



**BRUNA CAROLINE MIRANDA MACIEL**

**PROTEÔMICA E METALÔMICA COMPARATIVAS EM FOLHAS DE  
*ARABIDOPSIS THALIANA* TRANSGÊNICA E NÃO TRANSGÊNICA**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**BRUNA CAROLINE MIRANDA MACIEL**

**PROTEÔMICA E METALÔMICA COMPARATIVAS EM FOLHAS DE  
*ARABIDOPSIS THALIANA* TRANSGÊNICA E NÃO TRANSGÊNICA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO AURÉLIO ZEZZI ARRUDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO  
DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA  
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR  
BRUNA CAROLINE MIRANDA MACIEL, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO  
ZEZZI ARRUDA.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

M119p Maciel, Bruna Caroline Miranda, 1988-  
Proteômica e metalômica comparativas em folhas de *Arabidopsis thaliana* transgênica e não transgênica / Bruna Caroline Miranda Maciel. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Transgenia. 2. Selênio. 3. Espécies de proteínas diferenciais. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Comparative proteomics and metallomics in transgenic and non transgenic *Arabidopsis thaliana* leaves

**Palavras-chave em inglês:**

Transgenesis

Selenium

Differential protein species

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestra em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Zezzi Arruda [Orientador]

Ljubica Tasic

Pedro de Magalhães Padilha

**Data de defesa:** 06-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



### **Dedicatória**

Ao SENHOR Altíssimo, à minha família e ao meu "tio", que sempre foram o alicerce das minhas crenças: muito provavelmente sem eles, as minhas realizações pessoais de ontem, hoje e amanhã seriam apenas meros sonhos.



**"Confia** no SENHOR de todo o teu coração, e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas. Não sejas sábio aos teus próprios olhos; tema ao SENHOR e aparta-te do mal. Isto será saúde para o teu âmagô, e medula para os teus ossos."

Provérbios de Salomão 3:5-8

**"Porque** nada há encoberto que não haja de ser manifesto; e nada se faz para ficar oculto, mas para ser descoberto."

Evangelho de Marcos 4:22



## AGRADECIMENTOS

Sou grata ao **SENHOR Altíssimo**, por Ele ter sido sempre bom e justo. Sua palavra é viva e eficaz!

Sou grata aos meus pais (**Paulo e Edna**), irmãos (**Érika, Paulo Sérgio, Ana Paula e Fernanda**), àqueles que se fizeram parte da minha família (“**tio Braulino**, cunhada **Elize** e namorado **Orlando**), pelo apoio incondicional, pelo consolo com palavras de motivação e pela preocupação que revigoraram os meus dias, apesar do preço da distância.

Sou grata ao meu orientador da Iniciação Científica (**prof. Dr. Puspitapallab Chaudhuri**) e sua esposa (**profa. Dra. Angsula Ghosh**), pela maneira que me incentivaram à pesquisa científica.

Sou grata ao meu orientador de Mestrado (**prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda**), pela oportunidade e confiança.

Sou grata à **CAPES**, pela bolsa concedida, bem como a **FAPESP** e **CNPq**, por apoiarem financeiramente.

Sou grata ao **prof. Dr. Carlos Ramos** e ao **prof. Dr. Gonçalo Pereira** e respectivos colaboradores, por terem cedido os lotes de sementes, a infraestrutura dos laboratórios de “Química de Proteínas” (Instituto de Química) e de “Genômica e Expressão” (Instituto de Biologia). E também ao professor **Fábio Gozzo** e colaboradores, pela infraestrutura do laboratório de espectrometria de massas “Dalton”.

Sou grata àqueles amigos da minha cidade natal (Manaus) e aos amigos de vários lugares do Brasil e do mundo que conheci na cidade de Campinas, que tiveram influências para a motivação deste trabalho. De maneira especial, sou muitíssimo grata: ao “**Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostra e**

**Mecanização” – GEPAM** (Alejandra, Alessandra, Alisson, Bruna, Cícero, Daiane, Elidiane, Eraldo, Fernanda, Giovana, Giovanni, Gustavo, Herbert, Ivanilce, Josiane, Katherine, Larissa, Nádia, Odilon, Paola, Rodrigo, Silvana e Stacy) por todo apoio e conversa, não apenas de caráter profissional, mas também pessoal. Às biólogas **Danieli, Marcela, Michelle e Viviane**, por terem me ajudado com tanta atenção! Ao grupo de percussão **“Nação Resgate”**, por ter me contagiado com tanta alegria e saúde espiritual! À república estudantil **“Chincha”** que morei, por toda hospitalidade, companhia e risadas, que atenuavam as sobrecargas diárias! Ao casal **Cleusa e Sidnei** e à **Isabel Coghi e sua família** por terem apoiado meus ideais, de maneira tão sensível e amável, além de terem sido pessoas acolhedoras nos momentos precisos!

Sou grata pelos cuidados da **CPG**, aos demais **funcionários** da UNICAMP e a todos que, de maneira direta e/ou indireta cooperaram para a conclusão deste trabalho!

## Súmula Curricular

### Dados pessoais

Bruna Caroline Miranda Maciel  
Brasileira, natural de Manaus – AM, 15/09/1988  
e-mail: bc\_maciel@yahoo.com.br

### Formação acadêmica

2011 – 2014 Mestrado em Química Analítica  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,  
Campinas/SP  
2006 – 2010 Graduação em Química/Bacharelado  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus/AM

### Principais experiências profissionais

- ✓ Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Membro do Comitê de Apoio do 3<sup>rd</sup> *International Congresso on Analytical Proteomics – ICAP* (2013)
- ✓ Universidade Federal do Amazonas – UFAM  
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC  
(Departamento de Física – Instituto de Ciências Exatas):
  - a) *Estudo teórico do Efeito de Solvente na Molécula de ácido orto-Aminobenzóico (o-Abz)*, bolsa CNPq (08/2008 – 08/2009)
  - b) *Estudo sobre estrutura eletrônica e ligação molecular para caracterizar estrutura e espectro da molécula de ácido orto-Aminobenzóico (o-Abz)*, bolsa FAPEAM (08/2007 – 08/2008).

### Produção científica

#### Artigo

Maciel, B.C.M.; Barbosa, H.S.; Pessôa, G.S.; Salazar, M.M.; Pereira, G.A.G.; Gonçalves, D.C.; Ramos, C.H.I.; Arruda, M.A.Z., *Comparative proteomics and metallomics studies in Arabidopsis thaliana leaf tissues: Evaluation of the selenium addition in transgenic and nontransgenic plants*

using two-dimensional difference gel electrophoresis and laser ablation imaging, **Proteomics**, 14, (2014) 904-912.

Maciel, B.C.M.; Chaudhuri, P., *An Ab Initio Quantum Chemical Characterization of Structure and Vibrational Spectra of Anthranilic Acid*, **International Journal Quantum Chemistry**, 111 (2011) 1709-1718.

## Principais resumos

Maciel, B.C.M.; Barbosa, H.S.; Koolen, H.H.F.; Salazar, M.M.; Arruda, M.A.Z., *Separação e quantificação de proteínas diferenciais em folhas de Arabidopsis thaliana não-transgênica e transgênica por 2-D DIGE*, **17º Encontro Nacional de Química Analítica – ENQA**, Belo Horizonte/MG/BR 2013. Forma de apresentação – poster. Anais divulgados em livro de resumo.

Maciel, B.C.M.; Barbosa, H.S.; Koolen, H.H.F.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z., *Comparative proteomics studies focusing on transgenic and non-transgenic Arabidopsis thaliana leaves*, **3<sup>rd</sup> International Congress on Analytical Proteomics – ICAP**, São Pedro/SP/BR. Forma de apresentação – poster. Anais divulgados em livro de resumo.

Maciel, B.C.M.; Ramos, C.H.I.; Arruda, M.A.Z., *Proteômica comparativa em folhas de linhagens natural e transgênica de Arabidopsis thaliana*, **5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica/ 2º Congresso Uruguayo de Química Analítica – 5º CIAQA/ 2º CUQA**, Montevideo/UY 2012. Forma de apresentação – oral. Anais divulgados em livro de resumo.

Maciel, B.C.M.; Chaudhuri, P., *Um estudo ab initio da molécula de ácido orto-Aminobenzóico (o-Abz) em fase gasosa*, **XXVI Encontro de Físicos do Norte e Nordeste – EFNNE**, Recife/PE/BR 2008. Forma de apresentação – poster. Anais divulgados em livro de resumo e CD-Rom.

## Prêmio

Menção Honrosa no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica na Área de Ciências Exatas, da Terra e Engenharias, Universidade Federal do Amazonas – UFAM (2008).

Informações complementares: [www.lattes.cnpq.br/3825629539558626](http://www.lattes.cnpq.br/3825629539558626)

# PROTEÔMICA E METALÔMICA COMPARATIVAS EM FOLHAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* TRANSGÊNICA E NÃO TRANSGÊNICA

## Resumo

Tendo em vista que a prática da transgenia reflete uma realidade mundial no setor agrícola, o principal objetivo desse trabalho de Dissertação é avaliar algumas espécies de proteínas diferenciais entre folhas de *Arabidopsis thaliana* não transgênica (NT) e transgênica (T), ambas irrigadas com solução de Selênio (Se), frente a uma condição controle. De maneira a investigar as diferenças entre as folhas NT e T, usando como parâmetros efeito da transgenia e estresse oxidativo induzido por Se, um estudo proteômico comparativo foi desenvolvido por meio da metodologia 2-D DIGE, variante da técnica de separação por 2-D PAGE, que oferece vantagens, tais como na detectabilidade das proteínas de baixa abundância e precisão para análise quantitativa entre as intensidades diferenciais dos *spots* proteicos, resultando, com efeito, um mapa proteômico mais representativo destas folhas. Quatro grupos de plantio foram combinados para análise comparativa: NT x T, NT x Se-NT, Se-NT x Se-T e T x Se-T. Embora não tenha sido detectadas espécies de proteínas diferenciais no grupo T x Se-T, para os outros, 68 proteínas diferenciais foram detectadas, usando um fator de regulação  $\geq 1,5$  baseado no teste *t* para  $p < 0,05$ . Dentre este total, 27 proteínas diferenciais foram identificadas por ESI-QTOF-MS/MS. Estas proteínas estão classificadas quanto às funções metabólicas, energéticas, de transdução de sinal, doenças/defensa vegetal, e algumas delas estão envolvidas na Glicólise, Fotossistema I e II, e combate à ERO (espécies reativas de

oxigênio). Adicionalmente, o imageamento por ablação a *laser* foi feito para avaliar a distribuição de Se e Enxofre (S) em folhas dos grupos diferentes, corroborando com alguns resultados obtidos, principalmente às proteínas envolvidas na Glicólise. A partir destes resultados é possível concluir que o vetor inserido também confere à planta a resistência ao estresse oxidativo, no qual o Selênio adicionado foi o efeito mais influente comparado com o efeito da transgenia.

**Palavras-chave:** transgenia, Selênio, espécies de proteínas diferenciais.

# COMPARATIVE PROTEOMICS AND METALLOMICS IN TRANSGENIC AND NON TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA* LEAVES

## Abstract

In view of the techniques related to transgenesis show the global reality in the agricultural sector, the main goal of this Thesis work is to evaluate some differential protein species in non-transgenic (NT) and transgenic (T) *Arabidopsis thaliana* leaves, both they irrigated with Selenium (Se) solution against control condition. In order to estimate the differences between NT and T leaves, using as parameters the transgenesis effect and the oxidative stress induced by Se, a comparative proteomic study was performed using 2-D DIGE methodology, a variant technique of separation by 2-D PAGE that offers ideal advantages, such as detectability of low abundant proteins and accuracy to quantitative analysis among differential intensities of protein spots, resulting in a more representative proteomic map of these leaves. Four plant groups were combined to comparative analysis: NT x T, NT x Se-NT, Se-NT x Se-T e T x Se-T. Although differential protein species from T x Se-T group were not detected, for the others, 68 differential protein species were detected, using regulation factor  $\geq 1.5$ , which was based in *t* test to  $p < 0.05$ . Among them, 27 differential proteins were accurately identified by ESI-QTOF-MS/MS. These proteins are classified regarding functions as metabolism, energy, signal transduction, diseases/vegetal defense and some of these were involved in the Glycolysis pathway, Photosystem I and II, and combat the ROS (reactive oxygen species). Additionally an imaging by laser ablation was done to evaluate the Se and Sulfur (S) distribution in leaves of different groups corroborating with some

obtained results, mainly those proteins involved in the Glycolysis pathway. From these results, it is possible to conclude that insert vector confers resistance to the T plant regarding oxidative stress where the added Se was the effect more influential than compared with transgenesis effect.

**Keywords:** transgenesis, Selenium, differential protein species.

## Lista de acrônimos

<b>2-D DIGE:</b>	do inglês, <i>Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese Diferencial em Gel Bidimensional)
<b>2-D PAGE:</b>	do inglês, <i>Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida)
<b>35S:</b>	promotor 35S
<b>ACN:</b>	acetonitrila
<b>Bisacrilamida:</b>	N,N'-metilenobisacrilamida
<b>BME:</b>	$\beta$ -mercaptoetanol
<b>BSA:</b>	do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i> (Soro de Albumina Bovina)
<b>CBBG:</b>	do inglês, <i>Coomassie brilliant blue G-250</i> (azul de <i>Coomassie</i> )
<b>CIA:</b>	clorofórmio e álcool isoamílico
<b>CHAPS:</b>	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato
<b>CTAB:</b>	brometo de hexadeciltrimetilamônio
<b>DMF:</b>	N, N-dimetilformamida
<b>DNA:</b>	do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>DnTP:</b>	“desoxirribonucleotídeo trifosfato”
<b>DTT:</b>	ditiotreitól
<b>EDTA:</b>	do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetate</i> (etilenodiaminotetracetato)
<b>ESI:</b>	do inglês, <i>electrospray ionization</i> (ionização <i>electrospray</i> )

<b>ERO:</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>HCl:</b>	ácido clorídrico
<b>ICP-MS:</b>	do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado)
<b>IEF:</b>	do inglês, <i>isoelectric focusing</i> (focalização isoeletrica)
<b>IPG:</b>	do inglês, <i>immobilized pH gradient</i> (gradiente de pH imobilizado)
<b>LA:</b>	do inglês, <i>laser ablation</i> (ablação a laser)
<b>MeCN:</b>	cianeto de metila
<b>micro-SPE:</b>	do inglês, <i>micro Solid Phase Extraction</i> (microextração em fase sólida)
<b>MM:</b>	massa molar
<b>MS:</b>	do inglês, <i>mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)
<b>MS/MS:</b>	espectrometria de massas em sequência
<b><i>m/z</i>:</b>	razão massa/carga
<b>NCBI:</b>	do ingles, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NT:</b>	não transgênico
<b>pb:</b>	pares de base
<b>PCR:</b>	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
<b>pH:</b>	potencial hidrogeniônico
<b>pI:</b>	ponto isoeletrico
<b>PMSF:</b>	do inglês, <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoreto de fenilmetilsulfonila)

<b>PVP:</b>	polivinilpirrolidona
<b>Q:</b>	quadropolo
<b>RF:</b>	rádio frequência
<b>RPq:</b>	parâmetro de “Mathieu”, aplicado em Volt
<b>SDS:</b>	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; docecil sulfato de sódio
<b>T:</b>	transgênico
<b>TAE:</b>	tampão “tris-acetato-EDTA”
<b>t-DNA:</b>	DNA de transferência
<b>TEMED:</b>	N, N', N, N'-tetrametilenodiamina
<b>TFA:</b>	do inglês, <i>trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoroacético)
<b>Ti:</b>	“indutor de tumor”
<b>TOF:</b>	do inglês, <i>time of flight</i> (tempo de voo)
<b>Tris:</b>	tris-hidroximetilaminometano
<b>UPLC:</b>	do inglês, <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
<b>UV:</b>	ultravioleta



## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Condições dos Grupos de <i>Arabidopsis thaliana</i> não-transgênicas (NT) e transgênicas (T) .....	32
<b>Tabela 2:</b> Esquema da metodologia 2-D DIGE. Marcação feita em cada amostra com os respectivos fluoróforos, antes da separação por 2-D PAGE	39
<b>Tabela 3:</b> Condições para separação por 2-D PAGE com metodologia 2-D DIGE .....	41
<b>Tabela 4:</b> Eluição por Gradiente em sistema UPLC acoplado a espectrometria de massas .....	44
<b>Tabela 5:</b> Dados da quantificação do teor proteico de folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de cada réplica de extração, na qual foi utilizada a junção para as etapas de separação eletroforética .....	50
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros instrumentais otimizados para o ICP-MS .....	74
<b>APÊNDICE A</b> – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos NT x T, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (50% da variação) .....	89
<b>APÊNDICE B</b> – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos NT x Se-NT, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (variação de 50%) .....	91
<b>APÊNDICE C</b> – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos Se-NT x Se-T, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (50% da variação) .....	98



## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> não transgênica (Col-0) no estágio inicial de floração, aos 57 dias de cultivo .....	7
<b>Figura 2:</b> Transformação da planta mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	11
<b>Figura 3:</b> Amplificação exponencial das moléculas de DNA por PCR .....	13
<b>Figura 4:</b> Estrutura molecular dos fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5 que possuem distintos comprimentos de onda fluorescente .....	20
<b>Figura 5:</b> Esquema da metodologia 2-D DIGE como extensão da técnica 2-D PAGE convencional .....	21
<b>Figura 6:</b> Esquema do funcionamento do sistema do espectrômetro de massas molecular tipo ESI-QTOF-MS/MS .....	23
<b>Figura 7:</b> Esquema do vetor pCAMBIA 2300 contendo a região t-DNA para a <i>Arabidopsis thaliana</i> , que se situa entre as bordas R e L, e a região fora do t-DNA para a <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
<b>Figura 8:</b> Parte do cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> T e NT mostrando os grupos organizados de maneira alternada (cada grupo composto por 12 plantas) e após 57 dias de cultivo .....	32
<b>Figura 9:</b> Gráfico da quantificação de ácidos nucleicos (em ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) baseada na razão entre as absorbâncias máxima e mínima .....	46
<b>Figura 10:</b> Gel de Agarose 1% (m/v) mostra confirmação da modificação genética em DNA de plantas T, baseado nos <i>primers</i> de <i>nptII</i> e pRT100, onde: 1 kb <i>ladder</i> (Invitrogen <sup>®</sup> ) que varia de 100 a 4000 pb, 1: DNA da planta NT, 2: DNA da planta T, 3: vetor pCAMBIA 2300 contendo 35S + poliA, A: <i>primers</i> para sequência <i>nptII</i> ( $\approx 700$ bp), B: <i>primers</i> para a sequência pRT100 ( $\approx 1100$ bp) .....	48

<b>Figura 11:</b> Gráfico da curva de calibração baseada em padrão BSA .....	49
<b>Figura 12:</b> Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos NT x T. Em azul, espécies de proteínas do grupo NT, e, em vermelho, do grupo T	52
<b>Figura 13:</b> Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos NT x Se-NT. Em azul, espécies de proteínas do grupo NT, e, em vermelho, do grupo Se-NT .....	53
<b>Figura 14:</b> Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos Se-NT x Se-T. Em azul, espécies de proteínas do grupo Se-NT, e, em vermelho, do grupo Se-T .....	53
<b>Figura 15:</b> Via da Glicólise dividida em 2 fases, nas quais a espécie identificada <i>Fructose-bisphosphate aldolase</i> participa da 1ª fase e a espécie <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit</i> , da 2ª fase .....	55
<b>Figura 16:</b> Diferenças fenotípicas mostram que 12 plantas Se-NT apresentaram baixa massa fresca (39,78g) a comparado com 12 plantas NT (53,99g) .....	56
<b>Figura 17:</b> Esquema de um cloroplasto, organela pertencente à célula vegetal, mostra a dependência dos Fotossistemas I e II com o Ciclo de Calvin. Justifica para os grupo Se-NT a alta abundância das espécies de proteínas responsáveis pela produção de ERO's, e baixa produção de massa orgânica relativa à <b>RuBisCO</b> .....	59
<b>Figura 18:</b> Esquema das linhas projetadas para ablação a <i>laser</i> em folha de <i>Arabidopsis thaliana</i> não transgênica seca .....	75
<b>Figura 19:</b> Intensidade de a) SO <sup>+</sup> obtida da folha NT do grupo controle; b) SeO <sup>+</sup> obtida da folha NT do grupo controle; c) SO <sup>+</sup> obtida da folha NT do grupo tratado com Selênio; d) SeO <sup>+</sup> obtida da folha NT do grupo tratado com Selênio; e) SO <sup>+</sup> obtida da folha T do grupo controle; f) SeO <sup>+</sup> obtida da folha T do grupo controle; g) SO <sup>+</sup> obtida da folha T do grupo tratado com Selênio; h) SeO <sup>+</sup> obtida da folha T do grupo tratado com Selênio .....	78

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> – Detecção da transgenia em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e obtenção de um mapa proteômico das folhas transgênicas e não transgênicas para análise comparativa por Eletroforese em Gel Diferencial Bidimensional (2-D DIGE) .....	5
<b>1 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	7
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> : uma planta modelo.....	7
1.2 Impactos da manipulação genética .....	9
1.2.1 A técnica de PCR .....	12
1.3 Estudos proteômicos .....	14
1.3.1 Análise proteômica .....	16
1.3.1.1 A técnica 2-D PAGE .....	18
1.3.1.2 Análise quantitativa por 2-D DIGE .....	19
1.3.1.3 Identificação das proteínas por espectrometria de massas .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	26
3.1 Equipamentos e acessórios .....	26
3.2 <i>Softwares</i> e bancos de dados .....	27

3.3 Reagentes e soluções .....	28
3.4 Material vegetal .....	29
3.5 Condições do cultivo .....	32
3.6 Amostra de DNA das folhas T e NT .....	33
3.6.1 Preparo da amostra .....	34
3.6.2 Quantificação do teor de ácidos nucleicos totais .....	35
3.6.3 Amplificação da sequência gênica .....	35
3.6.4 Separação da sequência gênica amplificada e detecção .....	36
3.7 Amostra de proteínas das folhas T e NT .....	36
3.7.1 Preparo da amostra .....	36
3.7.2 Quantificação do teor de proteínas totais .....	38
3.7.3 Separação das espécies de proteínas por 2-D PAGE com extensão da metodologia 2-D DIGE .....	39
3.7.4 Análise dos <i>spots</i> proteicos .....	42
3.7.5 Identificação por ESI-QTOF-MS/MS .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>46</b>
4.1 Detecção da transgenia .....	46
4.1.1 Dados de quantificação do teor de ácidos nucleicos .....	46
4.1.2 Amplificação da sequência baseada na transgenia .....	47
4.2 Análise proteômica .....	48

4.2.1 Dados de quantificação do teor proteico .....	48
4.2.2 Detecção e análise de proteínas diferenciais .....	50
4.2.3 Proteínas diferenciais identificadas .....	54
4.2.4 Eventos bioquímicos relacionados .....	54
4.2.4.1 Via da Glicólise .....	54
4.2.4.2 Ciclo de Calvin .....	56
4.2.4.3 Perturbação na homeostase iônica .....	57
4.2.4.4 Estresse oxidativo .....	58
4.2.4.5 Defesa vegetal e outro eventos .....	59
<b>5 CONCLUSÕES PARCIAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO II – Imageamento das folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transgênica e não transgênica e avaliação da distribuição de Selênio e Enxofre via ablação a <i>laser</i> acoplado ao espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente [LA(i)-ICP-MS] .....</b>	<b>63</b>
<b>6 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>65</b>
6.1 Nutrição mineral .....	65
6.1.1 O elemento Selênio (Se) .....	66
6.1.2 Defesa vegetal. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo .....	67
6.2 Estudos metalômicos .....	69

6.2.1 Imageamento da distribuição elementar. Desenvolvimento da técnica de LA(i)-ICP-MS .....	70
<b>7 OBJETIVOS</b> .....	72
<b>8 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	73
8.1 Equipamentos e acessórios .....	73
8.2 <i>Softwares</i> .....	73
8.3 Amostra das folhas T e NT .....	73
8.4 Condições da técnica LA(i)-ICP-MS .....	74
8.5 Tratamento de dados .....	75
<b>9 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	76
9.1 Distribuição de Se e S .....	76
9.2 Competição Selênio/Enxofre e tolerância vegetal .....	79
<b>10 CONCLUSÕES PARCIAIS</b> .....	80
<b>11 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82
<b>APÊNDICE A</b> .....	89
<b>APÊNDICE B</b> .....	91
<b>APÊNDICE C</b> .....	98

## INTRODUÇÃO

Atualmente, as técnicas de modificação genética têm se mostrado cada vez mais comuns, principalmente no setor agrícola, cujo intuito é a constante melhoria pelo custo-benefício: culturas cada vez mais tolerantes ao estresse, com mais rendimento na produção e redução pós-colheita, bem como alternativas para indústrias farmacêuticas e de energia são exemplos desta realidade mundial. Alguns países – tal como o Brasil – adotaram comercialmente os produtos transgênicos para consumo humano e afins, outros países – como a França – não possuem esta circulação no comércio por questões polêmicas, relacionadas aos organismos geneticamente modificados (OGM). Neste contexto, esta dissertação de Mestrado visa apresentar uma compreensão clara dos efeitos endógenos e exógenos utilizando abordagem bioanalítica, por meio de estudo proteômico, baseado nas folhas de um organismo vegetal tido como modelo – a espécie *Arabidopsis thaliana* –, cuja intenção é investigar as possíveis alterações no proteoma dessas plantas levando às discussões a respeito dos eventos relacionados em suas fisiologias.

