴⁸⁾ a relação m/z corresponde à massa molecular do peptídeo em

questão. Uma vez obtidos esses espectros, automaticamente a câmara de colisão foi preenchida com gás N_2 (1×10^{-6} psi – vale lembrar que tanto a fonte de ionização quanto o tubo de vôo possuem pressão de 1×10^{-8} psi) e os cinco íons mais intensos foram temporalmente selecionados e fragmentados (usando CID).

As Figuras 53 a 56 apresentam os spots selecionados (1 a 63), que após serem digeridos e dessalinizados, foram submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF. Os spots 1 a 52 foram recortados de géis referentes a plantas doentes enquanto os outros (53 a 63) foram obtidos de um gel de planta sadia. Alguns spots localizados em regiões coincidentes dos géis (ex.: 6-53; 8-54; 27-57; 28-58; 29-59) foram propositalmente escolhidos a fim de confirmar (ou não) a identidade dessas proteínas em géis de plantas sadias e doentes, principalmente os spots correspondentes às regiões diferentemente expressos em ambas as condições.

Figura 53. Spots (1 a 12) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Figura 54. Spots (13 a 33) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Figura 55. Spots (34 a 52) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Figura 56. Spots (53 a 63) submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Um exemplo ilustrativo da excelente performance desse equipamento está apresentado na Figura 57, que mostra o espectro de PMF e três espectros MS/MS, obtidos automaticamente para o spot 6.

Figura 57. Espectro de PMF e três espectros de MS/MS automaticamente obtidos para o spot 6.

Toda a informação adquirida para cada spot, ou seja, as relações m/z e intensidade dos picos obtidos no espectro de PMF bem como as razões m/z e intensidades dos picos referentes a cada um dos cinco espectros de MS/MS, foi compilada em um arquivo texto (extensão txt). Esse arquivo foi usado pelo Mascot para realizar a busca nos bancos de dados. Uma vez anexado o arquivo com a informação espectral, diversos parâmetros devem ser informados a fim de que estes direcionem a busca de acordo com as exigências/condições estabelecidas. A Figura 58 mostra a página de acesso ao MASCOT devidamente preenchida com os parâmetros de busca empregados nesse estudo.

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name Marcelo D. Cantu **Email** marceloc@iqsc.usp.br

Search title Citrus Sudden Death Disease

Database NCBI

Taxonomy ... Viridiplantae (Green Plants)

Enzyme Trypsin **Allow up to** 1 missed cleavages

Fixed modifications Biotin (K), Biotin (N-term), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Carbamyl (N-term)

Variable modifications Methylthio (C), NIPCAM (C), Oxidation (M), Oxidation (HW), Phospho (ST)

Protein mass kDa **ICAT** ☐

Peptide tol. ± 0.1 Da **MS/MS tol. ±** 0.3 Da

Peptide charge 1+ **Monoisotopic** ☒ **Average** ☐

Data file C:\MALDI-TOF-TOF-spot61.txt **Browse...**

Data format Mascot generic **Precursor** m/z

Instrument MALDI-TOF-TOF **Report top** 20 hits

Overview ☐ **Start Search ...** **Reset Form**

Figura 58. Página da web de acesso ao Mascot. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por MALDI-TOF-TOF.

Além dos parâmetros básicos (nome, endereço de e-mail, título da busca), inseridos a título de informação, existem parâmetros extremamente importantes que devem ser criteriosamente informados a fim de otimizar as condições de busca de acordo com o sistema em estudo. Esses parâmetros estão apresentados a seguir:

- i) Banco de dados que se pretende realizar a busca: Neste caso, diferentes bancos de dados foram usados, tais como o MSDB, NCBI e SwissProt, sendo que todos apresentaram resultados semelhantes. Assim, decidiu-se adotar o NCBI por se tratar do banco de dados não redundante com o maior número de sequências depositadas.
- ii) Taxonomia: As buscas foram inicialmente realizadas usando todas as entradas. Uma vez concluída essa busca mais abrangente, novas buscas foram feitas empregando apenas as entradas referentes a *Viridiplantae* (*green plants*).
- iii) Enzima proteolítica usada e o possível número de falhas na clivagem que a ferramenta deve considerar na busca: A enzima usada foi a tripsina e considerou-se que ela pode falhar em apenas uma clivagem (“pulando” o ponto correto de clivagem). Esse valor foi considerado pois credenciar eficiência total à enzima, ou seja, considerar que ela clivou todos os pontos teóricos, não condiz com a experiência adquirida. Por outro lado, considerar mais de um ponto de clivagem falho, adicionaria ao software uma quantidade enorme de verificações que tornaria a busca mais demorada.⁽⁶⁹⁾

iv) Modificações fixas: A única modificação fixa proporcionada à proteína foi a carbamidometilação das cisteínas, realizada durante a separação eletroforética.

v) Modificações variáveis: Avaliou-se a oxidação da metionina (gerando sulfóxido de metionina) devido a grande facilidade com que esse resíduo sofre oxidação quando em condições oxidativas.⁽⁶⁹⁾ Adicionalmente, foi considerada a metil-esterificação dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico em razão do procedimento de coloração do gel empregar metanol em condições ácidas.⁽⁹⁸⁾ Por fim, foi investigada a possibilidade de carbamilação N-terminal devido ao uso da uréia como agente de solubilização das proteínas. Sabe-se que a uréia está em equilíbrio com o ácido isocianico, o qual na presença de calor pode atacar o grupamento N-terminal das proteínas induzindo a carbamilação das mesmas.⁽⁹⁹⁾

vi) Erro referente a m/z (PMF e MS/MS): A exatidão de massa dos íons detectados depende exclusivamente do instrumento usado, neste caso a massa monoisotópica foi considerada com um erro máximo de 0,1 e 0,3 Da para os dados de MS e MS/MS respectivamente. Esses poderiam ser inclusive menores porém decidiu-se usar um intervalo de massas um pouco mais amplo a fim de tornar a busca mais abrangente.

Por fim, deve-se informar ainda qual o instrumento usado para a obtenção dos espectros de massas bem como a carga dos íons formados, que neste caso é igual a +1 (ionização por MALDI).

Uma vez concluída a busca, de acordo com a sistemática apresentada na Figura 22, o Mascot informa o resultado, usando para isso

um gráfico de barras no qual existe um valor tido com o limite. Scores abaixo desse valor indicam eventos randômicos, ou seja, sem valor estatístico. Por outro lado, se o *score* atribuído para uma determinada proteína exceder o valor limite a chance da identificação gerada ser um evento randômico é menor que 5% e quanto maior esse valor maior a probabilidade da identificação estar correta.⁽⁶⁹⁾ A título de exemplo, a Figura 59 apresenta o gráfico de barras que expressa o resultado obtido para o spot 6. Nesse caso, o score obtido foi 219, valor consideravelmente maior que o valor limite (39), fato que credita ao resultado uma altíssima probabilidade de acerto.

Figura 59. Gráfico de barras que expressa o resultado obtido pelo Mascot para o spot 6.

Dentre os 63 spots selecionados para análise, 26 deles (Tabelas 13 a 20) apresentaram *scores* bastante superiores aos valores limites e por consequência foram considerados inequivocamente identificados. Entretanto, diversos desses spots referem-se a mesma proteína de modo que, no total, apenas sete diferentes proteínas foram identificadas por similaridade. Como apontado anteriormente, alguns spots coincidentes

foram intencionalmente escolhidos e assim, obviamente, já era esperado que correspondessem a mesma proteína. Entretanto, não era esperado que todos os spots correspondentes a cada uma das regiões diferentemente expressas em plantas sadias e doentes fossem identificados como sendo a mesma proteína. Todos os spots referentes a região de *pI* entre 6,1 e 9,6 e *MM* de aproximadamente 20 kDa (spots 6, 7, 8, 53, 54 e 55 - Figura 53 e 55), uma das regiões diferentemente expressas, foram identificados como proteína putativa similar a miraculina 2 (Tabela 13). De maneira análoga, inúmeros outros spots localizados na região de *pI* entre 4,5 e 5,2 e *MM* em torno de 30 kDa, a outra região diferentemente expressa, foram identificados como quitinase ácida classe II (spots 27, 28 e 29 – Figura 53 – Tabela 16), quitinase (spots 61, 62 e 63 – Figura 55 – Tabela 20) e ainda por ambas (spots 56, 57, 58, 59 e 60 – Figura 55 – Tabela 19). É bastante evidente que a resolução da separação eletroforética dos spots dessa região (principalmente no gel apresentado na Figura 55) não é o ideal, de maneira que é perfeitamente compreensível a identificação de mais de uma proteína num mesmo spot, como no caso dos spots 56 a 60. Esse fato é ainda mais compreensível se levarmos em consideração que quitinase e quitinase ácida classe II são proteínas que apresentam um enorme similaridade (isoformas) e por consequência possuem valores de *pI* e *MM* bastante próximos. A não identificação de um número maior de spots deve-se ao fato de que o genoma dos citros ainda não foi completamente sequenciado, sendo assim bastante pequena a quantidade de informação depositadas nos bancos de dados.

As tabelas 13 a 20 apresentam todas as proteínas identificadas usando MALDI-TOF-TOF. As tabelas mostram inúmeras informações inerentes as identificações, o que inclui os peptídeos identificados, erro em relação a m/z e cobertura da sequência de aminoácidos.

Tabela 13. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 6, 7, 8, 53, 54 e 55, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spots:		Resultados experimentais (gel 2D)					
6, 7, 8, 53, 54 e 55		pI: ≈ 7,5 - 9		MM (kDa): ≈ 20			
MASCOT – Score: 219 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>			
Nome da proteína		Proteína putative similar a miraculina 2					
Código de acesso (NCBI)		ABL67650					
pI / MM (teóricos)		8,18 / 23610 Da					
Organismo		Citrus cv. Shiranuhi					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1237,728	1	1236,721	1236,719	0,002	0	ALAVVLVPGNER	59
1487,770	1	1486,763	1486,763	0,000	0	TSIINEDVDLNVR	29
1875,962	1	1874,954	1874,953	0,001	0	WFITTGGVEGNPGAQTLK	52
1960,928	1	1959,920	1959,921	0,001	0	NELCPLDVVQLSSDSER	57
Sequência Primária (213 aminoácidos)		1 MSTPFVTAIS FLLLT FATKP LVGLADPLVD VNGNKVEASR DYLVSAIRG					
		51 AGGGGLTLFR GRNELCPLDV <u>VQLSSDSERG</u> TRLRFMSMDK <u>TSIINEDVDL</u>					
		101 <u>NVRFSTETRC</u> NEPTVWRVDS YDPSRGK <u>WFI</u> TTGGVEGNPG AQTLLKNWFKF					
		151 ERIGRDRATY KIVHCPSVCE SCVSLCNDVG VSN DHARRLA LTNGR <u>ALAVV</u>					
		201 <u>LVPGNERSAS</u> CAS					
Cobertura da sequência		(60 / 213) * 100 = 28%					

Os resultados obtidos para os spots 6, 7, 8, 53, 54 e 55 são extremamente satisfatórios. Quatro peptídeos foram identificados o que proporcionou uma cobertura de 28% da sequência de aminoácidos. Além disso, os valores de pI e MM preditos por meio dos géis bidimensionais estão de acordo com os valores teóricos. Por fim, vale re-enfatizar que o fato de todos esses spots terem sido identificados como sendo a mesma proteína pode ser atribuído ao fato de que estas tratam-se da mesma proteína com diferentes e inúmeras modificações pós-traducionais, ocorrência muito comumente verificada em plantas.⁽¹⁰⁰⁾ Nesse caso, essas modificações proporcionaram alterações consideráveis nos valores de pI de modo que inúmeras isoformas (mais precisamente 9, de acordo com a Figura 49) com valores de pI entre 6,1 e 9,6 podem ser visualizadas. Assim, tal identificação ganha uma importância muito grande tendo em vista que as diversas isoformas da proteína putativa similar a miraculina 2 estão sendo consideravelmente sub-expressas em plantas doentes.

Tabela 14. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 12 e 40, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Resultados experimentais (gel 2D)							
Nº spots: 12 e 40	pl: ≈ 7,6	MM (kDa): ≈ 10					
MASCOT – Score: 82 – Cut-Off: 37							
Banco de dados: NCBI		Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>					
Nome da proteína	HSP19 classe II (Fragmento)						
Código de acesso (NCBI)	AAP33012						
pl / MM (teóricos)	8,01 / 11191 Da						
Organismo	Citrus paradisi						
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1685,917	1	1684,910	1684,863	0,047	0	VQVEDDNVLLISGER	82
Sequência Primária			1 YVFIVDMPGL KSGDIK VQVE <u>DDNVLLISGE</u> RKREEEKDGA KYVRMERRVG				
(99 aminoácidos)			51 KFMRK FVLPE NANVEAISAV CQDGVLT VTV DKLPPEPKK PKTIEVKIA				
Cobertura da sequência			(15 / 99) * 100 = 15%				

Mesmo tendo sido identificada por meio de um único peptídeo, a HSP-19 classe II (Fragmento) foi considerada uma identificação inequívoca devido ao alto score obtido para o peptídeo em questão, ou seja, praticamente todos os íons das séries **-b** e **-y** foram identificados. Além disso, por se tratar de uma proteína pequena (11191 Da), a digestão trípica dessa proteína propiciará uma reduzida quantidade de peptídeos o que reduz a probabilidade de um desses peptídeos apresentar as características apropriadas para que seja adequadamente ionizado e analisado.⁽²²⁾ Complementarmente, os dados referentes ao pI e MM obtidos por meio dos géis bidimensionais estão de acordo com os valores preditos teoricamente.

Tabela 15. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 24, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spot: 24		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: ≈ 5,3		MM (kDa): ≈ 35			
MASCOT – Score: 233 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Proteína hipotética					
Código de acesso (NCBI)		CAB09799					
pI / MM (teóricos)		5,46 / 32737 Da					
Organismo		Citrus x paradisi					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1030,61	1	1029,61	1029,56	0,05	0	GGTTHIAFVK	54
1465,79	1	1464,79	1464,72	0,07	0	DPDGYIFELIQR	51
1543,90	1	1542,89	1542,83	0,06	0	SAEVVNLVTQELGGK	65
1292,73	1	1291,72	1291,67	0,05	0	TVLVDNEDFLK	62
Sequência Primária (291 aminoácidos)		1 MAEASPAAN AELLEWPCKD KRRFLHAVYR VGDLDRTIKF YTECFGMKLL					
		51 RKRDVPEEKY SNAFLGFGPE QSHFVELTY NYGVTSYDIG TGFGHFAIAT					
		101 EDVYKLVENI RAKGGNVTR PGPLKGGTTH IAFVKDPDGY IFELIQRGPT					
		151 PEPLCQVMLR VGDILGRSIF YEKALGMKLL RTVDKPEYKY TLAMLGYAEE					
		201 DQTTVLELTY NYGVTEYTKG NAYAQAIST DDVYKSAEVV NLVTQELGGK					
		251 ITRQPGSIPG LNTKITSFVD PDGWKTVLVD NEDFLKEIQS E					
Cobertura da sequência		(48 / 291) * 100 = 16%					

A proteína correspondente ao spot 24 trata-se de uma proteína hipotética conservada que foi claramente identificada por meio de quatro peptídeos constituintes (cobertura da sequência de 16%). Novamente, os valores de pI e MM experimentalmente obtidos estão plenamente de acordo com os valores teóricos o que reforça a identificação.

Tabela 16. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spots:		Resultados experimentais (gel 2D)					
25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31		pI: ≈ 5		MM (kDa): ≈ 30			
MASCOT – Score: 104 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>			
Nome da proteína		Quitinase ácida classe II					
Código de acesso (NCBI)		BAC20285					
pI / MM (teóricos)		5,17 / 32864 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1312,716	1	1311,708	1311,617	0,091	0	EMFEDLLPYR	33
1495,810	1	1494,803	1494,703	0,100	0	GFYTYDAFIEAAK	71
Sequência Primária (293 aminoácidos)		1 MRLIGSLLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV CGERDTGHGT DGGELGKIIS					
		51 REMFEDLLPY RNDVRCFARG FYTYDAFIEA AKAFPAFGNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGDE TTGGWPDAPG GEYAWGYCYI RQVSRPASDY CYRYCPCPLP					
		151 GQYYGRGPIQ LTWNCNYLRC GEALGVDLLN NPDLLATDPV LSFKSAIWWF					
		201 MTAQPPKPSC HEVIIDEWKP SAIEVNAGRL PGYGLTTNII NGGIECGQGG					
		251 NDAVRNRIGF FTTFCGKFGI QPGDNLDCYN QRPYGLNLMA QSM					
Cobertura da sequência		(23 / 293) * 100 = 8%					

Os spots 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 diferentemente expressos em plantas sadias e doentes, foram identificados como sendo quitinase ácida classe II. Dois peptídeos foram identificados e os parâmetros verificados na etapa de eletroforese bidimensional estão coerentes com os preditos teoricamente. Mais uma vez é importante ressaltar que a identificação desses spots apresenta grande importância para o trabalho proposto uma vez que os spots 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 pertencem a uma das regiões

dos géis nas quais as proteínas estão bastante sub-expressas em plantas doentes. Além disso, o fato de que a mesma proteína tenha sido identificada nesses spots pode ser justificado pela presença de inúmeras modificações pós-traducionais na proteína identificada.⁽¹⁰⁰⁾

Tabela 17. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 34, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spot: 34		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: ≈ 7			MM (kDa): ≈ 26		
MASCOT – Score: 90 – Cut-Off: 37							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Dehidroascorbato redutase 1 dependente de GSH					
Código de acesso (NCBI)		BAA90672					
pI / MM (teóricos)		5,65 / 23712 Da					
Organismo		Oryza sativa (japonica cultivar-group)					
Peptídeo identificado							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1497,86	1	1496,85	1496,81	0,04	0	LYHLQVALEHFK	90
Sequência Primária (213 aminoácidos)		1 MGVEVCVKAA VGHPDTLGDC PFSQRVLLTL EEKKVPYEMK LIDVQNNPDW					
		51 FLKISPEGKV PVFNGGDGKW IPDSDVITQV IEEKYPTPSL VTPPEYASVG					
		101 SKIFSCFTTF LKSKDPNDGS EKALLTELQA LEEHLKAHGP FINGQNISAA					
		151 DLSLAPKLYH LQVALEHFKG WKIPEDLTNV HAYTEALFSR ESFIKTKAAK					
		201 EHLIAGWAPK VNA					
Cobertura da sequência		(12 / 213) * 100 = 6%					

Mais uma vez, apesar da identificação de apenas um único peptídeo, a dehidroascorbato redutase 1 dependente de GSH pôde ser considerada identificada devido ao altíssimo score (90) obtido para o peptídeo LYHLQVALEHFK. Na verdade, a proteína identificada não se trata

de uma proteína de citros, porém considerando a identificação inequívoca do peptídeo descrito acima e aliando esse fato aos valores coerentes de *pI* e *MM* observados nos géis bidimensionais é possível afirmar que a proteína considerada, GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1, possui uma alta similaridade com a proteína constituinte desse spot.

