



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica

Dissertação de Mestrado

**Aspectos proteômicos, enzimáticos e
metaloproteômicos em sementes de soja
transgênica e não-transgênica**

Adilson Roberto Brandão

Orientador: Prof. Dr.
Marco Aurélio Zezzi Arruda

Campinas/SP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

B734a	Brandão, Adilson Roberto. Aspectos proteômicos, enzimáticos e metaloproteômicos em sementes de soja transgênica e não-transgênica / Adilson Roberto Brandão. -- Campinas, SP: [s.n], 2009. Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Soja. 2. Proteômica. 3. Estresse oxidativo. 4. Metaloproteômica. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Proteomic, enzymatic and metalloproteomic aspects of transgenic and non-transgenic soybean seed

Palavras-chaves em inglês: Soybean, Proteomic, Oxidative stress, Metalloproteomic

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (orientador), Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha (IB-UNESP), Prof. Dr. José Alberto Fracassi (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 19/08/2009

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e ao Instituto de Química, pela possibilidade de realização desta Dissertação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação e marcante presença durante esse período.

À todos os professores que também contribuíram para a minha formação profissional. Em especial, aos professores doutores da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Luiz F.C. Oliveira, Rosana Colombara, Renato C. Mattos, Maria A. Mattos e Renata Diniz pelo carisma e amizade.

Aos amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), Alessandra Melo, Alessandra Sussulini, Aline Klassen, Aline Lopes, Ana Cristi, Daiane, Eduardo, Elidiane, Eraldo, Geraldo, Gustavo, Herbert, Jerusa, Lidiane, Marcel, Marcelo, Márcia e Renata pelo companheirismo mútuo e agradável convívio, os quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento desta Dissertação.

Aos recentes colegas do “Ciência e Arte nas Férias” pela afetividade e compromisso demonstrados durante o estágio, em especial à estudante Karina Oliveira que contribuiu para a obtenção de alguma figura desta Dissertação.

Aos funcionários do Instituto de Química que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta Dissertação.

Aos amigos de Bueno Brandão e de Juiz de Fora. Em especial, muito especial, à Mariana R. Almeida, uma companhia que sempre esteve presente me apoiando, corrigindo-me e ajudando-me a superar os momentos difíceis e tornando ainda mais agradáveis os momentos felizes; MUITO OBRIGADO por tudo! Te adoro!

Também, de forma especial, agradeço à toda minha família por acreditarem e confiarem em minha força de vontade, determinação e em meu trabalho.

Enfim, agradeço à todos que contribuíram para a elaboração desta Dissertação.

Súmula Curricular

Dados pessoais

Adilson Roberto Brandão

Brasileiro, Natural de Bueno Brandão – MG, 15/10/1981

e-mail: arobran@yahoo.com.br

Formação acadêmica

2007-2009 Mestrado em Química Analítica

Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas/SP

2002-2006 Graduação em Química/Bacharelado

Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora/MG

Experiência profissional

a) Universidade Estadual de Campinas

- ✓ Monitoria em projeto de pesquisa realizada no Instituto de Química para o programa Ciência e Arte nas Férias (01-02/2009 e 01-02/2008).
- ✓ Membro do Comitê de Apoio do *1º Congresso Brasileiro sobre Especiação Química – EspeQBrasil* (2008).

b) Universidade Federal de Juiz de Fora

- ✓ Monitoria em disciplinas da graduação realizada no Instituto de Ciências Exatas (10/2006 – 02/2007 e 03-07/2004).
- ✓ Iniciação Científica: *Caracterização Espectroscópica de Materiais Sintéticos e Naturais*, bolsa CNPQ (08/2004 – 08/2006).

Produção Científica

Artigo

Brandão, A.R.; Barbosa, H.S.; Arruda, M.A.Z., *Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds*, **J. Proteom.**, submetido.

Oliveira de, L.F.C.; Silva, M.A.P.; Brandão, A.R.; Stephani, R.; Oliveira de, C.I.R.; Gonçalves, R.R.; Barbosa, A.J.; Barude, H.S.; Messaddeq, Y.; Ribeiro, S.J.L., *Amorphous manganese polyphosphates: preparation, characterization and incorporation of azo dyes*, **J. Sol-Gel Sci. Technol.** 50 (2009) 158-163.

Principais resumos

Brandão, A.R.; Capaldi, F.R.; Gratão, P.L.; Azevedo, R.A.; Arruda, M.A.Z., *Avaliação de metaloenzimas em semente de soja transgênica e não-transgênica*, **1º Encontro Brasileiro sobre Especificação Química – EspeQBrasil**, São Pedro/SP 2008.

Barbosa, H.S.; Silva, M.A.O.; Brandão, A.R.; Sussulini, A.; Gozzo, F.C.; Arruda, M.A.Z., *Comparative proteome analysis in transgenic e non-transgenic soybeans*, **2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas – BrMass**, Campinas 2007.

Brandão, A.R.; Oliveira, L.F.C.; Stephani, R., *Caracterização espectroscópica de coacervatos de Mn (II) dopados com tartrazina (E102) e vermelho bordeaux-S (E123)*, **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – RASBQ**, Águas de Lindóia/SP 2006.

Brandão, A.R.; Oliveira de, L.F.C.; Barud, H.S., Ribeiro, S.J., *Caracterização espectroscópica de coacervatos de Ni (II) e Co (II)*, **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – RASBQ**, Poços de Caldas/MG 2005.

Informações complementares:

www.lattes.cnpq.br/2425363676951960

Resumo

Neste trabalho de Dissertação, os organismos em estudo foram sementes de soja transgênica e não-transgênica, sendo que a soja geneticamente modificada é do tipo *Roundup Ready*® (RR), na qual a inserção de um gene tornou a planta resistente a herbicidas que possuem o glifosato como princípio ativo. Procurou-se avaliar o perfil proteômico, enzimático e metálico em sementes de soja a fim de contribuir com uma recente área do conhecimento, a Metalômica. Os resultados deste estudo indicam que não foi encontrada variação quanto ao total de proteínas entre as amostras e, também, que não houve variação quanto ao número total de *spots* detectados nos géis de ambas as amostras para as faixas de pH avaliadas (3-10 e 4-7) após a separação do conjunto de proteínas por 2D PAGE. Porém, por meio do estudo de análise de imagens dos géis verificou-se que 10 *spots* apresentaram variações significativas quanto a expressão de proteínas entre as sementes ($\geq 90\%$). Deste conjunto, 08 proteínas puderam ser identificadas por meio da obtenção dos espectros de massa empregando MALDI-QTOF MS e busca em banco de dados. Aparentemente, não foi encontrada variações em termos de atividade enzimática das enzimas CAT, GR, SOD e APX, avaliadas em gel e por espectrofotometria, entre as amostras de soja transgênica e não-transgênica no estágio de semente, portanto, não verifica-se uma situação de estresse oxidativo neste estágio. O mapeamento das espécies metálicas foi feito por SR-XRF e ICP MS e, alguns elementos puderam ser detectados (Co, Nb, Cd, Se, V, La, Ce, Th, Ru, Zr e Hg). Apenas 02 *spots* protéicos das amostras de semente de soja transgênica apresentaram teor de V que pudesse ser quantificado, no entanto, devido a enorme variação de gel para gel e de variações que são intrínsecas de sistemas biológicos, aspectos mais conclusivos sobre suas quantificações ainda não foram possíveis. Também, não foi encontrado na literatura relatos sobre a possível presença deste elemento nas proteínas identificadas.

Abstract

In this work, transgenic and non-transgenic soybean seeds were studied, being the Roundup Ready® (RR) type, the soybean genetically modified, to which the insertion of the gene make the plant resistant to herbicides that present the glifosate as active principle. The proteomic, enzymatic and metal profiles were evaluated in the soybean seeds to contribute to a new area, Metallomics. The results indicated that no variation was obtained related to the amount of total proteins between both samples as well as no variation related to the number of those detected spots in the gels in the pI range evaluated (3-10 and 4-7) after 2D PAGE. However, from the gel image analysis, 10 spots presented significant variation related to the protein expression between the seeds ($\geq 90\%$). From this set, 08 proteins were analyzed by MALDI-QTOF-MS and the peptide sequence of each one identified in the protein data bank. Apparently, no variation when considering CAT, GR, SOD and APX in terms of enzymatic activity for transgenic and non-transgenic soybean seeds was achieved, when spectrophotometry and gel electrophoresis were used. Apparently, there is not the detection of the oxidative stress at this stage. The metallic species mapping was carried out by SR-XRF and ICP MS, and some elements were detected (Co, Nb, Cd, Se, V, La, Ce, Th, Ru, Zr and Hg). Vanadium was quantificated in 02 spots of transgenic soybean seeds only; however, due to the high gel to gel variation and those ones commonly achieved in biological systems, conclusive aspects about their quantifications were not still possible. There is no information in the literature about a possible presence of V in those identified proteins.