A relevância que conduziu este trabalho de dissertação está relacionada às várias questões que têm surgido quanto ao comportamento vegetal, uma vez que a informação genética é alterada de maneira que não ocorreria naturalmente e baseado no fato de que os processos bioquímicos demandaram muito tempo para se adaptar durante a Evolução. Além do mais, o efeito do ambiente externo é outro fator bastante influente, senão determinante, no desenvolvimento da maioria das plantas e, portanto, convém a avaliação comportamental fenotípica.

Baseado nisso, este trabalho tem como hipótese de que dado organismo geneticamente modificado (OGM)/ transgênico pode ter tido seu equilíbrio alterado, tal como um conjunto de proteínas possivelmente comprometido. Se for verdade, uma mudança no mapa proteômico pode ser a evidência mais visível deste evento, uma vez que as proteínas são os produtos diretamente ligados ao material genético do organismo que os contém. Nisto, o objetivo deste trabalho de dissertação é versar as proteínas diferencialmente abundantes entre folhas de *Arabidopsis thaliana* transgênica (T) e não transgênica (NT), de maneira que a detectabilidade seja quantitativa e a identificação consolide com as características fenotípicas percebidas durante os cultivos, tendo, como parâmetros, o efeito da modificação genética e o efeito do estresse oxidativo induzido pela exposição ao Selênio entre a espécie natural e a linhagem transgênica da planta.

No **CAPÍTULO I** foi realizado um cultivo a partir dos lotes de sementes cedidas de *Arabidopsis thaliana* transgênica (T) e não transgênica (NT) – uma planta frequentemente usada como organismo modelo em estudos de botânica e biologia molecular –, cujo propósito experimental é detectar as proteínas diferenciais das folhas que, por hipótese, respondessem aos efeitos da modificação genética e irrigação com Selênio. Para isto, foi inicialmente investigada a detecção da transgenia por meio da técnica de PCR, para sustentar sua ocorrência nas plantas de sementes T cultivadas. Os estudos proteômicos baseados nas folhas de *Arabidopsis thaliana* foram desenvolvidos a partir da obtenção dos perfis eletroforéticos por meio da técnica 2-D PAGE e, a partir deles, a metodologia 2-D DIGE foi utilizada como ferramenta para análise quantitativa destas proteínas, por meio da análise das intensidades diferenciais entre os *spots* proteicos, levando em consideração quatro grupos comparativos distintos: Não Transgênico x Transgênico (NT x T), Não

Transgênico  $\times$  Não Transgênico tratado com Selênio (NT  $\times$  Se-NT), Transgênico  $\times$  Transgênico tratado com Selênio (T  $\times$  Se-T) e Não Transgênico tratado com Selênio  $\times$  Transgênico tratado com Selênio (Se-NT  $\times$  Se-T). A identificação das espécies de proteínas diferenciais foi realizada por espectrometria de massas molecular.

Baseado no mesmo cultivo de *Arabidopsis thaliana* T e NT, o **CAPÍTULO II** objetivou, de maneira complementar, estudos metalômicos que mostrassem o comportamento dos elementos Enxofre (S) e Selênio (Se) a partir da adição de Selenito de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), frente a uma condição controle. Os experimentos requeridos para este propósito foram baseados no imageamento contendo a distribuição de S e Se em folha representativa para cada grupo cultivado, por meio da técnica de ablação a *laser* acoplada à espectrometria de massas elementar.





## **CAPÍTULO I**

---

Detecção da transgenia em folhas de *Arabidopsis thaliana* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e obtenção de um mapa proteômico das folhas transgênicas e não transgênicas para análise comparativa por Eletroforese em Gel Diferencial Bidimensional (2-D DIGE)



# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 *Arabidopsis thaliana*: uma planta modelo

Dentre as várias espécies de vegetais superiores estudadas, a *Arabidopsis thaliana* (vide **Figura 1**), herbácea da família Brassicaceae – da mesma família que a mostarda –, possui características vantajosas para pesquisas relacionadas ao comportamento vegetal, tais como a fácil adaptação dos cultivos em lugares restritos, possui um ciclo de vida curto, apresenta alta produtividade de sementes, e por conta disso, foi inicialmente estabelecida como organismo modelo nos estudos de botânica (MEINKE, 1998).

**Figura 1:** *Arabidopsis thaliana* não transgênica (Col-0) no estágio inicial de floração, aos 57 dias de cultivo



**Fonte:** obtida em Câmera GE<sup>®</sup> Healthcare, modelo X550

Devido o seu genoma ser considerado pequeno, quando comparado a vários organismos vegetais, foi a primeira planta com o genoma completamente sequenciado, constituindo-se em cinco cromossomos (UNSELD, 1997) e 125 mega pares de base (mpb) (ARABIDOPSIS Genome Initiative, 2000). Em virtude disso, não demorou muito para esta espécie ganhar atenção nos estudos em genética e biologia molecular até os dias atuais, especialmente nos estudos em vegetais de Genômica, Transcriptômica e Proteômica, que foram gradativamente acrescidos por conta de um conjunto de plataformas e bancos de dados disponíveis para a espécie, tal como a TAIR – do inglês, *The Arabidopsis Information Resource* (fonte: [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), onde uma iniciativa de auxílio à coordenação de pesquisa proteômica internacional em *Arabidopsis thaliana* foi estabelecida e permitiu a identificação coletiva de 21.415 proteínas, sendo a MASCP – do inglês, *Multinational Arabidopsis Steering Committee Proteomics* (fonte: [www.masc-proteomics.org](http://www.masc-proteomics.org)) – a principal plataforma, assim contribuindo continuamente como ferramenta favorável para muitos pesquisadores (JOSHI *et al.*, 2011).

Graças ao desenvolvimento e melhoramento das técnicas de modificação genética (RÉDEI, 1975; LLOYD *et al.*, 1986; VALVEKENS *et al.*, 1988), com o tempo a espécie agregou um número significativo de linhagens geneticamente modificadas. Isto tem facilitado a análise das sequências de genes exógenos e o efeito dos seus produtos nos estudos de comportamento do vegetal, ilustrado pelas proteínas codificadas destes genes.

Sendo assim, as contribuições desta espécie vegetal como organismo modelo têm permitido uma compreensão para muitos outros organismos vegetais, que ainda não possuem bancos de dados completos.

## 1.2 Impacto da manipulação genética

A manipulação da natureza, como prática antiga desde o surgimento das primeiras organizações humanas em civilização, sempre foi mais pronunciada na agricultura. Em prol da melhoria no custo-benefício, tal prática se desenvolveu com o tempo, de maneira a obter aumento da produção, redução pós-colheita, aumento do valor nutricional dos alimentos, aproveitamento de fertilizantes, tolerância ao estresse, além de oferecer alternativas para as industriais farmacêuticas e de energia, como exemplos respectivos, produção de princípios ativos medicinais e aproveitamento da biomassa para produção de etanol de segunda geração (MA, DRAKE & CHRISTOU, 2003; HUBER, IBORRA & CORMA, 2006).

O melhoramento genético foi a primeira atividade de manipulação, que permitia a obtenção de alelos favoráveis em população animal ou vegetal, uma vez que era disponível uma variabilidade genética para tal progresso (ALBERTS *et al.*, 2002).

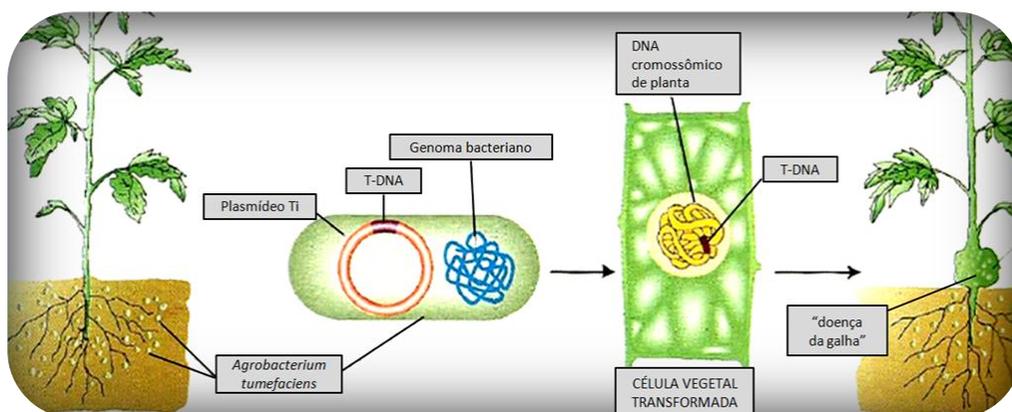
Atualmente, as tecnologias da informação baseadas no DNA são fundamentais no avanço das ciências biológicas, pois elucidam muitos princípios bioquímicos que contribuem para diversas áreas, como áreas de saúde, biotecnológicas ou forenses. Sendo assim, as técnicas para clonagem do DNA prepararam o caminho dos campos da Genômica e Proteômica, uma vez que um conjunto de ferramentas não convencionais possibilita a transferência de informação genética de um organismo – seja um microrganismo, um vegetal ou um animal – para outro (ALBERTS *et al.*, 2002; NELSON & COX, 2009). De maneira prática, é possível fazer cortes

específicos do DNA com endonucleases de restrição – também chamadas de “enzimas de restrição” –, selecionar moléculas de DNA capazes de autorreplicação, produção de DNA recombinante e inserção deste último no maquinário de uma célula hospedeira. Um vetor de clonagem – ou “vetor de expressão” – é uma sequência de DNA responsável por levar o gene de interesse para transformação de um organismo. Para tal, existem dois tipos destes vetores: os plasmídeos, que são moléculas circulares de DNA capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico, e as moléculas de DNA viral (ALBERTS *et al.*, 2002; NELSON & COX, 2009). Os mecanismos de inserção do gene de interesse, conhecido por “T-DNA” (DNA de transferência), ao genoma de um organismo, ocorrem por transformações diretas, como a biobalística, eletroporação de protoplastos, microinjeção de DNA, por meio de lisossomos, e, também, indireta, mediada por agrobactérias, em geral pela espécie *Agrobacterium tumefaciens* (POTRYKUS, 1991).

A transformação mediada por agrobactérias, em especial, é muito aplicada em plantas, pois elas transferem naturalmente parte de seu genoma às células vegetais no momento da infecção, onde para cada tipo de planta existe um modo de infecção, que é designada por meio de cinco subdivisões do gênero *Agrobacterium* (BECHTOLD *et al.*, 1993; CLOUGH & BENT, 1998). As agrobactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens*, uma vez transformadas com o gene de interesse (DNA de transferência – T-DNA), são contidas em solução a ser borrifada na etapa de florescimento da planta, e a transformação da planta finalmente é dada por um processo de infecção que aparentemente é vista na forma de calos na base do caule, conhecido como “doença da galha”, ou ainda, “galha da coroa” (TAIZ & ZEIGER, 2006). Este é o tipo mais comum de modificação genética, pois no momento da infecção, a transferência dos

genes presentes nos plasmídeos ocorre horizontalmente nas plantas, aproveitando o processo de divisão celular desorganizado, semelhante a um tecido tumoral (vide **Figura 2**).

**Figura 2:** Transformação da planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.  
**Fonte:** adaptado de Griffiths *et al.*, 2006



**Fonte:** adaptado de Griffiths *et al.*, 2006

Com estas ferramentas biotecnologicamente atrativas, algumas espécies vegetais de importância comercial também já possuem linhagens transgênicas disponíveis e são consumidas em alguns países. Por exemplo, a soja, que tem como primeiro país produtor os Estados Unidos, seguido pelo Brasil, é uma das principais fontes de proteínas vegetais, consistindo em 40% da massa seca, e, também, possui um percentual muito expressivo de óleo vegetal, consistindo em, aproximadamente, 21% da massa seca. Ela possui linhagens transgênicas, na qual a mais comum é aquela oriunda do gene exógeno que codifica a enzima *CP4 EPSPS*, que oferece a propriedade de resistência ao herbicida glifosato, tornando as culturas de soja mais resistentes ao estresse

deste herbicida, contribuindo desta maneira para alta produtividade dos grãos no comércio (LUNDRY, 2008).

Embora o consumo humano de produtos transgênicos seja uma realidade mundial, alguns países não aderiram a este sistema, por motivos polêmicos, seja ético ou porque que ainda não se asseguraram. Por conta disso, muitos estudos têm se ramificado objetivando esclarecer muitos aspectos comportamentais e adaptativos do novo organismo obtido após a modificação genética.

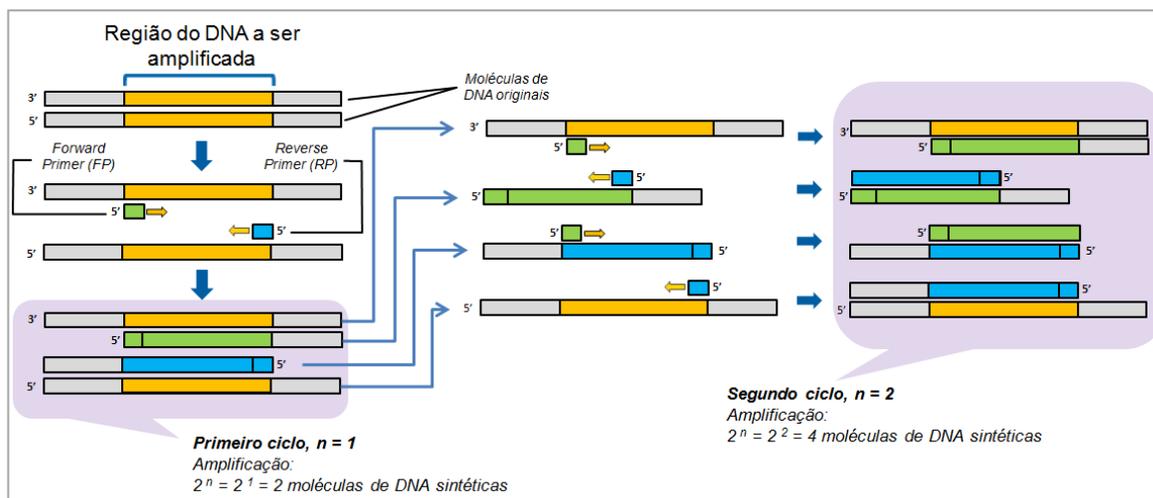
### 1.2.1 A técnica de PCR

A técnica de PCR é baseada na amplificação exponencial de uma sequência do gene de interesse, e, por conta desta propriedade, é uma ferramenta poderosa por ser muito sensível, visto que a partir de uma única molécula de DNA na amostra é possível a detecção da sequência (NELSON & COX, 2009).

Como a amplificação ocorre exponencialmente, em função dos ciclos aplicados, esta técnica possui grande variedade de procedimentos analíticos, na qual a amostra de DNA é incubada junto com os reagentes necessários para a síntese e seu mecanismo consiste em três etapas fundamentais: aquecimento, resfriamento e replicação (ALBERTS *et al.*, 2002). No aquecimento, as moléculas de DNA da amostra têm suas fitas separadas por conta do calor aplicado no sistema. No resfriamento, a presença de dois oligonucleotídeos, em concentrações significativas na amostra, os faz como iniciadores – ou “*primers*”, do inglês –, nos quais são hibridizados às respectivas sequências complementares nas duas fitas de DNA. Na replicação, a presença da enzima

DNA polimerase inicia a síntese a partir dos iniciadores hibridizados, fazendo o uso dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato para construção da cadeia polimérica, tendo a fita de DNA da amostra como molde. Este ciclo inteiro é repetido de maneira que os fragmentos de DNA sintetizados atuam como molde para o próximo ciclo. Repetidos ciclos produzem o DNA predominante idêntico à sequência de DNA da amostra original e, geralmente, são aplicados de 20 a 40 ciclos (vide **Figura 3**).

**Figura 3:** Amplificação exponencial das moléculas de DNA por PCR.



**Fonte:** adaptado de Alberts *et al.*, 2002

Quando a amostra de DNA é clivada por enzimas de restrição, para liberação da sequência desejada a ser amplificada, sua confirmação pode ser feita na estimativa do tamanho baseado em pares de base (pb) por um marcador padrão, que consiste numa mistura de nucleotídeos elucidados em uma faixa de tamanho determinada. A separação feita por tamanho é tipicamente realizada em gel de agarose, polímero que possui em sua estrutura secundária cadeia linear de polissacarídeos sem ligações cruzadas. O gel de

agarose obtido é de rigidez considerável e inércia biológica relativa, sendo grandemente empregado como matriz na separação por tamanho dos genes amplificados por PCR. Os ácidos nucleicos da amostra são negativamente carregados, a corrida eletroforética em gel de agarose tem suas propriedades elétricas dependentes do campo elétrico aplicado e o sentido da eletromigração é para o polo positivo, convencionalmente, o cátodo.

A detecção da sequência amplificada ocorre a partir da intensidade da fluorescência por conta dos raios UV incididos no gel de agarose, contendo, *a priori*, brometo de etídio (EtBr), um composto aromático que se intercala nos ácidos nucleicos da amostra e, algumas vezes exposto aos raios UV, exibe o efeito da fluorescente, proporcional à quantidade amplificada.

### 1.3 Estudos proteômicos

As proteínas são macromoléculas biológicas bastante abundantes, constituindo a maior parte de massa seca da célula. Elas desempenham funções celulares em diversos processos biológicos, além das suas propriedades como “blocos construtores” que, de longe, governam a morfologia e o aspecto fisiológico, uma vez que são traduzidas em determinadas condições ambientes. Suas características, marcadamente versáteis, são devidas aos níveis de organização molecular, descritos por unidades monoméricas de aminoácidos (aa) ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A influência das ligações de hidrogênio e dissulfeto, ligações iônicas, fatores cooperativos externos como o meio geralmente aquoso, a diversidade de mudanças pós-traducional, propriedade de se conjugar a grupos prostéticos e ainda interagir temporariamente com outros

elementos disponíveis no meio em que estão contidas, permite, assim, a origem de suas estruturas tridimensionais complexas e, funcionalmente, mais variáveis que se pode conhecer. Em virtude, as proteínas em seu estado nativo (estrutura em que possui funcionalidade biológica) desempenham um maquinário cooperativo no organismo, que regula diversas funções vitais, como funções energéticas, metabólicas, regulatórias etc (ALBERTS *et al.*, 2002; NELSON & COX, 2009).

As proteínas estão diretamente associadas ao genoma, pois são os produtos finais dos genes ativos. Baseado nisto, os estudos que visam apenas a busca pelas informações da constituição genética de um organismo e suas sequências responsáveis por características na aparência, fazem jus ao “genótipo”. Quando um organismo sofre transformações na aparência durante o seu desenvolvimento temporal e dependentes dos fatores intrínsecos e condições ambientais, estes estudos fazem jus ao “fenótipo”, que se refere, praticamente, ao reflexo das modificações pós-traducionais das proteínas na aparência. Em outras palavras, o fenótipo de um organismo é definido pelo seu genótipo com resposta aos fatores externos. Esta definição constitui o “dogma central da biologia molecular”, e, dentro desta importância, os estudos bioquímicos e proteômicos estão bastante envolvidos. Neste contexto, os estudos bioquímicos visam detalhar, de maneira pontual, as informações de uma proteína de interesse, desde a sua caracterização estrutural e funcional até suas mudanças pós-traducionais e interações, seja com outra proteína, íons ou metabólitos, para elucidar seus efeitos no organismo. Ao passo que os estudos proteômicos visam obter informações das espécies de proteínas que constituem uma região do organismo em estudo, seja uma organela ou um tecido, para que, em simbiose com os estudos bioquímicos, venham a elucidar os eventos biológicos (ALBERTS *et al.*, 2002).

### 1.3.1 Análise proteômica

Com as propriedades físicas e químicas elucidadas a respeito da estrutura das proteínas, a realização dos estudos proteômicos se aprimorou em técnicas instrumentais e preparo de amostra. Os critérios são empregados de acordo com o objetivo proposto.

Para obtenção do mapa visual proteômico, a técnica de Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2-D PAGE) é a estratégia de separação mais eficiente em termos de se permitir observar uma grande quantidade de espécies de proteínas resolvidas em um mesmo gel. Para este propósito, é necessário averiguar o preparo adequado da amostra, que é absolutamente essencial para obtenção de bons resultados na separação eletroforética.