Tabela 18. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 36, submetido à análise por MALDI-TOF-TOF.

Resultados experimentais (gel 2D)							
Nº spot: 36		pI: ≈ 6,5			MM (kDa): ≈ 22		
MASCOT – Score: 188 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>			
Nome da proteína		SOD					
Código de acesso (NCBI)		AAB57670					
pI / MM (teóricos)		6,03 / 15577 Da					
Organismo		Citrus maxima					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1260,73	1	1259,72	1259,69	0,03	0	AVEQLFQALNK	61
1458,85	1	1457,84	1457,81	0,03	0	VDTSTVVQLQGAIK	66
1627,92	1	1626,91	1626,88	0,03	0	LVVETTANQDPLVTK	61
Sequência Primária		1 KHHQTYVTNY NK <u>AVEQLFQA</u> LNKVDTSTVV <u>QLQGAIK</u> FNG GGHVNHSIFW					
(142 aminoácidos)		51 KNLAPVHEGG GEPPHSSLGW AIDTHFGSLE ALIQKMSAEG AALQGSGWVW					
		101 LGLDTEFKRL <u>VVETTANQDP</u> <u>LVT</u> KAPTLVP LLGIDVWEHA YY					
Cobertura da sequência		(40 / 142) * 100 = 28%					

A proteína referente ao spot 36 trata-se da superóxido dismutase (SOD). Três peptídeos foram identificados de modo que uma cobertura de aproximadamente 30% da sequência foi obtido. Nesse caso, o valor de *pI*

verificado experimentalmente está concordante com o teórico, entretanto, o valor de MM (≈ 22000 Da) está consideravelmente acima do teórico (15577 Da). Uma justificativa para tal fato pode ser encontrada considerando-se que a proteína presente no gel se trate de uma proteína altamente similar (por exemplo uma isoforma) a proteína identificada pelo Mascot (SOD) porém não exatamente a proteína.

Tabela 19. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 56, 57, 58, 59 e 60, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spots:		Resultados experimentais (gel 2D)					
56, 57, 58, 59 e 60		pI: ≈ 4,5 – 5,2			MM (kDa): ≈ 30		
MASCOT – Score: 119 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Quitinase ácida classe II					
Código de acesso (NCBI)		BAC20285					
pI / MM (teóricos)		5,17 / 32864 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1312,699	1	1311,692	1311,617	0,075	0	EMFEDLLPYR	43
1328,694	1	1327,687	1327,612	0,075	0	EM(Ox)FEDLLPYR	16
1495,796	1	1494,788	1494,703	0,085	0	GFYTYDAFIEAAK	76
Sequência Primária (293 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV CGERDTGHGT DGGELGKIIS					
		51 REMFEDLLPY RNDVRCPARG FYTYDAFIEA AKAFPAFGNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGDE TTGGWPDAPG GEYAWGYCYI RQVSRPASDY CYRYCPCPLP					
		151 GQYYGRGPIQ LTWNCNYLRC GEALGVDLLN NPDLLATDPV LSFKSAIWFV					
		201 MTAQPPKPSC HEVIIDEWKP SAIEVNAGRL PGYGLTTNII NGGIECGQGG					
		251 NDAVRNRIGF FTTCGKFGI QPGDNLDCYN QRPYGLNLMA QSM					
Cobertura da sequência		(23 / 293) * 100 = 8%					
MASCOT – Score: 75 – Cut-Off: 39							
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pI / MM (teóricos)		5,06 / 32459 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeo identificado							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1623,905	1	1622,898	1622,821	0,077	0	GPIQLSWNYYLR	75
Sequência Primária (292 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRDTGHGT HGGELGKIIS					
		51 REMFDDLLEY RNDERCPARG FYTYDAFIEA AQAFPGFGNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPPSDYC DPNYPCRGKY					
		151 YGRGPIQLSW NYYNLRGCEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFKSAIWFWM					
		201 TAQPPKPSCH EVIIDEWKPS ANDVNAGRLP GYGLTTNIIN GGIECGQGGN					
		251 AAVRNRIFFF TTFCGKFGIQ PGDSLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM					
Cobertura da sequência		(13 / 292) * 100 = 4%					

Os resultados obtidos para os spots 56 a 60 indicaram que duas proteínas estão presentes nesses spots. Essas proteínas são isoformas e possuem diversos trechos de suas sequências conservados. No entanto, três diferentes peptídeos foram identificados para a quitinase ácida classe II enquanto um peptídeo referente a quitinase foi identificado. Analisando o gel do qual esses spots foram recortados é facilmente compreensível que mais de uma proteína seja identificada por spot uma vez que a completa separação dos spots presentes na região de pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa não foi possível.

Tabela 20. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 61, 62 e 63, submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF.

Nº spots: 61, 62 e 63		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: ≈ 4,5 - 5			MM (kDa): ≈ 30		
MASCOT – Score: 117 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pI / MM (teóricos)		5,06 / 32459 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1177,63	1	1176,62	1176,56	0,06	0	IGFFTTCGK	42
1346,65	1	1345,65	1345,59	0,06	0	EM(Ox)FDDLLEYR	30
1623,90	1	1622,90	1622,82	0,08	0	GPIQLSWNYYLR	45
Sequência Primária (292 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRDTGHGT HGGELGKIIS 51 REMFDDLLEY RNDERCPARG FYTYDAFIEA AQAFPGFGNS GNETMRKREI 101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPPSDYC DPNYPCRGKY 151 YGRGPIQLSW NYNYLRCGEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFKSAIWFWM 201 TAQPPKPSCH EVIIDEWKPS ANDVNAGRLP GYGLTTNIIN GGIECGQGGN 251 AAVRNRI GFF TTECGKFGIQ PGDSLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM					
Cobertura da sequência		(33 / 292) * 100 = 11%					

Tal como nos spots 56 a 60, a quitinase foi novamente identificada nos spots 61 a 63. No entanto, nesse último caso somente peptídeos referentes a quitinase foram identificados.

Em todos os casos apresentados, os *scores* obtidos foram substancialmente superiores aos valores limites estabelecidos. Além disso, a menos das proteínas identificadas nos spots 12 (HSP-19 classe II - Fragmento) e 34 (dehidroascorbato redutase 1 dependente de GSH), todas as outras identificações foram realizadas tendo sido identificados mais de um peptídeo, fato que aumenta em muito a confiabilidade do resultado. Aliado a isso, os valores de *pI* e *MM* obtidos experimentalmente foram coincidentes com os teóricos em praticamente todos os casos.

Entretanto, a fim de confirmar as identificações, todos os peptídeos identificados pelo Mascot foram sequenciados manualmente (*de novo*) seguindo a estratégia apresentada no item 1.10 da introdução. A fim de ilustrar o trabalho realizado para cada peptídeo constituinte dos spots identificados, as Figuras 60 e 61 apresentam os espectros de MS/MS obtidos experimentalmente para os íons 1177,63 e 1623,90, referentes ao spot 61 – quitinase. Além disso, as figuras mostram os espectros de fragmentação teóricos para cada um dos íons em questão e por fim apresenta às séries de íons *-b* e *-y* verificadas via sequenciamento *de novo*.

Figura 60. Comparação entre os espectros teórico e experimental obtidos para o íon com m/z 1177,63 referente ao spot 61. Sequenciamento *de novo* do íon em questão e apresentação dos íons referentes às séries *-b* e *-y* identificados.

Marcelo Delmar Cantú

ordem de 40 ppm para espectros de MS/MS), a correta determinação desses aminoácidos torna-se trivial.

No caso do íon com m/z 1623,90, o sequenciamento *de novo* não permitiu a correta atribuição da ordem dos dois primeiros aminoácidos da região N-terminal. A interpretação permitiu conclusivamente determinar que esses dois aminoácidos são G e P porém a ordem não foi determinada.

Além disso, a análise dos espectros de MS/MS mostrados nas Figuras 60 e 61 permite verificar a característica típica dos espectros de fragmentação obtidos por esse tipo de equipamento (TOF-TOF). Ou seja, muitos íons são observados na região de baixas relações m/z , fato que contrasta com os poucos e esparsos íons verificados na região de altas m/z .⁽¹⁰¹⁾ Dessa maneira, a determinação de todos os íons correspondentes às séries **-b** ou **-y** (especialmente os íons de altas massas) fica comprometida. No entanto, isso não impede a completa determinação da sequência de aminoácidos uma vez que as séries são complementares.

Assim, concluída a apresentação e discussão dos resultados referentes a identificação dos spots por MALDI-TOF-TOF é evidente que a informação mais relevante oriunda desse trabalho foi a identificação inequívoca dos dois conjuntos de proteínas diferentemente expressas em plantas saudáveis e doentes. As proteínas presentes nas regiões dos géis com pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa foram identificadas como sendo quitinase e quitinase ácida classe II. Essas proteínas são isoformas e o fato de diversos spots terem sido identificados como sendo a mesma proteína pode ser justificado pela ocorrência de inúmeras e diferentes modificações

pós-traducionais nas proteínas identificadas. Da mesma maneira, as proteínas presentes nas regiões dos géis com *pI* entre 6,1 e 9,6 e *MM* em torno de 20 kDa foram identificadas como Putative miraculi-like 2, sendo o fato de inúmeros spots terem sido igualmente identificados devido a existência de inúmeras modificações pós-traducionais.

4.3.2 Análise dos spots por LC-ESI-MS/MS

Para esse conjunto de análises, cada um dos spots (64 a 95) mostrados nas Figuras 62 e 63 foram recortados dos géis de duas plantas controle (Figura 62: porta-enxerto limão cravo e Figura 63: copa laranja valência) e digeridos com tripsina de acordo com o procedimento descrito na Tabela 6. Os peptídeos oriundos dessa digestão foram submetidos a uma etapa de separação por cromatografia líquida, fazendo uso de uma coluna capilar (*PicoFrit* – Figura 20) empacotada com partículas de C-18 (fase reversa), e posteriormente analisados *on-line* por MS. Devido a configuração do sistema cromatográfico empregada (Figura 21), a qual possui uma coluna de aprisionamento (*trap column*) alocada anteriormente à coluna analítica, as amostras foram diretamente injetadas no sistema, sendo submetidas ao processo de dessalinização *on-line*. Resumidamente, após condicionar a coluna cromatográfica com uma fase móvel majoritariamente aquosa (levemente acidificada), aproximadamente 1 µL de amostra foi injetado no sistema. Os peptídeos constituintes dessa amostra ficam retidos na coluna de aprisionamento (1 cm – partículas de C-18 – 10 µm de diâmetro) sendo dessalinizados por alguns minutos. Então, um lento gradiente de fase

orgânica é iniciado a fim de transferir os peptídeos para a coluna analítica (10 cm – partículas de C-18 – 5 μ m de diâmetro). Considerando a natureza da fase estacionária empregada, os peptídeos apresentam ordem de eluição relacionada à suas hidrofobicidades. Os peptídeos mais hidrofílicos eluirão anteriormente aos mais hidrofóbicos.

Figura 62. Spots (64 a 76) submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Figura 63. Spots (77 a 95) submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Após a separação, os peptídeos são ionizados e transferidos para a fase gasosa por meio da técnica de electrospray. Nesse ponto, é importante destacar a grande vantagem de empregar colunas do tipo *PicoFrit* uma vez que, após separadas as bandas dos analitos são diretamente ionizadas e analisadas. Ao contrário, as interfaces que empregam colunas que não às *PicoFrit* possuirão uma coluna de transferência dos analitos separados até a fonte de ionização o que obviamente introduz um volume morto no sistema contribuindo para o alargamento dos picos e consequentemente perda de resolução. Assim, com a interface empregada, o potencial do electrospray é aplicado anteriormente

a coluna analítica e o uso de gás secante ou qualquer líquido auxiliar é dispensável.

Os espectrômetros empregados (LTQ e LTQ-orbitrap) foram operados num modo de aquisição dos dados chamado de *Data Dependent*, sendo que isso significa dizer que após varrer um intervalo de m/z entre 350 e 2000 o espectrômetro automaticamente seleciona os quatro íons mais intensos submetendo-os a fragmentação por CID. Ainda, para evitar a aquisição de determinados espectros de maneira redundante, fez-se uso de um recurso chamado *Dynamic Exclusion*, o qual “coloca” os espectros recentemente analisados numa lista de exclusão por um determinado tempo.

A Figura 64 apresenta o cromatograma do pico base obtido para os spot 94 usando o LTQ. Além disso, um “zoom” na figura mostra o espectro de MS obtido para o íon (m/z 503,5) eluído em torno de 25 min bem como o seu respectivo espectro de MS/MS (obtido automaticamente).

M156-GT2 #4167 RT: 26.03 AV: 1 NL: 5.27E4
 F: ITMS + c NSI d Full ms2 503.49@30.00 [125.00-1525.00]

Figura 64. Cromatograma do pico base obtido para o spot 94 usando o LTQ. Um “zoom” na região do cromatograma referente ao tempo 25,1 min ilustra o espectro de MS referente ao íon com m/z 503,5 sendo apresentado ainda seu espectro de MS/MS.

No caso do LTQ-orbitrap, a medida do espectro de MS foi sempre realizada no orbitrap com o objetivo de adquirir o valor de m/z referente ao íon precursor de cada peptídeo com alta resolução e exatidão de massa. Esse equipamento permite que o operador determine a resolução desejada para a medida sendo disponíveis os seguintes valores de 7500, 15000, 30000, 60000 e 100000 (valores referenciados a um íon com m/z igual a 400). Conforme maior a resolução exigida, maior o tempo requerido para a medida, de modo que a maneira mais adequada de fazer uso desse instrumento para o tipo de aplicação proposta é fazer a medida de MS no orbitrap e simultaneamente obter os espectros de fragmentação no íon trap linear. O tempo necessário para o orbitrap fazer uma varredura no intervalo de m/z entre 350 e 2000 com resolução de 60000 (empregada nesse estudo) é aproximadamente 1 s (tempo que inclui a introdução dos íons no LTQ, transferência para o C-trap, transferência para o orbitrap e a medida propriamente dita).⁽¹⁰²⁾ Por outro lado, o íon trap linear gasta aproximadamente 300 ms para fazer a varredura do mesmo intervalo. Com relação a exatidão de massas do LTQ-orbitrap, valores inferiores a 3 ppm podem ser facilmente obtidos após a calibração do instrumento. Entretanto, uma excelente estratégia foi desenvolvida por Olsen e colaboradores.⁽⁶⁶⁾ O princípio dessa estratégia baseia-se no uso de do íon com m/z 445,120025, referente ao composto polidimetilciclosilano,⁽¹⁰³⁾ formado em qualquer condição que envolva o uso de colunas capilares e altos potenciais elétricos. Assim, durante a análise, o instrumento faz a leitura da relação m/z desse

composto e usa essa informação para a calibração do sistema. Com essa estratégia, a exatidão de massas obtida atinge níveis de ppb.

Os resultados obtidos para cada spot submetido à análise por LC-MS/MS (relação m/z e intensidade do sinal de cada MS/MS adquirido) foram compilados em arquivos texto (.dta), os quais foram empregados como informação de entrada para os softwares de busca. As Figuras 66 e 67 apresentam as páginas de acesso dos softwares (Mascot e Sequest, respectivamente) bem como indicam os parâmetros usados para as buscas. Aqui, em ambos os casos, tal como na análise dos dados obtidos por MALDI-TOF-TOF, o banco de dados usado para a busca foi o NCBI. As mesmas modificações fixas (carbamidometilação das cisteínas) e variáveis (oxidação da metionina e carbamilação N-terminal) foram avaliadas em ambos as ferramentas. Considerando a baixa exatidão de massas fornecida pelos equipamentos do tipo íon trap, a tolerância em relação ao erro associado às medidas foi de 2 Da para o íon precursor (MS) e 0,7 Da para os dados de MS/MS. No caso das medidas realizadas no LTQ-Orbitrap, mesmo este se tratando de um equipamento que produz dados com altíssima exatidão, fez-se uso de um intervalo de massas maior a fim de obter informações mais abrangentes. Assim, os resultados obtidos podem ser refinados numa etapa subsequente, onde o sequenciamento *de novo* foi usado para confirmação das sequências identificadas.