Índice

LISTA DE ACRÔNIMOS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURA.....	XIV
HIPÓTESE E OBJETIVO.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	2

CAPÍTULO I ASPECTOS PROTEÔMICOS..... 5

1 OBJETIVO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 <i>Soja: Importância e modificação genética</i>	6
2.2 <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE</i>	7
2.3 <i>Análise proteômica por 2D PAGE e tratamento de imagens de géis</i>	9
2.4 <i>Espectrometria de Massas – MALDI-QTOF MS</i>	10
3 PARTE EXPERIMENTAL	12
3.1 <i>Equipamentos e acessórios</i>	12
3.2 <i>Reagentes e Soluções</i>	12
3.3 <i>Amostras</i>	14
3.4 <i>Extração das proteínas para análise por 2D PAGE</i>	14
3.5 <i>Quantificação de proteínas totais no extrato</i>	15
3.6 <i>Separação das proteínas por 2D PAGE</i>	15
3.7 <i>Tratamento de imagens</i>	17
3.8 <i>Digestão das proteínas e caracterização por MALDI-QTOF MS</i>	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 <i>Extração e quantificação de proteínas totais</i>	20
4.2 <i>Deteção e seleção dos spots</i>	21
4.3 <i>Análise de imagens dos géis de poliacrilamida</i>	22
4.3.1 <i>Otimização da massa de proteínas a ser aplicada nos géis</i>	22
4.3.2 <i>Avaliação da distribuição dos spots nos géis</i>	24
4.3.3 <i>Avaliação e comparação das imagens dos géis</i>	26
5 CONCLUSÕES PARCIAIS	34

CAPÍTULO II ASPECTOS ENZIMÁTICOS E METALOPROTEÔMICOS..... 35

6 OBJETIVO	36
7 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
7.1 <i>Estresse oxidativo em vegetais</i>	36
7.2 <i>Espécies metálicas em sistemas biológicos</i>	38

7.3	<i>Fluorescência de raios X – SR-XRF</i>	39
7.4	<i>Espectrometria de massas – ICP MS</i>	40
8	PARTE EXPERIMENTAL	42
8.1	<i>Equipamentos e acessórios</i>	42
8.2	<i>Reagentes e soluções</i>	42
8.3	<i>Extração das proteínas para análise de atividade enzimática</i>	43
8.4	<i>Quantificação de proteínas totais no extrato</i>	44
8.5	<i>Separação por PAGE nativa para avaliar atividade enzimática</i>	44
8.5.1	Revelação para CAT	45
8.5.2	Revelação para GR	45
8.5.3	Revelação para SOD	45
8.6	<i>Determinação da atividade enzimática por espectrofotometria</i>	46
8.7	<i>Mapeamento e quantificação das espécies metálicas nos spots</i>	47
8.7.1	Mapeamento das espécies metálicas por SR-XRF	47
8.7.2	Secagem e decomposição dos spots	48
8.7.3	Mapeamento e quantificação das espécies metálicas por ICP MS	48
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
9.1	<i>Quantificação de proteínas totais</i>	50
9.2	<i>Avaliação da atividade enzimática nos géis</i>	50
9.3	<i>Atividade enzimática por espectrofotometria</i>	54
9.4	<i>Avaliação das espécies metálica nos spots</i>	55
10	CONCLUSÕES	58
	CONCLUSÕES GERAIS	60
	REFERÊNCIAS	61

Lista de Acrônimos

2D PAGE – *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*

%I – intensidade relativa

%V – volume relativo

AAS – *atomic absorption spectrometry*

APX – ascorbato peroxidase

CAT – catalase

CE – *capillary electrophoresis*

CHAPS – 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilâmonio]-1-propanosulfonato

CHCA – ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

CBB G-250 – *comassie brillante blue* G-250

DNTB – ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

DPIP – 2,6-dicloroindofenol de sódio

DTT – 1,4-ditiotreitol

EPSPS – *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*

ESI MS – *electrospray ionisation mass spectrometric*

ESI MS/MS – *electrospray ionization tandem mass spectrometry*

ETAAS – *electrothermal atomic absorption spectrometry*

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAAS – *flame atomic absorption spectrometry*

FAES – *flame atomic emission spectrometry*

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

fmol – 10^{-15} mol

GR – glutationa redutase

GSH – γ -glutamil-cistenil-glicina

GSSG – L-glutationa oxidada

HPLC – *high-performance liquid chromatography*

IAA – iodoacetamida

IEF – *isoelectric focusing*

IEF PAGE – *isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis*

ICP MS – *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP OES – *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

IV - infravermelho

LA – *laser ablation*

LA-ICP MS – *laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry*

LC – *liquid chromatography*

LC-MS/MS – *liquid chromatography tandem mass spectrometry*

MALDI-QTOF MS – *matrix-assisted laser desorption ionization quadrupole time of flight mass spectrometry*

MM – massa molecular

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazólio

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato sal tetrasódico

NBT – cloreto de nitroazul de tetrazólio

PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*

pI – ponto isoelétrico

pmol – 10^{-12} mol

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonila

PVPP – polivinilpirrolidona

ROS – *reactive oxygen species*

RR – *Roundup Ready®*

SDS – *sodium dodecyl sulfate*

SDS PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*

SOD – superóxido dismutase

SR-XRF – *synchrotron radiation X ray fluorescence*

TEMED – N,N',N,N'-tetrametilenodiamina

TFA – ácido trifluoracético

UV/Vis – ultravioleta/visível

XRF – *X ray fluorescence*

Lista de Tabelas

Tab. 1: Concentração de proteínas totais nas amostras de soja, p. 20

Tab. 2: Número de *spots* detectados nas amostras de soja, p. 26

Tab. 3: *Spots* com variação de 90% em volume relativo e/ou intensidade relativa, p. 32

Tab. 4: Caracterização das proteínas para os *spots* que apresentaram variação de expressão, p. 33

Tab. 5: Programa aplicado para decomposição dos *spots* protéicos, p. 48

Tab. 6: Condições de operação do equipamento de ICP MS, p. 49

Tab. 7: Mapeamento das espécies metálicas e metalóides do *spots* selecionados, p. 55

Tab. 8: Equação da curva de calibração e figuras de mérito para quantificação das espécies metálicas, p. 57

Lista de Figuras

Fig. 1: Curva de calibração média construída para a quantificação de proteínas no extrato, p. 20

Fig. 2: Detecção dos spots nos pares de géis, p.22

Fig. 3: Géis de poliacrilamida nas condições otimizadas para a quantidade de proteínas totais aplicadas, p. 24

Fig. 4: Histogramas de distribuição das proteínas nos géis em relação ao pI, p. 24

Fig. 5: Histogramas de distribuição das proteínas nos géis em relação a MM, p. 25

Fig. 6: Equivalência dos géis (*matching*), p. 27

Fig. 7: Correlação entre os *spots* dos pares de géis (*scatter plot*), p. 29

Fig. 8: Spots com variação de expressão de %V e/ou %I a um nível de 90%, p. 31

Fig. 9: Géis de poliacrilamida nas condições otimizadas das massas de proteínas totais aplicada, p. 50

Fig. 10: Avaliação da atividade enzimática para CAT e GR a partir dos géis, p. 51

Fig. 11: Avaliação da atividade enzimática para SOD a partir do gel, p. 52

Fig. 12: Famílias de SOD, p. 52

Fig. 13: Gráfico de densidade óptica com a indicação das isoformas de SOD, p. 53

Fig. 14: Classificação das isoformas de SOD, p. 53

Fig. 15: Atividade enzimática das enzimas CAT, GR e APX analisadas por espectrofotometria, p. 54

Hipótese e Objetivo

A hipótese desta dissertação baseia-se no fato de que a modificação genética pode levar a uma variação do conjunto de proteínas de um organismo, logo, de seu proteoma. Neste sentido, seria possível identificar possíveis variações no conjunto de proteínas entre as sementes de soja transgênica e não-transgênica. Foi também inferido que estas modificações poderiam desencadear algum nível de estresse nas plantas e, quem sabe, alterar a distribuição e/ou concentração dos possíveis metais nas proteínas.

Assim, para corroborar com a hipótese formulada, o objetivo geral desta dissertação foi avaliar o perfil proteômico em sementes de soja transgênica e não-transgênica, avaliar algumas das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, bem como identificar e quantificar espécies metálicas que estariam ligadas a proteínas.

Introdução Geral

Embora a modificação genética de organismos biológicos gere polêmicas, no caso dos vegetais, esta tem sido bastante requerida por diversos setores da sociedade, a saber, aqueles envolvidos na produção destes novos cultivares e aqueles responsáveis pelo manufaturamento e/ou industrialização. Uma vez que estas espécies vegetais são submetidas a um processo de melhoramento genético ou modificação genética, elas se tornam resistentes a condições climáticas adversas, pragas, doenças, defensivos agrícolas, bem como apresentam melhoria em sua composição nutricional [1].