Matriz de propriedades complexas, tal como mistura de espécies de proteínas de uma amostra, requer protocolos de preparação tipicamente determinados de maneira empírica. Para os estudos proteômicos, uma das metas é o desenvolvimento de estratégia de preparação da amostra proteica em que seja possível visualizar tantas espécies quanto possível. A exigência da técnica 2-D PAGE para o preparo da amostra é o uso de tampão extrator composto por agentes que desnaturem com eficiência as espécies, conservando suas propriedades de carga iônica originais. Uma das estratégias para desnaturação proteica bastante usada é adição de agentes redutores para o rompimento das ligações de dissulfeto, tal como DTT. Outros agentes são necessários para: (a) inibir a ação de proteases – que são liberadas durante a extração –, que podem ser empregados PMSF e EDTA; (b) favorecer

solubilidade de maneira a evitar que as proteínas desnaturadas se agreguem, no qual pode ser empregada Ureia ou Tiourea; (c) permitir a eficiência da extração, que pode ser adicionado KCl para atuar na força iônica do meio. Além disso, são requeridas etapas adicionais para purificação da amostra, as quais envolvem precipitação proteica (efeito *salting out*), podendo ser realizada com adição de solvente orgânico, tal como acetona, ou combinado com sal orgânico, tal como acetato de amônio, além de etapas de lavagem do precipitado com as próprias soluções precipitantes usadas. Maldonado *et al.* (2008) avaliaram três condições de extração de proteínas em *Arabidopsis thaliana* para aplicação na técnica 2-D PAGE: (i) TCA-acetona, (ii) fenol e (iii) TCA-acetona-fenol, nos quais os resultados mostraram que, mesmo empregando-se reagentes distintos, não houve diferenças estatisticamente significantes na produção de proteínas entre os métodos com as condições propostas, entretanto a condição *iii* proporcionou melhores resultados, em termos de focalização do *spot*, *spots* resolvidos, intensidade do *spot*, *spots* únicos detectados e reprodutibilidade. Silva *et al.* (2010) desenvolveram seis protocolos de extração de proteínas em folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) e os resultados mostraram que o método mais eficiente fez o uso do fenol como reagente “chave” para extração e, para precipitação das proteínas, o acetato de amônio em metanol. Ambos os trabalhos mostraram a influência dos reagentes não apenas na eficiência da extração, bem como seus efeitos diretos no sistema eletroforético, sendo, portanto, necessário o uso de etapas adicionais na extração à purificação. Entretanto, o uso de várias etapas pode ocasionar a perda seletiva das espécies e, logo, devem ser empregadas em quantidades mínimas.

### 1.3.1.1 A técnica 2-D PAGE

Esta técnica de separação é dita bidimensional, porque compreende em dois parâmetros: a separação feita por ponto isoelétrico (pI) e a separação feita em função do tamanho (Da). Na primeira dimensão, a focalização isoelétrica é feita em um gradiente de pH imobilizado em gel comercial, onde a eletromigração de grupos de proteínas, que diferem nas características iônicas e ionizáveis em função do campo elétrico aplicado, encontram seus respectivos pI's no gradiente. Na segunda dimensão, estando as espécies de proteínas idealmente desnaturadas e solvatadas por moléculas negativamente carregadas, a separação é baseada na eletromigração dependente do tamanho, o qual é frequentemente associado à massa molar das espécies, e do campo elétrico aplicado, onde o sentido da eletromigração é para o pólo positivo (cátodo).

Esta técnica de separação foi proposta inicialmente por Tiselius (1933 *apud* HAMES, 1990), quando trabalhava com proteínas de soro sanguíneo em solução, e teve problemas devido à rápida difusão das proteínas em meio aquoso, motivo que limitara a resolução. Laemmli (1970) propôs à técnica o uso da poliacrilamida como suporte, variando em função das massas molares das proteínas. Esta técnica é denominada SDS-PAGE, que resolvera o problema da difusão, se comportando como um tipo de material inerte e estável às proteínas, além de suas fáceis visualizações por ser transparente (JÚNIOR, 2001). O'Farrel (1975) propôs e adaptou separação por gradiente de pH, resultante da poliacrilamida contida em um tubo cilíndrico na presença de anfólitos, de maneira que a separação das espécies de proteínas fosse realizada de acordo com seus pI's: o problema consistia na focalização dos pI's, que

atualmente foram resolvidos com o uso de fitas que apresentam os anfólitos imobilizados, refletindo o gradiente de pH.

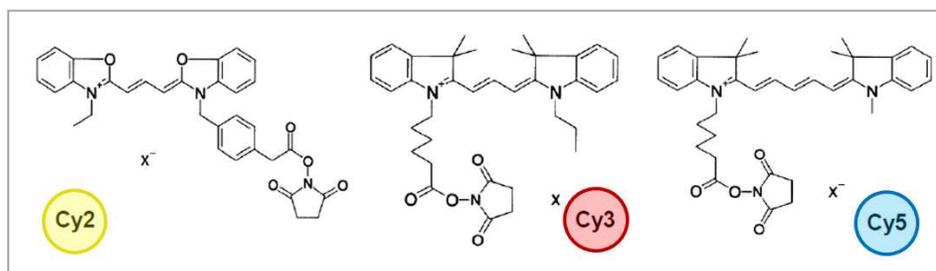
Em virtude dos princípios em que é feita a separação por 2-D PAGE, ela tem se tornado uma das técnicas mais populares, sendo amplamente usada em métodos de separação e fracionamento de misturas proteicas (DEUTSCHER, 1990), porque, além de fazer o uso de um procedimento eficaz, possui vantagens na realização de análises simultâneas em um mesmo gel, com resoluções adequadas, principalmente quando o fracionamento é incorporado a outras técnicas, como espectrometria de massas (CHERRY, 1988).

#### 1.3.1.2 Análise quantitativa por 2-D DIGE

A metodologia 2-D DIGE é tipicamente usada para os estudos proteômicos que buscam espécies de proteínas diferenciais entre duas amostras analisadas comparativamente (MAROUGA *et al.*, 2005). É baseada na marcação de uma mistura de espécies de proteínas com moléculas de propriedade fluorescente antes da separação eletroforética (vide **Figura 4**), de forma que cada fluoróforo tem seu comprimento de onda fluorescente distinto (TONGE *et al.*, 2001). Os fluoróforos são baseados em cianina (Cy, do inglês: *cyanine*), que é um nome não sistemático de uma família de corante sintético pertencente ao grupo polimetina. Dentre algumas metodologias de análise, o método “*minimal dyes*” é baseado na marcação das proteínas de maneira que uma molécula de corante seja ligada covalentemente. Uma vez que se tem determinada amostra proteica marcada com o fluoróforo Cy3 e outra amostra marcada com o fluoróforo Cy5, a detecção das proteínas podem ser resolvidas

no mesmo gel, de maneira comparativa direta. O fluoróforo Cy2 atua como um padrão interno, composto por uma mistura 1:1 das amostras a ser analisadas, que atua como normalizador dos valores de abundância das espécies.

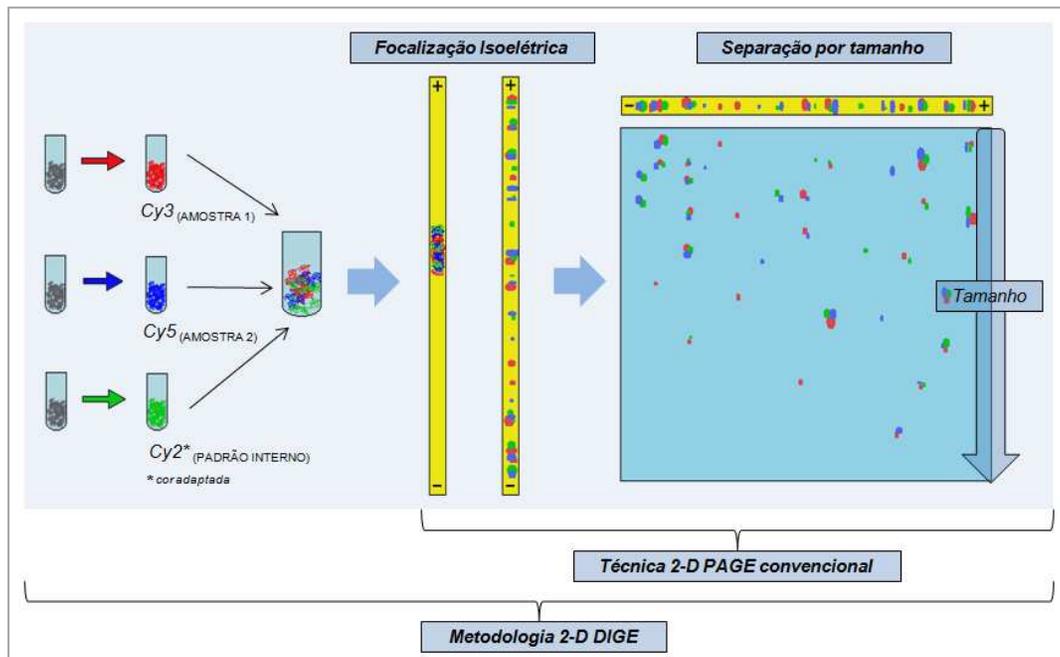
**Figura 4:** Estrutura molecular dos fluoróforos Cy2, Cy3 e Cy5 que possuem distintos comprimentos de onda fluorescente



**Fonte:** Adaptado de Tonge *et al.*, 2001

2-D DIGE consiste em uma extensão da técnica 2-D PAGE convencional (vide **Figura 5**), e esta metodologia comparativa oferece vantagens para as limitações da técnica: a sensibilidade dos fluoróforos oferece uma ampla faixa dinâmica e baixos limites de detecção, permitindo, inclusive, a detectabilidade de espécies de proteínas de baixa abundância; elimina o efeito de matriz e problemas com a reprodutibilidade; quando feita quadruplicatas que combinem as marcações na amostra, reduz o efeito biológico.

**Figura 5:** Esquema da metodologia 2-D DIGE como extensão da técnica 2-D PAGE convencional



**Fonte:** Adaptado de *University College London* ([www.ucl.ac.uk](http://www.ucl.ac.uk))

Estudo proteômico comparativo, feito por meio da metodologia 2-D DIGE em sementes de soja transgênica [*Glycine max* (L) Merrill], revelou que havia diferenças entre os proteomas destas amostras com o lote original de sementes não transgênicas, onde quatro espécies de proteínas foram detectadas como diferencialmente abundantes. Para esta análise, foi usado fator de regulação  $\geq 1,5$ , com significância estatística baseada no teste *t* de Student, para  $p < 0,05$ . Os resultados da identificação por espectrometria de massas corroboraram com os testes enzimáticos, revelando estresse oxidativo em nível de semente na linhagem transgênica (BARBOSA *et al.*, 2012). De maneira contínua, folhas de soja, de plantas oriundas dos mesmos lotes de sementes transgênica e não transgênica, foram estudadas com a mesma metodologia, de maneira que o resultado da análise por 2-D DIGE revelou 47

espécies de proteínas diferenciais, usando fator de regulação  $\geq 1,8$  com a mesma significância estatística e corroborando, também, com os testes enzimáticos para estresse oxidativo (ARRUDA *et al.*, 2013).

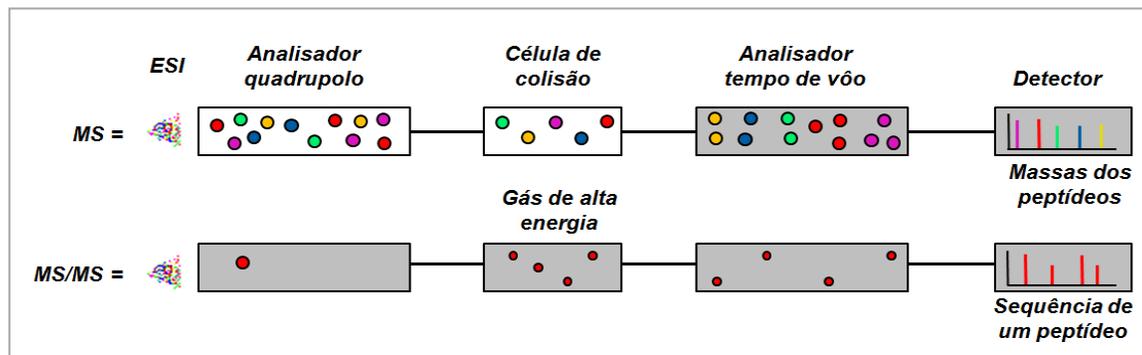
### 1.3.1.3 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental muito sensível que requer pouco material e permite determinar a massa exata das espécies de proteínas, intactas ou clivadas enzimática ou quimicamente (AEBERSOLD & MANN, 2003). Uma vez que as informações obtidas são organizadas, tornam-se bastante úteis para definir bancos de dados em conjunto com estudos genômicos. Deste modo, os métodos espectrométricos se tornam criticamente importantes para o campo de proteomas, nos quais são feitos grandes esforços para identificar e caracterizar todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo, incluindo suas modificações pós-traducionais (*Matrix Science – Mascot Search*, fonte: [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

Dentre os diversos métodos comumente usados em análise proteômica, o método ESI-QTOF-MS/MS tem atenção especial (vide **Figura 6**). Este método consiste na separação prévia dos peptídeos das proteínas digeridas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Uma vez que são ionizados por uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI), os íons carregados positivamente – ou duplamente carregados – são transferidos para um quadrupolo, que atua como um “filtro” de massas, por meio da geração de um campo eletrostático oscilante nos eixos  $x$  e  $y$ , onde os íons com certa razão  $m/z$  de oscilação estável atravessam para o eixo  $z$ . Estando estes peptídeos ainda ionizados, defronte, encontram um campo elétrico forte o suficiente para

separá-los por diferença de velocidades, que está em função das respectivas massas e cargas dos peptídeos. As informações que se mostram no detector são suas razões  $m/z$  com suas respectivas intensidades. Para se obter informação das sequências nos peptídeos (DOMON & AEBERSOLD, 2006), é necessário o uso de espectrometria de massas em sequência (MS/MS): o primeiro separa os peptídeos obtidos após a digestão da proteína selecionada e permite analisar cada peptídeo ao seu tempo. Este peptídeo é, depois, fragmentado por colisão com átomos de um gás de alta energia, de maneira que as clivagens são feitas, preferencialmente, nas ligações peptídicas, gerando uma fragmentação em série, cada um se diferenciando por um único aminoácido. O segundo espectrômetro separa estes fragmentos e exibe suas massas. Cada aminoácido possui uma massa molar característica e, portanto, a sequência deles pode ser deduzida com base na diferença de massa. A mudança pós-traducional pode ser detectada quando a massa do aminoácido a qual está ligada se apresenta aumentada, e, também, pode ser deduzida com base na diferença de massa entre a massa observada pelo espectrômetro e a massa teórica do aminoácido.

**Figura 6:** Esquema do funcionamento do sistema do espectrômetro de massas molecular tipo ESI-QTOF-MS/MS



**Fonte:** Adaptado de Domon & Aebersold, 2006

Com as informações do MS, a busca em banco de dados de sequências é analisada de maneira que combine com as massas teóricas calculadas para os peptídeos clivados com a enzima usada, e as informações do MS/MS mostram as sequências parciais de aminoácidos.

## **2 OBJETIVOS**

### Objetivo geral

Detectar a ocorrência de transgenia nas folhas de *Arabidopsis thaliana* referentes ao lote de sementes transgênicas cedidas e realizar análise proteômica quantitativa das proteínas diferencialmente abundantes entre as folhas não transgênica e transgênica, combinando com condições distintas de exposição ao Selênio, empregando a metodologia 2-D DIGE.

### Objetivos específicos:

- ✓ Otimizar as condições da técnica de PCR;
- ✓ Definir *primers* para detecção da transgenia por PCR.
- ✓ Adaptar protocolo de extração de proteínas e otimizar condições da técnica de 2-D PAGE para metodologia 2-D DIGE;
- ✓ Investigar proteínas com intensidades diferenciais, a partir de significância estatística com base no teste *t* de Student, para  $p < 0,05$ ;
- ✓ Identificar as proteínas diferenciais por espectrometria de massas.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador de tubos (Phoenix, Brasil);
- ✓ Balança analítica (modelo 260, Mettler, EUA);
- ✓ Coluna cromatográfica analítica (modelo BEH130 C<sub>18</sub>, 100 mm × 100 µm i.d., partículas de 1,7 µm, Waters, Inglaterra)
- ✓ Cromatógrafo (nanoAcquity<sup>®</sup> UPLC, Waters, Inglaterra)
- ✓ Concentrador (SpeedVac<sup>®</sup> Savant, modelo SPD131DDA, Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Espectrofotômetro para ácidos nucleicos, UV (Nanodrop<sup>®</sup> 2000, Thermo Scientific, EUA);
- ✓ Espectrofotômetro UV-Visível (modelo B582, Micronal, Brasil);
- ✓ Espectrômetro de massas tipo nanoESI-QTOF (Waters Synapt HDMS, Inglaterra);
- ✓ Estufa (Quimis, Brasil);
- ✓ Fitas de gel imobilizado pH 4-7 (Amersham Biosciences)
- ✓ Mesa agitadora (modelo Q225M, Quimis, Brasil);
- ✓ Misturador *vortex*, (modelo M-37600, Thermolyne, EUA);
- ✓ Placa aquecedora (Quimis, Brasil)
- ✓ Pré coluna cromatográfica (Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 20 mm × 180 µm d.i., partículas de 5 µm, Waters, Inglaterra)
- ✓ *Scanner* (modelo ImageScanner<sup>®</sup> II, Amersham Biosciences, Suécia);

- ✓ *Scanner* (modelo Ettan<sup>®</sup> DIGE Imager, Amersham Biosciences, Suécia);
- ✓ Sistema de purificação Milli-Q (modelo Quantum<sup>®</sup> cartridge, Millipore, França);
- ✓ Sistema eletroforético 2-D PAGE (modelo Ettan<sup>®</sup> Daltsix, GE Healthcare, Suécia);
- ✓ Termociclador para PCR (Mastercycler<sup>®</sup> Nexus Gradiente, Eppendorf, Brasil)
- ✓ Ultracentrífuga (modelo Bio-Spin-R, BioAgency, Brasil)
- ✓ Vidrarias de uso rotineiro em laboratório.

### 3.2 *Softwares* e bancos de dados

- ✓ 2D Platinum<sup>®</sup> 6.0 (GE Healthcare);
- ✓ Banco de dados NCBIInr (*Matrix Science Ltd* – fonte: [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com));
- ✓ DeCyder<sup>®</sup> 2-D Differential Analysis v.7.0 (GE Healthcare);
- ✓ DIGE<sup>®</sup> Imager Scanner Ettan (GE Healthcare)
- ✓ LabScan<sup>®</sup> (GE Healthcare)
- ✓ ProteinLynx<sup>®</sup> Global Server v.2.2. (Waters);
- ✓ Sistema MASCOT v.2.2. (*Matrix Science Ltd* – fonte: [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))

### 3.3 Reagentes e soluções

- ✓ Acetato de amônio,  $C_2H_7NO_2$  – 77,08 g mol<sup>-1</sup> (Mallinckrodt);
- ✓ Acetona,  $C_3H_6O$  – 58,08 g mol<sup>-1</sup> (Synth);
- ✓ ACN, grau HPLC,  $C_2H_3N$  – 58,10 g mol<sup>-1</sup> (Synth);
- ✓ Ácido acético glacial,  $C_2H_4O_2$  – 60,05 g mol<sup>-1</sup> (J. T. Baker);
- ✓ Ácido fosfórico,  $H_3PO_4$  – 98,00 g mol<sup>-1</sup> (Synth);
- ✓ Ácido clorídrico,  $HCl$  – 36,50 g mol<sup>-1</sup> (Merck);
- ✓ Acrilamida,  $C_3H_5NO$  – 71,08 g mol<sup>-1</sup> (USB);
- ✓ Agarose (BioAgency);
- ✓ Anfólitos pH 4-7 (Amersham Biosciences);
- ✓ Azul de bromofenol (BioAgency);
- ✓ Bicarbonato de amônio,  $(NH_4)HCO_3$  – 79,06 g mol<sup>-1</sup> (Mallinckrodt);
- ✓ Bisacrilamida,  $C_7H_{10}N_2H_2$  – 154,17 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences);
- ✓ BSA, padrão usado do Kit<sup>®</sup> 2D Quant (Amersham Biosciences);
- ✓ CBBG (T. J. Baker);
- ✓ CHAPS,  $C_{32}H_{58}N_2O_7S$  – 614,88 g mol<sup>-1</sup> (UBS);
- ✓ Cloreto de potássio,  $KCl$  – 74,55 g mol<sup>-1</sup> (Merck);
- ✓ Corantes fluorescentes (CyDye<sup>®</sup> DIGE Fluors, Amersham Biosciences)
- ✓ DMF,  $C_7H_7NO$  – 73,09 g mol<sup>-1</sup> (Sigma)
- ✓ DTT,  $C_4H_{10}O_2S_2$  – 154,24 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences);
- ✓ Etanol,  $C_2H_6O$  – 46,07 g mol<sup>-1</sup> (J. T. Baker)
- ✓ Fitas de focalização isoeletrica, gradiente de pH 4-7 (Immobiline<sup>®</sup>, Amersham Biosciences)
- ✓ Glicerol,  $C_3H_8O_3$  – 92,09 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences);
- ✓ Iodoacetamida,  $C_2H_4INO$  – 184,96 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences);
- ✓ Kit<sup>®</sup> 2D Quant (Amersham Biosciences)

- ✓ Kit<sup>®</sup> de calibração de baixa massa molecular, mistura de seis proteínas padrão – 14,4 kDa, 20,1 kDa, 30,0 kDa, 45,0 kDa, 66,0 kDa, 97 kDa (Amersham Biosciences);
- ✓ Kit<sup>®</sup> de calibração, mistura de padrão ácidos nucleicos – 100 pb a 4000 pb (Invitrogen<sup>®</sup>);
- ✓ Kit<sup>®</sup> de fluoróforos para sistema Ettan<sup>®</sup> DIGE (CyDye DIGE fluors, minimal dyes, Amersham Biosciences);
- ✓ Kit<sup>®</sup> para PCR (GoTaq Flex, Promega)
- ✓ Lisina C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 146,19 g mol<sup>-1</sup> (Sigma);
- ✓ Metanol, CH<sub>4</sub>O – 32,04 g mol<sup>-1</sup> (J. T. Baker)
- ✓ Óleo mineral (Amersham Biosciences)
- ✓ Persulfato de amônio, N<sub>2</sub>H<sub>8</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – 228,20 g mol<sup>-1</sup> (Mallinckrodt)
- ✓ PMSF, C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FO<sub>2</sub>S – 174,19 g mol<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich)
- ✓ SDS, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S – 288,28 g mol<sup>-1</sup> (Synth);
- ✓ TEMED, C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub> – 116,20 g mol<sup>-1</sup> (J. T. Baker)
- ✓ TFA, C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub> – 114,03 g mol<sup>-1</sup> (Merck);
- ✓ Tiourea, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>S – 76,12 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences)
- ✓ Tripsina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Tris, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N – 121,14 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences)
- ✓ Ureia, CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O – 60,06 g mol<sup>-1</sup> (Amersham Biosciences)

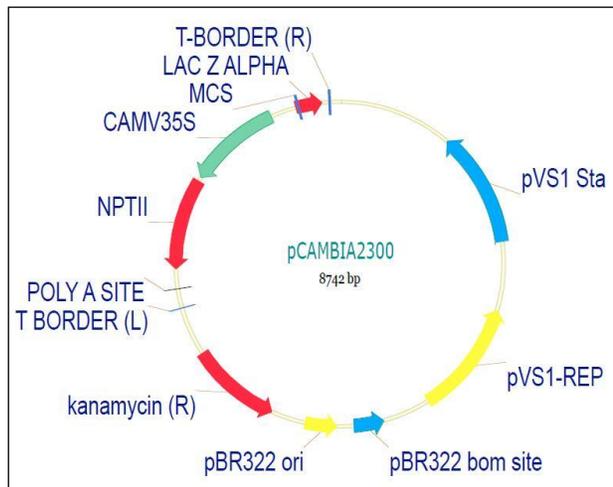
### 3.4 Material vegetal

As sementes transgênicas (T) e não-transgênicas (NT) da espécie *Arabidopsis thaliana* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (IQ/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil), oriundas do

trabalho de Gonçalves *et al.* (2012), cujo ecótipo originário das plantas NT é Columbia (Col-0). Ambas as sementes NT e a cepa GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens*), utilizada para transformação das plantas, foram originalmente obtidas pelo Prof. Michel Vincentz (CBMEG/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil).