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name	Marcelo D Cantu	Email	marceloc@iqsc.usp.br
Search title	Citrus Sudden Death Disease		
Database	NCBI nr		
Taxonomy	... Viridiplantae (Green Plants)		
Enzyme	Trypsin	Allow up to	1 missed cleavages
Fixed modifications	Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamidomethyl (C) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term)		
Variable modifications	NIPCAM (C) Oxidation (HW) Oxidation (M) Phospho (ST) Phospho (Y)		
Quantitation	None		
Peptide tol. ±	2 Da	# ¹³C	0
MS/MS tol. ±	0.7 Da		
Peptide charge	2+ and 3+	Monoisotopic	☒ Average ☐
Data file	C:\Data\LC-MS/MS-spot numbe Browse...		
Data format	Sequest (.DTA)	Precursor	m/z
Instrument	ESI-TRAP	Error tolerant	☐
Decoy	☐	Report top	AUTO hits
Start Search ...		Reset Form	

Figura 65. Página da web de acesso ao Mascot. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por LC-ESI-MS/MS.

Run TurboSequest

Searchflow: Default, Trypsin, nr (Indexed), 2007-03-12 Save																													
Directory: ☒ Single ☐ Multiple Cantu, M. (M197-GT_2007) - 07/03/08	Server Options Sequest Queue: 0 Dir 0 Procs Priority: 5 Continue ☐ Oper: mdc Run SEQUEST Help	Differential Modifications <table border="1"> <thead> <tr> <th>Symbol</th> <th>AA</th> <th>DiffMass</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>*</td> <td>M</td> <td>15.9949</td> </tr> <tr> <td>#</td> <td>C</td> <td>57.0214</td> </tr> <tr> <td>@</td> <td></td> <td>79.9663</td> </tr> <tr> <td>^</td> <td></td> <td>31.9898</td> </tr> <tr> <td>~</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>\$</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>]</td> <td>N-term</td> <td></td> </tr> <tr> <td>[</td> <td>C-term</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Symbol	AA	DiffMass	*	M	15.9949	#	C	57.0214	@		79.9663	^		31.9898	~			\$			]	N-term		[	C-term	
Symbol	AA	DiffMass																											
*	M	15.9949																											
#	C	57.0214																											
@		79.9663																											
^		31.9898																											
~																													
\$																													
]	N-term																												
[	C-term																												
Database & Enzyme First: nr.fasta.hdr Second: Options: ☒ Auto ☐ Protein ☐ Nucleotide Enzyme: Trypsin Cleaves At: Both Ends																													
Options Edit Add-Mass Edit Advanced <table border="1"> <tr> <td> Parent Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Fragment Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Peptide Mass Units: ☒ amu ☐ mmu ☐ ppm Peptide Mass Tolerance: 2.0 amu Fragment Ion Tolerance: 0.7 Output Lines: 12 Description Lines: 12 </td> <td> Neutral Losses (H₂O/NH₂) a: ☐ b: ☒ y: ☒ Ion Series Weightings a: 0.0 b: 1.0 c: 0.0 d: 0.0 v: 0.0 w: 0.0 x: 0.0 y: 1.0 z: 0.0 </td> <td> Normalize XCorr Values: ☐ Sequence Header Filter: Partial Sequence: Use different parameters to continue: ☐ Load params from selected directory: Refresh Show Fragment Ions: ☐ </td> </tr> </table>			Parent Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Fragment Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Peptide Mass Units: ☒ amu ☐ mmu ☐ ppm Peptide Mass Tolerance: 2.0 amu Fragment Ion Tolerance: 0.7 Output Lines: 12 Description Lines: 12	Neutral Losses (H₂O/NH₂) a: ☐ b: ☒ y: ☒ Ion Series Weightings a: 0.0 b: 1.0 c: 0.0 d: 0.0 v: 0.0 w: 0.0 x: 0.0 y: 1.0 z: 0.0	Normalize XCorr Values: ☐ Sequence Header Filter: Partial Sequence: Use different parameters to continue: ☐ Load params from selected directory: Refresh Show Fragment Ions: ☐																								
Parent Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Fragment Mass Type: ☒ Mono ☐ Avg Peptide Mass Units: ☒ amu ☐ mmu ☐ ppm Peptide Mass Tolerance: 2.0 amu Fragment Ion Tolerance: 0.7 Output Lines: 12 Description Lines: 12	Neutral Losses (H₂O/NH₂) a: ☐ b: ☒ y: ☒ Ion Series Weightings a: 0.0 b: 1.0 c: 0.0 d: 0.0 v: 0.0 w: 0.0 x: 0.0 y: 1.0 z: 0.0	Normalize XCorr Values: ☐ Sequence Header Filter: Partial Sequence: Use different parameters to continue: ☐ Load params from selected directory: Refresh Show Fragment Ions: ☐																											

Figura 66. Página de acesso ao Sequest. Os campos estão preenchidos com os parâmetros empregados para as buscas realizadas com os dados obtidos por LC-ESI-MS/MS.

4.3.2.1 Spots analisados por LC-ESI-MS/MS – busca em banco de dados usando o Mascot

As Tabelas 21 a 38 apresentam as identificações obtidas usando o Mascot. Dos 32 spots (64 a 95) em estudo, 26 foram positivamente identificados. Dentre esses 26 spots, a identidade de 19 proteínas foi determinada.

Tabela 21. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 65, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 65		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 60			
MASCOT – Score: 315 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Fator de elongação alfa 1					
Código de acesso (NCBI)		AAL79774					
pI / MM (teóricos)		9,14 / 49739 Da					
Organismo		Saccharum hybrid cultivar CP65-357					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
560,65	2	1119,28	1120,26	-0,97	0	STTTGHLIYK	45
726,18	2	1450,35	1451,61	-1,25	0	YYCTVIDAPGHR	38
918,36	3	2752,07	2751,03	1,03	1	VGYNPDKIHFPISGFEGDNM(Ox)IER	48
489,10	2	976,18	975,14	1,04	0	LPLQDVYK	52
513,15	2	1024,28	1025,20	-0,92	0	IGGIGTVPVGR	68
821,61	3	2461,81	2462,86	-1,04	0	VETGVIKPGM(Ox)VVTFGPSGLTTEVK	44
Sequência Primária (447 aminoácidos)		1 MGKEKTHINI VVIGHVDSGK <u>STTTGHLIYK</u> LGGIDKRVIE RFEKEAAEMN					
		51 KRSFKYAWVL DKLKAERERG ITIDIALWKF ETTKY <u>Y</u> CTVI <u>DAPGHR</u> DFIK					
		101 NMITGTSQAD CAVLIIDFTT GGFEAGIFKD GQTREHALLA FTLGVKQMIC					
		151 CCNKMDATTP KYSKARYDEI VKEVSSYLKK <u>VGYNPDKIHF</u> <u>VPISGFEGDN</u>					
		201 <u>MIER</u> STNLDW YKGPTLLEAL DLINEPKRPS DKPLRL <u>PLQD</u> <u>VYKIGGIGTV</u>					
		251 <u>PVGRVETGVI</u> <u>KPGMVVTFGP</u> <u>SGLTTEVK</u> SV EMHHEALQEA LPGDNVGFNV					
		301 KNAVVKDLKR GYVASNSKDD PAKEAASFTS QVIIMNHPGQ IGNGYAPVLD					
		351 CHTSHIAVKF AELVTKIDRR SGKELEKEPK FLKNGDAGMV KMVPTKPMVV					
		401 ETFSEYPPLG RFAVRDMRQT VAVGVIKSVE KKDPTGAKVT KAAAKKK					
Cobertura da sequência		(89 / 447) * 100 = 20%					

Tabela 22. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 66 e 82, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 66 e 82		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 50			
MASCOT – Score: 180 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicolítico					
Código de acesso (NCBI)		CAA42103					
pI / MM (teóricos)		8,34 / 36667 Da					
Organismo		Antirrhinum majus (snapdragon)					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
417,72	2	833,43	832,95	0,49	0	IGINGFGR	49
471,83	2	941,65	942,15	-0,50	1	KVIISAPSK	57
718,17	2	1434,3	1434,59	-0,27	0	AASFNIIPSSTGAAK	56
749,90	2	1497,78	1498,72	-0,94	0	VPTVDVSVVDLTVR	110
500,63	3	1498,86	1498,72	0,14	0	VPTVDVSVVDLTVR	52
1073,50	2	2144,98	2145,24	-0,26	0	GILGYTEDDVSTDFVGDSR	69
888,40	2	1774,78	1775,87	-1,09	0	LVSWYDNEWGYSTR	57
Sequência Primária (336aminoácidos)							
1 APIKIGINGF GRIGRLVARV ALQRDDVELV AVNDPFISTD YMTYMFKYDS							
51 VHGAWKHHEL KVKDEKTLF GEKPVVVFGR RNPEEIPRAS TGAEYIVEST							
101 GVFTDKDKAA AHLKGGAKKV IISAPSKDAP MFVVGVNEKE YKSDLHIVSN							
151 ASCTTNCLAP LAKVINDRFG IVEGLMTTVH SITATQKTVD GPSAKDWRGG							
201 RAASFNIIPS STGAAKAVGK VLPQLNGKLT GMSFRVPTVD VSVVDLTVRL							
251 EKKATYEQIK AAIKEESEGG LKGILGYTED DVVSTDFVGD SRSSIFDAKA							
301 GIALNDNFVK LVSWYDNEWG YSTRVVDLIV HMASVQ							
Cobertura da sequência		(80 / 336) * 100 = 24%					

Tabela 23. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 67, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 67		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 50			
MASCOT – Score: 122 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Peroxidase Aniônica					
Código de acesso (NCBI)		CAA74203					
pI / MM (teóricos)		5,41 / 38288 Da					
Organismo		Zea mays					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
454,09	2	906,16	905,95	0,21	0	TPNAFDNK	49
499,68	2	997,34	998,18	-0,84	0	DIGIAAGLIR	74
Sequência Primária		1 MARSSGSRPV ALVLLALCAA ALSSATVTVN EPIANGLSWS FYDVSCPSVE					
(356 aminoácidos)		51 GIVRWHVAEA LRRDIGIAAG LIRIFFHDCF PQGCDASVLL SGSNSEQIEV					
		101 PNQTLRPEAL KLIDDIRAAV HAVCGPTVSC ADITTLATRD AVVASGGPFF					
		151 EVPLGRRDGL APASSDLVGT LPAPFFDVPT LIESFKNRSL DKADLVALSG					
		201 AHTVGRGHCV SFSDRLPPNA DDGTMDPAFR QRLTAKCASD PSGNVVTQVL					
		251 DVRTPNAFDN KYFDLIAKQ GLFKSDQGLI NHPDTKRAAT RFALNQAAFF					
		301 DQFARSMVKM SQMDILTGSA GEIRRNCSVR NTALGDVSSS AQLETTAGDE					
		351 GLAADA					
Cobertura da sequência		(18 / 356) * 100 = 5%					

Tabela 24. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 68, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 68		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 8,8		MM (kDa): ≈ 40			
MASCOT – Score: 169 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		NAD(P)H óxidoreductase, homóloga a isoflavona redutase					
Código de acesso (NCBI)		CAA63056					
pI / MM (teóricos)		6,16 / 33851					
Organismo		Solanum tuberosum (potato)					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
619,69	2	1237,37	1238,47	-1,10	0	ILFIGGTGYIGK	66
432,58	2	863,15	864,00	-0,85	0	FIVEASAK	53
716,00	2	1429,98	1429,49	0,49	0	FFPSEFGNDVDR	51
Sequência Primária (308 aminoácidos)		1 MAGKSKILFI GGTGYIGKFI VEASAKAGHD TFVLVRESTL SNPTKTKLID					
		51 TFKSFGVTFV HGDLYDHESL VKAIKQVDVV ISTVGHALLA DQVKLIAAIK					
		101 EAGNVKRFFP SEFGNDVDRV HAVEPAKAAF NTKAQIRRVV EAEGIPFTYV					
		151 ATFFFAGYSL PNLAQPGAAG PPNDKVILG HGNTKAVFNK EEDIGTYTIN					
		201 AVDDPKTLNK ILYIKPPHNI ITLNELVSLW EKKTGKNLER LYPPEEQVLK					
		251 NIQEASVPMN VGLSIYHTAF VKGDHTNFEI EPSFGVEASE VYPDVKYTPI					
		301 DEILNQYV					
Cobertura da sequência		(32 / 308) * 100 = 10%					

Tabela 25. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 69, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 69		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 40			
MASCOT – Score: 233 – Cut-Off: 47							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Pectinesterase					
Código de acesso (NCBI)		AAB57670					
pI / MM (teóricos)		9,03 / 63997 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
657,20	2	1312,38	1312,47	-0,09	0	TVAAAVAAPQGGTK	59
534,12	2	1066,22	1067,15	-0,93	0	NVVDGSTTFK	60
639,70	2	1277,38	1278,37	-0,99	0	DITFQNTAGPSK	73
398,11	2	794,20	793,91	0,29	0	HQAVLR	41
1 MTHIKEFFTK LSESSSNQNI SNIPKKKKKL FLALFATLLV VAAVIGIVAG							
51 VNSRKNSGDN GNEPHAILK SSCSSTRYPD LCFSIAIAPV EASKKVT SQK							
101 DVIEMSLNIT TTAVEHNYFG IQKLLKRTNL TKREKVALHD CLETIDETLD							
151 ELHKAVEDLE EYPNKKSLSQ HADDLKLMS AAMTNQGTCL DGFSHDDANK							
201 HVRDALSDGQ VHVEKMCSNA LAMIKNMTDT DMMIMRTSNN RKLTEETSTV							
Sequência Primária		251 DGWPAWLSPG DRRLQSSSV TPNVVAADG SGNFKTVAAA VAAAPQGGTK					
(584 aminoácidos)		301 RYIIRIKAGV YRENEVTTK HKNIMFIGDG RTRTIITGSR NVVDGSTTFK					
351 SATVAVVGEQ FLARDITFQN TAGPSKHQAV ALRVGADLSA FYNCDMLAYQ							
401 DTLYVHSNRQ FFFVNCIAGT VDFIFGNAAA VLQNCDIHAR KPNSGQKNMV							
451 TAQGRTPNQ NTGIVIQSR IGATSDLKPV QGSFPTYLGR PWKEYSRTVI							
501 MQSSITDLIH PAGWHEWDGN FALNTLFYGE HQNSGAGAGT SGRVKWKGFR							
551 VITSATEAQA FTPGSFIAGS SWLGSTGFPP SLGL							
Cobertura da sequência		(44 / 584) * 100 = 8%					

Tabela 26. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 70, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Resultados experimentais (gel 2D)							
Nº spot: 70		pl: 6,2		MM (kDa): ≈ 20			
MASCOT – Score: 252 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Malato desidrogenase					
Código de acesso (NCBI)		ABB16910					
pl / MM (teóricos)		6,10 / 36083 Da					
Organismo		Solanum chilense					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
673,25	3	2016,74	2016,41	0,33	0	VLVTGAAGQIGYALVPM(Ox)IAR	43
673,70	2	1345,38	1346,63	-1,25	0	MELVDAAFPLLK	80
681,74	2	1361,47	1362,63	-1,16	0	M(Ox)ELVDAAFPLLK	72
454,93	3	1361,77	1362,63	-0,87	0	M(Ox)ELVDAAFPLLK	54
550,87	3	1649,58	1649,97	-0,39	0	VLVVANPANTNALILK	58
826,20	2	1650,38	1649,97	0,41	0	VLVVANPANTNALILK	71
823,60	2	1645,18	1645,79	-0,61	0	LSSALSAASSACDHIR	68
549,75	3	1646,24	1645,79	0,45	0	LSSALSAASSACDHIR	48
753,09	2	1504,17	1504,64	-0,46	1	KDLTAEELSEEK	78
688,64	2	1375,27	1376,46	-1,19	0	LDLTAEELSEEK	85
Sequência Primária (334 aminoácidos)		1 MNRAKDPVRV LVTGAAGQIG YALVPMIARG VMLGADQPVI LHMLDIPPAA					
		51 EALNGVKMEL VDAAFPLLKG VVATDDAVEA CTGVNVAVMV GGFPRKEGME					
		101 RKDVMSKNVS IYKSQASALE KHAAPNCKVL VVANPANTNA LILKEFAPSI					
		151 PEKNITCLTR LDHNGPWQI SERLSVQVSD VKNVWIWGNH SSSQYPDVNH					
		201 ATVSTPAGDK PVRELVADDA WLNGEFISTV QQRGAIIKA RKLSSALSAA					
		251 SSACDHIRDW VLGTPEGTFV SMGVYSDGSY NVPSGLIYSF PVTCKNGEWS					
		301 IVQGLPIDEF SRKKDLTAE ELSEEKALAY SCLA					
Cobertura da sequência		(77 / 334) * 100 = 23%					

Tabela 27. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 71, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 71		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 8		MM (kDa): ≈ 15			
MASCOT – Score: 341 – Cut-off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Hemoglobina não simbiótica classe 1					
Código de acesso (NCBI)		AAK07675					
pI / MM (teóricos)		9,15 / 20650 Da					
Organismo		Citrus unshiu					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
416,28	2	830,55	830,93	-0,37	0	NSGELALK	48
488,25	2	974,48	975,14	-0,66	0	IFEIAPSAK	56
621,61	2	1241,21	1241,30	-0,09	0	DSDIPVEQNPK	49
768,78	3	2303,33	2304,69	-1,36	0	LKPHTTVFVM(Ox)TCESAVQLR	52
697,82	2	1393,62	1394,48	-0,86	0	YGVADHFEVTK	75
817,88	2	1633,75	1634,79	-1,03	0	NAWAEAYDQLAAAIK	61
Sequência Primária							
(183 aminoácidos)		1 MRDGLSKGLF CTAPKSIRSV RRNSGSFNVT AFTEEQEALV VKSWNAMKKN					
		51 SGELALKFFL RIFEIAPSAK KLFTFLKDSD IPVEQNPKLK PHATTVFVMT					
		101 CESAVQLRKA GKVTVRESNL KDLGATHFKY GVADEHFEVT KYALLEPIKE					
		151 PVPEMWSEL KNAWAEAYDQ LAAAIKIEMK PPS					
Cobertura da sequência		(76 / 183) * 100 = 42%					