No presente trabalho de dissertação, os organismos em estudo são sementes de soja transgênica e não-transgênica. Na soja geneticamente modificada denominada *Roundup Ready*® (RR), desenvolvida pela empresa Monsanto, a inserção de um gene tornou a planta resistente a herbicidas que possuem o glifosato (N-fosfometil-glicina, $C_3H_8NO_5P$) como princípio ativo [1]. Contudo, a inserção, a eliminação ou a substituição de genes em um organismo pode levar a uma alteração em seu proteoma, ou seja, uma alteração em seu conjunto de proteínas como, por exemplo: i) a síntese de novas substâncias, ii) a extinção de substâncias que são normalmente produzidas pelo organismo sem a modificação genética, iii) a produção em quantidade diferenciada de substâncias que já sejam produzidas pelo organismo não modificado geneticamente, entre outras [2,3]. Todavia, uma alteração no proteoma do organismo pode significar, também, uma alteração em seu metaloma, pois se estima que cerca de 40% do total de proteínas contenham metais em sua constituição [4].

A presença de íons metálicos em amostras biológicas já é bem conhecida pela comunidade científica, no entanto, sua participação e/ou função em processos biológicos como, por exemplo, em reações de transferências de elétrons (Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}), em processos catalíticos, sendo constituintes de proteínas e peptídeos (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Se^{4+}), ainda não é totalmente compreendida. Todavia, este tema tem ganhado enorme importância em uma recente área do conhecimento, a Metalômica [5, 6].

Ainda neste contexto, várias linhas de pesquisa tem surgido na literatura com diferentes termos e abordagens. Pode-se citar, por exemplo, o “metaloma” – que trata da caracterização do total de espécies metálicas/metalóides presentes no organismo; a “metaloproteômica” – que trata da caracterização do total de elementos presentes em um local específico no organismo (compartimento celular, proteína, metaloproteína); a “metalômica” – que trata de um estudo mais aprofundado do metaloma. Nesta área busca-se informações sobre as interações e conexões funcionais de espécies metálicas/metalóides com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas do organismo [6] e, portanto, a elucidação e o papel biológico dos íons metálicos ligados biomoléculas.

Para se poder avaliar estas possíveis alterações no metaloma e também no proteoma em um sistema biológico, é necessário combinar técnicas analíticas que possibilitem reunir componentes estrutural, de seletividade e sensibilidade adequadas. As técnicas que possuem seletividade apropriada mais empregadas neste contexto para análises de proteínas são a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e cromatografia líquida (LC) multidimensionais; as técnicas que possuem sensibilidade compatível para a determinação das espécies metálicas são a espectrometria de emissão óptica ou de massas com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP OES e ICP MS, respectivamente), fluorescência de raios X (XRF), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ETAAS) e, em alguns casos, com chama (FAAS); por fim, a componente estrutural pode ser alcançada por meio de técnicas de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI MS) ou com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), as quais possibilitam realizar a identificação e caracterização das proteínas previamente separadas [4-7].

A avaliação de alterações protéicas quando estas são expressas em um gel de poliacrilamida é realizada por meio do estudo de análise de imagens dos géis. Estes estudos, apesar de serem tediosos e necessitarem de inúmeros cuidados, podem fornecer informações singulares para este campo de pesquisa [8]. Uma de suas principais aplicações está relacionada à indicação de possíveis biomarcadores em sistemas biológicos [9].

Ainda não se sabe com certeza, mas alterações como estas poderiam levar a uma condição de estresse os organismos vivos como as plantas, uma vez que, o

estresse vegetal pode ser originado de diferentes maneiras. As causas mais comuns costumam ser a poluição do ar, a seca, as limitações nutricionais e a temperatura; podendo também, ser induzido pela atividade humana [10]. Contudo, uma característica comum a estes diferentes tipos de estresse é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) nos tecidos da planta [10]. Alguns estudos têm mostrado que a exposição de plantas a elevadas concentrações de íons metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) causa um aumento na produção de ROS, levando-as, portanto, ao estresse oxidativo [11]. Logo, se houver alguma variação expressiva em termos de proteínas na planta e estas tenderem a possuir espécies metálicas em sua constituição, este fato poderia conduzir o organismo a uma situação de estresse oxidativo.

Portanto, este trabalho procura levantar alguns aspectos, dentre eles o proteômico, o enzimático e o metaloproteômico que possam contribuir com informações significativas para esta recente área do conhecimento e, também, tenta sugerir a possibilidade de identificar alguns possíveis indicadores do processo de modificação genética.

Capítulo I

Aspectos proteômicos

1 Objetivo

Neste capítulo procura-se destacar possíveis variações quanto ao número e expressão de proteínas entre as amostras de semente de soja transgênica e não-transgênica, bem como, efetuar a identificação e caracterização das mesmas. Para a avaliação de expressão pretende-se destacar os principais aspectos que devem ser verificados nos estudos de análise de imagens de géis. Com a identificação e caracterização das proteínas pretende-se destacar as principais funções e/ou em que processos as mesmas estão envolvidas no organismo do vegetal.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Soja: Importância e modificação genética

A opção do emprego de sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.) para se realizar estudos proteômicos é bastante conveniente, pois são encontradas quantidades significativas de proteínas em sua composição (cerca de 40% em termos de massa seca). Deste percentual, a Glicinina e β -Conglicinina são responsáveis por cerca de 70% do total de proteínas de armazenamento [12]. Esta quantidade expressiva de proteínas, e também um percentual considerável de óleo (algo em torno de 21% em massa seca), torna a soja um produto de grande importância para o setor industrial, pois várias aplicações podem ser propícias, como, por exemplo: na fabricação de farinha protéica, que pode ser empregada nos mais diversos setores alimentícios, na fabricação de cosméticos e, mais recentemente, como biodiesel [1]. Além destas características peculiares, há estudos que sugerem o consumo frequente de soja, uma vez que este alimento pode estar relacionado com a redução de doenças cardiovasculares, cânceres e osteoporose [13].

A soja transgênica, assim como outros organismos geneticamente modificados, pode ser obtida por meio de processos biotecnológicos, sendo que a característica

desejada que se pretende transferir para o organismo, geralmente, é conduzida pelas seguintes etapas: i) rastreamento: etapa em que é selecionada a característica desejada; ii) seleção de genes: etapa em que se escolhe o gene ou genes que irão fornecer a característica escolhida; iii) inserção do gene na planta e iv) cultivo da planta geneticamente modificada [14]. Desta forma, vários tipos de soja transgênica são desenvolvidos atualmente, sendo mais conhecida e comercializada a soja denominada de *Roundup Ready*® (RR), a qual foi desenvolvida pela empresa Monsanto (EUA). No presente caso, a respectiva modificação consistiu na codificação da enzima EPSPS (EC 2.5.1.19) por um gene proveniente da bactéria do solo *Agrobacterium sp.* cepa CP4. Assim, a enzima resultante - CP4 EPSPS, que possui muito menor afinidade pelo glifosato, permite que a planta modificada torne-se resistente aos herbicidas a base de glifosato, uma vez que este atua de forma a impedir que a planta forme aminoácidos essenciais para síntese de proteínas e, também, de alguns metabólitos [14,15].

Kin *et al* [16] investigaram variações da proteína CP4 EPSPS em sementes de soja transgênica empregando a proteína extraída e purificada de *Escherichia coli* clonada como controle. Após a separação e detecção da proteína por 2D PAGE, com base em seu pI (5,1) e MM (47kDa) característicos, foi realizada sua identificação empregando-se MALDI-QTOF MS e ESI MS/MS por meio de banco de dados de proteínas.

2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida – 2D PAGE

A eletroforese é uma técnica de separação que baseia-se na migração de espécies carregadas na presença de um campo elétrico aplicado, sendo que a carga adquirida por estas espécies pode resultar da ionização, dissociação ou pela associação com outras moléculas carregadas (SDS no caso da separação em gel) [17].

Em misturas complexas como, por exemplo, na separação de proteínas, os sistemas em duas dimensões mostram-se muito eficientes. Nestes sistemas, em uma primeira dimensão é explorada a propriedade carga das proteínas; a qual se dá por meio da focalização isoeletrica (IEF PAGE), em que um gradiente de pH é formado no gel. Em

uma segunda dimensão é explorada a propriedade massa molecular (MM) das proteínas em condição desnaturante, ou seja, na presença do detergente docecil sulfato de sódio. Desta forma, ao final da separação, e após a revelação das proteínas contidas no gel, obtêm-se pontos (*spots*), os quais contêm uma proteína, pelo menos. Desta maneira, e também quando padrões de proteínas com MM conhecidas são submetidos ao processo de separação, é possível fazer uma estimativa do ponto isoelétrico e da massa molecular das proteínas em cada *spot* visualizado [18].