O lote de sementes de *Arabidopsis thaliana* transgênica cedidas para esta Dissertação foi obtido de plantas transformadas com agrobactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens*. As características do plasmídeo Ti – “indutor de tumor”, que origina a doença de galha já descrita na seção **1.2** – destas bactérias é representada pelo vetor pCAMBIA 2300, que possui 8742 pb e pode ser visualizado na **Figura 7**. Além da vantagem desta espécie de agrobactéria transferir horizontalmente a sequência de interesse para o genoma da planta transformante, este vetor é caracterizado por mecanismos de transferência rotineiros bem elucidados (fonte: [www.cambia.org](http://www.cambia.org)). A sequência de interesse que é transferida ao genoma é T-DNA (DNA de transferência), que representa a região entre as bordas R e L. O T-DNA é caracterizado por sequências promotoras, neste caso, a sequência 35S, que é responsável pela regulação da expressão do gene para a planta inteira e é baseado em fragmento de gene viral (vírus do mosaico da couve-flor). O gene de interesse usado foi o *nptII*, que oferece resistência ao antibiótico canamicina, em plantas. As regiões do plasmídeo Ti fora do T-DNA, atuam como origem de replicação, estabilidade e indutores de catálise necessários para a agrobactéria hospedeira.

**Figura 7:** Esquema do vetor pCAMBIA 2300 contendo a região t-DNA para a *Arabidopsis thaliana*, que se situa entre as bordas R e L, e a região fora do t-DNA para a *Agrobacterium tumefaciens*



Fonte: [www.cambia.org](http://www.cambia.org)

Nas etapas de clonagem foram usados outros vetores, que aqui destaca-se o vetor pRT100, que é responsável pela inserção do promotor 35S mencionado.

Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), construídos a partir do T-DNA, foram comprados da empresa IDT (do inglês, “*Integrated DNA Technologies*”). A etapa de clonagem envolveu o vetor pGEM-T Easy (Promega), e para a subclonagem, os vetores pRT100 e pCAMBIA 2300 (fonte: [www.cambia.org](http://www.cambia.org)).

### 3.5 Condições do cultivo

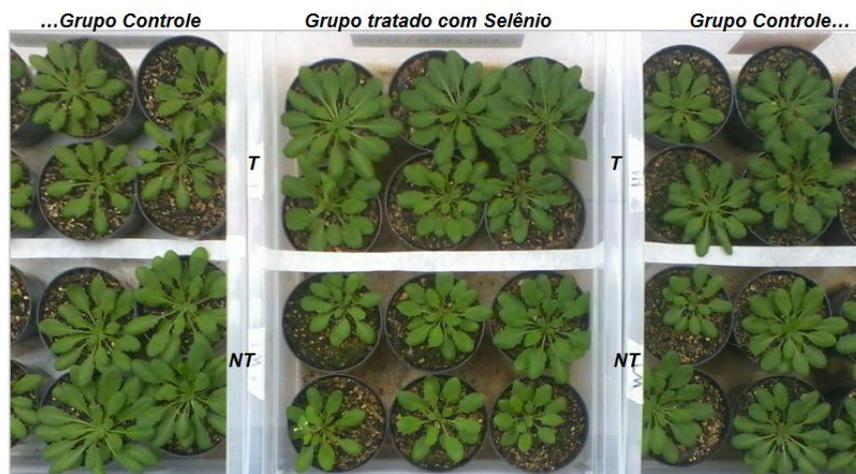
O tratamento do cultivo de *Arabidopsis thaliana* T e NT segue na **Tabela 1** e o manejo do cultivo pode ser representado pela **Figura 8**, onde as amostras de folha foram voltadas para extração do DNA e extração proteica, a ser visto neste capítulo (seção **3.6** e **3.7**, respectivamente), e também foram voltadas para imageamento elementar, a ser visto no próximo capítulo.

**Tabela 1:** Condições dos Grupos de *Arabidopsis thaliana* não-transgênicas (NT) e transgênicas (T)

Grupo <sup>a)</sup>	Irrigação
NT (controle)	Água ultrapura
Se-NT (tratado com Selênio)	Solução 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ <sup>b)</sup>
T (controle)	Água ultrapura
Se-T (tratado com Selênio)	Solução 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ <sup>b)</sup>

a) cada grupo continha 12 plantas; b) massa de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  acumulada ao final do cultivo: 0,88 mg

**Figura 8:** Parte do cultivo de *Arabidopsis thaliana* T e NT mostrando os grupos organizados de maneira alternada (cada grupo composto por 12 plantas) e após 57 dias de cultivo.



Fonte: Obtido de Câmera GE<sup>®</sup> Healthcare, modelo X550

A *priori*, as sementes NT e T foram incubadas em água ultrapura ( $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Millipore, Bedford<sup>®</sup>, USA) a 5°C por dois dias, para o processo biológico conhecido por “vernalização”. Em média, quatro sementes foram plantadas por vaso, onde cada continha cerca de 80 g de terra. A composição da terra era uma mistura 1:1 de substrato (Tropstrato HT Hortaliças, Vida Verde<sup>®</sup>) e vermiculita expandida (Terra Master<sup>®</sup>), ambos previamente autoclavados. Os vasos foram irrigados com a mesma fonte de água deionizada, o suficiente para o desenvolvimento das plantas durante 10 dias. O cultivo foi mantido em uma casa de vegetação (LGE – IB/UNICAMP) à temperatura regulada na faixa de 21 a 24 °C, em fotoperíodo de 12h-luz/12h-escuro. Após 10 dias do início do cultivo, em cada vaso, foi mantida a planta mais desenvolvida, e descartada adequadamente as demais. A irrigação das plantas foi feita três vezes por semana em dias alternados. O período do cultivo foi de 57 dias. Uma vez que o cultivo foi encerrado, as folhas frescas foram coletadas adequadamente, pesadas (grupos: NT com 53,99 g, Se-NT com 39,78 g, T com 56,63 g e Se-T com 54,75 g), lavadas com água ultrapura e armazenadas em refrigerador a -80°C.

### 3.6 Amostra de DNA das folhas T e NT

As amostras de folhas NT e T usadas foram aquelas do grupo “controle”, no qual foi tratado com água ultrapura ( $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Millipore, Bedford<sup>®</sup>, USA).

### 3.6.1 Preparo da amostra

O protocolo de extração foi adaptado de Zeng & Yang (2002), cujas modificações foram propostas por Provost *et al.* (2007). A solução extratora era baseada em 100 mmol L<sup>-1</sup> de Tris-HCl pH 8,0 e composta por 25 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 2 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,05% (m/v) de Espermidina, 2% (m/m) de PVP, 0,2g de CTAB, BME 2% e 10 mg de RNase.

A extração de DNA de folhas NT e T foi baseada em 1,0 g das respectivas amostras moído com nitrogênio líquido em almofariz. A solução extratora foi pré-aquecida à 65 °C. O material moído foi transferido para seus respectivos microtubos, e em cada um foi adicionado 1,0 mL de solução extratora, seguido de uma agitação por efeito *vortex* durante 15 s. A mistura foi incubada a 65 °C por 10 min, com breve agitação (*vortex*) em 3 intervalos deste tempo. Foi adicionado à mistura 1,0 mL de CIA na proporção de 24:1(v/v) e foi feita mistura por inversão durante 1 min. Transferiu-se para centrifugação em 10000 g por 10 min, à 4°C. A fase aquosa (superior) foi coletada e transferida para outro microtubo, devidamente gelado. Para precipitação do teor de DNA, foi adicionado 600 µL de isopropanol. A amostra foi incubada à -20 °C. Foi centrifugada em 10000 g por 20 min, à 4 °C e realizada duas etapas de lavagem: uma com 400 µL de etanol 70% (gelado) e outra com etanol absoluto. O *pellet* foi seco à 70°C por 10 min e a ressuspensão foi feita em 20 µL de água ultrapura ( $\geq 18$  M $\Omega$  cm, Millipore, Bedford<sup>®</sup>, USA).

### 3.6.2 Quantificação do teor de ácidos nucleicos totais

A concentração do material foram avaliadas com espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> 2000 (Thermo Scientific) usando uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$ , cujo o branco foi a mesma fonte de água deionizada.

### 3.6.3 Amplificação da sequência gênica

Os *primers* utilizados para PCR foram dos vetores *nptII* e pRT100 e a mistura para PCR consistiu em 2  $\mu\text{L}$  de tampão (GoTaq Flex, Promega), 0,8 $\mu\text{L}$  (concentração final – 2mmol  $\text{L}^{-1}$ ) de  $\text{MgCl}_2$  25 mmol  $\text{L}^{-1}$ , 6  $\mu\text{L}$  (concentração final – 0,8 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) de DnTP 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  (concentração final – 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) de *forward primer* 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  (concentração final – 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) *reverse primer* 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de BSA, 1,0  $\mu\text{L}$  (100 ng) de DNA da amostra (100ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de polimerase (GoTaq Flex, Promega) e água deionizada em quantidade suficiente para 10  $\mu\text{L}$ . O termociclador foi estabelecido segundo a sequência:

- I) 1 ciclo: em 94 °C por 5 min (desnaturação);
- II) 35 ciclos: em 94 °C por 45 s (desnaturação),  
em 50 °C por 45 s (anelamento),  
em 72 °C por 3 min (extensão);
- III) 1 ciclo: 72 °C por 7 min.

### 3.6.4 Separação da sequência gênica amplificada e detecção

A separação foi realizada em gel de agarose 1% (m/v) em 100 mL de solução tampão TAE, contendo 4  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A ordem de diluição para obtenção do tampão foi 10 vezes, a partir de uma solução TAE estoque, composta por: 2 mol  $\text{L}^{-1}$  de tris, 57,1 mL de ácido acético e 0,05 mol  $\text{L}^{-1}$  de EDTA. As condições de separação foram 90 V e 100W. O marcador utilizado na corrida foi uma mistura de 12 padrões entre 100 pb a 4000 pb (Invitrogen<sup>®</sup>), e a detecção foi realizada em exposição à radiação UV ( $\lambda = 265 \text{ nm}$ , Biosystems<sup>®</sup>).

## 3.7 Amostra de proteínas das folhas T e NT

As amostras de folhas NT e T usadas foram aquelas do grupo “controle”, no qual foi tratado com água ultrapura ( $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , Millipore, Bedford<sup>®</sup>, USA), e do grupo tratado com Selênio (vide **Tabela 1**). As extrações foram feitas em duplicata para cada grupo (NT, Se-NT, T, Se-T).

### 3.7.1 Preparo da amostra

Como ponto de partida, o protocolo para extração foi adaptado de Delaplace *et al.* (2006), e o procedimento foi desenvolvido com base em 1 g de amostra de folhas frescas NT e T. A amostra foi moída em um almofariz com nitrogênio líquido, e a ela foi adicionado 4,0 mL de solução extratora a base de 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  de Tris-HCl pH 7,5. Esta solução era composta por 0,7

mol L<sup>-1</sup> de Sacarose, 50 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> de tiouréia, 50 mmol L<sup>-1</sup> de DTT, 2 mmol L<sup>-1</sup> de PMSF. O material foi macerado vigorosamente por 15 min. O extrato foi transferido para uma ultracentrífuga (modelo Bio-Spin-R<sup>®</sup>, BioAgency, Brasil) cuja rotação foi 12857 g por 10 min, a 4 °C, a fim de decantar o material particulado. O sobrenadante foi coletado, e a ele foi feita uma extração por partição, adicionando-se 5,0 mL da solução extratora saturada com Fenol. O extrato foi agitado em misturador *vortex* (modelo M-37600<sup>®</sup>, Thermolyne, EUA) por 10 min, e a decantação foi obtida por centrifugação nas mesmas condições citadas. A fase fenólica (superior), que continha as proteínas, foi coletada. Duas etapas de lavagem foram realizadas na fase coletada e a solução usada consistiu na adição de 5,0 mL de solução extratora original (sem fenol). A agitação em *vortex* e decantação por centrifugação foi realizada no fim de cada etapa e, em todas elas, coletada a fase fenólica (superior).

Para precipitação das proteínas, foi adicionado 5,0 mL de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio em metanol, previamente gelada, para cada mL do extrato final obtido. Agitou-se de forma branda em misturador *vortex* e a precipitação foi submetida a -20 °C, por 24 h. A decantação do material precipitado foi feita por centrifugação com rotação de 1157 g por 10 min, a 4°C. Foram realizadas três etapas de lavagem do precipitado: duas consecutivas com a solução de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio em metanol, e, a última, com a solução de acetona 80% (v/v). Estas soluções eram devidamente geladas (-20 °C) e o procedimento seguido foi o mesmo das etapas de agitação e decantação mencionadas, descartando o sobrenadante em cada etapa. O precipitado final foi seco com gás nitrogênio.

A ressuspensão do precipitado foi feita em 300  $\mu\text{L}$  de solução apropriada a base de água ultrapura ( $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), composta por 7  $\text{mol L}^{-1}$  de uréia, 2  $\text{mol L}^{-1}$  de tiouréia, 2% (m/v) de CHAPS, 0.5% (v/v) de anfólitos (Amersham Biosciences<sup>TM</sup>) e 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de Tris em pH 8,8 (sem agente redutor), na qual a amostra foi agitada em aparelho *vortex* e centrifugada para retirada do material insolúvel, indesejado da etapa de quantificação.

### 3.7.2 Quantificação do teor de proteínas totais

A quantificação foi realizada por meio do kit<sup>®</sup> 2D Quant (GE Healthcare, Suécia), que oferece a determinação exata da concentração do teor proteico em pouco volume da alíquota. Esta vantagem leva ao bom aproveitamento das amostras, que são posteriormente analisadas por técnicas eletroforéticas de alta resolução, neste caso, a técnica 2-D PAGE, empregando, como extensão, a metodologia de análise quantitativa 2-D DIGE.

O padrão que acompanha este kit consiste em 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$  de BSA, cujas massas estabelecidas para a curva de calibração está na faixa de 0 a 50  $\mu\text{g}$ .

Os reagentes que acompanham o kit são: uma solução precipitante, uma solução co-precipitante, soluções colorimétricas A e B e uma solução de íons cobre livre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). A particularidade do ensaio é baseada na ligação específica dos íons cobre com as proteínas, cuja absorbância máxima ocorre no comprimento de onda  $\lambda = 480 \text{ nm}$  e decresce com a concentração da proteína.

As medidas foram realizadas em triplicata, usando alíquotas de 5  $\mu\text{L}$ .

### 3.7.3 Separação das espécies de proteínas por 2-D PAGE com extensão da metodologia 2-D DIGE

Um total de quatro grupos foi estabelecido para análise quantitativa das proteínas diferenciais: (1) NT x T , (2) NT x Se-NT, (3) T x Se-T e (4) Se-NT x Se-T (vide **Tabela 2**). Cada grupo de géis foi preparado em quadruplicata.

**Tabela 2:** Esquema da metodologia 2-D DIGE. Marcação feita em cada amostra com os respectivos fluoróforos, antes da separação por 2-D PAGE

Gel	fluoróforo Cy3 <sup>a)</sup>	fluoróforo Cy5 <sup>a)</sup>	fluoróforo Cy2 <sup>b)</sup>
<i>Grupo comparativo: NT x T</i>			
1	NT	T	NT + T
2	NT	T	NT + T
3	T	NT	NT + T
4	T	NT	NT + T
<i>Grupo comparativo: NT x Se-NT</i>			
5	NT	Se-NT	NT + Se-NT
6	NT	Se-NT	NT + Se-NT
7	Se-NT	NT	NT + Se-NT
8	Se-NT	NT	NT + Se-NT
<i>Grupo comparativo: T x Se-T</i>			
9	T	Se-T	T + Se-T
10	T	Se-T	T + Se-T
11	Se-T	T	T + Se-T
12	Se-T	T	T + Se-T

<b>Grupo comparativo: Se-NT x Se-T</b>			
<b>13</b>	Se-NT	Se-T	Se-NT + Se-T
<b>14</b>	Se-NT	Se-T	Se-NT + Se-T
<b>15</b>	Se-T	Se-NT	Se-NT + Se-T
<b>16</b>	Se-T	Se-NT	Se-NT + Se-T

a) 50 µg de amostra marcados com o fluoróforo; b) total de 50 µg (25 µg +25 µg) de amostras marcados com o fluoróforo como padrão interno.

A metodologia 2-D DIGE consiste em marcar as amostras de proteínas de acordo com o protocolo do fabricante para a marcação mínima (GE Healthcare). Para marcação com corantes (CyDye® DIGE Fluor minimal, GE Healthcare), baseados nos dados de quantificação do teor proteico, 50 µg de cada amostra foi marcada com 400 pmol (0,8 µL) de corante, seguido da incubação em gelo durante 30 min, no escuro. Para cada replicata, uma amostra foi marcada com Cy3, a outra amostra com Cy5, e o padrão interno com Cy2, também feitas marcações trocadas entre os corantes para corrigir qualquer desvio introduzido pelas diferentes características de fluorescência na acrilamida nos diferentes comprimentos de onda de excitação de Cy3 e Cy5. O padrão interno, marcado com Cy2, consistiu de uma amostra combinada composta por quantidades iguais de cada uma das amostras utilizadas para cada quadruplicata. O corante Cy2, em si, é considerado um normalizador (LIN *et al.*, 2012), aumentando a confiança estatística para quantificação entre os diferentes géis. As reações foram encerradas por meio da adição de 1mL de 10 mmol L<sup>-1</sup> de lisina, seguida por uma incubação durante 10 min adicionais. Cada amostra de proteína marcada foi diluída com uma solução de reidratação.

As condições de separação em primeira e segunda dimensão seguem na **Tabela 3**. A focalização isoeétrica (separação eletroforética de primeira dimensão) foi realizada com fitas tipo Immobiline<sup>®</sup> (pH 4-7, 13 centímetros, GE Healthcare), acumulando 14600 Vh. Na segunda dimensão, os géis finais consistiam em poliacrilamida 12,5% [acrilamida 30% (m/v) com Bisacrilamida 0,8% (m/v)] e as proporções dos reagentes de acordo com o protocolo elucidado (GE Healthcare).

**Tabela 3:** Condições para separação por 2-D PAGE com metodologia 2-D DIGE

<b>1<sup>a</sup>. dimensão: focalização isoeétrica (gradiente de pH 4 - 7)</b>			
<b>Etapa</b>	500 V		500 Vh
<b>Gradiente</b>	1000 V		800 Vh
<b>Gradiente</b>	10000 V		11300 Vh
<b>Etapa</b>	10000 V		2000 Vh
<b>2<sup>a</sup>. dimensão: separação por tamanho [em kDa<sup>a</sup>]</b>			
<b>Parte I</b>	90 V	15 mA (por gel)	100 W
<b>Parte II</b>	200 V	30 mA (por gel)	100W

*a) Gel com estimativa de tamanho das espécies de proteínas, a priori, otimizado, usando padrão de mistura proteica de baixa massa molecular, 14,4 kDa a 97,0 kDa (Amersham<sup>®</sup> kit, GE Healthcare)*

Para a detecção dos *spots* proteicos, os géis foram digitalizados com um aparelho DIGE<sup>®</sup> Imager Scanner Ettan (GE Healthcare), para analisar as diferenças no proteoma.

### 3.7.4 Análise dos *spots* proteicos

Um analisador de imagem diferencial (DeCyder<sup>®</sup>, GE Healthcare) foi usado para análise de imagem na detecção de *spots* correspondentes entre os géis, e normalização com base no padrão interno combinado antes da quantificação dos *spots*. Um fator de regulação de 1,5 (50% de variação) foi escolhido como também determinado pelo programa de análise de imagem DeCyder<sup>®</sup> D-2 versão 7.0 (GE Healthcare). A intensidade diferencial foi considerada estatisticamente significativa com base no teste *t* de Student, para  $p < 0,05$ .

### 3.7.5 Identificação por ESI-QTOF-MS/MS

Após análise da imagem, foram preparados géis 2-D PAGE, usando as mesmas condições da **Tabela 3**, e 500 µg de massa de amostra.

Para a digestão dos *spots* proteicos, os géis foram cortados manualmente e colocados em uma placa contendo resina de afinidade de peptídeos de micro-SPE, usando o kit<sup>®</sup> Montage In-Gel digestZP (Millipore, Bedford, USA). A digestão e protocolos de eluição a vácuo foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Foi feita a remoção de corante Coomassie, utilizando acetonitrila, seguido por digestão com tripsina (utilizando 166 ng de enzima para cada *spot* cortado) a 37 °C por 3 h. Em seguida, uma etapa de limpeza foi feita, usando 130 µL de solução de TFA 0,2% (v/v). Finalmente, os peptídeos purificados foram eluídos a partir da resina, utilizando 20 µL de 0,1% (v/v) de TFA 50% (v/v) com acetonitrila. Para eluição à vácuo, foi utilizado um Manifold<sup>®</sup> Multiscreen Vacuum

(Millipore), e foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de água deionizada à solução resultante de peptídeos purificados da etapa de digestão, referentes a cada spot proteico, nos quais foram concentrados com concentrador (concentrador SeepVac<sup>®</sup> Savant, modelo SPD131DDA, Thermo Scientific) até o volume final cerca de 20  $\mu\text{L}$ . A solução concentrada foi centrifugada a 17000  $g$  por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para frascos apropriados para análise por LC-MS.

As análises dos peptídeos presentes nos digeridos proteicos por LC-MS foram realizadas em cromatógrafo UPLC (nanoAcquity<sup>®</sup>, Waters) acoplado a um espectrômetro (Synapt<sup>®</sup> HDMS, Waters), equipado com fonte de nanoESI. Tipicamente, 4,5  $\mu\text{L}$  de amostra aquosa foram injetados pelo auto-injetor do sistema nUPLC e direcionados a uma pré-coluna (Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 20 mm  $\times$  180  $\mu\text{m}$  d.i., partículas de 5  $\mu\text{m}$ , Waters), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0  $\mu\text{L min}^{-1}$  de 97:3 H<sub>2</sub>O/MeCN com 0,1% ácido fórmico (v/v), sendo, então, transferidas para a coluna analítica (BEH130<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, 100 mm  $\times$  100  $\mu\text{m}$  i.d., partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters) e eluídas com fluxo de 1,0  $\mu\text{L min}^{-1}$ , com um gradiente linear, estabelecido na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Eluição por Gradiente em sistema UPLC acoplado a espectrometria de massas

Tempo (min)	% A <sup>a)</sup>	% B <sup>b)</sup>
0	97	3
5	85	15
10	65	35
22	40	60
26	3	97
28	97	3
30	97	3

a) A = H<sub>2</sub>O com ácido fórmico 0,1% (v/v); b) B = MeCN com ácido fórmico 0,1% (v/v)

A detecção dos peptídeos foi feita pelo espectrômetro de massas de forma *online*, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (*full scan* de  $m/z$  200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*). Os demais parâmetros do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100 °C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L h<sup>-1</sup>, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (*full scan*) e MS/MS (espectro de íons fragmentos por dissociação induzida por colisão) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s<sup>-1</sup>. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico [solução de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05% (v/v) em H<sub>2</sub>O/MeCN 50:50] de  $m/z$  90 a 1960. Argônio a uma pressão de 9,7 x 10<sup>-3</sup> mbar foi utilizado como gás de colisão. As corridas de LC-MS foram processadas pelo *software* ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas via MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd)

por busca em banco de dados NCBI. Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até um sítio de clivagem ignorado, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos, ambos em  $\pm 0,1$  Da.