Tabela 28. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 72 e 88, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Resultados experimentais (gel 2D)							
Nº Spot: 72, 88		pl: 6,2			MM (kDa): ≈ 13		
MASCOT – Score: 136 – Cut-off: 47							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Cu/Zn superóxido dismutase					
Código de acesso (NCBI)		CAA03881					
pl / MM (teóricos)		5,82 / 12784 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
776,90	2	1551,79	1552,68	-0,89	0	GTVSFSVEGSGPTTVK	86
518,45	3	1552,31	1552,68	-0,37	0	GTVSFSVEGSGPTTVK	74
657,70	2	1313,38	1314,49	-1,11	0	TIPLSGTNSVIGR	76
438,82	3	1313,43	1314,49	-1,05	0	TIPLSGTNSVIGR	26
Sequência Primária		1 VKAVAVMTGT NGRK <u>GTVSFS VEGSGPTTVK</u> GSLSGLPPGD HALIIHTYGN					
(126 aminoácidos)		51 ISNDWISTGP PFKPAGADGF LENITVTSEG IATFEIYKTI <u>PLSGTNSVIG</u>					
		101 <u>RGLVVHSSPS</u> PDPGDGVAVG TIGLSY					
Cobertura da sequência		(29 / 126) * 100 = 23%					

Tabela 29. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 74 e 75, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 74 e 75		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pl: 6,4	MM (kDa): ≈ 44				
MASCOT – Score: 121 – Cut-Off: 48							
Nome da proteína		Cisteíno proteinase similar a Catepsina B					
Código de acesso (NCBI)		AAR25800					
pl / MM (teóricos)		7,12 / 39936 Da					
Organismo		Solanum tuberosum (potato)					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1051,96	2	2101,91	2102,26	-0,35	0	NGPVEVSFTVYEDFAHYK	76
701,80	3	2102,39	2102,26	0,14	0	NGPVEVSFTVYEDFAHYK	35
Sequência Primária (354 aminoácidos)		1 MYLTKSLIT PLLLGAFIL ILQVAAEKPI SEAKLESAIL QDSIVKRVNE					
		51 NAEAGWKAFF NPQLSNFTVS QFKRLLGVKP AREGDLEGIP VLTHPRLKEL					
		101 PKEFDARKAW PQCSTIGKIL DQGHCGSCWA FGAVESLSDR FCIHYNLSIS					
		151 LSVNDLLACC SFLCGSGCDG GYPAAWRYF KRSGVTEEC DPYFDTTGCS					
		201 HPGCEPLYPT PKCHRCVKVG NVLWRKSKHY GVNAYRVSHD PQSIMAEVYK					
		251 NGPVEVSFTV YEDFAHYKSG VYKHVTGGNM GGHAVKLIGW GTSEQGEDYW					
		301 LIVNSWNRGW GEDGYFKIRR GTNECGIEHS VVAGLPASRN LNVELGDAVL					
		351 DASM					
Cobertura da sequência		(18 / 354) * 100 = 5%					

Tabela 30. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 76, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 76		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6		MM (kDa): 45			
MASCOT – Score: 290 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Proteína hipotética					
Código de acesso (NCBI)		CAB09799					
pI / MM (teóricos)		5,46 / 32757 Da					
Organismo		Citrus x paradisi					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
516,15	2	1030,29	1030,18	0,10	0	GGTTHIAFVK	58
733,21	2	1464,40	1465,61	-1,20	0	DPDGYIFELIQR	74
857,68	2	1713,35	1714,83	-1,47	0	GNAYAQVAISTDDVYK	77
773,10	2	1544,18	1543,72	0,46	0	SAEVVNLVTQELGGK	81
Sequência Primária (291 aminoácidos)		1 MAEASPAAN AELLEWPKKD KRRFLHAVYR VGDLDRTIKF YTECFGMKLL					
		51 RKRDVPEEKY SNAFLGFGPE QSHFVVELTY NYGVTSYDIG TGFGHFAIAT					
		101 EDVYKLVENI RAKGGNVTRE PGPLKGGTTH IAFVKDPDGY IFELIQRGPT					
		151 PEPLCQVMLR VGDLGRSIFK YEKALGMKLL RTVDKPEYKY TLAMLYAEE					
		201 DQTTVLELTY NYGVTEYTKG <u>NAYAQVAIST DDVYKSAEVV NLVTQELGGK</u>					
		251 ITRQPGSIPG LNTKITSFVD PDGWKTVLVD NEDFLKEIQS E					
Cobertura da sequência		(53 / 291) * 100 = 18%					

Tabela 31. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 78, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 78		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 7,2		MM (kDa): 65			
MASCOT – Score: 219 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Catalase					
Código de acesso (NCBI)		AAL83720					
pI / MM (teóricos)		6,71 / 57265 Da					
Organismo		Vitis vinifera					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
756,40	2	1510,78	1511,72	-0,94	0	GPVLLEDYHLVEK	100
568,82	2	1135,63	1136,34	-0,71	0	APGVQTPVIVR	68
755,38	2	1508,75	1509,75	-1,00	0	FPDVIHAFKPNPK	51
Sequência Primária (492 aminoácidos)		1 MDPYKYRPSS AYNSPYFTTN AGAPVYNDS SLTVGSR <u>GPV LLEDYHLVEK</u>					
		51 LANFQRERIP ERVVHARGAS AKGFFEVTHTD VSDLTCADFL <u>RAPGVQTPVI</u>					
		101 <u>VRFSTVIHER</u> GSPETIRDPR GFAVKFYTRE GNFDVMGNNF PVFFIRDAMK					
		151 <u>FPDVIHAFKP NPK</u> SHIQEYW RVVDFLSYHP ESLSTFAFLF DDVGIPQDYR					
		201 HMEGFGVHTF TLLNKAGKAN YVKFHWKPTC GVKCLEDEA IRVGGTNHSH					
		251 ATQDLYDSIK AGNYPEWKLF IQTMDPEHED KDFDPLDVT KTWPEDILPL					
		301 QPVGRLVLNK NIDNFFAENE MLAFNPALVV PGIYYTNDKM LQGRIFAYSD					
		351 TQRHRLGPNY LQLPVNAPKC AFHNNHHDGS MNFMHRDEEV DYFPSRFDPV					
		401 RHAETFIPIPS TICHGKREKV VIEKENNFKQ PGERYRSFAP DRQERFINRW					
		451 VETLSDPRVT YEIRSIWISY WSQADRSLGQ KLASRLNVKP KY					
Cobertura da sequência		(37 / 492) * 100 = 8%					

Tabela 32. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 80, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 80		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pl: 6,2	MM (kDa): ≈ 70				
MASCOT – Score: 359 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI		Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)					
Nome da proteína		Óxido reductase málica					
Código de acesso (NCBI)		ABE81243					
pI / MM (teóricos)		5,98 / 65678 Da					
Organismo		Medicago truncatula					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
658,78	2	1315,55	1315,47	0,08	0	SIQVIVTDGER	73
900,96	2	1799,91	1801,14	-1,22	0	ILGLDGLGCQGM(Ox)GIPVGK	57
800,41	2	1598,80	1599,80	-1,00	0	VHDDM(Ox)LLAASEALAK	101
636,38	2	1270,75	1270,48	-0,27	1	KISANIAANVAAK	51
572,35	2	1142,68	1142,31	0,38	0	ISANIAANVAAK	77
Sequência Primária (591 aminoácidos)		1 MESTLKSFRD GESVLDLSPR SAVGGGVEDV YGEDCATEDQ LVTPWTFSSA					
		51 SGYSLLRDPQ YNKGLAFTEK ERDAHYLRGL LPPTVSSQQL QEKKLMHNIR					
		101 QYEVPLQKYV AMMDLQERNE RLFYKLLIDN VEELLPIVYT PVVGEACQKY					
		151 GSIYKRPQGL YISLKEKGKI LEVLKNWPER SIQVIVTDG ERILGLDGLG					
		201 CQGMGIPVGK LALYSALGGV RPSACLPVTI DVGTTNNEKLL NDEFYIGLRQ					
		251 KRATGKEYYD LLHEFMTAVK QNYGEKVLVQ FEDFANHNAF ELLAKYGTTH					
		301 LVFNDDIQGT AAVVLGVVA SLKLIGGTLP EHTFLFLGAG EAGTGIAELI					
		351 ALEMSKQTKA PIEESRKIIW LVDSKGLIVS SRANSLQHFK KPWAHEHEPV					
		401 STLLDAVKII KPTVLIGSSG VGKTFTKEVV EAMTEINKIP LILALSNPTS					
		451 QSECTAEAY TWSEGRAIFA SGSPFDPVEY KGKTYSGQS NNAYIFPGFG					
		501 LGIVMSGAIR VHDDMLLAAS EALAKQVTEE NYKKGLTYPP FSDIRKISAN					
		551 IAAANVAAKAY ELGLATHLPR PENLVKYAES CMYSPLYRNY R					
Cobertura da sequência		(59 / 591) * 100 = 10%					

Tabela 33. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 81, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 81		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,2		MM (kDa): ≈ 70			
MASCOT – Score: 381 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		F1 ATPase - sub-unidade alfa					
Código de acesso (NCBI)		BAA32243					
pI / MM (teóricos)		6,01 / 55328 Da					
Organismo		Beta vulgaris					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
486,80	2	971,58	972,10	-0,52	0	VVSVGDGIAR	59
522,27	2	1042,53	1043,17	-0,64	0	TGSIVDVPAGK	80
870,36	2	1738,70	1739,00	-0,30	0	QILVIYAAVNGFCDR	85
1002,91	2	2003,80	2005,21	-1,40	0	ATSESETLYCVYVAVGQK	78
669,55	3	2005,64	2005,21	0,43	0	ATSESETLYCVYVAVGQK	69
1079,48	2	2156,95	2157,40	-0,45	0	VYGLNEIQAGEM(Ox)VEFASGVK	105
1154,52	2	2307,03	2308,50	-1,47	0	EVAFAQFGSDLDAATQALLNR	101
1187,09	2	2372,16	2373,66	-1,49	0	GIALNLENENVGIVVFGSDTAIK	59
Sequência Primária (506 aminoácidos)		1 MEFSPPRAAEL TNLLESRTN FYTNFQVDEI GRVVSVGDGI ARVYGLNEIQ					
		51 AGEMVEFASG VKGIALNLEN ENVGIVVFGS DTAIKEGDLV KRTGSIVDVP					
		101 AGKAMLGRVV DALGVPIDGR GALSDHERRR VEVKAPGII E RKSVEHEPMQT					
		151 GLKAVDSLVP IGRGQRELII GDRQTGKTAI AIDTILNQKQ LNSKATSESE					
		201 TLYCVYVAVG QKRSTVAQLV QILSEANALE YSILVAATAS DPAPLQFLAP					
		251 YSGCAMGEYF RDNGMHALII YDDLKQAVA YRQMSLLRR PPGREAFPGD					
		301 VFYLHSRLLE RAAKRSQDTG AGSLTALPVI ETQAGDVSAY IPTNVISITD					
		351 GQICLETETF YRGIRPAINV GLSVSRVGS AQLKAMKQVC GSKLELAQY					
		401 REVAFAQFG SDLDAATQAL LNRGARLTV LKQPQYAPLP IEKQILVIYA					
		451 AVNGFCDRMP LDKISQYERT ILNSVKPELL QSLKGGLTNE KKMELDSFLK					
		501 ECALNY					
Cobertura da sequência		(119 / 506) * 100 = 24%					

Tabela 34. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente aos spots 83, 90, 91, 92, 93 e 94, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spots:		Resultados experimentais (gel 2D)					
83, 90, 91, 92, 93 e 94		pI: 6,5 – 8,8			MM (kDa): ≈ 20		
MASCOT – Score: 423 – Cut-Off: 39							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Proteína putative similar a miraculina 2					
Código de acesso (NCBI)		ABL67650					
pI / MM (teóricos)		8,18 / 23210 Da					
Organismo		Citrus cv. Shiranuhi					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
981,00	2	1959,98	1959,92	0,06	0	NELCPLDVVQLSSDSER	61
744,34	2	1486,66	1486,76	0,10	0	TSIINEDVDLNVR	45
550,32	2	1098,62	1098,57	0,05	0	DYYLVSAIR	55
619,34	2	1236,67	1236,72	-0,05	0	ALAVVLVPGNER	57
Sequência Primária (213 aminoácidos)		1 MSTPFVTAIS FLLTFATKP LVGLADPLVD VNGNKVEASR <u>DYYLVSAIRG</u> AGGGGLTLFR					
		61 GRNELCPLDV VQLSSDSERG TRLRFSMSDK <u>TSIINEDVDL</u> NVRFSTETRC NEPTVWRVDS					
		121 YDPSRGKWFI TTGGVEGNPG AQLTKNWFKF ERIGRDRATY KIVHCPSVCE SCVSLCNDVG					
		181 VSNDHARRLA LTNGRALAVV LVPGNERSAS CAS					
Cobertura da sequência		(51 / 213) * 100 = 24%					

Tabela 35. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 84, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 84		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,7		MM (kDa): ≈ 22			
MASCOT – Score: 196 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Lipocalin induzida por temperatura					
Código de acesso (NCBI)		ABB02403					
pI / MM (teóricos)		6,33 / 21574 Da					
Organismo		[Citrus sinensis]					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
525,68	3	1574,01	1575,68	-1,67	0	ATYTLNEDGTVHVR	56
788,58	2	1575,15	1575,68	-0,53	0	ATYTLNEDGTVHVR	81
611,74	3	1832,19	1832,00	0,20	0	EPHM(Ox)DEAIYNQLVEK	53
917,43	2	1832,85	1832,00	0,86	0	EPHM(Ox)DEAIYNQLVEK	54
529,28	2	1056,55	1056,08	0,47	0	ATSEGYDVSK	68
986,38	2	1970,75	1969,97	0,79	0	TPQSDNPPEAEESPQDTK	82
657,95	3	1970,82	1969,97	0,86	0	TPQSDNPPEAEESPQDTK	63
1 MASKKEMEVV RGLDIKRYMG RWYEIASFPS RNQPKNGADT R <u>ATYTLNEDG</u>							
Sequência Primária		51 <u>TVHVR</u> NETWS DGKRGSI EGT AYKADPKSDE AKLKVKFYVP PFFPIIPVVG					
(186 aminoácidos)		101 NYWVLYIDDN YQYALIGEPT RKYWLWLCR <u>E</u> PHMDEAIYNQ LVEKATSEGY					
		151 <u>DVSKLHRT</u> PQ SDNPPEAEES PQDTKGIWWI KSIFGK					
Cobertura da sequência		(57 / 186) * 100 = 31%					

Tabela 36. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 85, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Resultados experimentais (gel 2D)							
Nº spot: 85							
		pI: 6,3		MM (kDa): ≈ 25			
MASCOT – Score: 168 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>			
Nome da proteína		SOD					
Código de acesso (NCBI)		ABA82133					
pI / MM (teóricos)		6,03 / 15586 Da					
Organismo		Citrus maxima					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
630,97	2	1259,92	1260,44	-0,52	0	AVEQLFQALNK	51
730,01	2	1458,01	1458,66	-0,64	0	VDTSTVVQLQGAIK	72
543,46	3	1627,35	1627,83	-0,48	0	LVVETTANQDPLVTK	74
814,96	2	1627,91	1627,83	0,08	0	LVVETTANQDPLVTK	62
Sequência Primária		1 KHHQTYVTNY NK <u>AVEQLFQA</u> LNKVDTSTVV <u>QLQGAIK</u> FNG GGHVNHSIFW					
(142 aminoácidos)		51 KNLAPVHEGG GEPPHSSLGW AIDTHFGSLE ALIQKMSAEG AALQSGSGVWW					
		101 LGLDTEFKRL <u>VVETTANQDP</u> <u>LVTK</u> APTLPV LLGIDVWEHA YY					
Cobertura da sequência		(40 / 142) * 100 = 28%					

Tabela 37. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 86, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 86		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: ≈ 5		MM (kDa): ≈ 30			
MASCOT – Score: 82 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)			
Nome da proteína		Quitinase ácida classe II					
Código de acesso (NCBI)		BAC20285					
pI / MM (teóricos)		5,17 / 32885 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
588,92	2	1175,82	1177,37	-1,55	0	IGFFTTFCGK	52
758,30	2	1514,58	1514,62	-0,04	0	AFPAFGNSGNETM(Ox)R	63
Sequência Primária (293 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV CGERDTGHGT DGGELGKIIS					
		51 REMFEDLLPY RNDVRCARG FYTYDAFIEA AKAFPAFGNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGDE TTGGWPDAPG GEYAWGYCYI RQVSRPASDY CYRYCPCPLP					
		151 GQYYGRGPIQ LTWNCNYLRC GEALGVDLLN NPDLLATDPV LSFKSAIWFV					
		201 MTAQPPKPSC HEVIDEWKP SAIEVNAGRL PGYGLTTNII NGGIECGQGG					
		251 NDAVRNRIGF FTTECGKFGI QPGDNLDCYN QRPYGLNLMA QSM					
Cobertura da sequência		(24 / 293) * 100 = 8%					
MASCOT – Score: 63 – Cut-Off: 48							
Nome da proteína		Quitinase ácida classe I					
Código de acesso (NCBI)		BAC20284					
pI / MM (teóricos)		4,70 / 35207 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeo identificado							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
758,30	2	1514,58	1514,62	-0,04	0	AFPAFGNSGNETM(Ox)R	63
Sequência Primária (310 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG LAQNCGSGVV CPGGECCSQY GWCGLTTDHC					
		51 CEGCQSNCDQ VVCGECPDD GTAGDGGELG KIISREMFDD LLEYRNDKRC					
		101 PARCFYTYDD FIEAAKAFPA FGNSGNETMR KREIAAFFAQ TGHETTGGWP					
		151 DAPGGEYAWG YCFKREVSPD SDYCDPNYPC RGKYYGRGPI QLTWNYNYLL					
		201 CGEGLGRGED LLNPDLLIT NDKEGRVLSF KSAIWFWMTA QPPKPSCHEV					
		251 IIDEWKPSVN DVNAGRPLGY GLTTNIINGG IECGQGGNDA VRNRIGFFTT					
		301 LLWQVWDSAW					
Cobertura da sequência		(14 / 310) * 100 = 5%					
MASCOT – Score: 52 – Cut-Off: 48							
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pI / MM (teóricos)		5,06 / 32480 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeo identificado							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
588,92	2	1175,82	1177,37	-1,55	0	IGFFTTFCGK	52
Sequência Primária (292 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRDTGHGT HGGELGKIIS					
		51 REMFDDLLPY RNDVRCARG FYTYDAFIEA AQAFFPGFNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPSPSYC DPNYPCRGKY					
		151 YGRGPIQLSW NNYLRCGEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFSKSAIWFWM					
		201 TAQPPKPSC HEVIDEWKP ANDVNAGRLP GYGLTTNIIN GGIECGQGGN					
		251 AAVRNRIQFF TTECGKFGIQ PGDSLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM					
Cobertura da sequência		(10 / 292) * 100 = 3%					