A fim de se esclarecer como ocorre a separação das proteínas por 2D PAGE, faz-se necessário compreender que na eletroforese com focalização isoelétrica o objetivo é separar as proteínas de acordo com seus respectivos ponto isoelétricos (pIs), ou seja, a proteína irá migrar pelo gel com gradiente de pH (formado pela migração rápida de substâncias poliméricas – ex. anfólitos) até que sua carga de rede seja nula; neste ponto, o pI da proteína será igual ao pH do gradiente. Na eletroforese em gel em condições desnaturantes (SDS PAGE), o surfactante (SDS) atua de modo a normalizar a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre elas passa a ser as suas respectivas MM. Esta normalização se dá pelo aumento de cargas negativas nas proteínas provenientes do SDS e pela presença de agentes redutores (DTT), os quais rompem ligações de sulfeto na estrutura protéica facilitando o acesso do SDS e conferindo uma forma similar ao conjunto de proteínas [17, 18]. Logo, fica claro que a eletroforese 2D PAGE é a combinação da eletroforese IEF PAGE e SDS PAGE.

A matriz de gel - poliacrilamida - é rotineiramente empregada nestes experimentos, pois possui características importantes como, por exemplo, ser transparente, inerte, e estável em extensas faixas de pH, temperatura e força iônica. Esta é formada por agentes de polimerização e co-polimerização como a acrilamida e a bis-acrilamida (N,N'-metileno bis-acrilamida), respectivamente [17].

A importância da eletroforese em gel para estudos metaloproteômicos pode ser verificada pelo trabalho de Ma *et al* [19]. Os autores comentam que a eletroforese em gel é a plataforma chave para a separação de proteínas devido ao seu alto poder de resolução. Destacam, também, que a especiação de metaloproteínas pode ser realizada, uma vez que após a separação em gel é possível a combinação com técnicas de espectrometria atômica (AAS) e de massa (ICP MS) para a determinação dos elementos presentes. Os autores consideram que o ponto mais importante para se realizar a

especificação de metaloproteínas seria a manutenção da integridade do metal ligado a proteína durante o processo de separação eletroforética. Portanto, alguns cuidados experimentais, como, por exemplo, evitar alta temperatura, controlar o pH, dentre outros fatores, podem contribuir para que não ocorra a perda da espécie metálica ligada a proteína.

2.3 Análise proteômica por 2D PAGE e tratamento de imagens de géis

Em estudos proteômicos a identificação de diferenças quanto a expressão de proteínas e/ou a verificação de *spots* novos ou ausentes, e portanto, de possíveis biomarcadores, é uma de suas principais aplicações. Neste sentido, a 2D PAGE merece destaque, pois sua alta resolução permite realizar uma separação eficiente e, principalmente devido às características inerentes à técnica (obtenção de um gel bidimensional), há a possibilidade de se realizar estudos comparativos, os quais podem facilitar a identificação de candidatos a biomarcadores por meio da comparação entre os *spots* dos géis [9, 20].

No entanto, a comparação entre géis, que é realizada pela comparação de imagens dos géis obtidas por registradores de imagens específicos, é uma tarefa bastante árdua, que exige atenção, paciência e, principalmente, cuidado experimental [8]. O principal problema destes estudos comparativos é a alta variação que existe entre os géis. Estas são decorrentes da variabilidade intrínseca de amostras biológicas e outros fatores como, por exemplo, o preparo de amostra, a quantidade de proteínas totais aplicada, o método empregado para a marcação das proteínas no gel e, talvez, um dos fatores mais relevantes seja a polimerização do gel; uma vez que inúmeros fatores podem influenciar (temperatura em que ocorre a polimerização, concentração e pureza dos reagentes, tempo de formação do polímero, etc) [8, 21, 22,].

Provavelmente, devido a estas dificuldades experimentais ainda não está claramente definido na literatura de quanto deve ser a diferença de expressão entre *spots* de pares de géis para que possa se garantir que, de fato, haja uma variação significativa entre as expressões de proteínas no gel. Este fato pode ser evidenciado por

meio da análise de alguns trabalhos da literatura, Eravci *et al* [21] e Choe *et al* [23] afirmam que somente variações quanto a expressão de proteínas no gel são usualmente consideradas relevantes se alcançarem diferenças da ordem de 100% (2 vezes) ou superiores. Carli *et al* [24], no entanto, em um estudo envolvendo plantas transgênicas (*Lycopersicon esculentum* e *Nicotiana benthamiana*) consideraram variações de 75% (1,5 vezes); Garcia *et al* [25] em um estudo no qual avaliaram alterações no proteoma de girassol quando cultivado na presença de espécies metálicas adotaram 90% (1,8 vezes) como sendo uma variação significativa de expressão de proteínas nos géis de eletroforese.

Contudo, além da otimização de vários destes fatores (ex. massa aplicada) bem como da tentativa de padronização de outros fatores experimentais (ex. evitar variações interdias para avaliações comparativas), devem ser tomados cuidados adicionais para que se consiga realizar uma análise comparativa que seja mais confiável, como, por exemplo, uma clara definição do *spot* da proteína, ou seja, deve-se delimitar áreas que sejam aproximadamente circulares ou elípticas. Outro cuidado importante diz respeito a uniformidade da densidade de fundo no gel, a qual deve ser baixa em relação a densidade dos *spots* [22].

2.4 Espectrometria de Massas – MALDI-QTOF MS

O princípio da espectrometria de massas se baseia em 04 unidades fundamentais: a primeira é responsável pela ionização da molécula, etapa que resulta na formação de um íon positivo ou negativo e que ocorre por meio de uma fonte de íons do espectrômetro; a segunda está encarregada de separar os íons previamente gerados de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Esta ocorre em um analisador de massas; a terceira é responsável pela medida desses íons e ocorre em um transdutor – dispositivo encarregado de converter o feixe de íons em sinal elétrico – e, finalmente, a quarta unidade encarrega-se da medida da abundância desses íons, a qual é baseada na altura ou área do pico. Esta unidade de aquisição dos dados registra e armazena as informações provenientes do transdutor [26]. Assim, devido aos tipos de informações

geradas e também a alta detectabilidade (faixas de pmol a fmol), seletividade e rapidez de análise, a espectrometria de massas tem sido muito empregada em estudos de sistemas biológicos, nos quais se buscam, principalmente, informações estruturais [27].

Na técnica de espectrometria de massas por tempo de voo em quadrupolo com ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI-QTOF MS), os analitos deverão ser adsorvidos em uma matriz (ie. ac. nicotínico, ác. sinapínico e ác. α -ciano-4-hidroxicinâmico) que absorva radiação do laser incidente (região do UV) e, em seguida, transfira suavemente sua energia para os mesmos, que, em decorrência da sublimação, são levados ao analisador de massas, onde são separados pelos diferentes tempos de voo [26]. Wind e Lehmann [27] discutem sobre as aplicações da espectrometria de massas para sistemas biológicos (proteínas, peptídeos, metaloproteínas, ácidos nucleicos, etc), onde é destacada a especificidade molecular como a característica principal da técnica.

Xu *et al* [28] realizaram a identificação de proteínas de folhas de soja empregando MALDI-QTOF MS e LC-MS/MS após a separação por 2D PAGE. Ao todo 260 *spots* foram digeridos com tripsina para a efetuação das análises, sendo que 53 *spots* protéicos tiveram as proteínas identificadas por MALDI-QTOF MS e 66 por LC-MS/MS. Em ambos os casos, as buscas foram realizadas utilizando bancos de dados de proteínas como o NCBI e SwissProt. Os autores destacam que 71 *spots* protéicos apresentaram uma única proteína presente e que a maioria das proteínas identificadas estão envolvidas em processo de metabolismo de energia. Portanto, a combinação da 2D PAGE com MALDI-QTOF MS e LC-MS/MS foi bastante adequada para a separação e identificação de proteínas da folha de soja.

3 Parte experimental

3.1 Equipamentos e acessórios

Os principais equipamentos e acessórios utilizados na primeira parte desta dissertação são apresentados a seguir.

- ✓ Balança analítica, modelo AE 200 (Mettler);
- ✓ Espectrofotômetro UV/Vis, modelo B582 (Micronal);
- ✓ Espectrômetro de massas do tipo MALDI-QTOF (Waters);
- ✓ Estufa microprocessada de cultura e bacteriologia, modelo Q316M2 (Quimis);
- ✓ Fonte de corrente contínua, modelo EP19001 (Amersham Biosciences);
- ✓ Kit de digestão, *Montage® In-Gel Digest_{2P} Kit* (Millipore);
- ✓ Mesa agitadora, modelo Q225M (Quimis);
- ✓ Misturador vortex, modelo M-376000 (Thermolyne);
- ✓ Placa aquecedora, modelo 261.1 (Quimis);
- ✓ Potenciômetro, modelo DM20 (Digmed);
- ✓ Sistema de purificação Milli-Q, modelo Quantum™ cartridge (Millipore);
- ✓ Sistema para eletroforese 2D PAGE, modelo Ettan™ Daltisik (GE Healthcare);
- ✓ Scanner, modelo ImageMaster™ II (GE Healthcare);
- ✓ Sistema de vácuo, *Manifold MultiScreen™ HTS* (Millipore);
- ✓ Ultracentrífuga, modelo Bio-Spin-R (BioAgeny);
- ✓ Vidrarias disponíveis em laboratórios de química.