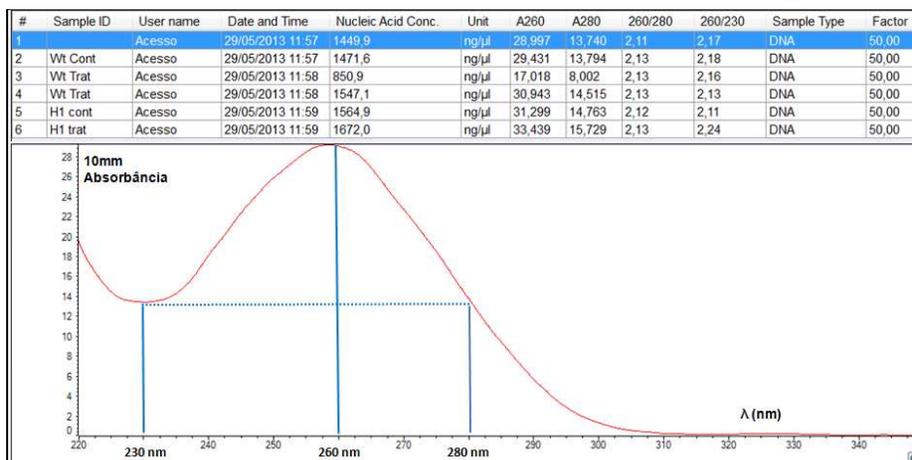
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Detecção da transgenia

#### 4.1.1 Dados de quantificação do teor de ácidos nucleicos

A quantificação foi baseada na razão entre absorvância máxima (em  $\lambda = 260$  nm) e mínima (em  $\lambda = 230$  nm), e integrada até  $\lambda = 280$  nm. De acordo com estas razões, a busca em banco de dados com parâmetros relativos aos ácidos nucleicos foi feita no próprio *software* do equipamento, cuja quantificação foi expressa em  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  (**Figura 9**). Com base nos dados de quantificação, o DNA foi diluído para  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para posteriores etapas de amplificação.

**Figura 9:** Gráfico da quantificação de ácidos nucleicos (em  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) baseada na razão entre as absorvâncias máxima e mínima



**Fonte:** Obtido de equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)

#### 4.1.2 Amplificação da sequência baseada na transgenia

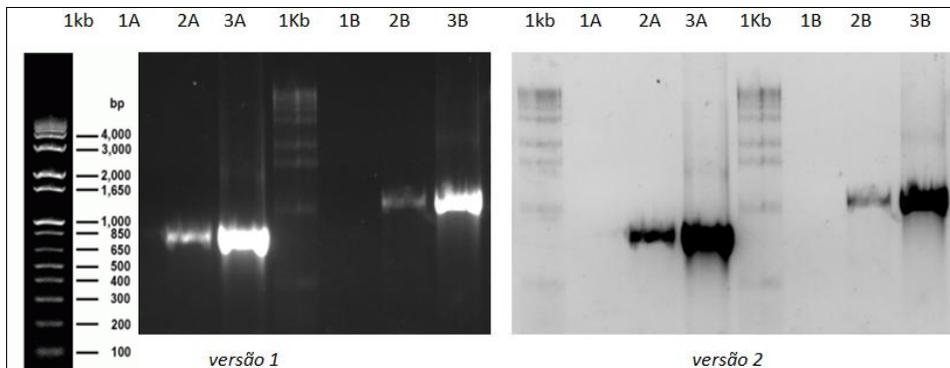
A detecção da transgenia foi realizada em amostras de DNA obtida de folhas transgênicas. Os *primers* foram desenhados dentro da sequência exógena inserida por t-DNA (Gonçalves *et al.*, 2012), sendo, assim, a sequência de *nptII* (gene de resistência à canamicina em plantas) e pRT100, presentes no vetor pCAMBIA 2300, foram escolhidas.

Como controle negativo foi usado o DNA da amostra de folhas NT, e como controle positivo, foi usado o próprio vetor de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, o pCAMBIA 2300 (Gonçalves *et al.*, 2012).

Estes experimentos foram realizados com intuito de explicitar as diferenças entre dos genomas das plantas NT e T, baseado na transformação realizada.

Os resultados mostraram que ambos os *primers* amplificaram a sequência gênica baseada no gene exógeno, no qual os *primers* relativos à sequência de pRT100 apresentaram amplificação menos intensa, comparado com *nptII* (vide **Figura 10**), ao passo que o DNA das plantas NT apresentou controle negativo, e o plasmídeo pCAMBIA apresentou controle positivo, como esperado. Estes resultados mostram de maneira evidente, que o DNA das plantas T possui presença de algumas sequências do t-DNA e, logo, a autenticidade da planta T como “transgênica” para seguimento da análise proteômica, que será prosseguida neste capítulo.

**Figura 10:** Gel de Agarose 1% (m/v) mostra confirmação da modificação genética em DNA de plantas T, baseado nos *primers* de *nptII* e pRT100, onde: 1 kb *ladder* (Invitrogen®) que varia de 100 a 4000 pb, 1: DNA da planta NT, 2: DNA da planta T, 3: vetor pCambia 2300 contendo 35S + poliA, A: *primers* para sequência *nptII* ( $\approx 700$  bp), B: *primers* para a sequência pRT100 ( $\approx 1100$  bp).

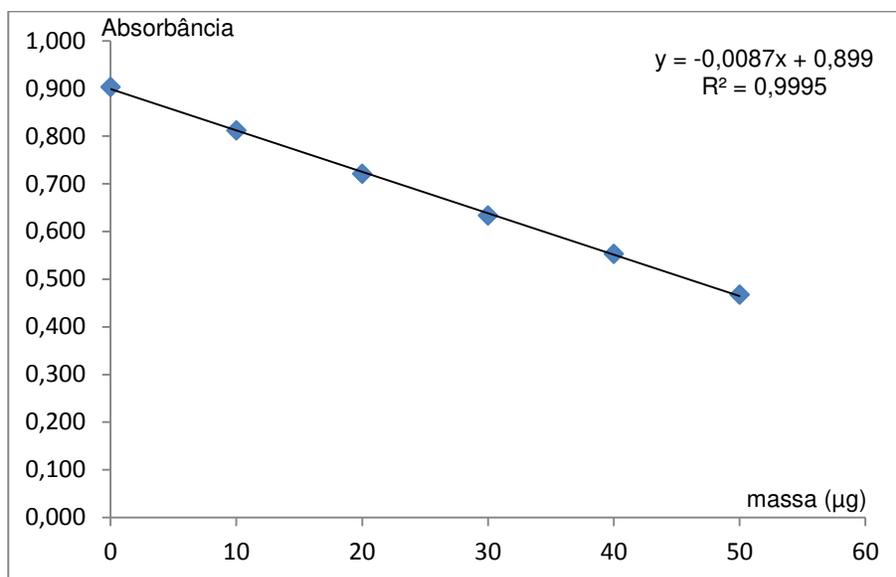


**Fonte:** Obtido de aparelho Biosystems, com exposição UV (265 nm)

## 4.2 Análise proteômica

### 4.2.1 Dados de quantificação do teor proteico

O uso do kit 2-D Quant<sup>®</sup> para quantificação do teor proteico apresentou curva de calibração com boa resposta linear, no caso  $R^2 = 0,999$  (vide **Figura 11**).

**Figura 11:** Gráfico da curva de calibração baseada em padrão BSA.

**Fonte:** Obtido via Excel<sup>®</sup> (Microsoft)

A **Tabela 5** mostra os dados da quantificação de cada amostra. A mescla das duas réplicas de extração de cada amostra foi também quantificada e, *a posteriori*, foi destinada às duas separações eletroforéticas, uma voltada para análise por 2-D DIGE (vide seção **3.7.3**), e a outra voltada para identificação das espécies de proteínas por espectrometria de massas (vide seção **3.7.5**).

**Tabela 5:** Dados da quantificação do teor proteico de folhas de *Arabidopsis thaliana* de cada réplica de extração, na qual foi utilizada a junção para as etapas de separação eletroforética

Grupo <sup>a)</sup>	Réplicas de extração	Massa, µg (em 5 µL)
NT (controle)	1	22,069
	2	16,552
	mescla 1 e 2	17,816
Se-NT (tratado com Selênio) <sup>b)</sup>	3	12,874
	4	13,678
	mescla 3 e 4	17,586
T (controle)	5	17,816
	6	18,506
	mescla 5 e 6	14,425
Se-T (tratado com Selênio) <sup>b)</sup>	7	19,655
	8	18,621
	mescla 7 e 8	18,736

a) cada grupo continha 12 plantas; b) massa de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> acumulada ao final do cultivo: 0,88 mg

#### 4.2.2 Detecção e análise das proteínas diferenciais

A técnica 2-D DIGE foi usada para visualizar, quantitativamente, as proteínas diferenciais em abundância, por meio dos perfis proteicos das amostras de folha NT e T de *Arabidopsis thaliana*, onde cada grupo de comparação foi baseado em quatro replicatas biológicas, como pode ser visto nas **Figuras 12 – 14**.

Neste estudo, as diferenças na abundância entre proteínas, que são relativas às intensidades resolvidas pelos fluoróforos, foram detectadas usando um fator de regulação  $\geq 1,5$  (variação de 50%), em que 68 proteínas foram diferencialmente encontradas, com significância estatística baseada no teste de  $t$  para  $p < 0,05$ . Dentro deste total:

- ✓ 08 pertencem ao grupo NT  $\times$  T: 01 mais abundante e 07 menos abundantes para T em relação a NT;
- ✓ 27 pertencem ao grupo NT  $\times$  Se-NT: 14 menos abundantes e 13 mais abundantes para Se-NT em relação a NT;
- ✓ 33 pertencem ao grupo Se-NT  $\times$  Se-T: 13 mais abundante e 20 menos abundante para Se-NT em relação a Se-T.

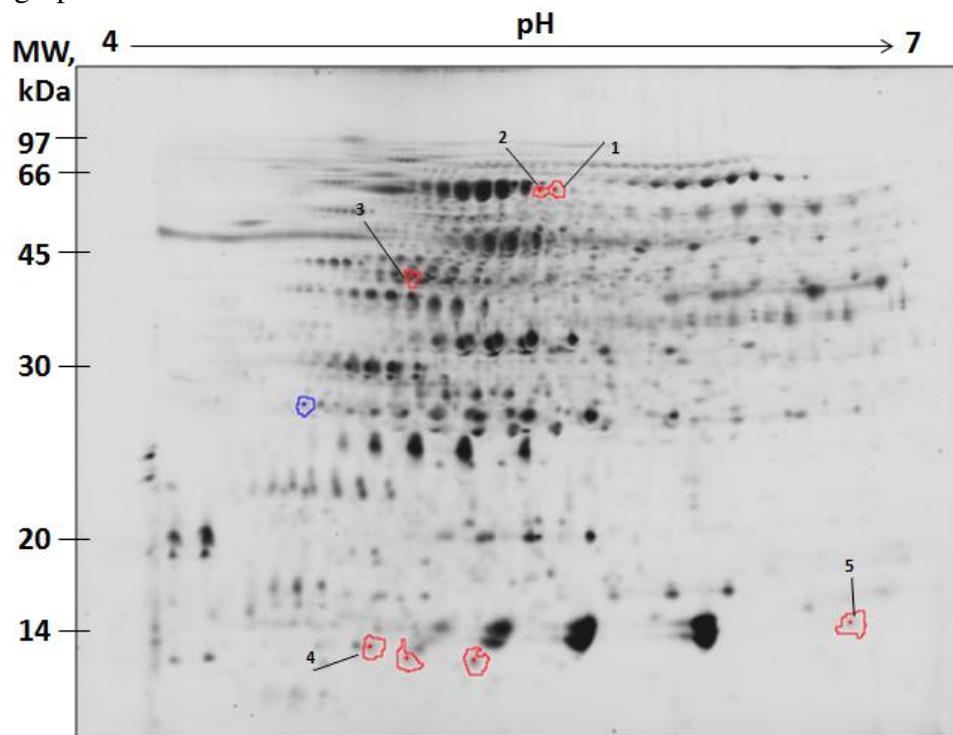
Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas para o grupo T  $\times$  Se-T.

Depois de verificar estes resultados, é possível concluir que a condição mais diferencial foi aquela onde o Selênio foi adicionado ao cultivo, quando comparado com a transgenia em si, onde pequenas diferenças no mapa proteômico – somente 08 proteínas diferenciais – foram obtidas comparando plantas NT  $\times$  T, as quais não foram tratadas com Selênio. Este resultado está em um caminho contrário àqueles obtidos por nosso grupo de pesquisa em trabalho com soja transgênica (ARRUDA *et al.*, 2013), onde mais de 70 espécies de proteínas foram diferencialmente encontradas quando comparadas com a soja NT e T. Este fato indica que o comportamento em termos de proteínas diferenciais é dependente da modificação genética que, naquele caso, o objetivo da era produzir sojas resistentes ao herbicida glifosato.

A informação estatística em relação ao teste de  $t$  (para  $p < 0,05$ ), bem como a razão do volume médio destes *spots* estão descritos nas tabelas dos

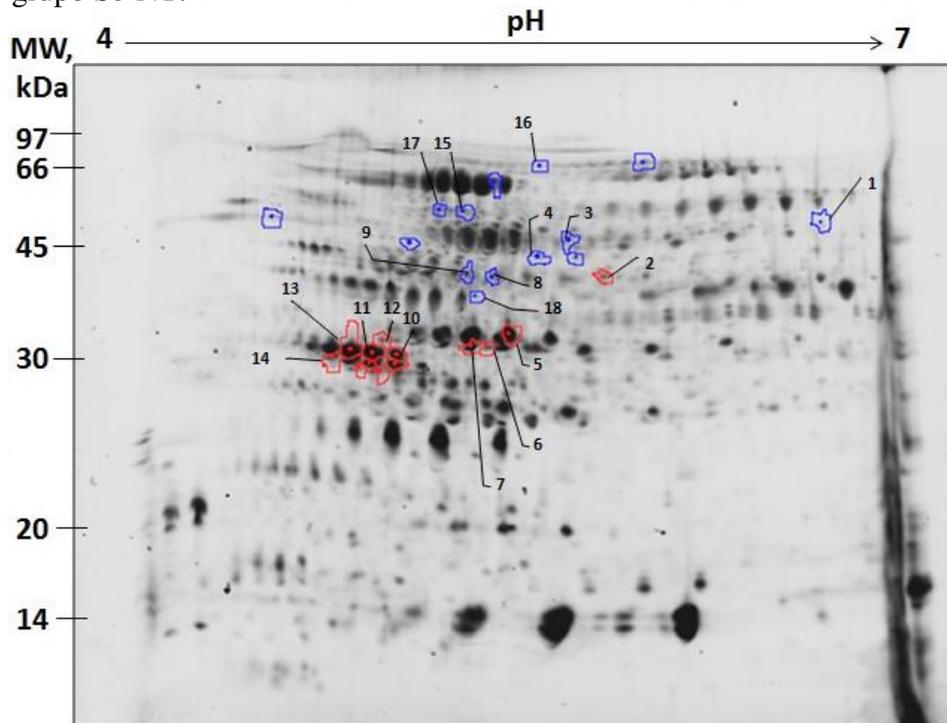
APÊNDICES A – C. Adicionalmente, os volumes médios mostraram extremas diferenças entre as espécies de proteínas em cada grupo investigado.

**Figura 12:** Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos NT x T. Em azul, espécies de proteínas do grupo T, e, em vermelho, do grupo NT.

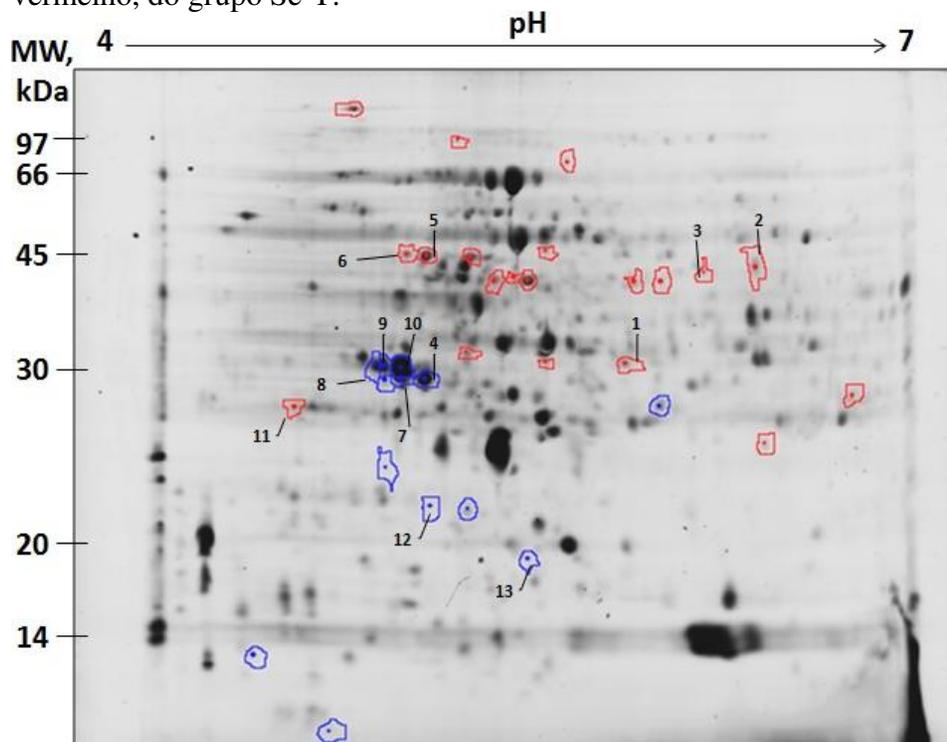


Fonte: Obtido do *Scanner*, modelo Ettan<sup>®</sup> DIGE Imager

\* **Figura 13:** Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos NT x Se-NT. Em azul, espécies de proteínas do grupo NT, e, em vermelho, do grupo Se-NT.



\* **Figura 14:** Gel 2-D DIGE das proteínas de folha obtidas dos grupos Se-NT x Se-T. Em azul, espécies de proteínas do grupo Se-NT, e, em vermelho, do grupo Se-T.



\* **Fonte:** Obtido do Scanner, modelo Ettan<sup>®</sup> DIGE Imager

### 4.2.3 Proteínas diferenciais identificadas

As **Figuras 12 – 14** mostram a localização dos spots analisados por 2-D DIGE, via programa analisador de imagem diferencial (DeCyder). Das proteínas diferenciais encontradas, 27 foram identificadas, das quais 03 correspondem ao grupo NT x T, 15 do grupo NT x Se-NT e 09 do grupo Se-NT x Se-T (ver as tabelas nos **APÊNDICES A – C**).

### 4.2.4 Eventos bioquímicos relacionados

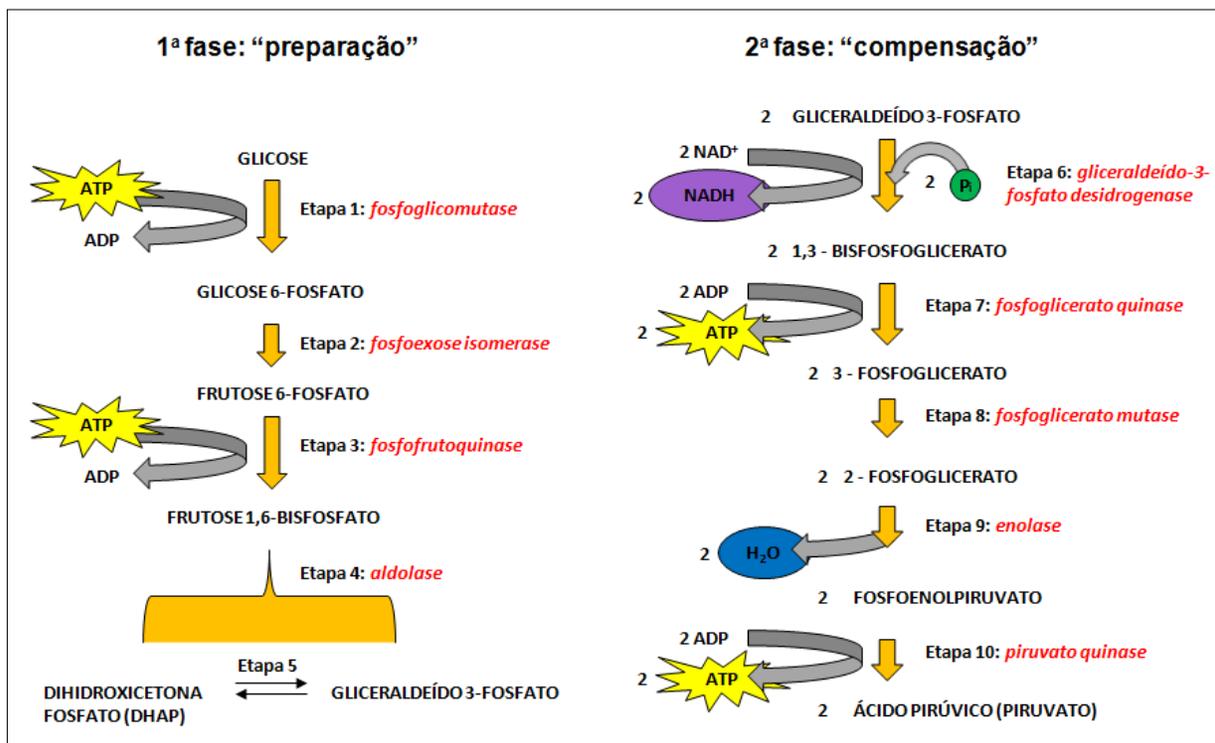
#### 4.2.4.1 Via da Glicólise

A análise dos grupos NT e Se-NT revela que a maioria das proteínas diferenciais desenvolve funções metabólicas, as quais são diferentes daquelas encontradas no grupo NT x T, bem como função energética. Neste sentido, a *Fructose-bisphosphate aldolase* (At4g38970/F19H22\_70) e *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit* podem ser exemplificadas, nas quais são mais abundantes no grupo Se-NT, comparado com o grupo NT. Estas proteínas estão envolvidas na glicólise, uma via catabólica que está dividida em duas fases: uma fase “preparatória”, que consiste em cinco etapas envolvidas na fosforilação da glicose e na sua conversão em gliceraldeído-3-fosfato, e a outra fase é intitulada como “compensação”, que consiste em cinco etapas, e está envolvida na conversão oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato em piruvato (vide **Figura 15**).