Tabela 38. Descrição da proteína identificada (Mascot) referente ao spot 87, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 87		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pl: ≈ 5	MM (kDa): ≈ 30				
MASCOT – Score: 212 – Cut-Off: 48							
Banco de dados: NCBI		Taxonomia: Viridiplantae (Green Plants)					
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pl / MM (teóricos)		5,06 / 32480 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
812,93	2	1623,85	1623,81	0,04	0	GPIQLSWNYNYLR	66
542,31	3	1623,89	1623,81	0,09	0	GPIQLSWNYNYLR	45
1436,92	2	2871,82	2872,21	-0,38	0	CGEGLGLGEELLNPNDLLATDPVLSFK	65
589,80	2	1177,58	1177,37	0,21	0	IGFFTTCGCK	43
Sequência Primária (292 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRTDGHGT HGGELGKIIS					
		51 REMFDDLEY RNDERCPARG FYTYDAFIEA AQAFPGFGNS GNETMRKREI					
		101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPPSDYC DPNYPCRGKY					
		151 YGRGPIQLSW NYNYLRCGEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFKSAIWFWM					
		201 TAQPPKPSCH EVIIDEWKPS ANDVNAGRLP GYGLTTNIIN GGIECGQGGN					
		251 AAVRNRIFFE TFCGKFGIQ PGDSLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM					
Cobertura da sequência		(50 / 293) * 100 = 17%					
MASCOT – Score: 66 – Cut-Off: 48							
Nome da proteína		Quitinase ácida classe I					
Código de acesso (NCBI)		BAC20284					
pl / MM (teóricos)		4,70 / 35207 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeo identificado							
m/z observada	z	MM (experimental)	MM calculada	Erro (Da)	clivagem perdidas	Sequência	Score
1079,43	2	2156,85	2155,28	1,57	1	REVSPSDYCDPNYPCR**	66
Sequência Primária (310 aminoácidos)		1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG LAQNCGSGVV CPGGECCSQY GWCGLTTDHC					
		51 CEGCQSNCDQ VVCGECPDD GTAGDGGELG KIISREMFDD LLEYRNDKRC					
		101 PARCFYTYDD FIEAAKAFPA FGNSGNETMR KREIAAFFAQ TGHETTGGWP					
		151 DAPGGEYAWG YCFKREVSP SDYCDPNYPC RGKYYGRGPI QLTWNYNYLL					
		201 CGEGLGRGED LLNPDLLIT NDKEGRVLSF KSAIWFWMTA QPPKPSCHEV					
		251 IIDEWKPSVN DVNAGRLPGY GLTTNIINGG IECGQGGNDA VRNRIGFFTT					
		301 LLWQVWDSAW					
Cobertura da sequência		(17 / 310) * 100 = 5%					

Sustentado não somente nos altos *scores* obtidos para cada peptídeo identificado, mas também na coerência entre os valores de pI e MM obtidos experimentalmente com os dados teóricos, 19 proteínas foram

identificadas por similaridade. Em alguns casos, os valores de pI e MM referentes as proteínas consideradas identificadas apresentaram alguma variação em relação aos valores experimentalmente obtidos. Tal diferença pode ser justificada pelo simples fato de que a proteína presente no spot trata-se de um espécie similar à proteína identificada. Ou seja, apesar de compartilharem trechos da sequência de aminoácidos exatamente iguais, estas não se tratam exatamente das mesma proteínas. Tal justificativa serve para explicar porque proteínas pertencentes a outros organismos foram identificadas em amostras de citros. Novamente, deve ser enfatizado que a não identificação de diversos spots se deve ao fato de que o genoma dos citros não está completamente sequenciado.

Dentre as 19 proteínas identificadas, apenas duas delas (spot 86, quitinase e spot 87, quitinase ácida classe II) foram identificadas por meio de um único peptídeo. Entretanto, considerando os altos scores obtidos para tais peptídeos, a concordância dos valores de pI e MM teóricos com os valores experimentalmente obtidos bem como o fato dessa proteína serem isoformas e terem sido inequivocamente identificadas em outros spots, a identificação foi considerada positiva. Em relação a porcentagem de cobertura das sequências de aminoácidos, valores entre 3 (no caso drástico da identificação de apenas um peptídeo) e 42% (spot 71, no qual 6 peptídeos foram identificados) foram verificados. Em diversas proteínas (spots 66, 70, 72, 74, 81, 84, 85, 87) o mesmo peptídeo com diferentes estados de carga (+2 e +3) foi verificado. Esse trata-se de outro forte indicativo da veracidade da identificação.

Entretanto, o dado obtido de maior relevância para o presente trabalho foi a confirmação da identidade das proteínas presentes nas regiões dos géis diferentemente expressas em plantas sadias e doentes, previamente identificadas por MALDI-TOF-TOF. Assim, além da proteína putativa similar a miraculina 2, quitinase e quitinase ácida classe II, as quais já haviam sido identificadas, e foram novamente identificadas aqui, outro isoforma foi identificada, trata-se da quitinase ácida classe I.

A fim de avaliar a performance de outro software de busca de proteínas em bancos de dados, o mesmo conjunto de dados obtidos por LC-ESI-MS/MS analisado com o Mascot foi submetido a busca com o Sequest.

4.3.2.2 Spots analisados por LC-ESI-MS/MS – busca em banco de dados usando o Sequest

As tabelas 39 a 52 apresentam as identificações obtidas usando o Sequest. Dos 32 spots (64 a 95) em estudo, 22 foram positivamente identificados. Dentre os 22 spots, a identidade de 15 proteínas foi determinada.

Tabela 39. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 64, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 64		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9				MM (kDa): ≈ 30	
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Pom30					
Código de acesso (NCBI)		CAA63968					
pI / MM (teóricos)		8,85 / 29302 Da					
Organismo		Solanum tuberosum]					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH* (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
9,43	2	903,19	331,2	0	SAAVGEITR	3,31	0,10
21,62	2	974,25	287,7	0	GPGLFADIGK	2,84	0,21
Sequência Primária		1 MSKGPGLFADIGKKARDLLTKDYISDQKLSISTYSDTGVALTSTAVKKGG LSTGDVGAQY					
(276 aminoácidos)		61 KYKNTLIDVKKVDTASNISTTLTLNDIAPSTKTIASLKFPDYSSGKLEVQYYHHHAAFSTA					
		121 VGLKQSPIVDLSVTLGTPTF AIGAEASYETAEGKLAKYTAGISVTKPDSCAAIILGDKGD					
		181 TIKASYIHHLDELKKSAAVGEITRRFSTNETFTVGGSYAVDNLTIVKLKLNNHGNLGAL					
		241 LQHELIPKSLLTISSEFDTKALEKTPKFGVALALKP					
Cobertura da sequência		(19 / 276) * 100 = 7%					

Tabela 40. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 65, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 65		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 30			
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Fator de alongação alfa 1					
Código de acesso (NCBI)		AAL79774					
pI / MM (teóricos)		9,14 / 49739 Da					
Organismo		Saccharum hybrid cultivar CP65-357					
Peptídeo identificado							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
15,77	2	1451,00	436,3	0	YYCTVIDAPGHR	2,76	0,18
Sequência Primária (447 aminoácidos)		1 MGKEKTHINI VVIGHVDSGK STTTGHLIYK LGGIDKRVIE RFEKEAAEMN					
		51 KRSFKYAWVL DKLKAERERG ITIDIALWKF ETTKYCTVI DAPGHRDFIK					
		101 NMITGTSQAD CAVLIIDFTT GGFEAGIFKD GQTREHALLA FTLGVKQMIC					
		151 CCNKMDATTP KYSKARYDEI VKEVSSYLKK VGYNPDKIHF VPISGFEGDN					
		201 MIERSTNLDW YKGPTLLEAL DLINEPKRPS DKPLRLPLQD VYKIGGIGTV					
		251 PVGRVETGVI KPGMVVTFGP SGLTTEVKSVE EMHHEALQEA LPGDNVGFNV					
		301 KNAVVDLKR GYVASNSKDD PAKEAASFTS QVIIMNHPGQ IGNGYAPVLD					
		351 CHTSHIAVKF AELVTKIDRR SGKELEKEPK FLKNGDAGMV KMPVTKPMVV					
		401 ETFSEYPPLG RFAVRDMRQT VAVGVKSVE KKDPTGAKVT KAAAKKK					
Cobertura da sequência		(12 / 447) * 100 = 3%					

Tabela 41. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente aos spots 66 e 82, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spots: 66 e 82		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 9		MM (kDa): ≈ 50			
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase					
Código de acesso (NCBI)		CAA42905					
pI / MM (teóricos)		7,09 / 36959 Da					
Organismo		Magnolia quinquepeta					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
29,33	2	1498,79	38,4	0	VPTVDVSVDLTVR	4,65	0,36
30,81	3	1499,87	-679,5	0	VPTVDVSVDLTVR	3,66	0,10
32,17	3	1664,55	-958,2	1	TLLFGEKPVTVFGVR	4,07	0,13
17,26	2	942,66	-65,4	1	KVIISAPSK	2,92	0,11
Sequência Primária							
(341 aminoácidos)							
1 MGGKKIKIGI NGFGRIGRLV ARVALQRDDV ELVAVNDPFI TTDYMTYMFK YDSVHGQWKH							
61 HELKVKDSKT LLFGEKPVTV FGVRNPEEIP WGETGAEFVV ESTGVFTDKD KAAHLKGGA							
121 K KVIISAPSK DAPMFVVGVN EHEYKSNIDI VSNASCTTNC LAPLAKVIND KFGIVEGLMT							
181 TVHSITATQK TVDGPSSKDW RGGRAAGFNI IPSSTGAAGA VGKVLPALNG KLTGMAFRVP							
241 TVDVSVDLT VRLEKAASYE EIKAVIKAES EGKLGILGY TEEDVVSTDF IGDNRSSIFD							
301 AKAGIALNEH FVKLVSWYDN EWGYSSRVID LILIVHMASC Q							
Cobertura da sequência		(24 / 341) * 100 = 7%					

Tabela 42. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 69, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 69		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pl: 9				MM (kDa): ≈ 40	
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Pectinesterase					
Código de acesso (NCBI)		AAB57670					
pI / MM (teóricos)		9,03 / 63997 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
12,88	2	1312,91	-143,1	0	TVAAAVAAAPQGGTK	3,28	0,39
14,19	2	1067,27	249,7	0	NVVDGSTTFK	2,30	0,20
Sequência Primária (584 aminoácidos)		1 MTHIKEFFTK LSESSSNQNI SNIPKKKKKL FLALFATLLV VAAVIGIVAG					
		51 VNSRKNSGDN GNEPHHAILK SSCSSTRYPD LCFSIAIAVP EASKKVTSQK					
		101 DVIEMSLNIT TTAVEHNYFG IQKLLKRTNL TKREKVALHD CLETIDETLD					
		151 ELHKAVEDLE EYPNKKLSLQ HADDLKTLMs AAMTNQGTCL DGFSHDDANK					
		201 HVRDALSDGQ VHVEKMCSNA LAMIKNMTDT DMMIMRTSNN RKLTEETSTV					
		251 DGWPAWLSPG DRRLQSSSV TPNVVAADG SGNFKTVAAA VAAAPQGGTK					
		301 RYIIRIKAGV YRENVEVTKK HKNIMFIGDG RTRTIITGSR NVVDGSTTFK					
		351 SATVAVVGEG FLARDITFQN TAGPSKHQAV ALRVGADLSA FYNCDMLAYQ					
		401 DTLYVHSNRQ FFFVNCLIAGT VDFIFGNAAA VLQNCDIHAR KPNSGQKNMV					
		451 TAQGRDPNQ NTGIVIQKSR IGATSDLKPV QGSFPTYLGR PWKEYSRTVI					
		501 MQSSITDLIH PAGWHEWDGN FALNTLFYGE HQNSGAGAGT SGRVKWKGF					
		551 VITSATEAQA FTPGSFIAGS SWLGSTGFPP SLGL					
Cobertura da sequência			(25 / 584) * 100 = 4%				

Tabela 43. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 70, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 70		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,2		MM (kDa): ≈ 20			
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Malato desidrogenase					
Código de acesso (NCBI)		AAO15575					
pI / MM (teóricos)		6,01 / 35525 Da					
Organismo		Lupinus albus					
Peptídeos identificados							
Retention time	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
16,05	2	1505,18	-269,5	1	KLDLTAEELSEEK	4,92	0,32
28,14	2	1346,39	258,9	0	MELVDAAFPLLK	4,60	0,22
21,86	3	1650,59	-357,2	0	VLVVANPANTNALILK	4,14	0,39
16,71	2	1376,28	289,8	0	LDLTAEELSEEK	4,36	0,27
25,09	2	1362,48	186,1	0	M(Ox)ELVDAAFPLLK	4,26	0,25
Sequência Primária							
(332 aminoácidos)							
1 MARDPVRVLV TGAAGQIGYA LVPMIARGVM LGADQPVLH LLDIPPAES LNGVKMELVD							
61 AAFPLLKGVV ATDDAVEACT GVNI AVLGG FPRKEGMERK DVMSKNVSIY KSQASALEKY							
121 AAANCKVLVV ANPANTNALI LKEFAPSIPE KNISCLTRLD HNRALGQISE KLNTQVSNVK							
181 NVIIWGNHSS TQYPDVNHAT VTTPAGEKPV RELVCDDAWL NSEFISTVQQ RGAAIKARK							
241 LSSALSAASA ACDHIRDWVL GTPEGTWVSM GVYSDGSYNV PAGLIYSFPV TTQNGEWKIV							
301 QGLAIDEFSR KLDLTAEEL SEEKALAYSC LS							
Cobertura da sequência		(41 / 332) * 100 = 12%					

Tabela 44. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 71, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 71		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 8				MM (kDa): ≈ 15	
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Hemoglobina não simbiótica classe 1					
Código de acesso (NCBI)		AAK07675					
pI / MM (teóricos)		9,15 / 20650 Da					
Organismo		Citrus unshiu					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
21,49	2	1394,63	20,6	0	YGVAD EH FEVTK	4,41	0,45
25,16	3	2304,34	-66,0	1	LKPHATTVFVM(Ox)TCESAVQLR	4,49	0,32
27,08	2	1634,76	35,0	0	NAWAEAYDQLAAAIK	3,36	0,24
Sequência Primária							
(183 aminoácidos)		1 MRDGS L KGLF CTAPKSIRSV RRNSGSFNVT AFTEE Q EALV VKSWNAMKKN					
		51 SGELALKFFL RIFEIAPSAK KLFTFLKDSD IPVEQNPKL K PHATTVFVMT					
		101 <u>CESAVQLRKA</u> GKVTVRESNL KDLGATHFKY <u>GVADEHFEVT</u> KYALLEPIKE					
		151 PVPEMWSP E L <u>KNAWAEAYDQ</u> LAAAIK I EMK PPS					
Cobertura da sequência		(47 / 183) * 100 = 26%					

Tabela 45. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente aos spots 72 e 88, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spots: 72, 88		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,2			MM (kDa): ≈ 13		
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Cu/Zn superóxido dismutase					
Código de acesso (NCBI)		CAA03881					
pI / MM (teóricos)		5,82 / 12777 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH* (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
22,22	2	1680,79	53,7	1	KGTVSFSVEGSGPTTVK	4,68	0,33
39,42	2	2643,28	14,7	0	PAGADGFLENITVTSEGIATFEIYK	6,26	0,44
26,48	2	1553,17	-569,1	0	GTVSFSVEGSGPTTVK	4,88	0,40
Sequência Primária		1 VKAVAVMTGT NGR <u>KGTVSFS VEGSGPTTVK</u> GSLSGLPPGD HALIIHTYGN ISNDWISTGP					
(126 aminoácidos)		61 PFK <u>PAGADGF LENITVTSEG IATFEIYK</u> TI PLSGTNSVIG RGLVVHSSPS PDPGDGVAWG					
		121 TIGLSY					
Cobertura da sequência		(42 / 126) * 100 = 33%					