3.2 Reagentes e Soluções

Todos os frascos e vidrarias utilizados no desenvolvimento do trabalho foram lavados em água corrente e descontaminados pela imersão em solução de HNO₃ 10% (v/v) por, pelo menos, 12h. Em seguida, após três enxágues em água destilada os materiais eram levados para secagem apropriada. Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (18,2 MΩcm), obtida a partir do sistema de purificação

Milli-Q. Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico, e aqueles empregados nesta primeira parte do trabalho são citados a seguir.

- ✓ 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilânio]-1-propanosulfonato (**CHAPS**) – $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, MM = 614,88 g/mol (USB);
- ✓ 1,4 Ditiotretitol (**DTT**), $C_4H_8O_2S_2$ – MM = 154,24 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ Acetato de amônio, $NH_4CH_3CO_2$ – MM = 77,08 g/mol (Mallinckrodt);
- ✓ Acetona, $(CH_3)_2CO$ – MM = 58,08 g/mol (Synth);
- ✓ Acetonitrila grau HPLC, CH_3CN – MM = 41,05 g/mol (J. T. Backer);
- ✓ Ácido acético glacial, CH_3CO_2H – MM = 60,05 g/mol (J. T. Baker);
- ✓ Ácido clorídrico 37% (v/v), HCl – MM = 36,5 g/mol (Merck);
- ✓ Ácido fosfórico, 85% (v/v) H_3PO_4 – MM = 98,00 g/mol (Merck);
- ✓ Ácido trifluoracético (**TFA**), CF_3CO_2H – MM = 114,02 g/mol (Tedia);
- ✓ Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (**CHCA**), $C_{10}H_7NO_3$ MM = 189,17 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Acrilamida, C_3H_5NO – MM = 71,08 g/mol (USB);
- ✓ Agarose, grau biologia molecular (BioAgency);
- ✓ Albumina de soro bovino (Merck);
- ✓ Anfólitos de pH 3-10 (Amersham Biosciences);
- ✓ Azul de bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$ – MM = 691,94 g/mol (BioAgency);
- ✓ Azul de coomassie G-250 (**CBB G-250**), $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$ – MM = 854,03 g/mol (J. T. Baker);
- ✓ Bicarbonato de amônio, NH_4HCO_3 – MM = 79,06 g/mol (Mallinckrodt);
- ✓ Cloreto de potássio, KCl – 74,55 g/mol (Merck);
- ✓ Dodecil sulfato de sódio (**SDS**), $C_{12}H_{25}NaO_4S$ – MM = 288,28 g/mol (Synth);
- ✓ Etanol, CH_3CH_2OH – MM = 46,07 g/mol (J. T. Baker);
- ✓ Éter de petróleo, p.e. 35-60 °C (Mallinckrodt);
- ✓ Fluoreto de fenilmetanosulfonila (**PMSF**), $C_7H_7FO_2S$ – MM = 174,19 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Glicerol, $C_3H_8O_3$ – MM = 92,09 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ Glicina, NH_2CH_2COOH – MM = 75,07 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ Iodoacetamida (**IAA**), C_2H_4INO – MM = 184,96 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ Metanol, CH_3OH – MM = 32,04 g/mol (J. T. Baker);
- ✓ N,N'-metilenobisacrilamida (**bisacrilamida**), $C_7H_{10}N_2H_2$ – MM = 154,17 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ N,N',N,N'-tetrametilenodiamina (**TEMED**), $C_6H_{16}N_2$ – MM = 116,20 g/mol (J. T. Baker);
- ✓ Nitrogênio líquido (White Martins);
- ✓ Óleo mineral (Amersham Biosciences);
- ✓ Padrão protéico de massa molar (Amersham Bioscience);
- ✓ Persulfato de amônio, $(NH_4)_2S_2O_8$ – MM = 228,20 g/mol (Mallinckrodt)

- ✓ Sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – MM = 132,14 g/mol (J. T. Baker)
- ✓ Tiouréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ – MM = 76,12 g/mol (Synth);
- ✓ Tripsina grau proteômico (Sigma-Aldrich);
- ✓ Tris-hidroximetilaminometano (**tris**), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ – MM = 121,14 g/mol (Amersham Biosciences);
- ✓ Uréia, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ – MM = 60,06 g/mol (BioAgency).

3.3 Amostras

As amostras de sementes de soja transgênica (MSOY 7575) e não-transgênica (MSOY 7501) utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra. Siu Mui Tsai (CENA/USP – Piracicaba, SP), sendo estas, previamente adquiridas da empresa Monsanto – Brasil [29]. As sementes de soja geneticamente modificadas que foram estudadas neste trabalho são aquelas denominadas *Roundup Ready*® (RR).

Como neste trabalho as amostras em estudo incluem organismos geneticamente modificados é informado o número de registro do Certificado de Qualidade em Biossegurança: 240/2007, publicado em 24 de julho de 2007.

3.4 Extração das proteínas para análise por 2D PAGE

O procedimento de extração empregado foi baseado no protocolo desenvolvido por Sussulini *et al* [30]. Inicialmente, ca. de 0,50 g de ambas as amostras foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas, separadamente, com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó bastante fino. Em seguida, o pó fino foi transferido para um béquer contendo ca. de 10 mL de éter de petróleo sob agitação durante 15 min. Esta etapa foi realizada duas vezes e é necessária para remoção do excesso de óleo. Em seguida, extraiu-se as proteínas por meio de uma solução tampão contendo tris – 50,0 mmol/L (pH 8,8), KCl – 1,5 mmol/L, DTT – 10,0 mmol/L, PMSF – 1,0 mmol/L e SDS – 0,10% (m/v) na proporção de 10:1 (mL/g). A extração foi realizada sob agitação lenta por

10 min em banho de gelo. O extrato protéico foi centrifugado a 5000 g^1 por 5 min na temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante contendo a mistura protéica foi transferido para tubos Eppendorf® e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Quantificação de proteínas totais no extrato

A estimativa da concentração de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford [31], em que a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão de calibração.

Construiu-se curvas de calibração a partir de soluções estoques de albumina ($500\text{ }\mu\text{g/ml}$) para a faixa de 0 a $90\text{ }\mu\text{g/ml}$. Após diluição adequada (ca. 500 vezes), foi adicionado $200\text{ }\mu\text{L}$ do extrato de proteínas em cubetas de plástico a $2,50\text{ mL}$ do reagente de Bradford, o qual é composto por CBB G-250 – $0,01\%$ (m/v), etanol – 5% (v/v) e H_3PO_4 – 10% (v/v). Após 4 min de reação mediu-se a absorvância, em triplicata, a 595 nm , utilizando um espectrofotômetro UV/Vis.

3.6 Separação das proteínas por 2D PAGE

Foi realizada uma etapa de precipitação das proteínas totais utilizando acetato de amônio – $0,10\text{ mol/L}$ (12 h) com o objetivo de remover possíveis interferentes no processo eletroforético (sais, surfactantes aniônicos, etc).

O precipitado foi centrifugado a 5000 g por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com soluções de acetato de amônio – $0,10\text{ mol/L}$ (uma vez), acetona – 80% (v/v) (duas vezes) e etanol – 70% (v/v) (uma vez). Todas as soluções de limpeza devem ser mantidas geladas a fim de minimizar a ressolubilização das proteínas. Em seguida, o precipitado foi ressolubilizado empregando uma solução de ressolubilização composta por uréia – $7,0\text{ mol/L}$, tiouréia – $2,0\text{ mol/L}$, CHAPS – 2%

¹ g – relative centrifugation force (rcf); rpm – revolutions per minute. Para conversão: $g \times 1\text{ cm} = 11,110 \times R \times (\text{rpm}/1000)^2$, sendo R a medida em cm do raio do rotor.

(m/v), anfólitos de pH 3-10 – 0,5% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT – 0,28% (m/v), utilizando um misturador *vortex*.

Para a separação por IEF empregou-se fitas de 13 cm contendo gel de poliacrilamida com gradientes de pH de 3-10 e de 4-7. As quantidades em massa de proteínas totais foram calculadas para que fossem aplicadas nos géis de 3-10 as massas de 150, 300 e 500 µg e 500 µg para os géis de 4-7 no volume máximo de hidratação da fita (250 µL). A fita foi então coberta com aproximadamente 1300 µL de óleo mineral e colocada para hidratar em suporte apropriado por, pelo menos, 12h. Em seguida, a fita foi levada ao sistema focalizador onde o seguinte programa foi aplicado [18]: i) 500 V em 500 Vh, ii) 1000 V em 800 Vh, iii) 10000 V em 11300 Vh e iv) 10000 V em 2000 Vh para os géis de 3-10 e em 3000 Vh para os géis de 4-7 (total acumulado 14600 Vh e 15600 Vh, respectivamente).