A *Fructose-bisphosphate aldolase* participa da primeira fase deste processo e sua função é a clivagem da frutose-1,6-bisfosfato, formando

gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (DHAP), e a *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit* participa da segunda fase, cuja função catalítica é a oxidação e fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, sendo que o NADH é formado nesta etapa. Uma vez que estas enzimas atuam juntas na glicólise, pode-se supor que suas abundâncias nas plantas Se-NT têm sido estimuladas. Como exemplo, a *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit* tem um resíduo de cisteína no seu centro catalítico, que pode ter sido substituído por uma selenocisteína bioativa, uma vez que o S e o Se apresentam similaridade nos tipos de ligações químicas, cuja diferença é o Se ser mais reativo que o S.

**Figura 15:** Via da Glicólise dividida em 2 fases, nas quais a espécie identificada *Fructose-bisphosphate aldolase* participa da 1ª fase e a espécie *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B subunit*, da 2ª fase.



**Fonte:** Adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2006.

#### 4.2.4.2 Ciclo de Calvin

*RuBisCO*, que está envolvida na primeira etapa do ciclo de Calvin (fixação do  $\text{CO}_2$ ), e *Chaperonin Hsp60* atua no enovelamento da *RuBisCO*. Ambas as proteínas foram abundantes no grupo NT, e estão de acordo com *RuBisCO activase (RCA – At2g39730/T517.3)*, que é um membro da família dessas proteínas, apresenta atividade de ATPase, função de chaperona e está associada em uma diversidade de respostas celulares. De fato, *RCA* apresentou o mesmo fator de regulação que *RuBisCO*, igual a -1,74. Como consequência da ligação do ATP em *RCA*, que contribui para o processo de assimilação de  $\text{CO}_2$ , essas proteínas podem ter influenciado o fenótipo, em termos de massa orgânica, como observado durante o período do cultivo, uma vez que as plantas foram mais bem desenvolvidas (vide **Figura 16**).

**Figura 16:** Diferenças fenotípicas mostram que 12 plantas Se-NT apresentaram menor massa fresca (39,78g) a comparado com 12 plantas NT (53,99g).



**Fonte:** Obtido de Câmera GE<sup>®</sup> Healthcare, modelo X550

#### 4.2.4.3 Perturbação na homeostase iônica

Por outro lado, o grupo Se-NT apresentou uma baixa produção de massa orgânica, devido, provavelmente, ao tratamento com  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , por conta do estresse salino relacionado ao Sódio. Quando os eletrólitos são adicionados na zona das raízes, eles aumentam a condutividade elétrica, que tem relação com o efeito osmótico: quanto maior a condutividade, menor o potencial osmótico. Isto quer dizer que o balanço hídrico das plantas é afetado, ou seja, o potencial hídrico também se torna baixo. Isto retarda o crescimento celular, o que, de longe, mostra que as plantas crescem mais lentamente, conforme observado no grupo Se-NT.

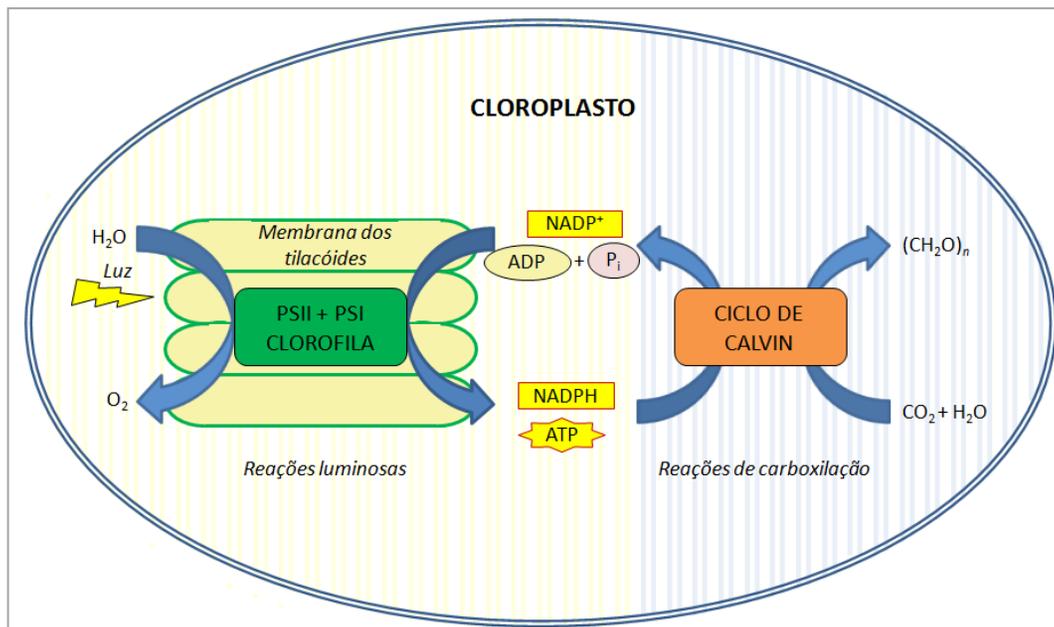
As análises de genômica e proteômica em *Arabidopsis thaliana* revelaram que um conjunto de genes é regulado por estresse abiótico induzido (XIONG *et al.*, 2002), onde os resultados obtidos aqui corroboram com este estudo, por meio da maior abundância da **Proteína 1 ligada a cátion**, que é associada à membrana plasmática (PCaP1) no grupo Se-NT. Tal proteína está envolvida na sinalização intracelular por meio da interação com os fosfatidilinositol fosfatos (PtdInsPs) e calmodulina (CaM – proteína que modula o cálcio), onde os PtdInsPs são ligados à membrana plasmática (no N-terminal) até que a  $\text{Ca}^{2+}$  – CaM atinja uma concentração competitiva (IDE *et al.*, 2007; KATO *et al.*, 2010). Embora a PCaP1 esteja em alta abundância no grupo Se-NT, sua contribuição no sistema não compensa com o estímulo competitivo do  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Embora a presença do Selênio seja mais influente (vide 4.2.4.4), por conta de que sua concentração está consideravelmente mais elevada que o detectado em solos comerciais, em parte, o  $\text{Na}^+$  pode ter tido

certa toxicidade (vulnerável em plantas glicófitas), pois é responsável por inativar enzimas e inibir síntese de proteínas, ocasionando certa perturbação na homeostase iônica, promovendo a saída de  $K^+$  deslocando  $Ca^{2+}$  para membrana plasmática. Uma vez que a proteína PCaP1 depende de  $Ca^{2+}$ , ela produz uma regulação negativa no alongamento celular do hipocótilo das plantas, devido à falta do cátion (LI, 2011). Para o grupo Se-NT, este foi o caso.

#### 4.2.4.4 Estresse oxidativo

Na análise comparativa entre os grupos NT x Se-NT e Se-NT x Se-T, a proteína de **33 kDa oxygen-evolving** está mais abundante no grupo Se-NT. Esta proteína, e, também, a proteína **Oxygen-evolving enhancer 1-2**, estão relacionadas no Fotossistema II (PSII), que é o sistema da fotossíntese responsável por oxidar a água em oxigênio ( $O_2$ ) (TAIZ & ZEIGER, 2006). Estas espécies de proteínas mostram uma relação de regulação com as espécies reativas de oxigênio (ERO), uma vez que o agente redutor (ferredoxina) do Fotossistema I é forte o suficiente para reduzir  $O_2$  em superóxido ( $O_2^-$ ). A baixa abundância de **RuBisCO** no grupo Se-NT poderia ser um indicativo da presença de ERO, e um estímulo para a regulação destas proteínas (vide **Figura 17**).

**Figura 17:** Esquema de um cloroplasto, organela pertencente à célula vegetal, mostra a dependência dos Fotossistemas I e II com o Ciclo de Calvin. Justifica para os grupo Se-NT a alta abundância das espécies de proteínas responsáveis pela produção de ERO's, e baixa produção de massa orgânica relativa à RuBisCO.



Fonte: Adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2006.

#### 4.2.4.5 Defesa vegetal e outros eventos

Os grupos Se-NT x Se-T apresentaram a *Isocitrate dehydrogenase*, que pode ser envolvida na resposta ao estresse oxidativo. Essa proteína está presente em alta abundância no grupo Se-T, mostrando que as plantas transgênicas estão buscando por um novo equilíbrio a fim de evitar as ERO. Entretanto, quando comparado aos grupos T x Se-T, nenhuma proteína diferencial foi obtida. É interessante enfatizar que as plantas do grupo Se-NT apresentaram alta abundância de *glycine-rich RNA-binding Protein 7*, que

está envolvida na resposta celular para o ambiente e as condições de desenvolvimento, indicando uma alta probabilidade de ocorrência de estresse em tais plantas.

Finalmente, é interessante também comentar que, no trabalho de Arruda *et al.* (2013), foi realizado estudo proteômico comparativo em folhas de soja de plantas NT e T, e resultados similares foram, também, obtidos. Considerando apenas o efeito da transgenia da soja com o efeito da transgenia induzido por Selênio na *Arabidopsis thaliana*, proteínas diferenciais em comum foram identificadas, tais como *Oxygen-evolving complex Protein 1*, *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO)*, *Fructose-bisphosphate aldolase 1*, *Phosphoglycerate Kinase 1* e *N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like*, que sugerem à planta transgênica uma tendência de busca por um novo equilíbrio.

## **5 CONCLUSÕES PARCIAIS**

A partir dos grupos comparativos avaliados, 68 espécies de proteínas foram diferencialmente encontradas, empregando-se um fator de regulação  $\geq 1,5$ , com significância estatística baseada no teste *t* de Student, para  $p < 0,05$ . Destas espécies, 27 foram caracterizadas e estão envolvidas na via da Glicólise, Fotossistemas I e II e combate às ERO, e foram classificadas em algumas categorias, tais como metabolismo, energia, transdução de sinal e doença/defesa. Além das diferenças entre os proteomas de plantas não transgênicas e transgênicas, a produção de proteínas se mostrou bastante alterada para a planta não transgênica, que recebeu adição de Selênio, ao passo que as plantas transgênicas não se mostraram significativamente alteradas com a adição deste elemento.





## **CAPÍTULO II**

---

Imageamento das folhas de *Arabidopsis thaliana* transgênica e não transgênica e avaliação da distribuição de Selênio e Enxofre via ablação a *laser* acoplado ao espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente [LA(i)-ICP-MS]



## **6 REVISÃO DA LITERATURA**

### **6.1 Nutrição mineral**

As plantas são organismos capazes de sintetizar seus próprios componentes orgânicos a partir dos nutrientes inorgânicos disponíveis no ambiente, por isso são denominadas como “organismos autotróficos”. Por conta disso, os estudos do modo como as plantas obtêm os nutrientes e os utilizam se relacionam à “nutrição mineral” (TAIZ & ZEIGER, 2006). A importância destes estudos tem contribuído para agricultura moderna e à proteção ambiental, onde a produtividade dos cultivos depende da maneira como os solos são fertilizados e, portanto, atenção esta em avaliar por meio de investigações que elucidem a translocação dos elementos essenciais nos tecidos vegetais por meio das rotas metabólicas (ATKINSON *et al.*, 2010).

Um elemento é dito “essencial” quando este compõe a estrutura ou metabolismo de uma planta, sendo que na sua ausência, problemas severos são acarretados no desenvolvimento e reprodução vegetal. Os elementos essenciais são frequentemente classificados quando às suas concentrações no tecido vegetal, em termos de “macro” e “micronutrientes”, exceto pelos elementos Hidrogênio, Carbono e Oxigênio, que não são considerados nutrientes minerais porque são obtidos primariamente da água ou dióxido de carbono (TAIZ & ZEIGER, 2006). Alguns pesquisadores argumentam que esta classificação é difícil de ser justificada do ponto de vista fisiológico em relação à necessidade nutritiva para cada espécie, pois existem tecidos vegetais que possuem micronutrientes no mesmo nível que macronutrientes, como é o caso do mesófilo, que possui quase tanto ferro e manganês quanto

Enxofre e Magnésio (BRUIJNZEEL *et al.*, 2011). Então MENGEL & KIRKBY (1987) propuseram que os elementos essenciais fossem classificados em quatro grupos básicos quanto ao papel bioquímico e função fisiológica, tais como os nutrientes que fazem parte: dos compostos de carbono da armazenagem de energia/integridade estrutural, da regulação nos potenciais osmóticos/atuação como cofatores de enzimas e das reações envolvendo transporte de elétrons.

Com base nisso, a análise comparativa de plantios expostos e não expostos aos nutrientes é uma maneira típica de avaliá-los nos tecidos vegetais conforme os níveis de exposição, classificados em faixas como deficiente, adequado e tóxico.

### 6.1.1 O elemento Selênio (Se)

O Se é um elemento que possui ocorrência natural nas plantas, pois possui a mesma similaridade nos tipos de ligação do Enxofre (S), no qual o segundo é um macronutriente – mencionado na seção 6.1. O S está presente em dois aminoácidos (cisteína e metionina) e constitui várias coenzimas e vitaminas (acetil coenzima A, S-adenosilmetionina, biotina, vitamina B<sub>1</sub>, ácido pantotênico) essenciais no metabolismo (TAIZ & ZEIGER, 2006). Portanto, assim como as plantas captam o S na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ; estado oxidativo  $\text{S}^{6+}$ ) por meio de transportadores próprios presentes na membrana plasmática das raízes, de maneira equivalente, o Se é captado na forma de selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ; estado oxidativo  $\text{Se}^{6+}$ ) pelo mesmo mecanismo (BISWAL, 2003). Quando são presentes as espécies sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ; estado oxidativo  $\text{S}^{4+}$ ) e selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ; estado oxidativo  $\text{Se}^{4+}$ ), o processo de captação é mais complexo, onde é suposto que a captação seja realizada por difusão, ou, então,

que os transportadores responsáveis sejam os mesmos inerentes aos íons fosfatos (LI, 2008). Uma vez que são captados, o que ocorre é um processo redox, que converte estas espécies à Sulfato e Selenato, respectivamente, ambos mediados pela Glutathione (HAWKESFORD, 2007). Por conta dos múltiplos caminhos de transporte destas espécies, o Se, dosado em níveis elevados e, devido a sua competição com o S, pode possuir uma estreita faixa entre adequado e tóxico, dependendo de sua espécie (NAVARRO-ALARCON *et al.*, 2008; VALDIGLESIAS *et al.*, 2010). Este efeito é, possivelmente, resultante da diferença entre as massas molares dos elementos e, com efeito desta seletividade, as diferenças de reatividade de cada elemento, por conta da configuração eletrônica nos raios covalentes, sendo os quais 104 pm para S e 117 pm para Se (WHITE, 2004).

### 6.1.2 Defesa vegetal. Espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo

Os estresses bióticos e abióticos prejudicam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade das plantas. Neste ponto, as plantas, como organismos sésseis, tendem a desencadear mecanismos metabólicos complexos para defesa, e as respostas disso são alterações na expressão gênica, no metabolismo celular, e variações na taxa de crescimento e produção de biomassa (NEUMANN *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo estimula a biossíntese de componentes antioxidantes, contribuindo para um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (GARCIA *et al.*, 2006). As enzimas que atuam na proteção das células e compartimentos subcelulares vegetais dos efeitos fitotóxicos das ERO,

influenciam diversas reações envolvidas na sinalização de defesa vegetal, ou em mecanismos de sinalização celular ou no estresse oxidativo. Assim, as enzimas têm suas concentrações e atividades modificadas em muitos processos fisiológicos envolvidos.

A consequência na sinalização química após o estresse que desencadeia presença das ERO é a modificação na constituição de compostos moleculares, onde começam aparecer diversas substâncias relacionadas à defesa química, tais como aminoácidos não proteicos, alcalóides, fenóis, saponinas, lectinas, proteínas inativadora de ribossomos (RIPs), quitinases, glucanases, flavonóides, inibidores de protease e alérgenos (BOWLES, 1990). Durante o estresse, os principais pontos de produção de ERO em células são nos cloroplastos e mitocôndrias, que são organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxo de elétrons sustentado (MITTLER, 2002).

Nos cloroplastos, a formação de ERO está relacionada com os eventos da fotossíntese. Algumas ERO são classificadas como radicais livres por apresentarem elétrons desemparelhados na estrutura, como no fenômeno de fotorrespiração em peroxissomos, que é uma fonte de ERO na forma de peróxido de hidrogênio (ÉAUX & TOLEDANO, 2007).

Além da exposição em níveis elevados de luminosidade, a produção de ERO também é favorecida nos efeitos da seca, na presença de metais potencialmente tóxicos, alta concentração de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição do ar e ataque de patógenos. O efeito final não depende apenas do compartimento celular que está sendo afetado, mas do tipo de ERO que são produzidas (BREUSEGEM *et al.*, 2001), onde as enzimas antioxidantes mais comuns contra os efeitos fitotóxicos das ERO são a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX), a glutatona redutase (GSH),

a peroxiredoxina (Prx), a catalase (CAT), a polifenol oxidase (PPO) e metabólitos, como a glutationa, o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e carotenoides (YU *et al.*, 2007).

## 6.2 Estudos metalômicos

A complexidade das proteínas permite às mesmas agregarem em suas estruturas funcionais as espécies metálicas. De fato, cerca de 30% das proteínas possuem em suas estruturas espécies metálicas coordenadas (GAO *et al.*, 2007). O efeito dos íons metálicos ligados às proteínas como um “sinalizador” tem contribuição vital para atividade de enzimas e outras proteínas, por meio de um tipo de elemento específico.

Por conta disso, fazem-se necessários estudos complementares aos estudos genômicos, proteômicos e metabolômicos, que envolvam elementos metálicos, ou inclusive metalóides, ligados à estrutura das proteínas ou livres em equilíbrio em solução. Caracterizar as espécies metálicas presentes em metaloproteínas e compreender seu funcionamento dentro dos organismos vivos compõem uma nova área de pesquisa, conhecida por Metalômica (BECKER & JAKUBOWSKI, 2009; ŁOBIŃSKI *et al.*, 2006), proposta inicialmente por Haraguchi (2004), que envolve os estudos de Genômica, Proteômica e outros. Os estudos metalômicos podem ser classificados quanto à ionômica ou metaloproteômica (MOUNICOU *et al.*, 2009). A primeira visa determinar os elementos metálicos e suas espécies, independentemente se estão livres em solução ou ligados a uma estrutura, seja uma proteína ou metabólito. A segunda visa relacionar seletivamente o metal/metalóide

associado a uma espécie de proteína, além de se estender nos estudos de conformação proteica e funcional.

As técnicas instrumentais em Metalômica têm sido bem adaptadas aos estudos proteômicos, permitindo uma abordagem complementar. Esta linha de estudos metalômicos tem crescido e está contribuindo de maneira promissora para muitas áreas, tais como nas ciências da saúde ou em ciências forenses, tendo em vista que, ainda, informações estão desconexas na literatura, refletindo em conclusões bastante fragmentadas sobre a importância das espécies metálicas/metaloides (HARAGUCHI, 1999).

### 6.2.1 Imageamento da distribuição elementar. Desenvolvimento da técnica de LA(i)-ICP-MS

A técnica de ICP-MS, utilizada para identificação e quantificação de elementos metálicos ligados às biomoléculas, tem sido uma ferramenta útil, porque possui vantagens no poder de resolução e baixos limites de detecção e quantificação. (ŁOBIŃSKI *et al.*, 2006). Quando acoplado à técnica de ablação a *laser* (LA), o ICP-MS se destaca em não necessitar de procedimentos de dissolução da amostra, uma vez que um pulso de *laser* energético sobre uma amostra tanto sólida como líquida transfere o material particulado na forma de plasma diretamente para espectrômetro com o auxílio de gás carreador, tal como argônio (BECKER, 2009).

Embora problemas como o fracionamento e ionização incompleta da amostra seja tendências persistentes durante o processo de ablação, diversos estudos voltados à metalômica e que utilizam análises em géis de poliacrilamida e a técnica ablação a *laser* acoplada à técnica de espectrometria

de massas com plasma indutivamente acoplado (LA-ICP-MS) tem obtido bons resultados, com metodologias exatas e precisas (BALLHAUT *et al.*, 2007). Os autores realizaram estudo metaloproteômico que avalia a presença do elemento Selênio em padrão contendo selenometioninas, com a finalidade de quantificá-lo em bandas expressas em géis de poliacrilamida com diferentes concentrações de proteínas. Os resultados do estudo foram satisfatórios, nos quais apresentaram curva analítica com resposta linear em função da concentração da proteína aplicada no gel, mostrando que a calibração externa pode ser aplicada sem maiores problemas.

Com a mesma instrumentação LA(i)-ICP-MS é possível desenvolver estudos ionômicos que avaliem a distribuição simultânea de vários elementos. No trabalho de SILVA & ARRUDA (2013), Selênio e Enxofre foram determinados em folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.), após a adição de selenito de sódio frente a uma situação controle. Os resultados foram atingidos com êxito, pois, além da precisão obtida quantitativamente pela ablação, as espécies monitoradas, baseadas em suas  $m/z$  ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  e  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ), não sofreram interferências poliatômicas, e a escolha da espécie  $^{12}\text{C}^+$ , como padrão interno, compensou possíveis flutuações da ablação, tornando-se, então, bastante útil para o imageamento e quantificação de Se e S na folha.

## **7 OBJETIVOS**

### Objetivo geral

Realizar imageamento contendo a distribuição de Selênio e Enxofre elementares em folha de *Arabidopsis thaliana* transgênica e não transgênica, expostas, e não expostas, ao Selênio durante os cultivos.

### Objetivos específicos:

- ✓ Definir amostra de folha representativa para cada grupo de plantas;
- ✓ Otimizar as condições da técnica de LA(i)-ICP-MS;
- ✓ Estabelecer padrão interno;
- ✓ Tratar os dados para obtenção da imagem, baseados na relação das intensidades.

## 8 PARTE EXPERIMENTAL

### 8.1 Equipamentos e acessórios

- ✓ ICP-MS (modelo ELAN<sup>®</sup> DRC-e, PerkinElmer, Shelton, EUA)
- ✓ Sistema de ablação a *laser* (New Wave UP 213)
- ✓ Estufa (Quimis, Brasil)

### 8.2 Softwares

- ✓ Excel<sup>®</sup> (Microsoft)
- ✓ MatLab<sup>®</sup> (Mathworks)

### 8.3 Amostra das folhas T e NT

As folhas de *Arabidopsis thaliana* controle e tratadas com Se utilizadas neste experimento foram aquelas colhidas do cultivo detalhado na seção **3.5** do CAPÍTULO I. As folhas foram secas até massa constante, a 38 °C em estufa convencional. Em seguida, foram selecionadas folhas representativas para cada grupo cultivado, e a distribuição de Se e S foi avaliada por LA(i)-ICP-MS.