Tabela 46. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 78, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 78		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 7,2			MM (kDa): ≈ 65		
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Catalase					
Código de acesso (NCBI)		AAL83720					
pI / MM (teóricos)		6,71 / 57265 Da					
Organismo		Vitis vinifera					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH* (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
27,70	2	1511,79	13,5	0	GPVLLDYHLVEK	4,96	0,36
21,64	2	1136,64	33,9	0	APGVQTPVIVR	3,06	0,11
27,11	2	1509,76	40,6	1	FPDVIHAFKPNPK	3,01	0,19
27,89	2	1073,41	156,3	0	FPDVIHAFK	2,57	0,13
Sequência Primária (492 aminoácidos)		1 MDPYKYRPSS AYNSPYFTTN AGAPVYNND S LTVGSRGPV LLEDYHLVEK					
		51 LANFQRERIP ERVVHARGAS AKGFFEVT HD VDLTCADFL R <u>APGVQTPVI</u>					
		101 <u>VRFSTVIHER</u> GSPETIRDPR GFAVKFYTRE GNFD MVGNF PVFFIRDAMK					
		151 <u>FPDVIHAFKP</u> <u>NPKSHIQEYW</u> RVVD FLSYHP ESLSTFAFLF DDVGIPQDYR					
		201 HMEGFGVHTF TLLNKAGKAN YVKFHWKPTC GVKCLLEDEA IRVGGTNHSH					
		251 ATQDLYDSIK AGNYPEWKLF IQTMDPEHED KDFDPLDVT KTWPEDILPL					
		301 QPVGRLVLNK NIDNFFAENE MLAFNPALVV PGIYYTNDKM LQGRIFAYSD					
		351 TQRHRLGP NY LQLPVNAPKC AFHNNHHDGS MNFMHRDEEV DYFPSRFDPV					
		401 RHAETFPIPS TICHGKREKV VIEKENNFKQ PGERYRSFAP DRQERFINRW					
		451 VETLSDPRVT YEIRSIWISY WSQADRSLGQ KLASRLNVKP KY					
Cobertura da sequência			(37 / 492) * 100 = 8%				

Tabela 47. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 80, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 80		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,2		MM (kDa): ≈ 70			
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Enzima málica 3 dependente de NADP					
Código de acesso (NCBI)		AAT02535					
pI / MM (teóricos)		6,53 / 63650 Da					
Organismo		Hydrilla verticillata					
Peptídeos identificados							
Retention time	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
31,38	2	1147,74	-49,3	0	LALYTALGGIR	3,98	0,28
21,68	2	1143,69	-906,1	0	ISANIAANVAAK	3,84	0,30
Sequência Primária (575 aminoácidos)		1 MEGNSNACGG VRDPYGEDCA TEEQLVTPWT FSVASGYTLL RDPRHNKGLA FTEKERDAHY					
		61 LRGLLPVCI TQERQEKIM HNLRYQVPL QRYMAMMDLQ ERNQRLFYKL LIDNVEELLP					
		121 VVYTPVGEA CQKYGCIYRR PQGLYISLKE KGKILEVLKN WPEKNIQVIV VTDGERILGL					
		181 GDLGTQGMGI PVGKLALYTA LGGIRPSSCL PITIDVGTNN ETLLNEEFYI GLRQKRATGK					
		241 EYADLLHEFM ISVKQNYGER VLVQFEDFAN HNAFELLSKY SKTHLVFNDD IQGTASVVLV					
		301 GVVAALKLVG GALAEHTFLF LGAGEAGTGI AELIALEISK QIKAPVEETR KKIWLVD SKG					
		361 LIVSSRKESL QHFKKPWAHE HEPKHLVDA VKTIKPTVLV GSSGVGRAFT KEVIEAMASF					
		421 NEKPIILALS NPTSQSECTA EEAYTWTQGR AIFASGSPFD PVEYEGKTFV PGQANNAYIF					
		481 PGFGLGLIIA GAIRVHDDML IAASEALANQ VSEENFEKGL IYPPFSNIRK ISANIAANVA					
		541 AKAYELGLAS HLP RPANLVK YAESCMYSPV YRTYR					
Cobertura da sequência		(23 / 575) * 100 = 4%					

Tabela 48. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 83, 90, 91, 92, 93 e 94, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spots:		Resultados experimentais (gel 2D)					
83, 90, 91, 92, 93 e 94		pI: 6,5 – 8,8				MM (kDa): ≈ 20	
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Proteína putative similar a miraculina 2					
Código de acesso (NCBI)		ABL67650					
pI / MM (teóricos)		8,18 / 23210 Da					
Organismo		Citrus cv. Shiranuhi					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH* (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
36,80	3	2088,13	-966,3	1	DYYLVSAIRGAGGGGLTLFR	5,39	0,36
59,77	2	1875,03	495,7	0	WFITGGVEGNPGAQTLK	5,30	0,32
29,80	2	2173,93	55,4	0	GRNELCPLDVVQLSSDSER	5,98	0,38
30,37	2	1960,99	-31,5	0	NELCPLDVVQLSSDSER	5,53	0,30
54,77	2	1487,67	67,2	0	TSIINEDVDLNV	3,97	0,30
25,52	2	1006,19	-637,8	0	GAGGGGLTLFR	3,95	0,22
34,38	2	1099,63	-47,0	0	DYYLVSAIR	3,27	0,19
48,28	2	1237,68	37,4	0	ALAVVLVPGNER	3,52	0,14
1 MSTPFVTAIS FLLLT FATKP LVGLADPLVD VNGNKVEASR <u>DYYLVSAIRG AGGGGLTLFR</u>							
Sequência Primária		61 <u>GRNELCPLDV VQLSSDSERG</u> TRLRFMSDK <u>TSIINEDVDL NV</u> RFSTETRC NEPTVWRVDS					
(213 aminoácidos)		121 YDPSRGKWF I TTGGVEGNPG <u>AQTLKNW</u> FKF ERIGRDRATY KIVHCPSVCE SCVSLCNDVG					
		181 VSNDHARRLA LTNGRA <u>LVV LVP</u> GNERSAS CAS					
Cobertura da sequência		(82 / 213) * 100 = 38%					

Tabela 49. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 84, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 84		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 6,7	MM (kDa): ≈ 22				
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Lipocalin induzida por temperatura					
Código de acesso (NCBI)		ABB02403					
pI / MM (teóricos)		6,33 / 21504 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
26,23	2	1814,79	588,3	0	EPHMDEAIYNQLVEK	4,59	0,23
15,32	3	1971,83	-997,5	0	TPQSDNPPEAEESPQDTK	5,02	0,14
20,17	2	1576,16	-243,4	0	ATYTLNEDGTVHVR	3,71	0,23
Sequência Primária (186 aminoácidos)		1 MASKKEMEVV RGLDIKRYMG RWYEFASFPS RNQPKNGADT <u>RATYTLNEDG</u> TVHVRNETWS					
		61 DGKRGSI EGT AYKADPKSDE AKLKVKFYVP PFFPIIPVVG NYWVLYIDDN YQYALIGEPT					
		121 RKYLWILCRE <u>PHMDEAIYNQ LVEK</u> ATSEGY DVSKLHRTPO SDNPPEAEES PQDTKGIWWI					
		181 KSIFGK					
Cobertura da sequência		(47 / 186) * 100 = 25%					

Tabela 50. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 85, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 85		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pl: 6,3	MM (kDa): ≈ 25				
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		SOD					
Código de acesso (NCBI)		ABA82133					
pl / MM (teóricos)		6,03 / 15577 Da					
Organismo		Citrus maxima					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
24,12	2	1628,36	-288,9	0	LVVETTANQDPLVTK	5,14	0,25
29,49	2	1260,78	-75,5	0	AVEQLFQALNK	3,40	0,16
Sequência Primária		1 KHHQTYVTNY NK <u>AVEQLFQA LNK</u> VDTSTVV QLQGAIKFNG GGHVNHISIFW KNLAPVHEGG					
(142 aminoácidos)		61 GEPPHSSLGW AIDTHFGSLE ALIQKMSAEG AALQGSGWVW LGLDTEFKRL <u>VVETTANQDP</u>					
		121 <u>LVT</u> KAPTLVP LLGIDVWEHA YY					
Cobertura da sequência		(26 / 142) * 100 = 18%					

Tabela 51. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 86, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 86		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 5				MM (kDa): ≈ 30	
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Quitinase ácida classe II					
Código de acesso (NCBI)		BAC20285					
pI / MM (teóricos)		5,17 / 32864 Da					
Organismo		Citrus jambhiri					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
30,24	2	1515,53	-567,3	0	AFPAFGNSGNETM(Ox)R	3,19	0,19
36,95	2	1178,01	-372,3	0	IGFFTTCGK	2,90	0,10
38,65	2	1329,89	532,3	0	EMFDDLLEYR	2,72	0,20
1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV CGERDTGHGT DGELGKIIS							
51 REMFEDLLPY RNDVRCARG FYTYDAFIEA AKAFPAFGNS GNETMRKREI							
Sequência Primária		101 AAFFAQTGDE TTGGWPDAPG GEYAWGYCYI RQVSRPASDY CYRYCPCPLP					
(293 aminoácidos)		151 GQYYGRGPIQ LTWNCNYLRC GEALGVDLLN NPDLLATDPV LSFKSAIWFV					
201 MTAQPPKPSC HEVIIDEWKP SAIEVNAGRL PGYGLTTNII NGGIECGQGG							
251 NDAVRNRIGF FTFCKGFGI QPGDNLDCYN QRPYGLNLMA QSM							
Cobertura da sequência		(35 / 293) * 100 = 12%					
Sequest							
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pI / MM (teóricos)		5,06 / 32480 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
16,74	2	1000,47	10,6	0	PSANDVNAGR	3,64	0,31
36,95	2	1178,01	-372,3	0	IGFFTTCGK	2,90	0,10
38,65	2	1329,89	532,3	0	EMFDDLLEYR	2,72	0,20
1 MRLIGSLIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRDTGHGT HGELGKIIS							
51 REMFDDLLPY RNDVRCARG FYTYDAFIEA AQAFPGFGNS GNETMRKREI							
Sequência Primária		101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPPSDYC DPNYPCRGKY					
(292 aminoácidos)		151 YGRGPIQLSW NYNYLRCGEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFKSAIWFWM					
201 TAQPPKPSCH EVIIDEWKPS ANDVNAGRLP GYGLTTNII NGGIECGQGGN							
251 AAVRNRIGF FTFCKGFGI QPGDNLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM							
Cobertura da sequência		(30 / 292) * 100 = 10%					

Tabela 52. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 87, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 87		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 5		MM (kDa): ≈ 30			
Sequest							
Banco de dados: NCBI							
Nome da proteína		Quitinase					
Código de acesso (NCBI)		CAA93847					
pI / MM (teóricos)		5,06 / 32480 Da					
Organismo		Citrus sinensis					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
38,70	2	1623,79	23,2	0	GPIQLSWNYNYLR	3,42	0,32
39,22	3	1624,90	-660,4	0	GPIQLSWNYNYLR	3,77	0,12
19,23	2	1000,27	210,4	0	PSANDVNAGR	2,95	0,20
Sequência Primária (292 aminoácidos)		1 MRLIGSLLIIF SLVLSFVLGG SAQNCGSGVV YGGRDTGHGT HGGELGKIIS 51 REMFDDLLEY RNDERCPARG FYTYDAFIEA AQAFPGFGNS GNETMRKREI 101 AAFFAQTGHE TTGGWPDAPG GEYAWGYCFI SEVSPPSDYC DPNYPCRGKY 151 YGR <u>GPIQLSW</u> <u>NYNYLR</u> CGEG LGLGEELLNN PDLLATDPVL SFKSAIWFWM 201 TAQPPKPSCH EVIIDEWK <u>PS</u> <u>ANDVNAGR</u> LP GYGLTTNIIN GGIECGQGGN 251 AAVRNRIFFF TFCGKFGIQ PGDSLDCYNQ RPYGLNLMAQ SM					
Cobertura da sequência		(23 / 292) * 100 = 8%					

Tabela 53. Descrição da proteína identificada (Sequest) referente ao spot 95, submetido à análise por LC-ESI-MS/MS.

Nº spot: 95		Resultados experimentais (gel 2D)					
		pI: 4				MM (kDa): ≈ 20	
Sequest							
Banco de dados: NCBI				Taxonomia: <i>Viridiplantae (Green Plants)</i>			
Nome da proteína		Actina					
Código de acesso (NCBI)		ABK55729					
pI / MM (teóricos)		4,90 / 19918 Da					
Organismo		Cucumis sativus					
Peptídeos identificados							
Tempo de retenção	z	MH ⁺ (experimental)	Erro (ppm)	clivagem perdidas	Sequência	X _{corr}	ΔC _n
30,10	2	1855,93	1,3	0	LAYVALDYEQELETAK	5,89	0,24
32,80	2	2200,06	-447,5	0	DLYGNIVLSGGSTM(Ox)FPGIADR	5,50	0,10
19,72	2	1192,51	17,0	0	GYMFTTTAER	3,48	0,33
Sequência Primária							
1 ASGRTTGIVL DSGDGVSHTV PIYEGYALPH AILRLDLAGR DLTDALMKIL TERGYMFTTT							
61 AEREIVRDMK VKLAYVALDY EQELETAKSS SSIEKNYELP DGQVITIGAE RFRCPVELFQ							
(182 aminoácidos)							
121 PSLIGMEAAG IHETTYNSIM KCDVDIRKDL YGNIVLSGGGS TMFPGIADRM SKEITALAPS							
181 SM							
Cobertura da sequência (47 / 182) * 100 = 26%							

Tendo em vista os valores de X_{corr} e ΔC_n obtidos, em todos os casos bastante superiores aos valores mínimos estabelecidos para a uma identificação confiável,^(71,72) 15 proteínas foram identificadas por similaridade. Além do X_{corr} e ΔC_n , outros parâmetros tais como pI e MM experimentalmente obtidos foram empregados para embasar com maior autoridade as identificações. Com exceção da proteína identificada no spot 65 (Fator de alongação alfa 1), todas as outras identificações foram

sustentadas pela identificação de mais de um peptídeo. Nos casos mais satisfatórios (spots 83, 90, 91, 92, 93 e 94), oito peptídeos foram identificados, rendendo uma cobertura de 38% da sequência de aminoácidos. Tal como nos resultados obtidos usando o Mascot, deve-se enfatizar que a identificação de proteínas pertencentes a organismos que não citros é justificada pela existência de proteínas de outros organismos que possuem trechos de sequência de aminoácidos conservados (similares). Assim, uma vez que o genoma dos citros não está completamente sequenciado, as informações disponíveis referentes a outras plantas são de extrema importância.

As proteínas identificadas referentes aos spots 66, 82 e 87 são exemplos de situações nas quais o mesmo peptídeo com diferentes estados de carga (+2 e +3) foram verificados. Conforme já apontado anteriormente essa verificação trata-se de uma forte evidência da veracidade da identificação. No caso do spot 70, um mesmo peptídeo (MELVDAAFPLLK) foi identificado como apresentado e com uma oxidação da metionina (M(Ox)ELVDAAFPLLK). Mais uma vez, tal como já havia ocorrido com os dados obtidos por MALDI-TOF-TOF (analisados usando o Mascot) e LC-ESI-MS/MS (submetidos a busca em banco de dados com o Mascot), foram confirmadas as identidades das proteínas constituintes das regiões diferentemente expressas em plantas sadias e doentes. Aqui, foram identificadas a proteína putativa similar a miraculina 2, quitinase e quitinase ácida classe II. A outra isoforma da quitinase, quitinase ácida classe I, não foi identificada nesse caso.

4.3.3 Comparação dos resultados obtidos por MALDI-TOF-TOF E LC-ESI-MS/MS

Outro dado importante que pôde ser verificado nesse trabalho é a concordância dos resultados obtidos por meio da análise dos spots por MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS. Considerando o fato de que alguns spots pertencentes à regiões coincidentes dos géis foram recortados para serem analisados pelas duas diferentes estratégias, a análise dos resultados permite, além da confirmação inequívoca dos resultados, a comparação das duas plataformas. A Tabela 54 apresenta os resultados obtidos para os spots coincidentes submetidos à análise por MALDI-TOF-TOF (usando o Mascot) e LC-ESI-MS/MS (usando ambos, Mascot e Sequest) e que foram identificados.

Tabela 54. Spots com valores de pI em MM coincidentes recortados de diferentes géis e submetidos a análise por MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS.

spots coincidentes		Proteína identificada
MALDI-TOF-TOF	LC-ESI-MS/MS	
6, 7, 8, 53, 54, 55	83, 90, 91, 92, 93 e 94	Proteína putativa similar a miraculina 2
24	76	Hypothetical protein
25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 56, 57, 58, 59 e 60	87	Isoformas de quitinases
36	85	SOD
61, 62 e 63	86	Isoformas de quitinases

Os spots 24–76 e 36–85 referem-se exatamente aos mesmos spots, recortados em diferentes géis e submetidos à análise pelos duas técnicas aplicadas nesse trabalho. Assim, sem surpresas, exatamente as mesmas identificações foram obtidas. No caso dos spots identificados como proteína putativa similar a miraculina 2, conforme já discutido, todos os spots referentes a região do gel como pI entre 6,1 e 9,6 e MM em torno de 20 kDa foram identificados como sendo a mesma proteína. A explicação para esse fato é sustentada na ocorrência de inúmeras modificações pós-traducionais na proteína putativa similar a miraculina 2 de modo que múltiplos spots são verificados. Os spots identificados como quitinase, quitinase ácida classe I e quitinase ácida classe II, ou seja, isoformas de quitinases correspondem a uma das regiões diferentemente expressas em plantas sadias e infectadas pela MSC. Assim, considerando que a resolução das separações obtidas para essa região não foi satisfatória, é perfeitamente aceitável que mais de uma proteína tenha sido identificada por spot. Além disso, tem-se claramente uma situação na qual proteínas com inúmeras modificações pós-traducionais estão presentes uma vez que diversos spots apresentaram a mesma identidade.

No que diz respeito a cobertura das sequências de aminoácidos obtidas por cada uma das duas metodologias, para os spots analisados os valores apresentaram-se bastante semelhantes.

4.3.4 Avaliação comparativa da performance do Mascot e do Sequest para a identificação de proteínas submetidas à análise por LC-ESI-MS/MS

A utilização de dois softwares de busca em bancos de dados aplicados ao mesmo conjunto de dados permitiu que uma comparação entre estes fosse realizada a fim de verificar suas performances. A Tabela 55 apresenta um resumo comparativo das proteínas identificadas fazendo uso do Mascot e do Sequest aplicados aos dados obtidos por LC-ESI-MS/MS (spots 64 a 95).