Ao término da focalização isoeletrica as fitas foram equilibradas em duas etapas. A primeira etapa tem a finalidade de manter as proteínas na forma reduzida. Nesta, foi empregada uma solução contendo uréia – 6,0 mol/L, SDS – 2,0% (m/v), azul de bromofenol – 0,002% (m/v), glicerol – 30% (v/v), tris – 50,0 mmol/L (pH 8,8) e DTT – 1,0% (m/v). A segunda etapa, denominada alquilação, tem a finalidade de prevenir que as proteínas sejam oxidadas durante o processo eletroforético [18], nesta, uma solução similar foi empregada substituindo o DTT por IAA – 2,5% (m/v). Ambas as etapas foram realizadas sob agitação por 15 min.

Para a separação por SDS PAGE foi preparado previamente um gel de poliacrilamida (12,5% m/v) em suporte apropriado de dimensões 18,0 x 16,0 x 0,15 cm. São necessários 50,0 mL de uma solução constituída por acrilamida – 12,5% (m/v), bis-acrilamida – 0,33% (m/v), tris – 0,375 mol/L (pH 8,8), SDS – 0,10% (m/v), persulfato de amônio – 0,050% (m/v) e TEMED – 0,033% (v/v) para o preparo de um único gel nestas dimensões. Em seguida, a fita, já equilibrada, foi aplicada sobre este gel e, ao lado desta, foi colocado um papel de filtro umedecido com 7,0 µL de um padrão de massa molecular compreendido por β-fosforilase (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa). Foi adicionada uma solução aquecida de agarose – 0,5% (m/v) para garantir o contato entre ambos (fita e papel) com o gel de poliacrilamida. Por fim, a corrida eletroforética foi realizada em duas etapas com o seguinte programa

aplicado [18]: i) 90 V, 15 mA/gel durante 30 min e ii) 250 V, 25 mA/gel durante ca. 5h em solução tampão contendo tris – 25 mmol/L (pH 8,8); glicina – 192 mmol/L e SDS – 0,1% (m/v) a temperatura de 12,5 °C.

Após a separação por SDS PAGE, o gel foi transferido para uma cuba contendo uma solução fixadora compreendida por ácido acético – 10% (v/v) e etanol – 40% (v/v), onde permaneceu por 50 min sob agitação lenta. Em seguida, o gel foi enxaguado com água desionizada, e, então, levado para revelação das proteínas. Para isso, aplicou-se uma solução reveladora compreendida por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 8,0% (m/v), H_3PO_4 – 1,6% (v/v), CBB G-250 – 0,08% (m/v) e metanol – 25% (v/v) durante um período de 48h.

Após o processo de revelação o gel foi enxaguado com água desionizada sob agitação por 15 min (3 vezes) e escaneado para posterior tratamento das imagens.

3.7 Tratamento de imagens

Os parâmetros escolhidos para a obtenção das imagens dos géis foram: resolução – 300 dpi, zoom 100% e *depth*² – 12 ou 16 *bits* por *pixel*, os quais foram selecionados a partir das recomendações do fabricante [32]. As imagens capturadas foram gravadas no formato *.tif, e, em seguida, importadas para tratamento das mesmas no programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*.

Todo o tratamento das imagens foi sempre feito para pares de géis de soja transgênica e não-transgênica obtidos de um mesmo processo de separação eletroforética (04 pares de ambos os gradientes de gel com massa otimizada).

Iniciou-se pelo ajuste de contraste da imagem do gel de forma a melhorar a visualização pelo analista. Depois, selecionou-se de uma pequena região do gel (ca. 10%), a qual continha *spots* de expressão intermediária. Os parâmetros para a detecção, *smooth*³ – 3, *saliency*⁴ – 60 e *min area*⁵ – 48, foram selecionados a partir das

² Regula o nível de cinza do pixel

³ Fixa o número de vezes que o programa homogeneiza a região selecionada antes de seguir a detecção

⁴ Medida que baseia-se na curvatura do *spot*, filtra *spots* reais

⁵ Elimina regiões menores que a indicada

recomendações do fabricante [32]. Em seguida, estendeu-se estes parâmetros para todo o gel por meio de uma ferramenta do programa para a detecção automática.

Após a detecção automática dos *spots*, fez-se a edição manual a fim de eliminar *spots* falso positivos, inserir *spots* falso negativos e efetuar correções quanto a delimitação das regiões dos *spots* – devendo estas serem aproximadamente circulares ou elípticas [22]. Esta edição manual foi realizada por meio da utilização da ferramenta para visualização em 3D de pequenas regiões do gel (ca. 10%) disponível no programa e, também, pela comparação das intensidades da área do *spot* com uma mesma área do fundo, adotando a seguinte condição para existência do *spot*: $I_{spot} > I_{fundo} + 3.S_{fundo}$ [21, 33], onde “I” é a intensidade.

A equivalência entre os *spots* dos pares de géis (*matching*) foi realizada pela definição manual de 03 *landmarks*⁶. Neste processo de *matching* o gel com maior número de *spots* é selecionado como sendo o gel padrão (*master gel*) para se realizar a comparação entre os géis. Nesta etapa não fez-se a edição manual dos *spots* equivalentes, pois os géis apresentaram uma boa correlação (*matching* > 70%⁷).

Por fim, os *spots* dos pares de géis foram comparados quanto a sua distribuição nos géis, volume e intensidade relativos (normalizados) para todas as réplicas. Os valores obtidos foram transferidos para uma planilha do programa *Excel (Microsoft)* para análise estatística.

3.8 Digestão das proteínas e caracterização por MALDI-QTOF MS

O procedimento de digestão das proteínas foi feito empregando-se um kit de digestão, de acordo com as recomendações do fabricante [34]. Inicialmente, os *spots* (~2 mm diâmetro) foram recortados do gel e colocados dentro de uma placa (*ZipPlate*). Adicionou-se 100 µL de (NH₄)₂CO₃ – 25 mmol/L em acetonitrila – 5% (v/v) em cada pocinho da placa e encubou-se por 30 min dentro de um recipiente fechado a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, aplicou-se um vácuo de -50 a -75

⁶ *Spots* claramente definidos e identificados nos pares de géis

⁷ Verificado experimentalmente.

kPa utilizando o sistema *manifold* até a remoção completa de toda a solução. Em seguida adicionou-se 100 µL de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 25 mmol/L em acetonitrila – 50% (v/v), e seguiu-se de forma análoga a descrita. Esta última etapa (adição de solução e vácuo) foi repetida mais uma vez. Finalizado este procedimento adicionou-se 200 µL de acetonitrila – 100% (v/v), encubou-se por 10 min e aplicou-se vácuo. Em seguida, adicionou-se 15 µL de solução triptica previamente preparada – 20 µg de tripsina em 0,2 mL de HCl – 1 mmol/L e 1,6 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ – 25 mmol/L, portanto, 166 ng tripsina por alíquota de 15 µL – e encubou-se por 12 horas a 30 °C. Adicionou-se 8 µL de acetonitrila – 100% (v/v) diretamente sobre a micro coluna e encubou-se por mais 15 min a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 130 µL de TFA – 0,2% (v/v) e encubou-se por 30 min a temperatura ambiente. Aplicou-se um vácuo de -20 a -30 kPa utilizando o sistema *manifold* até a remoção completa de toda a solução. Adicionou-se mais 100 µL de TFA – 0,2% (v/v) e, em seguida, aplicou-se vácuo de -50 a -75 kPa. Esta etapa foi repetida mais uma vez, e manteve-se o vácuo por mais 5 min após todos os pocinhos estarem vazios. Finalmente, adicionou-se 20 µL de solução para eluição (TFA – 0,1% (v/v) e acetonitrila – 50% (v/v)) diretamente sobre os *spots*. Antes de aplicar o vácuo de -20 a -30 kPa, foi colocado sob a placa *ZipPlate* uma placa coletora, contendo o mesmo número de pocinhos que a *ZipPlate*, para armazenar a mistura de peptídeos resultante da digestão.

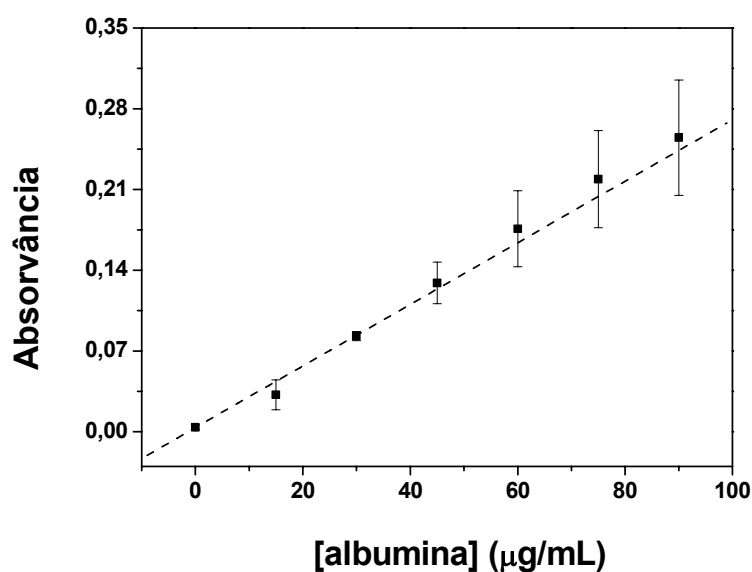
A partir de então, 2 µL de amostra foram misturados com 2 µL de matriz (água/acetonitrila – 1:1 (v/v), TFA – 0,1% (v/v), CHCA – 1,0% (m/v)); a mistura foi colocada sobre a placa de MALDI e esta deixada para secar por 30 min. Após seca, a placa de MALDI foi colocada no equipamento para a efetuação das medidas. As medidas foram realizadas no modo íon positivo, com fonte de íons nitrogênio, no modo “V” empregando os seguintes parâmetros: frequência do laser – 200 Hz, faixa de massa 800-3000 Da, com o mínimo de 40 contagens para a efetuação dos espectros MS/MS, e estes com o mínimo de 10 contagens para registro. Os espectros obtidos no formato *.pkl foram processados por meio do programa *MASCOT Distiller*. A identificação das proteínas foi realizada por meio da busca no banco de dados MSDB e/ou *Glycine max*, utilizando os seguintes parâmetros: um sítio de clivagem, digestão triptica, carbamidometilação em cisteína como modificação fixa e oxidação em metionina como modificação variável, considerando erro máximo de 0,1 Da.