## 8.4 Condições da técnica LA(i)-ICP-MS

Estas técnicas consistem em quadrupolo baseado no ICP-MS (modelo ELAN DRC-e, PerkinElmer) com sistema de ablação a *laser* acoplado (New Wave UP 213). As folhas foram fixadas em fita adesiva dupla-face (3M, Brasil), e colocadas dentro da câmara de ablação para análise. As condições de ablação utilizadas foram semelhantes às aquelas publicadas por SILVA & ARRUDA (2013), exceto para o padrão interno, em que para este trabalho de Dissertação, a espécie  $^{13}\text{C}^+$  foi monitorada. As condições otimizadas podem ser visualizadas na Tabela 6.

**Tabela 6:** Parâmetros instrumentais otimizados para o ICP-MS

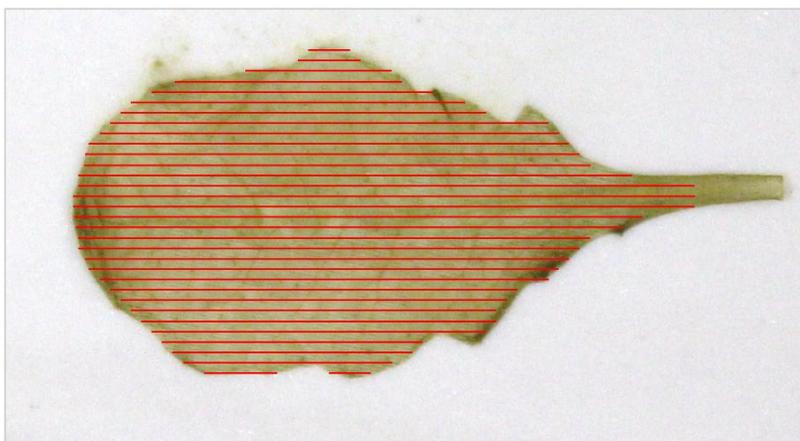
LA(i)-ICP-MS			
<b>Potência RF (W)</b>			1000
<b>Taxa de fluxo de gás carreador – Argônio (L min<sup>-1</sup>)</b>			1,1
<b>Taxa de fluxo de gás auxiliar – Argônio (L min<sup>-1</sup>)</b>			1,8
<b>Modo de leitura</b>			Pico esperado
<b>Dwell time (ms)</b>			50
<b>Tempo de integração para cada ponto (ms)</b>			324
<b>Detector do tempo morto (ns)</b>			60
<b>Sweeps</b>			3
Condições para operação da cela de dinâmica de reação			
Elemento	Espécie monitorada	Fluxo da vazão de Oxigênio (L min <sup>-1</sup> )	RPq (V)
Selênio	$^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$	0,70	0,50
Enxofre	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$	0,70	0,50
Carbono	$^{13}\text{C}^+$	0,70	0,50

Parâmetros instrumentais para o sistema de ablação a <i>laser</i>	
Comprimento de onda do Nd: YAG <i>laser</i> (nm)	213
Frequência (Hz)	15
Intensidade do <i>laser</i> (%)	45
Saída de energia média (mJ)	12
Fluência média ( $\text{J cm}^2$ )	52
Velocidade de digitalização ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	60
Diâmetro do feixe do <i>laser</i> ( $\mu\text{m}$ )	55
Resolução – eixo X ( $\mu\text{m}$ )	19,44
Resolução – eixo Y ( $\mu\text{m}$ )	120

## 8.5 Tratamento de dados

A ablação foi realizada em linhas paralelas na área de cada folha representativa para cada grupo do plantio de *Arabidopsis thaliana* (vide **Figura 18**).

**Figura 18:** Esquema das linhas projetadas para ablação a *laser* em folha de *Arabidopsis thaliana* não transgênica seca.



**Fonte:** Obtido de Câmera GE<sup>®</sup> Healthcare, modelo X550.

A aquisição obtida foi do tipo intensidade  $x$  tempo, onde a intensidade foi obtida em função do número de contagens  $s^{-1}$ , para cada espécie monitorada ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{13}\text{C}^+$ ).

Os dados foram tratados por *software* Excel<sup>®</sup> (Microsoft), de maneira que foi feita a diferença entre os “zeros” de cada espécie e suas respectivas contagens, para normalizar. A partir disso, foi calculada a razão das intensidades de  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  e  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  com a intensidade do padrão interno  $^{13}\text{C}^+$ . Os dados obtidos desta razão para as intensidades de cada espécie monitorada ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+ / ^{13}\text{C}^+$  e  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+ / ^{13}\text{C}^+$ ) foram pareados segundo tamanho real das linhas das folhas representativas, para obtenção das suas respectivas distribuições nas folhas. A determinação do tamanho real de cada linha foi obtida a partir das variáveis de velocidade e tempo da ablação. As imagens foram geradas pelo *software* MatLab<sup>®</sup>.

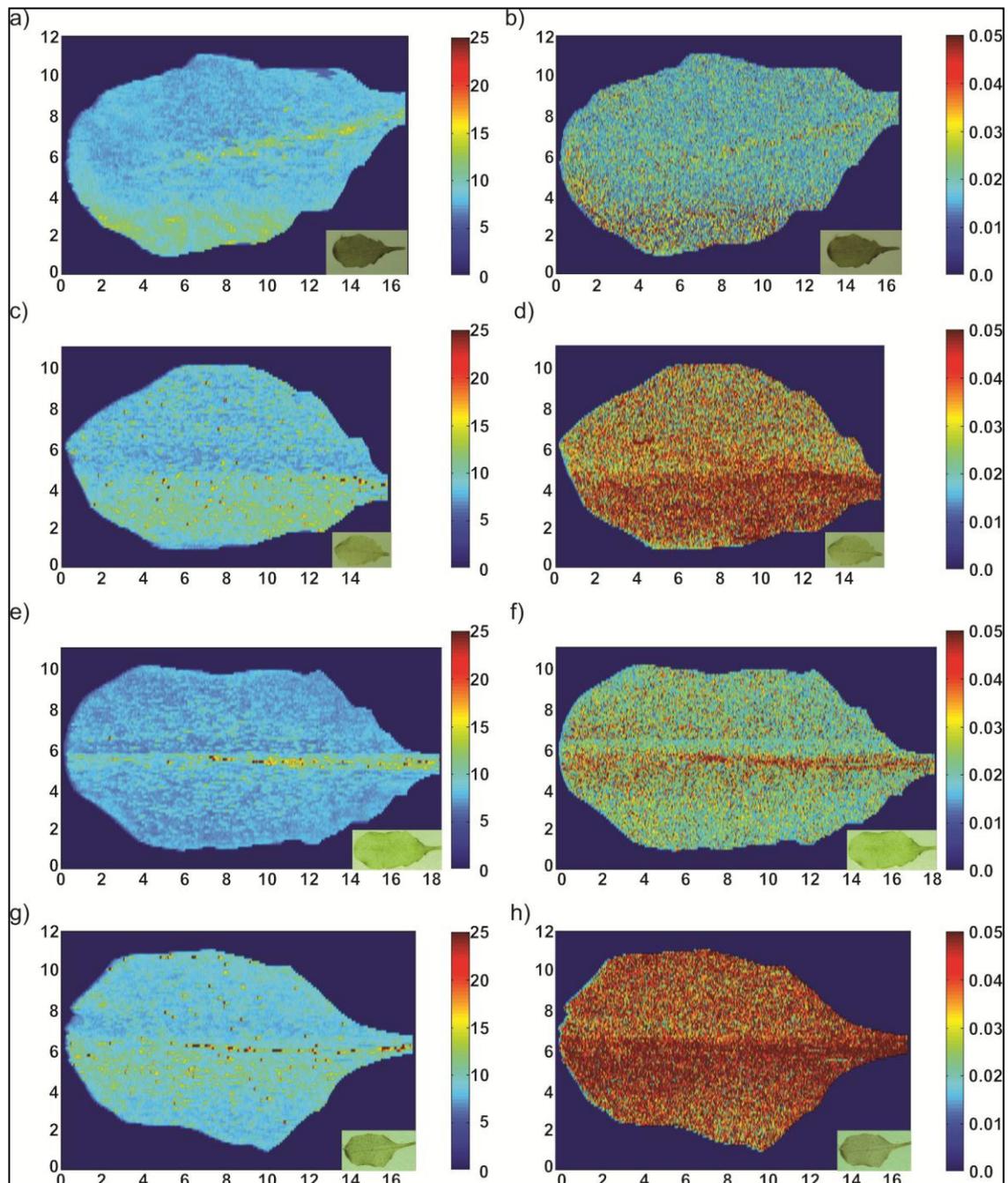
## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Distribuição de Se e S

As imagens obtidas para ambos os elementos monitorados podem ser vistas na **Figura 19**, e cada folha utilizada para o mapeamento é mostrada no canto superior direito. Elas foram adquiridas por meio da avaliação de Se como  $\text{SeO}^+$  ( $m/z$  96) e S como  $\text{SO}^+$  ( $m/z$  48), a fim de evitar interferências poliatômicas (SILVA & ARRUDA, 2013). Além disso, o  $^{13}\text{C}^+$  foi utilizado como padrão interno, para compensar as possíveis variações no processo de ablação (WU & BECKER, 2009), que podem estar relacionadas com a heterogeneidade das amostras ou do próprio processo de ablação.

A análise das imagens revelam os níveis de S basal para as amostras de folhas controle, independentemente se eles foram obtidos a partir de plantas NT e T (vide **Figura 19** “a” e “e”). Em termos de plantas controle, e considerando a presença de níveis de Se basal em plantas NT e T, parece que uma maior quantidade de Se foi translocada para as folhas, quando se considera plantas T (vide **Figura 19** “b” e “f”). Este fato foi reforçado quando se analisa as plantas tratadas com Se, devido a uma maior distribuição ao longo da folha, quando comparadas as plantas T e NT (vide **Figura 19** “d” e “h”). Outra característica importante é o aumento na distribuição de S para as plantas tratadas com Se (vide **Figura 19** “c” e “g” para as plantas NT e T, respectivamente), indicando um mecanismo de defesa natural em substituição de Se por S, uma vez que ambos os elementos possuem similaridade química quanto aos tipos de ligações (SORS *et al.*, 2005). De fato, a produção de algumas espécies de proteína foi ativada, como comentado anteriormente (vide seção 4.2.4), uma vez que elas apresentam resíduos de cisteína em suas constituições. Então, pode-se supor que a substituição entre Se e S, com a formação de seleno-aminoácidos, corrobora com os resultados mostrados na **Figura 19**.

**Figura 19:** Intensidade de a)  $\text{SO}^+$  obtida da folha NT do grupo controle; b)  $\text{SeO}^+$  obtida da folha NT do grupo controle; c)  $\text{SO}^+$  obtida da folha NT do grupo tratado com Selênio; d)  $\text{SeO}^+$  obtida da folha NT do grupo tratado com Selênio; e)  $\text{SO}^+$  obtida da folha T do grupo controle; f)  $\text{SeO}^+$  obtida da folha T do grupo controle; g)  $\text{SO}^+$  obtida da folha T do grupo tratado com Selênio; h)  $\text{SeO}^+$  obtida da folha T do grupo tratado com Selênio.



**Fonte:** Obtido por MatLab<sup>®</sup>, a partir do tratamento de dados por Excel<sup>®</sup>

## 9.2 Competição Selênio/Enxofre e tolerância vegetal

A assimilação de Enxofre por vegetais é realizada por várias vias bioquímicas. Pode se destacar a sua ocorrência natural em dois aminoácidos: metionina e cisteína. O sulfato é a forma do Enxofre absorvido pelos vegetais por meio do transportador  $H^+ - SO_4^{2-}$  a partir do solo. A assimilação do sulfato requer a redução do sulfato à cisteína. Como envolve um processo oxidativo, então, espécies de sulfito também podem ser incorporadas ao metabolismo, sendo convertidas a sulfato, e, novamente, reduzidas à cisteína (TAIZ & ZEIGER, 2006).

As folhas assimilam o sulfato de maneira mais ativa que as raízes, por conta da fotossíntese. Os fotossistemas proporcionam a ferredoxina reduzida e a fotorespiração gera a serina, que pode estimular a produção de *O*-acetilserina. O Enxofre assimilado nas folhas é transportado para os sítios de síntese proteica, sobretudo na forma de glutatona, que atua como um sinal que coordena a absorção do sulfato pelas raízes e assimilação desse íon na parte aérea. A partir da disponibilidade de cisteína, a metionina é um aminoácido sintetizado a partir dela (TAIZ & ZEIGER, 2006).

De maneira complementar, o Selênio é um elemento que possui a similaridade química do Enxofre (STADTMAN, 1990). Por conta disso, é viável que se utilize das mesmas vias metabólicas para a assimilação do Enxofre. Pode-se supor que o Selênio na forma adicionada aos cultivos tratados como Selenito de Sódio ( $SeO_3^{2+}$ ) pode ter sido convertido em Selenato ( $SeO_4^{2+}$ ) em processo de oxirredução e posteriormente incorporado na forma de selenocisteína e selenometionina (ANDERSON, 1993).

Os resultados sugerem que haja uma competição entre os dois elementos, de maneira que a assimilação do Enxofre se apresentou de maneira mais exacerbada comparada com as folhas não expostas ao Selênio. Além disso, os resultados sugerem que a grande assimilação de Selênio pelas plantas transgênicas esteja cooperando para a suposta existência de um mecanismo de tolerância vegetal, por conta da alteração genética, em processo de adaptação.

## **10 CONCLUSÕES PARCIAIS**

A partir dos resultados obtidos, foi evidenciada a potencialidade e eficiência da técnica de imageamento por ablação a *laser* acoplada ao ICP-MS, uma vez que pode ser visualizada uma absorção diferenciada entre as plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênica e não transgênica. A folha transgênica apresentou maior teor de Selênio, comparada com a folha não transgênica. Foi possível notar uma competição entre os elementos Enxofre e Selênio, no qual o excesso do último promoveu a absorção mais pronunciada do primeiro. Estes estudos metalômicos, de maneira adicional ao resultado das proteínas diferenciais detectadas no CAPÍTULO I, sustenta que os resíduos de cisteína podem ter sido substituídos por selenocisteína, como o exemplo da enzima *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, que apresenta resíduos de cisteína em seu centro ativo e é responsável por catalisar na segunda fase da Glicólise o composto gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, tendo sido apresentada como proteína diferencial identificada.

## 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese inicial deste trabalho era que a transgenia realizada em *Arabidopsis thaliana* poderia oferecer diferenças na produção de proteínas, quando comparadas com as plantas NT. Por conta da alteração genética das plantas T, era suposto que elas estivessem em certo nível de estresse por conta da adaptação evolutiva, e a questão importante, também, era se um estímulo externo poderia provocar uma produção exacerbada das proteínas e/ou novas espécies de proteínas ou, ainda, uma baixa produção delas, quando comparadas com as plantas NT. Os resultados da análise proteômica mostraram que há diferenças entre os perfis proteômicos das folhas NT e T, e que se mostraram mais significativas ao efeito do estresse oxidativo induzido por adição de Selênio nos plantios, no qual apenas as plantas NT responderam a este estímulo e as plantas T mantiveram sua produção de proteínas quase constante. De maneira complementar, foi feito um estudo metalômico, no qual foi possível observar a translocação do Selênio para as folhas, e a competição entre este elemento e o Enxofre, de forma que uma quantidade maior de Selênio foi encontrada na folha T, quando comparada com a folha NT. Estes dados indicam que as diferenças na abundância de proteínas entre as plantas NT e T podem estar relacionadas com um mecanismo de desintoxicação vegetal, onde foi, *a priori*, mais influente para as plantas T. Estes resultados obtidos permitem abrir novas possibilidades a respeito de outros aspectos nas plantas, tais como estudos de nutrição, fisiologia e metabolismo, validando a hipótese de que a planta transgênica pode estar buscando um novo equilíbrio por conta da modificação genética, de maneira a ser mais tolerante ao estresse abiótico.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. W. *Selenium interactions in sulfur metabolism*. In: De Kok, L. J., editor. *Sulfur nutrition and assimilation in higher plants—regulatory, agricultural and environmental aspects*. The Hague, The Netherlands: **SPB Academic Publishing** (1993) 49–60

AEBERSOLD, R.; MANN, M. *Mass Spectrometry-based proteomics*. **Nature** 422 (2003) 198-207

AKTINSON, C. J.; Fitzgerald, J. D.; Hipps, N. A. *Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review*. **Plant Soil** 337 (2010) 1 – 18.

ALBERTS, B.; Johnson, A.; Lewis, J. *et al. Molecular biology of the cell* 4<sup>th</sup> ed. New York: **Garland Science**, 2002

ARABIDOPSIS Genome Initiative. *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. **Nature** 408 (2000) 796–815

ARRUDA, S. C. C.; Barbosa, H. S.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. *Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes*. **Journal of Proteomics** 93 (2013) 107-116

BALLIHAUT, G.; Pécheyran, C.; Mounicou, S.; Preud'homme, H.; Grinaud, R.; Łobiński, R. *Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS<sup>2</sup>) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins*. **Trends in Analytical Chemistry** 26 (2007) 183-190

BARBOSA, H. S.; Arruda, S. C. C.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. *New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 402 (2012) 299-314

BECHTOLD, N.; Ellis, J.; Pelletier, G. *In plant Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants*. **Comptes rendus de l'Académie des sciences** 316 (1993) 1194–1199

BECKER, J. S.; JAKUBOWSKI, N. *The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences*. **Chemical Society Review** 38 (2009) 1969-1983

BISWAL, U. C.; Biswal, B.; Raval, M. K. *Chloroplast biogenesis: from proplastid to gerontoplast*, 1<sup>st</sup> ed. Dordrecht (Holanda): **Springer, 2003**

BOWLES, D. J. *Defense related proteins in higher plants*. **Biochemistry** 59 (1990) 837-907, 1990

BREUSEGEM, F. V.; Vranova, E.; Dat, J. F.; Inze, D. *The role of active oxygen species in plant signal transduction*. **Plant Science** 161 (2001) 405-414

BRUIJNZEEL, L. A.; Scatena, F. N.; Hamilton, L. S. *Tropical Montane Cloud Forests*. UK: **Cambridge University Press, 2011**

CARPENTIER, S. C.; Witters, E.; Laukens, K. *et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel-electrophoresis analysis*. **Proteomics** 5 (2005) 2497-2507

CHERRY, J. P.; Barford, R.A. *Methods for Proteins Analysis* 1<sup>st</sup> ed. USA: **Journal of the American Oil Chemists' Society, 1988**

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 16 (1998) 735–743

DELAPLACE, P.; Wal, F.; Dierick, J.; Cordewener, J.; Fauconnier, P. *America A. Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins*. **Proteomics** 6 (2006) 6494-6497

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. *Mass Spectrometry and Protein Analysis*. **Science** 312 (2006) 212-217

DEUTSCHER, M. P. *Guide to protein purification*, 1<sup>st</sup> ed. USA: **Academic Press, 1990**

- ÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 8 (2007) 813-824
- GARCIA, J. S.; Gratão, P. L.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. *Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development*. **Journal Agricultural and Food Chemistry** 54 (2006) 8623-8630
- GAO, Y. X.; Chen, C. Y.; Chai, Z. F. *Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 22 (2007) 856-866
- GONÇALVES, D. C. *Estudos iniciais de interações da Hsp90 através da caracterização funcional de um transgênico e biofísica de uma co-chaperona*, dissertação de mestrado (157 folhas). Campinas: **Instituto de Biologia da UNICAMP, 2012**
- HAMES, B. D.; Rickwood, D., *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> ed. England: **Oxford University Press, 1990**
- HARAGUCHI, H. *Multielement Profiling Analyses of Biological, Geochemical, and Environmental Samples as Studied by Analytical Atomic Spectrometry*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan** 72 (1999) 1163-1186
- HARAGUCHI, H. *Metallomics as integrated biometal science*. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry** 19 (2004) 5-14
- HAWKESFORD, M. J. *Sulfur in plants: an ecological perspective*, 1<sup>st</sup> ed. Dordrecht (Netherlands): **Springer, 2007**
- HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. *Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering*. **Chemical Reviews** 106 (2006) 4044-4098
- IDE, Y.; Nagasaki, N.; Tomioka, R. *et al. Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane*. **Journal of Experimental Botany** 58 (2007) 1173-1183
- JOSHI, H. J.; Hoffman, M. H.; Baerenfaller, K *et al. MASCP Gator: an Aggregation Portal for the visualization of Arabidopsis proteomics data*. **Plant Physiology** 155 (2011) 259 – 270

JÚNIOR, J. G. S. *Eletroforese de proteínas, 1ª ed.* Rio de Janeiro: Editora Interciência, **2001**

KATO, M.; Nagasaki-Takeuchi, N.; Ide, Y.; Tomioka, R.; Maeshima, M. *PCaPs, possible regulators of PtdInsP signals on plasma membrane.* **Plant Signaling & Behavior** 5 (2010) 848-850

KULAKOWSKA, A. B.; Krzysik, A. B.; Dylag, T. *et al.* *Methods for samples preparation in proteomic research.* **Journal of Chromatography** 849 (2007) 1-31

LAEMMLI, U. K. *Clivage of Estructural Proteins during the Assenbly of the Head of Bacteriophage T4.* **Nature** 227 (1970) 680-685

LI, H.; McGrath, S. P.; Zhao, F. *Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite.* **New Phytologist** 178 (2008) 92-102

LI, J., Wang, X.; Qin, T. *et al.* *MDP25, A Novel Calcium Regulatory Protein, Mediates Hypocotyl Cell Elongation by Destabilizing Cortical Microtubules in Arabidopsis.* **The Plant Cell** 23 (2011) 4411-4427

LIN, S.-T., Chou, H.-C., Chang, S.-J., Chen, Y.-W. *et al.* *Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer.* **Journal of Proteomics** 75 (2012) 5822-5847

LLOYD, A. M.; Barnason, A. R.; Rogers, S. G. *et al.* *Transformation of Arabidopsis thaliana with Agrobacterium tumefaciens.* **Science** 234 (1986) 464-466

ŁOBIŃSKI, R.; Schaumlöffel, D.; Szpunar, J. *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry.* **Mass Spectrometry Review** 25 (2006) 255-289

LUNDRY, D.R.; Ridley, W.P.; Meyer, J.J. *et al.* *Composition of Grain, Forage, and Processed Fractions from Second-Generation Glyphosate-Tolerant Soybean, MON 89788, Is Equivalent to That of Conventional Soybean (Glycine max L.).* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56 (2008) 4611-4622

MA, J. K.; DRAKE, P. M.; CHRISTOU, P. *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*. **Nature Reviews Genetics** 4 (2003) 794–805

MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. *Sample preparation for metalloprotein analysis: A case study using horse chestnuts*. **Talanta** 71 (2007) 1958-1963

MALDONADO, A. M.; -Zomeño, S. E.; Baptiste, S. J. *et al. Evaluation of three different protocols of protein extraction for Arabidopsis thaliana leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis*. **Journal of Proteomics** 4 (2008) 461 – 472

MAROUGA, R.; David, S.; Hawkins. *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 382 (2005) 669-678

MEINKE, D.; Cherry, J.; Dean, C.; Rounsley, S.; Koornneef, M. *Arabidopsis thaliana: A model plant for Genome Analysis*, **Science** 28: 5389 (1998) 662-682

MEDEL, A. S.; Bayón, M. M.; Sánchez, M. L. F. *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 377 (2003) 236-247

MITTLER, R. *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. **Trends in Plant Science** 9 (2002) 405-410

MOUNICOU, S.; Szpunar, J.; Łobiński, R. *Metallomics: the concept and Methodology*. **Chemical Society Review** 38 (2009) 1119-1138

NAVARRO-ALARCON, M.; Cabrera-Vique, C. *Selenium in food and human body: A review*. **Science of Total Environment** 400 (2008) 115 – 141

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: principles of biochemistry*, 5<sup>th</sup> ed. New York: **Freedman and Company**, 2009

NEUMANN, D.; Nover, L.; Scharf, K. D. *Results and Problems in Cell Differentiation*. Berlin: **Springer**, 1989.