Tabela 55. Comparação dos resultados obtidos para os spots analisados por LC-ESI-MS/MS usando o Mascot e o Sequest.

spot	Resultado - Proteína identificada	
	Mascot / código NCBI	Sequest / código NCBI
64	---	Pom30 / CAA63968
65	Fator de alongação alfa 1 / AAL79774	Fator de alongação alfa 1 / AAL79774
66	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicolítico / CAA42103	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase / CAA42905
67	Peroxidase aniônica / CAA74203	---
68	NAD(P)H óxidorredutase, homóloga a isoflavona redutase / CAA63056	---
69	Pectinesterase / AAB57670	Pectinesterase / AAB57670
70	Malato desidrogenase / ABB16910	Malato desidrogenase / ABB16910
71	Hemoglobina não simbiótica classe 1 / AAK07675	Hemoglobina não simbiótica classe 1 / AAK07675
72	Cu/Zn superóxido dismutase / CAA03881	Cu/Zn superóxido dismutase / CAA03881
73	---	---
74	Cisteíno proteinase similar a Catepsina B / AAR25800	---
75	Cisteíno proteinase similar a Catepsina B / AAR25800	---
76	Proteína hipotética / CAB09799	---
77	---	---
78	Catalase / AAL83720	Catalase / AAL83720
79	---	---
80	Óxidorredutase málica / ABE81243	Enzima málica 3 dependente de NADP / AAT02535
81	F1 ATPase – sub-unidade alfa / BAA32243	---
82	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase glicolítico / CAA42103	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase / CAA42905
83	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
84	Lipocalin induzida por temperatura / ABB02403	Lipocalin induzida por temperatura / ABB02403
85	SOD / ABA82133	SOD / ABA82133
86	Quitinase ácida classe II / BAC20285 Quitinase ácida classe I / BAC20284 Quitinase / CAA93847	Quitinase ácida classe II / BAC20285 Quitinase / CAA93847
87	Quitinase / CAA93847 Quitinase ácida classe I / BAC20284	Quitinase / CAA93847
88	Cu/Zn superóxido dismutase / CAA03881	Cu/Zn superóxido dismutase / CAA03881
89	---	---
90	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
91	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
92	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
93	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
94	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650	Proteína putativa similar a miraculina 2 / ABL67650
95	---	Actina / ABK55729

Dentre os 32 spots analisados, os Mascot identificou 26, sendo 19 proteínas diferentes. Por outro lado, o Sequest identificou as proteínas constituintes de 22 spots sendo 15 proteínas diferentes. Os softwares forneceram resultados exatamente idênticos para 9 proteínas (15 spots no total, sendo os seguintes: 65, 69, 70, 71, 72, 78, 83, 84, 85, 88, 90, 91, 92, 93 e 94). No caso dos spots 66/82 e 80, os softwares identificaram proteínas isoformas. Para os spots 86 e 87, os quais na verdade não podem sequer serem classificados como spots devido a falta de resolução na separação, foram identificados tanto pelo Mascot como pelo Sequest como uma mistura de proteínas. No caso do spot 86, o Mascot identificou peptídeos constituinte de três isoformas de quitinases enquanto o Sequest de apenas duas. O spot 87, foi identificado pelo Mascot como sendo uma mistura de duas isoformas de quitinases sendo que o Sequest identificou apenas peptídeos de uma das isoformas. Entretanto, devido a falta de resolução destes é possível afirmar que todos os spots referentes a essa região do gel são constituídos por uma mistura de isoformas de quitinases bem como quitinases com diferentes modificações pós-traducionais.

Por fim, fazendo uso das técnicas de MALDI-TOF-TOF (busca no banco de dados do NCBI usando o Mascot) e LC-ESI-MS/MS (busca no banco de dados do NCBI usando tanto o Mascot quanto o Sequest), 23 diferentes proteínas foram identificadas por similaridade.

4.4 Interpretação do significado biológico relacionado a supressão de quitinases e proteína putativa similar a miraculina 2 em amostras de plantas doentes

Árvores cítricas são plantas perenes e portanto enfrentam e tem que se proteger do ataque de patógenos e insetos durante toda sua existência (tipicamente entre 20 e 25 anos). Assim, a expressão constitutiva, ou seja, expressão contínua, de proteínas inseridas em mecanismos de defesa é uma maneira de proteger a planta destes ataques. Dessa maneira, algumas proteínas conhecidas como proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas) são constitutivamente expressas.⁽¹⁰⁰⁾

Quitinases de plantas são PR-proteínas (pertencentes às famílias 3, 4, 8 e 11 de PR-proteínas)⁽¹⁰⁴⁾ notoriamente conhecidas como marcadores de resistência à doenças e resistência sistêmica adquirida.⁽¹⁰⁵⁾ Embora essas proteínas estejam envolvidas na defesa de plantas, elas não são necessariamente identificadas por sua ação antipatogênica, mas sim por seu acúmulo em plantas submetidas à situação de patogênese.⁽¹⁰⁶⁾

A principal função atribuída às quitinases é a de clivar a quitina (β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose), constituinte principal da parede celular de fungos.⁽¹⁰⁷⁾ Algumas quitinases possuem ainda a capacidade de hidrolisar as ligações β -(1-4) entre o ácido N-acetilmurâmico e resíduos de N-acetil-D-glucosamina em peptídeoglicanos, atuando assim como lisozima.⁽¹⁰⁸⁾ Por fim, outras quitinases apresentam ainda atividade quitosanase uma vez que são capazes de clivar quitosana (N-acetil-D-glucose-2-amina).^(109,110) Além disso, quitinases fazem parte de um complexo sistema de defesa em

plantas. No entanto, o papel das quitinases não está restrito única e exclusivamente para evitar o crescimento do patógeno uma vez que elas são proteínas constituintes de diversos tecidos sadios tais como em flores.⁽¹⁰⁴⁾ Existem também suposições que indicam que nem todas as proteínas classificadas como quitinases apresentem atividade quitinase ou quitinolítica, possuindo sim uma outra função principal. Apesar dessas suposições, ainda não existem estudos suficientemente bem estabelecidos no sentido de que alguma afirmação acerca de todas as atividades das quitinases sejam feitas.⁽¹⁰⁴⁾

PR-proteínas podem frequentemente serem expressas como isoformas.⁽¹⁰⁰⁾ Oito isoformas de quitinases ácidas⁽¹⁰⁹⁾ e sete básicas⁽¹¹⁰⁾ foram purificadas de culturas de células de laranja valência. As sete isoformas básicas de quitinases tratam-se de proteínas com valores de pI entre 10,3 e 10,4. Apesar de alguns de nossos experimentos terem sido realizados com fitas IPG 6-11, definitivamente proteínas com valores de pI superiores a 10 não foram o foco desse trabalho, o qual contemplou proteínas com pI entre 3 e 10. Por outro lado, os dados apresentados para as oito quitinases ácidas (valores de pI entre 4,5 e 5,4 e MM entre 26 e 37,4 kDa)⁽¹⁰⁹⁾ estão plenamente de acordo com os resultados por nós obtidos, onde 13 isoformas de quitinases com valores de pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa foram identificadas. Além disso, tal como nós, Osswald *et al.*⁽¹⁰⁹⁾ também sugerem a ocorrência de modificações pós-traducionais nas quitinases.

PR-proteínas de diversas classes, especialmente as quitinases, foram identificadas por meio da técnica de MS em amostras de tomate infectadas com TMV⁽¹¹¹⁾ e em folhas de arroz infectadas com *Magnaporthe grisea*.⁽⁸⁵⁾ Em toranja (*Grapefruit flavedo*), tanto quitinases quanto β -1,3-glucanases estão presentes nas formas ácidas e básicas.⁽¹¹²⁾ Nessa espécie, a incidência de radiação UV bem como a falta de irrigação (seca) induziu a expressão de quitinases enquanto os níveis de β -1,3-glucanases mantiveram-se inalterados.⁽¹¹³⁾ Em *Prunus armeniaca*, um vírus classificado como Plum pox virus (PPV) provoca a supressão da expressão de uma quitinase putativa classe III em plantas infectadas que possuem genótipo parcialmente resistente e mantém a expressão inalterada em plantas com genótipo tolerante.⁽¹¹⁴⁾

Assim, apresentados esses exemplos, após uma minuciosa busca na literatura nós não encontramos sequer um trabalho descrevendo a supressão de quitinases em níveis proteicos em uma interação planta patógeno em amostras de casca do caule de plantas cítricas. Dessa maneira, considerando que as isoformas ácidas e básicas de quitinases foram purificadas a partir de culturas de células, dentro do nosso conhecimento, nós apresentamos pela primeira vez a ocorrência de isoformas ácidas de quitinases em amostras de casca do caule de laranja valência (copa) e limão cravo (porta-enxerto).

Considerando que as quitinases são proteínas marcadoras de resistência de defesa em plantas, seria esperado que a expressão dessas fosse maior em plantas doentes em comparação com plantas saudáveis. No

entanto, os resultados obtidos indicam uma tendência inversa, ou seja, em plantas doentes a expressão de quitinases é fortemente reduzida. Tal informação pode indicar que de alguma maneira o patógeno está debilitando a planta de modo a induzir a supressão dessa classe de proteínas mesmo em condições nas quais normalmente a expressão seria induzida. Além disso, com a conclusão indicando um comportamento contrário ao esperado, a corrente da ciência que atribui às quitinases outras atividades além da função de clivar quitina ganha muita força. Assim, ainda no sentido de sustentar a existência de outras funções para as quitinases, uma pergunta emerge: Se a função das quitinases é apenas clivar quitina, porque existem tantas isoformas ou porque proteínas com tantas modificações pós-traducionais são verificadas?

Antes de finalizar, foi apresentado um resultado bastante preliminar, que indicou que as quitinases identificadas em amostras de casca do caule do porta-enxerto limão cravo não apresentam atividade quitinases apesar de terem sido inequivocamente identificadas como tais. Tal resultado foi obtido por meio da realização de géis bidimensionais em meio não desnaturante sendo as proteínas separadas transferidas para uma membrana de nitrocelulose através da técnica de Western blot. Uma vez devidamente transferidas para a membrana, as proteínas foram reveladas usando um anticorpo específico para quitinases sendo que o resultado não indicou a presença de proteínas com atividade quitinase. Novamente, esses resultados foram obtidos de maneira preliminar e sem a realização de novos experimentos fica impraticável concluir algo com grande certeza. Mas, de

qualquer maneira, essa é mais uma evidência que pode ser usada para sustentar a existência de outras e inclusive importantes funções para as quitinases.

5. CONCLUSÕES

As amostras de plantas cítricas referentes ao porta-enxerto (limão cravo e limão volkameriano) e copa (laranja valência) com o mesmo ano de plantio (1995) foram coletadas e devidamente processadas usando um moinho criogênico. O uso desse moinho, ao invés do tradicional pistilo e almofariz, proporcionou a obtenção de amostras mais uniformemente moídas bem como reduziu o tempo para o preparo destas.

O primeiro desafio relacionado ao desenvolvimento desse trabalho foi avaliar uma série de metodologias de extração de proteínas presentes na casca do caule de plantas cítricas. Em busca de um método capaz de extrair uniformemente a maior quantidade de proteínas possível, nove metodologias foram avaliadas, seguindo os respectivos protocolos e adequando algumas etapas às condições experimentais disponíveis. Empregando a mesma amostra para todas as metodologias testadas, os extratos proteicos obtidos para cada método foram submetidos à análise por eletroforese bidimensional, sendo o resultado final comparado por meio da análise dos géis bidimensionais obtidos. O método escolhido (IX) apresentou um rendimento de aproximadamente 3% no tocante a quantidade total de proteínas extraídas. Além disso, proporcionou uma extração bastante uniforme, ou seja, contemplando proteínas ácidas, básicas, de baixas e altas MM.

Fazendo uso do protocolo de extração escolhido, e após ajustar as condições eletroforéticas para o sistema em estudo, iniciou-se a análise comparativa de amostras da casca do caule de plantas cítricas doentes,

sadias e controles. Essas análises foram realizadas empregando-se fitas IPG com diferentes tamanhos (13 e 24 cm) e gradientes de pH (3-10 L, 3-10 NL, 4-7 L e 6-11L), contemplando amostras de limão cravo, limão volkameriano (porta-enxerto) e laranja valência (copa). De uma maneira geral, os resultados obtidos indicaram que ocorre uma sensível redução dos níveis de expressão de dois conjuntos de proteínas em amostras de plantas doentes. Um desses conjuntos apresenta valores de pI entre 4,5 e 5,2 e MM em torno de 30 kDa enquanto o outro possui valores de pI entre 6,1 e 9,6 e MM de aproximadamente 20 kDa. Tal verificação é mais nítida nas amostras de porta-enxerto (limão cravo e limão volkameriano) que nas amostras de copa (laranja valência). Comparando apenas as duas variedades de porta-enxertos estudadas, pode-se inferir que as diferenças mais marcantes ocorrem no limão cravo. As amostras usadas como controle para o porta-enxerto limão cravo bem como para a copa laranja valência apresentaram, de uma maneira geral, um perfil de proteínas bastante semelhante ao verificado em amostras sadias, conforme esperado.

Por meio de análises específicas nas regiões diferentemente expressas dos géis de plantas sadias e doentes, pôde-se concluir que o conjunto de proteínas diferentemente expressas constituinte da região ácida dos géis (pI entre 4,5 e 5,2 e MM $\approx$ 30kDa) é composto por 13 proteínas. Por outro lado, o outro conjunto de proteínas diferentemente expressas, pI entre 6,1 e 9,6 e MM $\approx$ 20kDa, é constituído por 9 proteínas. Além disso, foi ainda possível determinar semi-quantitativamente as diferenças dos níveis de expressão de cada um dos spots referentes à essas regiões. Para alguns

spots, a intensidade verificada em plantas doentes é aproximadamente 4 vezes menor em comparação às plantas saudas.

Ainda, fazendo uso da análise comparativa entre géis bidimensionais, foi possível avaliar o perfil proteico de uma planta assintomática. O resultado obtido mostrou que o padrão de proteínas expressas segue o padrão obtido para amostras saudas. Tal resultado indica que às variações no conteúdo proteico das plantas doentes não ocorre anteriormente ao surgimento dos sintomas visuais. Por fim, avaliou-se a evolução de uma planta doente por meio da análise do extrato proteico obtido para tal num determinado tempo e seis meses depois. Os resultados obtidos não mostraram diferenças substanciais para tais amostras dentro do período estudado.

Uma vez separadas, diversos spots constituintes e não das regiões diferentemente expressas foram recortados e submetidos a um procedimento de digestão triptica. Empregando dois arranjos experimentais (MALDI-TOF-TOF e LC-ESI-MS/MS) usando espectrometria de massas, os peptídeos oriundos da digestão triptica de cada spot foram analisados. Fazendo uso de dois softwares (Mascot e Sequest) de busca de proteínas em bancos de dados, os dados espectrais obtidos proporcionaram a identificação por similaridade de 23 proteínas. Algumas dessas proteínas foram identificadas por ambas as técnicas. Os resultados obtidos para um determinado conjunto de spots, submetidos à análise por LC-ESI-MS/MS, foram usados para comparar a performance do Mascot e do Sequest.

Ambos os softwares forneceram resultados bastante semelhantes, ou seja, identificaram praticamente as mesmas proteínas.

Por fim, o resultado mais expressivo desse trabalho foi a determinação da identidade das proteínas diferentemente expressas em plantas saudas e doentes. O conjunto de proteínas com valor de *pI* entre 4,5 e 5,2 e *MM* $\approx$ 30 kDa foram identificadas como sendo quitinase, quitinase ácida classe I e quitinase ácida classe II, ou seja, isoformas de quitinases. Além disso, os inúmeros spots verificados (13 no total) devem-se às inúmeras e diferentes modificações pós-traducionais. O outro conjunto de proteínas diferentemente expressas em plantas saudas e infectadas pela MSC, com valores de *pI* entre 6,1 e 9,6 e *MM* $\approx$ 20 kDa, foram inequivocamente identificadas como sendo putative miraculi-like 2. Mais uma vez, o fato de 9 proteínas terem sido igualmente identificadas significa que inúmeras modificações pós-traducionais ocorreram.

As proteínas identificadas referentes a ambas às regiões sub-expressas em plantas doentes tratam-se de PR-proteínas, ou seja, são proteínas notoriamente conhecidas como marcadoras de resistência a doenças e a priori deveriam ser super expressas em plantas doentes. No entanto, o que se verificou foi uma drástica redução em suas expressões em plantas doentes o que indica que a MSC está de alguma maneira alterando o mecanismo de defesa da planta e assim debilitando-a.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; ROSSI, R. M.; MELO, P. A. O. Metodologias de análise de cadeias agroindustriais: Aplicação para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 468-473, 2004.
- (2) Associação Brasileira dos Exportadores de Citros (Abecitrus). Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br/menu_br.html>. Acesso em: 14 mar. 2007.
- (3) JESUS, W. C. Jr; YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B; FILHO, A. B. Morte súbita dos citros. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado - produção integrada de fruteiras tropicais: doenças e pragas**. Viçosa, Editora da Universidade de Viçosa, 2002. p.127-222.
- (4) GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. N. Doença de causa desconhecida afetapomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo mineiro. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 93-93, 2001.
- (5) Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). Morte súbita dos citros. Disponível em: <http://fundecitrus.com.br/doencas/morte_subita.html>. Acesso em: 14 mar. 2007
- (6) BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTFELD, R. T.; BOVÉ, J. M. Spatial and Temporal Analyses of Citrus Sudden Death as a Tool to Generate Hypotheses Concerning Its Etiology. **Phytopathology**, v. 93, n. 4, p. 502-512, 2003.
- (7) ROMÁN, M. P.; CAMBRA, M.; MORENO, J. P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. A. O. Sudden Death of Citrus in Brazil: A Graft-Transmissible Bud Union Disease. **Plant Disease**, v. 88, n. 5, p. 453-467, 2004.
- (8) MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F.; ZACHARIAS, P. R. A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.; ASSUMPCAO, L. C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E. C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P. F.; GIRASOL, A.; JORDAO, H.; SILVA, V. H. A.; SOUZA, L. C. A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ZANCA, A. S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J. P.; REINACH, F. C.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. R. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae Family) Associated with citris sudden death disease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.