4 Resultados e Discussão

4.1 Extração e quantificação de proteínas totais

O corante azul brilhante de coomassie (CBB G-250), utilizado no método de Bradford [31], interage com as cadeias laterais básicas e aromáticas da proteína formando um complexo. Esta interação provoca um deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm [35].

A curva de calibração construída em dias aleatórios e a comparação entre o teor de proteínas totais entre as amostras são apresentados na figura 1 e tabela 1, respectivamente. Os valores encontrados para a concentração de proteínas totais nas amostras de sementes de soja estão de acordo com resultados da literatura [30].



Tab. 1: Concentração de proteínas totais nas amostras de sementes de soja ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$).

Amostra	[proteínas] (mg/mL)	
	NT	T
	18 ± 2	18 ± 3

(NT) – não-transgênica; (T) – transgênica

Fig. 1: Curva de calibração média* ($n = 4$) construída para a quantificação de proteínas no extrato.

$R^2 = 0,998$, LD = 1,32 µg/mL e LQ = 4,40 µg/mL. (*) Obtida a partir de dias aleatórios.

Como pode ser verificado pela tabela 1, não há variação significativa em termos da concentração de proteínas totais entre as amostras de soja para extrações em dias aleatórios. Verifica-se, também, que há flutuações na medida da absorvância para as regiões de maiores concentrações da curva, as quais podem estar relacionadas a

alterações de pH durante a adição da amostra ao reagente, conforme reportado por Zaia *et al* [35].

4.2 Detecção e seleção dos spots

Previamente ao processo de detecção e seleção dos *spots* nos géis efetuou-se etapas de limpeza dos géis com água desionizada conforme descrito no item 3.6. Este procedimento elimina o excesso de corante do gel e, desta forma, contribui para a diminuição do fundo devido ao corante durante a obtenção das imagens.

Os parâmetros selecionados para a obtenção das imagens (item 3.7) influenciam diretamente na qualidade das mesmas. Resoluções inferiores à utilizada (150, 200 dpi) levam a perda de informações nestes estudos (definição da imagem) e não são recomendadas. Ampliação (zoom) menor que o utilizado (50%, 75%, etc) leva a inabilidade de se resolver a imagem. O parâmetro *depth*, que regula o nível cinza do pixel, deve ser de pelo menos 12 *bits*, pois desta forma obtêm-se mais detalhes na imagem do gel. Os parâmetros resolução e zoom, quando superiores aos utilizados apenas aumentam o tamanho do arquivo e não trazem informações adicionais [32].

Os parâmetros empregados para a detecção dos *spots* servem para auxiliar no processo de detecção, no entanto, o que mais influencia a qualidade dos dados é a adequada edição manual. *Smooff*, que fixa o número de vezes que o programa (*ImageMaster*) irá homogeneizar a região selecionada antes de seguir a detecção, deve ser otimizado de forma a detectar *spots* reais. *Saliency*, que é uma medida baseada na curvatura do *spot* e que serve como um filtro para o algoritmo do programa selecionar os *spots* reais, deve ser ajustada para que os *spots* reais apresentem saliência maior que a do fundo. *Min area*, que é utilizado para eliminar regiões menores que a indicada, possibilita, também, que partículas do gel com *pixels* muito escuros sejam eliminados.

Embora o ajuste adequado destes parâmetros possa resultar em um processo de detecção eficiente é indispensável a edição manual dos spots do gel para se fazer a seleção dos mesmos [32, 33]. Por meio desta, visa-se eliminar *spots* falso positivos, inserir *spots* falso negativos e efetuar correções quanto a delimitação das regiões dos *spots*, as quais devem ser aproximadamente circulares ou elípticas [22]. Este processo

pode ser melhor compreendido ao olhar para a figura 2, gerada a partir da ferramenta para visualização em 3D de pequenas regiões do gel (ca. 10%).

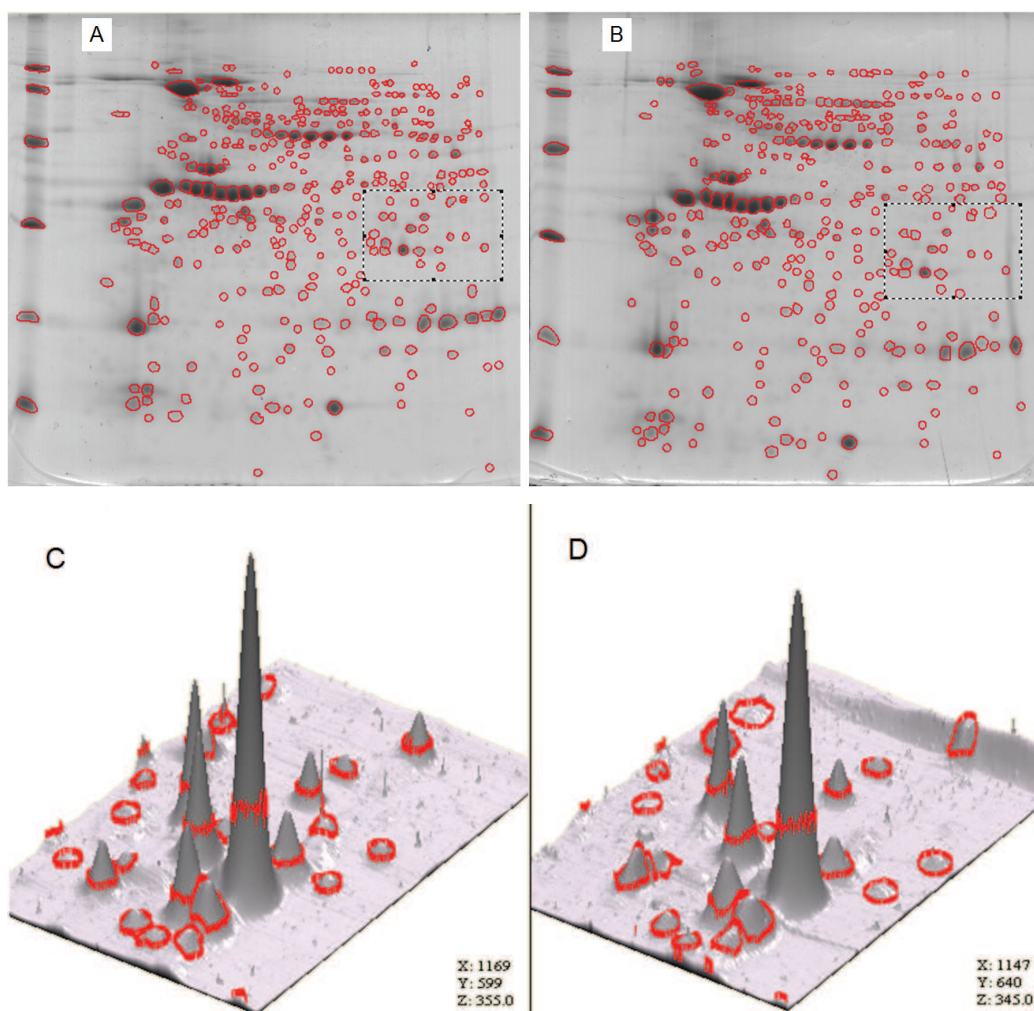


Fig. 2: Detecção dos spots nos pares de géis. **A** – gel de soja NT com 500 μ g; **B** – gel de soja T com 500 μ g; **C** e **D** são a ampliação, em 3D, das regiões selecionadas do gel “A” e “B”, respectivamente, para a verificação dos spots previamente detectados e selecionados.

4.3 Análise de imagens dos géis de poliacrilamida

4.3.1 Otimização da massa de proteínas a ser aplicada nos géis

Três diferentes massas de proteínas totais (150, 300 e 500 μ g) foram testadas no processo de separação por 2D PAGE para géis com gradiente de pH de 3-10.