O'FARREL, P. H. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. **Journal of Biological Chemistry** 250 (1975) 4007-4021

POTRYKUS, I. *Gene transfer to plants: Assessment of Published Approaches and Results*. **Plant Molecular Biology** 42 (1991) 205-225

PROVOST, G.L.; Herrera, R.; Paiva, J.A.; Chaumeil, P.; Salin, F.; Plomion, C. *A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees*. **Biological Research** 40 (2007) 291-297

RÉDEI, G. P. *Arabidopsis as a genetic tool*. **Annual Review of Genetics** 9 (1975) 111-127

SILVA, M. A. O.; ARRUDA, M. A. Z. *Laser ablation (imaging) for mapping and determining Se and S in sunflower leaves*. **Metallomics** 5 (2013) 62 – 67

SILVA, M. A. O.; Garcia, J. S.; Souza, G. H. M. F. *et al. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflowers leaves*. **Talanta** 80 (2010) 1545 – 1551

SORS, T. G.; Ellis, D. R.; Salt, D. E. *Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants*. **Photosynthesis Research** 86 (2005) 373-89

STADTMAN, T. C. *Selenium biochemistry*. **Annual Review of Biochemistry** 59 (1990) 111-127

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology* 4<sup>th</sup> ed. Sunderland (UK): **Sinauer Associates**, 2006

TONGE, R.; Shaw, J.; Middleton, B. *et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology*. **Proteomics** 1 (2001) 377-396

UNSELD, M.; Marienfeld, J.; Brandt, P.; Brennicke, A. *The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contain 57 genes in 366.924 nucleotides*, **Nature Genetics** 15 (1997) 57-61

VALDIGLESIAS, V.; Pásaro, E.; Méndez, J.; Laffon, B. *In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective e Vects: a review*. **Archives of Toxicology** 84 (2010) 337 – 351

VALVEKENS, D.; Montagu, M.; Lijsebettens, M. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America** 85 (1988) 5536-5540

WANG, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. *Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response*. **Trends in Plant Science** 9 (2004) 244 – 252

WHITE, P. J.; Bowen, H. C.; Parmaguru, P. *et al.* *Interactions between selenium and sulphur nutrition in Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany** 55 (2004) 1927-1937

WU, B.; Chen, Y.; Becker, J. S. *Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant Elsholtzia splendens after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)*. **Analytica Chimica Acta** 633 (2009) 165-172

XIONG, L.; Schumaker, K. S.; Zhu, J. K. *Cell signaling during cold, drought and salt stress*. **The Plant Cell** 14 (2002) S165-83

YU, H., Ge, Y., Wang, Y. *A fused selenium-containing protein with both GPx and SOD activities*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 358 (2007) 873-878

ZENG, Y.; YANG, T. *RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides*. **Plant Molecular Biology Reports** 20 (2002) 415-417

**APÊNDICE A** – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos NT x T, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (50% da variação)

Spot no gel	Nome da proteína	Número de acesso à proteína	pI/MW (Da) teórico	pI/MW (Da) observado	Mascot score	Cobertura (%)	Peptídeos pareados	Sequência dos peptídeos pareados	Teste de <i>t</i>	Logaritmo da razão do volume médio <sup>a)</sup>
<b>Categoria funcional: Metabolismo</b>										
1	Transketolase-like protein [Arabidopsis thaliana]	gi 7329685	5,80/81946	5,78/78281	145	6	05	K.TVTDKPTLIK.V K.VTTTIGYGSPNK.A K.KYPEEASELK.S K.TPSILALSR.Q K.ESVLPSDVSAR.V	0,00044	-1,50
3	Glutamine synthetase [Arabidopsis thaliana]	gi 15238559	6,43/47787	5,21/47301	433	20	22	R.VETLLNLDTKPYSDR.I R.VETLLNLDTKPYSDR.I R.VETLLNLDTKPYSDR.I R.VETLLNLDTKPYSDR.I R.VETLLNLDTKPYSDR.I R.TIEKPVEDPSELPK.W K.AAEIFSNK.K K.SMREEGGFEVIK.K R.EEGGFVIK.K R.EEGGFVIKK.A K.KAILNLSLR.H K.AILNLSLR.H K.AILNLSLR.H K.AILNLSLR.H K.AILNLSLR.H K.AILNLSLR.H R.HKEHISAYGEGNER.R K.EHISAYGEGNER.R K.EHISAYGEGNER.R K.HETASIDQFSWGVANR.	0,0059	-1,63

G  
K.HETASIDQFSWGVANR.  
G

<i>Categoria funcional: Classificação incerta</i>										
2	Unknown protein [Arabidopsis thaliana]	gi 28058762	5,94/80368	5,72/77260	250	10	09	K.NPYWFNR.D K.VTTTIGYGSPNK.A K.KYP EEASELK.S K.SIITGELPAGWEK.A R.KTPSILALSR.Q K.TPSILALSR.Q K.TPSILALSR.Q K.LPHLPGTSIEGVEK.G K.ESVLPSDVSAR.V	0,014	-1,50

a) Uma razão média positiva e negativa representa, respectivamente, um aumento ou uma redução na abundância das espécies de proteína das folhas T, comparadas com NT.

**APÊNDICE B** – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos NT x Se-NT, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (variação de 50%)

Spot no gel	Nome da proteína	Número de acesso à proteína	pI/MW (Da) teórico	pI/MW (Da) observado	Mascot score	Cobertura (%)	Peptídeos pareados	Sequência dos peptídeos pareados	Teste de <i>t</i>	Logaritmo da razão do volume médio <sup>a)</sup>
<b>Categoria funcional: Energia</b>										
9	At2g39730/T517.3 [Arabidopsis thaliana]	gi 15450379	5,69/52412	5,43/48152	304	13	15	R.GLAYDTSDDQQDITR. G K.LVVHITK.N K.NFLTLPNIK.V K.NFLTLPNIK.V K.NFLTLPNIK.V K.NFLTLPNIK.V K.VPLILGIWGGK.G K.VPLILGIWGGK.G K.VPLILGIWGGK.G K.VPLILGIWGGK.G K.VPLILGIWGGK.G K.VPLILGIWGGK.G K.FYWAPTR.E K.FYWAPTR.E R.VYDDEVR.K R.KFVESLGVEK.I	0,012	-1,74
10	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [Arabidopsis thaliana]	gi 15230324	5,92/35230	5,16/31359	458	43	19	K.RLTYDEIQSK.T R.LTYDEIQSK.T K.NAPPDFQNTK.L K.FKEEDGIDYAAVTVQ LPGGER.V R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLEASGKPESFSGK.F K.QLEASGKPESFSGK.F	0,0074	+1,70

K.FLVPSYR.G  
 R.GSSFLDPK.G  
 R.GGSTGYDNAVALPAG  
 GR.G  
 R.GDEEELSKENVK.N  
 K.NTAASVGEITLK.I  
 K.NTAASVGEITLK.I  
 K.NTAASVGEITLK.I  
 K.SKPETGEVIGVFESLQ  
 PSDTDLGAK.V

11	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [Arabidopsis thaliana]	gi 15230324	5,92/35230	5,06/31359	253	27	11	K.RLTYDEIQSK.T R.LTYDEIQSK.T K.NAPPDFQNTK.L R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLEASGKPESFSGK.F K.FLVPSYR.G R.GGSTGYDNAVALPAG GR.G K.NTAASVGEITLK.I K.NTAASVGEITLK.I	$6,3 \times 10^{-6}$	+2,47
12	33kDa oxygen-evolving protein [Arabidopsis thaliana]	gi 22571	5,68/35288	5,08/35423	565	37	22	K.RLTYDEIQSK.T R.LTYDEIQSK.T K.NAPPEFQNTK.L K.NAPPEFQNTK.L R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLDASGKPSFTGK.F K.QLDASGKPSFTGK.F K.FLVPSYR.G R.GSSFLDPK.G R.GGSTGYDNAVALPAG GR.G R.GGSTGYDNAVALPAG GR.G	0,025	+1,54

R.GDEEELVK.E  
 R.GDEEELVKENVK.N  
 K.NTAASVGEITLK.V  
 K.NTAASVGEITLK.V  
 K.NTAASVGEITLK.V  
 K.NTAASVGEITLK.V  
 K.SKPETGEVIGVFESLQ  
 PSDTDLGAK.V  
 K.SKPETGEVIGVFESLQ  
 PSDTDLGAK.V

14	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2 [Arabidopsis thaliana]	gi 15230324	5,92/35230	4,90/31499	141	15	06	K.NAPPDFQNTK.L R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLEASGKPESFSGK.F K.FLVPSYR.G K.NTAASVGEITLK.I	$2,9 \times 10^{-5}$	+1,69
15	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta [Arabidopsis thaliana]	gi 15222729	6,21/64176	5,38/61680	722	24	27	K.LADLVGVTLGPK.G K.LADLVGVTLGPK.G K.LADLVGVTLGPK.G K.LADLVGVTLGPK.G K.LADLVGVTLGPK.G R.IVNDGVTVAR.E R.IVNDGVTVAR.E R.EVELEDPVENIGAK.L K.VVAAGANPVLITR.G K.VVAAGANPVLITR.G K.ALVTELK.K K.ALVTELKK.M R.KGVVTLEEGK.S K.GVVTLLEEGK.S R.GYISPYFVTDSEK.M R.DLVGVLEDAIR.G R.DLVGVLEDAIR.G R.DLVGVLEDAIR.G R.DLVGVLEDAIR.G R.DLVGVLEDAIR.G R.DLVGVLEDAIR.G R.EEVGLSLDK.A	0,023	-1,74

								K.LRVEDALNATK.A R.VEDALNATK.A K.NAGVNGSVVSEK.V K.FGYNAATGK.Y K.YEDLMAAGIIDPTK.V		
17	Chaperonin hsp60 [Arabidopsis thaliana]	gi 16221	5,66/61660	5,25/60268	359	18	10	K.GVEDLADAVK.V K.SVAAGMNAMDLR.R R.GISMAVDAVVTNLK.S K.EGVITIQDGK.T K.KISSINSIVK.V K.VLELALK.R K.DDTVILDGAGDKK.G K.LPTANFDQK.I K.IGVQIIQNALK.T K.AGIIDPLK.V	0,059	-1,66

**Categoria funcional: Metabolismo**

2	Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase B subunit [Arabidopsis thaliana]	gi 336390	5,60/43175	6,05/47301	314	21	13	K.YDSMLGTFK.A K.YDSMLGTFK.A K.IVDNETISVDGK.L K.VIITAPAK.G K.VLDEEFGIVK.G K.VLDEEFGIVK.G R.AAALNIVPTSTGAAK.A K.AVSLVLPQLK.G K.AVSLVLPQLK.G K.GLTAEDVNEAFR.K R.VVDLAHLVASK.W R.VVDLAHLVASK.W R.VVDLAHLVASK.W	0,00045	+1,86
3	Cystine lyase [Arabidopsis thaliana]	gi 15236533	5,89/47415	6,00/55231	348	28	12	R.NEILETSNTAEK.A K.SAVAELYLNQGLPK.K R.HYNFLPEK.N K.NFEIDFDSVR.A K.IMVVSDEVFR.W K.IMVVSDEVFR.W K.FSSIVPVVTLGSISK.G R.TGWLTLHDLDGVFR.N K.DKVEFGYSK.L	0,056	-1,97

								K.EENLVVLPGLAFSQA.N R.HSIDMETPVLEDALER.L R.HSIDMETPVLEDALER.L		
5	AT4g38970/F19H22_70 [Arabidopsis thaliana]	gi 16226653	6,79/43031	5,63/38706	669	32	30	K.RLDSIGLENTEANR.Q R.LDSIGLENTEANR.Q R.LDSIGLENTEANR.Q K.KMVDVLEQNIVPGIK. V K.KMVDVLEQNIVPGIK. V K.MVDVLEQNIVPGIK.V K.MVDVLEQNIVPGIK.V K.MVDVLEQNIVPGIK.V K.MVDVLEQNIVPGIK.V K.MVDVLEQNIVPGIK.V K.MVDVLEQNIVPGIK.V R.TAAYYQQGAR.F R.TVVSIPNGPSALAVK.E R.TVVSIPNGPSALAVK.E K.EAAWGLAR.Y R.TYDVAEK.V R.ATPEQVAAYTLK.L R.ATPEQVAAYTLK.L R.ATPEQVAAYTLK.L R.ATPEQVAAYTLK.L R.ATPEQVAAYTLK.L R.ATPEQVAAYTLK.L R.ALQNTCLK.T K.TWGGRPENVNAAQTTL LAR.A K.TWGGRPENVNAAQTTL LAR.A K.TWGGRPENVNAAQTTL LAR.A K.TWGGRPENVNAAQTTL LAR.A K.ANSLAQLGK.Y K.ANSLAQLGK.Y K.YTGEGESEEAKE	0,041	+1,65

6	Strong similary to gb U20808 auxin-induced protein from Vigna radiata and a member of the zinc-binding dehydrogenase family PF 00107. ESTs gb T43674, gb H77006 and gb AA395179 come from this gene [Arabidopsis thaliana]	gi 4056456	5,65/32813	5,53/36620	396	33	14	K.LESNIVVPEIK.E K.LESNIVVPEIK.E K.LESNIVVPEIK.E K.VVAAALNPVDAK.R K.ATDSPLPTVPGYDVAG VVVK.V K.VVALTGAVTPPGFR.F K.VVALTGAVTPPGFR.F K.VVALTGAVTPPGFR.F K.VVALTGAVTPPGFR.F R.FVVTNSGDVLK.K K.KLNPYIESGK.V K.LNPYIESGK.V K.VKPVVDPK.G R.VADAFSYLETNHATGK. V	0,0013	+1,56
8	Delta-aminolevulinic acid dehydratase [Arabidopsis thaliana]	gi 15222443	6,96/47125	5,52/48152	117	4	02	R.HGLVQEVAK.A R.AVGVNSIVLFPK.V	0,0094	-1,95

**Categoria funcional: Transdução de sinal**

13	Plasma-membrane associated cation-binding protein 1 [Arabidopsis thaliana]	gi 15235363	4,99/24659	4,97/32999	188	31	06	K.IEFPGSK.A K.VSVFLPEEVK.T K.EIPVEEVK.A K.TEGTSGEKEEIVEETK.K K.KGETPETAVVEEK.K K.KEEATPAPAVVETPVK. E	0,00012	+2,44
----	----------------------------------------------------------------------------	-------------	------------	------------	-----	----	----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------	-------

**Categoria funcional: Classificação incerta**

4	Putative protein [Arabidopsis thaliana]	gi 3549670	6,34/47133	5,88/51432	286	18	09	K.LQAGYLFPEIAR.R K.YGNIEYMR.C K.YGNIEYMR.C R.EQLTQLVEFAK.K K.YAGFTGVR.L R.LGWTVIPK.K K.KLLYSDGFPVAK.D K.LLYSDGFPVAK.D	0,0045	-1,55
---	-----------------------------------------	------------	------------	------------	-----	----	----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------	-------

K.THVVTTPGSGFGPGGEGF  
VR.V

18	Unknown protein; 45415-47304 [Arabidopsis thaliana]	gi 12324985	5,64/44013	5,45/42764	279	16	11	K.NPGNALLEYR.G K.LSVETLEALSK.L K.LSVETLEALSK.L K.LSVETLEALSK.L K.LSVETLEALSK.L K.LSVETLEALSK.L K.AVDPQLEVVNK.N K.IQDPSYVYR.W R.LQAEIAMR.Q R.VLAIDIDEER.N R.VLAIDIDEERNPILAN.-	0,064	-1,66
----	--------------------------------------------------------	-------------	------------	------------	-----	----	----	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------	-------

a) Uma razão média positiva e negativa representa, respectivamente, um aumento ou uma redução na abundância das espécies de proteína das folhas Se-NT, comparadas com NT.

**APÊNDICE C** – Tabela com a caracterização das espécies de proteínas identificadas, considerando os grupos Se-NT x Se-T, mostrando as diferenças na abundância usando um fator de regulação de 1,5 (50% da variação)

<i>Spot</i> no gel	Nome da proteína	Número de acesso à proteína	pI/MW (Da) teórico	pI/MW (Da) observado	<i>Mascot</i> <i>score</i>	Cobertura (%)	Peptídeos pareados	Sequência dos peptídeos pareados	Teste de <i>t</i>	Logaritmo da razão do volume médio <sup>a)</sup>
<b><i>Categoria funcional: Energia</i></b>										
3	Isocitrate dehydrogenase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	gi 15218869	6,13/46065	6,22/42811	228	17	13	K.YFDLGLPHR.D K.YFDLGLPHR.D K.VTIESAEATK.K R.VTEFGLK.Q R.HAFGDQYR.A K.KWPLYLSTK.N K.WPLYLSTK.N K.TIEAEAAHGTVTR.H K.TIEAEAAHGTVTR.H K.LLDFTEK.L K.DLALIIHGSK.L K.DLALIIHGSK.L K.DLALIIHGSK.L	0,027	+1,64
5	phosphoglycerate kinase 1 [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	gi 15230595	5,91/50197	5,16/52602	605	28	27	K.SVGDLTSADLK.G K.SVGDLTSADLK.G K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A K.LASLADLYVNDAFG TAHR.A K.ELDYLVGAVSNPK.	$7,7 \times 10^{-6}$	+3,75

								R K.ELDYLVGAVSNPK. R K.RPFAAIVGGSK.V K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.LELATELLAK.A K.GVSLLLPTDVVVAD K.F K.GVSLLLPTDVVVAD K.F K.FAAGTEAIANK.L K.GVTTHIGGGDSVAA VEK.V		
6	phosphoglycerate kinase 1 [Arabidopsis thaliana]	gi 15230595	5,91/50197	5,09/52857	512	21	23	K.SVGDLTSAADLK.G K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L K.FSLAPLVPR.L R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A R.LSELLGIEVTK.A K.LASLADLYVNDAFG TAHR.A K.LASLADLYVNDAFG TAHR.A K.ELDYLVGAVSNPK. R K.ELDYLVGAVSNPK. R K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.IGVIESLLEK.C K.LELATELLAK.A	0,0038	+2,47

								K.GVSLLLPTDVVVAD K.F K.FAAGTEAIANK.L K.GVTTHIGGGDSVAA VEK.V K.VLPGVIALDEAIPVT V.-		
8	N-glyceraldehyde-2-phosphotransferase-like [Arabidopsis thaliana]	gi 8885622	5,14/32003	4,81/35605	139	17	06	K.LIEGVPETLDMLR.A K.LIEGVPETLDMLR.A R.LVFVTNNSTK.S K.VYVIGEEGILK.E K.IQPDFYTSK.I K.ISDFLSPK.A	$3,9 \times 10^{-5}$	-1,89
9	33 kDa oxygen-evolving protein [Arabidopsis thaliana]	gi 22571	5,68/35288	4,90/36228	595	37	33	K.RLTYDEIQSK.T K.RLTYDEIQSK.T R.LTYDEIQSK.T K.NAPPEFQNTK.L K.NAPPEFQNTK.L R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLDASGKPSFTGK. F K.QLDASGKPSFTGK. F K.QLDASGKPSFTGK. F K.FLVPSYR.G K.FLVPSYR.G K.FLVPSYR.G K.FLVPSYR.G R.GSSFLDPK.G R.GGSTGYDNAVALPA GGR.G R.GGSTGYDNAVALPA GGR.G	$3,5 \times 10^{-5}$	-1,81

---

								R.GDEEELVK.E R.GDEEELVKENVK.N R.GDEEELVKENVK.N K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.SKPETGEVIGVFESL QPSDTDLGAK.V K.SKPETGEVIGVFESL QPSDTDLGAK.V K.SKPETGEVIGVFESL QPSDTDLGAK.V		
10	33 kDa oxygen-evolving protein [Arabidopsis thaliana]	gi 22571	5,68/35288	4,96/34917	527	37	27	K.RLTYDEIQSK.T R.LTYDEIQSK.T K.NAPPEFQNTK.L R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q R.VPFLFTVK.Q K.QLDASGKPSFTGK. F K.QLDASGKPSFTGK. F K.FLVPSYR.G R.GSSFDPK.G R.GGSTGYDNAVALPA GGR.G R.GGSTGYDNAVALPA GGR.G R.GDEEELVK.E R.GDEEELVKENVK.N K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V K.NTAASVGEITLK.V	$1,7 \times 10^{-5}$	-1,69

K.NTAASVGEITLK.V  
 K.NTAASVGEITLK.V  
 K.SKPETGEVIGVFESL  
 QPSDIDLAK.V  
 K.SKPETGEVIGVFESL  
 QPSDIDLAK.V  
 K.SKPETGEVIGVFESL  
 QPSDIDLAK.V

**Categoria funcional: Doença/Defesa**

11	proteasome subunit alpha type-5-B [Arabidopsis thaliana]	gi 15231824	4,70/26135	4,65/28972	227	29	06	R.GVNTFSPEGR.L K.LGSTAIGVK.T K.EGVVLAWEK.R R.ITSPLEPSSVEK.I K.VTPNNVDIAK.V K.VAPAYHLYTPQEVE AVISR.L	0,061	+2,15
13	glycine-rich RNA-binding protein 7 [Arabidopsis thaliana]	gi 15226605	5,85/16938	5,53/18429	327	49	11	R.ALETAFAQYGDVIDS K.I R.GFGFVTFK.D R.GFGFVTFK.D R.GFGFVTFK.D R.GFGFVTFK.D R.GFGFVTFKDEK.A K.DAIEGMNGQDL DGR .S K.DAIEGMNGQDL DGR .S R.SITVNEAQR.G R.SGGGGYSGGGGSY GGGGGR.R R.EGGGGYSGGGGSY SR.G	0,0047	-1,96

**Categoria funcional: Classificação incerta**

1	Unknown [Zea mays]	gi 219885633	5,10/71524	5,91/34242	333	15	13	R.VEIIANDQGNR.T K.DAGVIAGLNVLRI K.DAGVIAGLNVLRI R.IINEPTAAAIAYGLD	0,00086	+1,58
---	--------------------	--------------	------------	------------	-----	----	----	----------------------------------------------------------------------------	---------	-------

---

K.K  
R.ARFEELNMDLFR.K  
R.FEELNMDLFR.K  
R.FEELNMDLFR.K  
R.FEELNMDLFR.K  
R.FEELNMDLFR.K  
R.FEELNMDLFR.K  
R.VQQLQDFNGK.E  
K.FELSGIPPAPR.G  
K.IEDAIDAAISWLDAN  
QLAEAEDEFEDK.M

---

a) Uma razão média positiva e negativa representa, respectivamente, um aumento ou uma redução na abundância das espécies de proteína das folhas Se-T, comparadas com Se-NT.