- (9) ATKINSON, A. J.; COLBURN, W. A.; DEGRUTTOLA, V. G.; DEMETS, D. L.; DOWNING, G. J.; HOTH, D. F.; OATES, J. A.; PECK, C. C.; SCHOOLEY, R. T.; SPILKER, B. A.; WOODCOCK, J.; ZEGER, S. L. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.
- (10) GILLETTE, M. A.; MANI, D. R.; CARR, S. A. Place of Pattern in Proteomic Biomarker Discovery. **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 4, p. 1143-1154, 2005.
- (11) HANCOCK, W.S. What is new in Proteomics? Biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 2, n. 5, p. 457, 2003.
- (12) VLAHOU, A.; FOUNTOULAKIS, A. Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. **Journal of Chromatography B**, v. 814, n. 1, p. 11-19, 2005.
- (13) TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-197, 2003.
- (14) AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207, 2003.
- (15) ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v.1, n.5, p.252-262, 2005.
- (16) THE NOBEL Prize in Chemistry 2002 – The Royal Swedish Academy of Sciences. Disponível em:
<<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/public.html>>. Acesso em: 14 mar. 2007.
- (17) MCLAFFERTY, F. W. Tandem mass spectrometry analysis of complex biological mixtures. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 212, n. 1-3, p. 81-81, 2001.
- (18) BOGDANOV, B.; SMITH, R. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and Bottom up. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 2, p. 168-200, 2005.
- (19) WILM, M.; NEUBAUER, G., MANN, M. Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 3, p. 527-533, 1996.

- (20) KELLEHER, N. L.; LIN, H. Y.; VALASKOVIC, G. A.; AASERUD, D. J. FRIDRIKSSON, E. K.; MCLAFFERTY, F. W. Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 4, p. 806-812, 1999.
- (21) BRECI, L. A.; TABB, D. L.; YATES, J. R.; WYSOCKI, V. H. Cleavage N-Terminal to Proline: Analysis of a Database of Peptide Tandem Mass Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 1963-1971, 2003.
- (22) WU, S. L.; KIM, J.; HANCOCK, H. S.; KARGER, B. Extended Range Proteomic Analysis (ERPA): A New and Sensitive LC-MS Platform for High Sequence Coverage of Complex Proteins with Extensive Post-translational Modifications. Comprehensive Analysis of Beta-Casein and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). **Journal of Proteome Research**, v. 4, n. 4, p. 1155-1170, 2005.
- (23) ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.
- (24) PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.
- (25) SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 952-965, 2003.
- (26) O' FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- (27) KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

- (28) 2-D ELECTROPHORESIS, principles and methods – GE Healthcare.
Disponível em:
<[http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/\\$file/80642960.pdf](http://www4.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/2A3643B6787885E0C12570BE000DC671/$file/80642960.pdf)>. Acesso em: 14 mar. 2007.
- (29) LEFKOVITS, I. Functional and structural proteomics: a critical appraisal. **Journal of Chromatography B**, v. 787, n. 1, p. 1-10, 2003.
- (30) RIGHETTI, P. G.; GIANAZZA, E.; GELFI, C.; CHIARI, M.; SINHA, P. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 1602-1612, 1989.
- (31) GÖRG, A.; BOGUTH, G.; OBERMAIER, C.; POSCH, A.; WEISS, W. 2-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (ipg-dalt) - the state-of-the-art and the controversy of vertical versus horizontal systems. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, p. 1079-1086, 1995.
- (32) GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.
- (33) HAMES, B. D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. 345p.
- (34) HJERTEN, S. Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 99, n. 3, p. 466, 1962.
- (35) LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- (36) SCHÄGGER, H.; VONJAGOW, G. Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

- (37) CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, n. 9, p.1327-1333, 2004.
- (38) TAL, M.; SILBERSTEIN, A.; NUSSER, E. Why does coomassie brilliant blue-r interact differently with different proteins - a partial answer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 18, p. 9976-9980, 1985.
- (39) MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.
- (40) UNLU, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, n. 11, p. 2071-2077, 1997.
- (41) MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 3, p. 669-678, 2005.
- (42) SOMIARI, R. I.; RUSSELL, S.; SOMIARI, S. B.; SULLIVAN, A. G.; ELLSWORTH, D. L.; BRZESKI, H.; SHRIVER, C. D. Difference gel electrophoresis in a high throughput research environment. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. New Jersey: Humana Press, 2005, p. 850.
- (43) TONGE, R.; SHAW, J.; MIDDLETON, B.; ROWLINSON, R.; RAYNER, S.; YOUNG, J.; POGNAN, F.; HAWKINS, E.; CURRIE, I.; DAVISON, M. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. **Proteomics**, v. 1, n. 3, p. 377-396, 2001.
- (44) ALBAN, A.; DAVID, S. O.; BJORKESTEN, L.; ANDERSSON, C.; SLOGE, E.; LEWIS, S.; CURRIE, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. **Proteomics**, v. 3, n. 1, p. 36-44, 2003.

(45) ZHOU, G.; LI, H.; DeCAMP, D.; CHEN, S.; SHU, H.; GONG, Y.; FLAIG, M.; GILLESPIE, J. W.; HU, N.; TAYLOR, P. R.; EMMERT-BUCK, M. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F.; ZHAO, Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 117-124, 2002.

(46) HAGER, J. W. Recent Trends in mass spectrometer development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 845-850, 2004.

(47) FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

(48) KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

(49) STEEN, H.; MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

(50) ARDREY, B. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. New York: John Wiley, 2003. 276p.

(51) ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 17, n. 5, p. 337-366, 1998.

(52) JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Review of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279-331, 1997.

(53) VESTAL, M. L.; JUHASZ, P.; MARTIN, S. A. Delayed extraction matrix-assisted time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 9, n. 11, p. 1044-1050, 1995.

(54) FLENSBURG, J.; HAID, D.; BLOMBERG, J.; BIELAWSKI, J.; IVANSSON, D. Applications and performance of a MALDI-ToF mass spectrometer with quadratic field reflectron technology. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, n. 3, p. 319-334, 2004.

(55) PAUL, W. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 29, n. 7, p. 739-748, 1990.

- (56) SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A Two-Dimensional Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, p. 659-669, 2002.
- (57) MARCH, R. E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, n. 4, p. 351-369, 1997.
- (58) BUSTILLOS, O. V.; SASSINE, A.; MARCH, R. **Espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo: Scortecci Editora, 2003. 162p.
- (59) LOURIS, J. N.; COOKS, R. G.; SYKA, J. E. P.; KELLEY, P. E.; STAFFORD, G. C.; TODD, J. F. J. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 1677-1685, 1987.
- (60) RITER, L. S.; GOODING, K. M.; HODGE, B. D.; JULIAN, R. K. Comparison of the Paul ion trap to the linear ion trap for use in global proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1735-1740, 2006.
- (61) BLACKLER, A. R.; KLAMMER, A. A.; MACCOSS, M. J.; WU, C. C. Quantitative Comparison of Proteomic Data Quality between a 2D and 3D Quadrupole Ion Trap. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 4, p. 1337-1344, 2006.
- (62) BELOV, M. E.; NIKOLAEV, E. N.; ANDERSON, G. A.; UDSETH, H. R.; CONRADS, T. P.; VEENSTRA, T. D.; MASSELON, C. D.; GORSHKOV, M. V.; SMITH, R. D. Design and Performance of an ESI Interface for Selective External Ion Accumulation Coupled to a Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 253-261, 2001.
- (63) HARDMAN, M.; MAKAROV, A. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1699-1705, 2003.
- (64) HU, Q. Z.; NOLL, R. J.; LI, H. Y.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 4, p. 430-443, 2005.
- (65) MAKAROV, A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1156-1162, 2000.

- (66) OLSEN, J. V.; GODOY, L. M. F.; LI, G.; MACEK, B.; MORTENSEN, P.; PESCH, R.; MAKAROV, A.; LANGE, O.; HORNING, S.; MANN, M. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010-2021, 2005.
- (67) RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 663-670, 2003.
- (68) ABIAN, J.; OOSTERKAMP, A. J.; GELPI, E. Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: Practical considerations. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 34, n. 4, p. 244-254, 1999.
- (69) CHAMRAD, D. C.; KORTING, G.; STUHLER, K.; MEYER, H.E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 619,628, 2004.
- (70) ELIAS, J. E.; HAAS, W.; FAHERTY, B. K.; GYGI, S. P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. **Nature Methods**, v. 2, n. 9, p. 667-675, 2005.
- (71) SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 2004.
- (72) WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2001.
- (73) PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

- (74) TABB, D. L.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A.; VYSOCKI, V. H.; LIN, D.; YATES, J. R. Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 1155-1163, 2003.
- (75) SYKA, J. E. P.; COON, J. J.; SCHROEDER, M. J.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9528-9533, 2004.
- (76) DONGRE, A. R.; JONES, J. L.; SOMOGYI, A.; WYSOCKI, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 35, p. 8365-8374, 1996.
- (77) MANN, M.; MENG, C. K.; FENN, J. B. Interpreting mass-spectra of multiply charged ions. **Analytical Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 1702-1708, 1989.
- (78) ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. **Biomedical Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 601-601, 1984.
- (79) O'HAIR, R. A. J. Special feature: Commentary - The role of nucleophile-electrophile interactions in the unimolecular and bimolecular gas-phase ion chemistry of peptides and related systems. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 12, p. 1377-1381, 2000.
- (80) WYSOCKI, V. H.; TSAPRAILIS, G.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A. Special feature: Commentary - Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 12, p. 1399-1406, 2000.
- (81) FALICK, A. M.; HINES, W. M.; MEDZIHRADSKY, K. F.; BALDWIN, M. A.; GIBSON, B. W. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass-spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 4, n. 11, p. 882-893, 1993.

- (82) ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J. B.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; MALDONADO, A. M.; JORRÍN, J. V. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5529-5548, 2006.
- (83) SALEKDEH, G. H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, v. 2, n. 9, p. 1131-1145, 2002.
- (84) RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N.; MCCALLUM, B.; BEIMCIK, E.; ENS, W. Analysis of the wheat and Puccinia tritricina (leaf rust) proteomes during a susceptible hostpathogen interaction. **Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 1897-1907, 2006.
- (85) KIM, S. T.; KIM, S. G.; HWANG, D. H.; KANG, S. Y.; KIM, H. J.; LEE, B. H.; LEE, J. J.; KANG, K. Y. Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, Magnaporthe grisea. **Proteomics**, v. 4, n. 11, p. 3569-3578, 2004.
- (86) GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 9, n. 11, p. 712-718, 1988.
- (87) FLENGSRUD, R.; KOBRO, G. A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 177, n. 1, p. 33-36, 1989.
- (88) MARSHALL, T.; WILLIAMS, K. M. Artifacts associated with 2-mercaptoethanol upon high resolution two-dimensional electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 502-505, 1984.
- (89) RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDÉL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, n. 3-4, p. 307-316, 1997.
- (90) RABILLOUD, T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 758-760, 1998.

- (91) DAMERVAL, C.; DEVIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.
- (92) BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- (93) SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.
- (94) WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2369-2375, 2003.
- (95) MECHIN, V.; CONSOLI, L.; GUILLOUX, M. L.; DAMERVAL, C. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, v. 3, n. 7, p. 1299-1302, 2003.
- (96) BLOM, N.; SICHERITZ-PONTEN, T.; GUPTA, R.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1633-1649, 2004.
- (97) HUNZINGER, C.; SCHRATTENHOLZ, A.; POZNANOVIC, S.; SCHWALL, G. P.; STEGMANN, W. Comparison of different separation technologies for proteome analyses: Isoform resolution as a prerequisite for the definition of protein biomarkers on the level of posttranslational modifications. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, n. 2, p. 170-181, 2006.
- (98) HAEBEL, S.; ALBRECHT, T.; SPARBIER, K.; WALDEN, P.; KORNER, R.; STEUP, M. Electrophoresis-related protein modification: Alkylation of carboxy residues revealed by mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 19, n. 5, p. 679-686, 1998.

- (99) STARK, G. R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. Inertness of aliphatic hydroxyl groups. Formation of carbamyl- and acylhydantoins. **Biochemistry**, v. 4, n. 11, p. 2363-2367, 1965.
- (100) FINK, W.; LIEFLAND, M.; MENDGEN, K. Chitinases and beta-1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena-sativa* L). **Plant Physiology**, v. 88, n. 2, p. 270-275, 1988.
- (101) MEDZIHRADSKY, K. F.; CAMPBELL, J. M.; BALDWIN, M. A.; FALICK, A. M.; JUHASZ, P.; VESTAL, M. L.; BURLINGAME, A. L. The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 3, p. 552-558, 2000.
- (102) YATES, J. R.; COCIORVA, D.; LIAO, L.; ZABROUSKOV, V. Performance of a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid for Peptide Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 493-500, 2006.
- (103) SCHLOSSER, A.; VOLKMER-ENGERT, R. Volatile polydimethylcyclsiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 3, p. 523-525, 2003.
- (104) KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases - Regulation and function. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 8, n. 3, p. 809-824, 2003.
- (105) STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANNMERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.
- (106) VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 9, p. 753-765, 1997.
- (107) SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, n. 6095, p. 365-367, 1986.

- (108) BERNASCONI, P.; LOCHER, R.; PILET, P. E.; JOLLES, J.; JOLLES, P. 1987. Purification and N-terminal amino-acid-sequence of a basic lysozyme from parthenocissus-quinquifolia cultured invitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 915, n. 2, p. 254-260, 1987.
- (109) OSSWALD, W. F.; SHAPIRO, J. P.; DOOSTDAR, H.; MACDONALD, R. E.; NIEDZ, R. P.; NAIRN, C. J.; HEARN, C. J.; MAYER, R. T. Identification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus-tissue. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 5, p. 811-820, 1994.
- (110) MAYER, R. T.; MCCOLLUM, T. G.; NIEDZ, R. P.; HEARN, C. J.; MCDONALD, R. E.; BERDIS, E.; DOOSTAR, H. Characterization of seven basic endochitinases isolated from cell cultures of Citrus sinensis (L.). **Planta**, v. 200, n. 3, p. 298-295, 1996.
- (111) CASADO-VELA, J.; SELLÉS, S.; MARTÍNEZ, R. B. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (Lycopersicon esculentum M.) fruits and detection of viral coat protein. **Proteomics**, v. 6, s. 1, p. S196-S206, 2006.
- (112) MCCOLLUM, T. G.; DOOSTDAR, H.; MAYER, R. T.; MCDONALD, R. E. Characterization of chitinases and beta-1,3-glucanases in grapefruit flavedo during fruit development. **Physiologia Plantarum**, v. 99, n. 3, p. 486-494, 1997.
- (113) PORAT, R.; LERS, A.; DORI, S.; COHEN, L.; WEISS, B.; DAUS, A.; WILSON, C. L.; DROBY, S. Induction of chitinase and beta-1,3-endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. **Phytoparasitica**, v. 27, n. 3, p. 233-238, 1999.
- (114) ESCALETES, V. S. L.; HULLOT, C.; WAWRZY'NCZAK, D.; MATHIEU, E.; EYQUARD, J. P.; LE GALL, O.; DECROOCQ, V. 2006. Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant stone fruit tree Prunus armeniaca cv. Goldrich. **Gene**, v. 374, p. 96-103, 2006.

MÉTODO PARA COLORAÇÃO COM COMASSIE BLUE COLOIDAL⁽³⁷⁾

- ➡ Transferir o gel para uma bandeja com uma solução fixadora (3 horas)
- ➡ Lavar com água deionizada [3×] (20 min cada lavagem)
- ➡ Transferir o gel para um recipiente com solução contendo pós-fixador (6 horas)
- ➡ Transferir para uma solução de Comassie Blue (24 horas)
- ➡ Transferir para uma bandeja com água para descoloração
- ➡ Escanear

Solução fixadora	<ul style="list-style-type: none"> - 40% metanol - 3% ácido fosfórico
Pós-fixador	<ul style="list-style-type: none"> - 4,42% ácido fosfórico - 10% sulfato de amônio - 20% metanol
Comassie Coloidal	<ul style="list-style-type: none"> - 10% ácido fosfórico - 10% sulfato de amônio - 0,12% Comassie Brilliant Blue G-250 - 20% metanol

MÉTODO PARA COLORAÇÃO COM PRATA⁽³⁹⁾

- ➡ Transferir o gel para uma bandeja com uma solução fixadora (8 horas)
- ➡ Transferir para uma solução incubadora (15 min)
- ➡ Lavar com água deionizada [3×] (10 min cada lavagem)
- ➡ Transferir o gel para a solução de prata (20 min)
- ➡ Lavar com água deionizada [3×] (10 min cada lavagem)
- ➡ Transferir para a solução reveladora (até o aparecimento das bandas)
- ➡ Transferir para a solução de parada (10 min)
- ➡ Lavar com água corrente
- ➡ Escanear

Solução fixadora	- 40% etanol - 10% ácido acético
Solução Incubadora	- 500 mmol L ⁻¹ acetato de sódio - 30% etanol - 16 mmol L ⁻¹ tiosulfato de sódio - 0,5% glutaraldeído
Solução de Prata	- 5 mmol L ⁻¹ nitrato de prata - 0,01% formaldeído
Solução Reveladora	- 235 mmol L ⁻¹ carbonato de sódio - 0,01% formaldeído
Solução de Parada	- 45 mmol L ⁻¹ EDTA