Para os géis em que foram aplicadas 150 µg de proteínas totais foi observado um número reduzido de *spots* (ca. 125 *spots*). Para os géis em que foram aplicadas 300 µg foi observado um aumento significativo no número de *spots* detectados (ca. 179 *spots* – 40%). Para os géis em que foram aplicadas 500 µg não foi observado um aumento significativo do número de *spots* (ca. 185 *spots* – 3,5%); no entanto, pôde ser notada uma alta densidade de fundo e uma maior dificuldade para se definir as regiões dos *spots*. Segundo Cutler *et al* [22] esta alta densidade de fundo e a incerteza na delimitação dos *spots* poderia levar a resultados equivocados e, com certeza, dificultaria, ainda mais, o estudo de análise das imagens. Logo, a escolha dos géis com 300 µg de proteínas totais aplicada foi adotada para o estudo de análise de imagens.

Para os géis com gradiente de pH de 4-7 um estudo semelhante foi feito [36], sendo que a quantidade de proteínas totais mais adequada foi de 500 µg para este gradiente de gel. Nesta condição, aproximadamente 370 *spots* foram detectados. As imagens dos géis para as condições otimizadas são mostradas na figura 3.

Após a definição da quantidade de proteínas totais a ser aplicada no gel com gradiente de pH de 3-10 como sendo de 300 µg, e de 500 µg para os géis com gradiente de pH de 4-7, foram produzidas 04 réplicas de géis para ambas as amostras de semente de soja, sendo que em todos os processos de separação as corridas eram realizadas para pares de géis, ou seja, em uma mesma corrida eletroforética, sempre era realizada a separação das proteínas para uma amostra de soja transgênica e outra de soja não-transgênica. Este cuidado experimental poderia garantir uma maior equivalência das condições experimentais durante o processo de separação, pois caso houvesse alguma variação de corrente, tensão, temperatura, etc, durante a corrida eletroforética, estas ocorreriam igualmente para ambas as amostras. Cabe destacar que o número de réplicas de géis adotado neste trabalho de dissertação para avaliação proteômica está de acordo com o indicado por trabalhos da literatura. Choe *et al* [23] sugerem que sejam corridas 03 ou 04 réplicas e Meunier *et al* sugerem que sejam corridas no mínimo 03, mas indicam 05 réplicas como aconselhável [37].

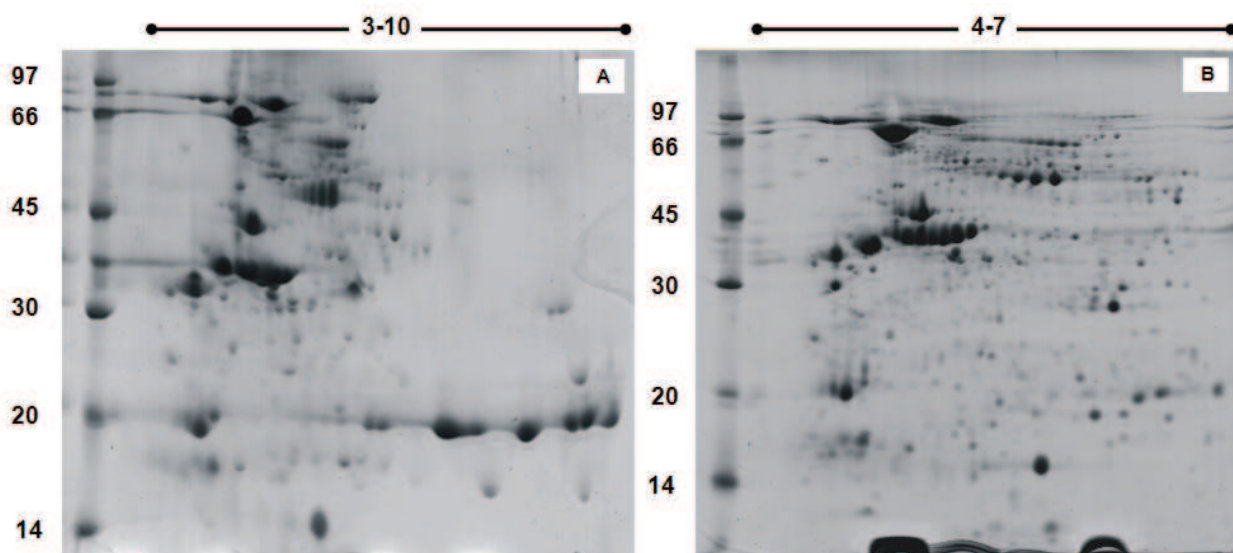


Fig. 3: Géis de poliacrilamida nas condições otimizadas para a massa de proteínas aplicada. **A** – gel de 3-10 com 300 μ g (soja T), **B** – gel de 4-7 com 500 μ g (soja T).

4.3.2 Avaliação da distribuição dos *spots* nos géis

Ambos os géis com gradiente de pH 3-10 e 4-7 foram avaliados quanto a distribuição dos *spots*. Estas avaliações foram realizadas por meio de histogramas, que relacionam a frequência com que os *spots* aparecem nos géis em função de seu ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) experimental, conforme mostram as figuras 4 e 5 respectivamente.

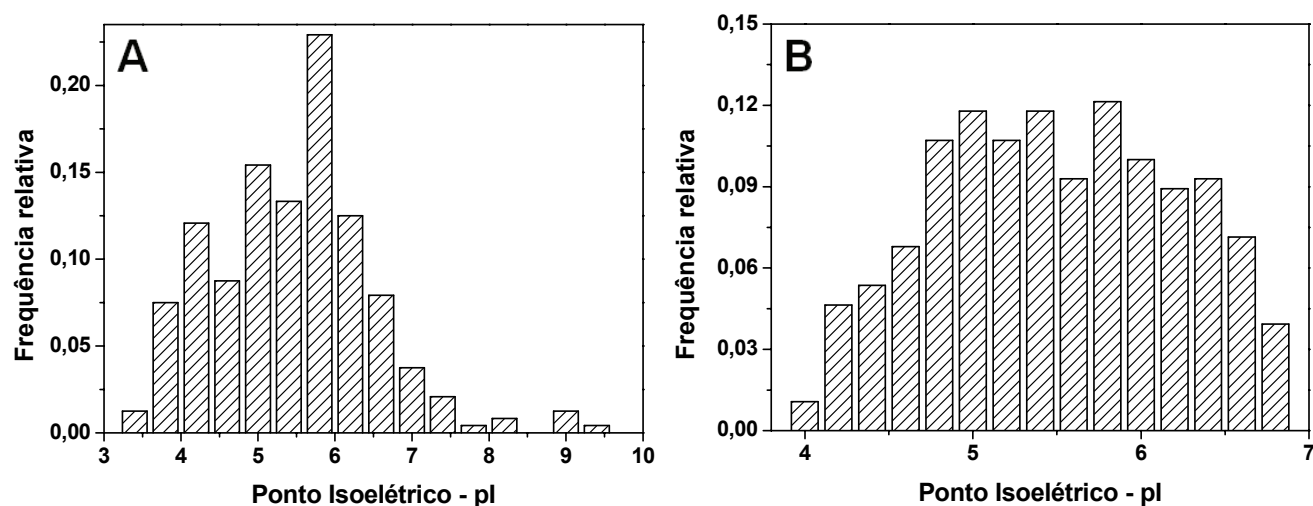


Fig. 4: Histograma de distribuição das proteínas nos géis. **A** e **B** são a distribuição dos *spots* em relação ao pIs em géis de 3-10 e 4-7 (fig. 3), respectivamente. A linha vermelha representa o valor médio de cada distribuição.

No histograma “A” verifica-se que a distribuição das proteínas em função de seus respectivos pls não é homogênea no gel, pois há uma incidência bastante alta destas em uma pequena região (pl 3,8-7,5). Este perfil sugere que com o gel de 3-10 não se consegue efetuar uma separação eficiente das proteínas para a região de 3,8-7,5, aproximadamente; logo, pode ocorrer situações em que *spots* estejam sobrepostos, implicando, portanto, em perda de informações.

Ao se analisar o histograma “B” nota-se que a distribuição das proteínas é bem mais homogênea que a anterior (histograma A). Neste caso, situações em que *spots* estejam sobrepostos são bem menos prováveis e, com certeza, haverá uma maior facilidade para a delimitação das regiões dos *spots* nestes géis, bem como um aumento na possibilidade de encontrar *spots* que em géis de 3-10 não estavam visíveis [20].

Na figura 5 é apresentada a avaliação da distribuição dos *spots* em relação a MM. Para os géis com gradiente de pH de 3-10, histograma “C”, verifica-se que a maioria das proteínas que compõem o mapa proteômico encontram-se distribuídas na faixa de 10-70 kDa, aproximadamente. Analisando-se, agora, a distribuição dos *spots* para os géis com gradiente de pH de 4-7, histograma “D”, pode-se dizer que é razoavelmente similar a anterior (histograma “C”), sendo que as proteínas encontram-se distribuídas na faixa de 10-75 kDa, aproximadamente.

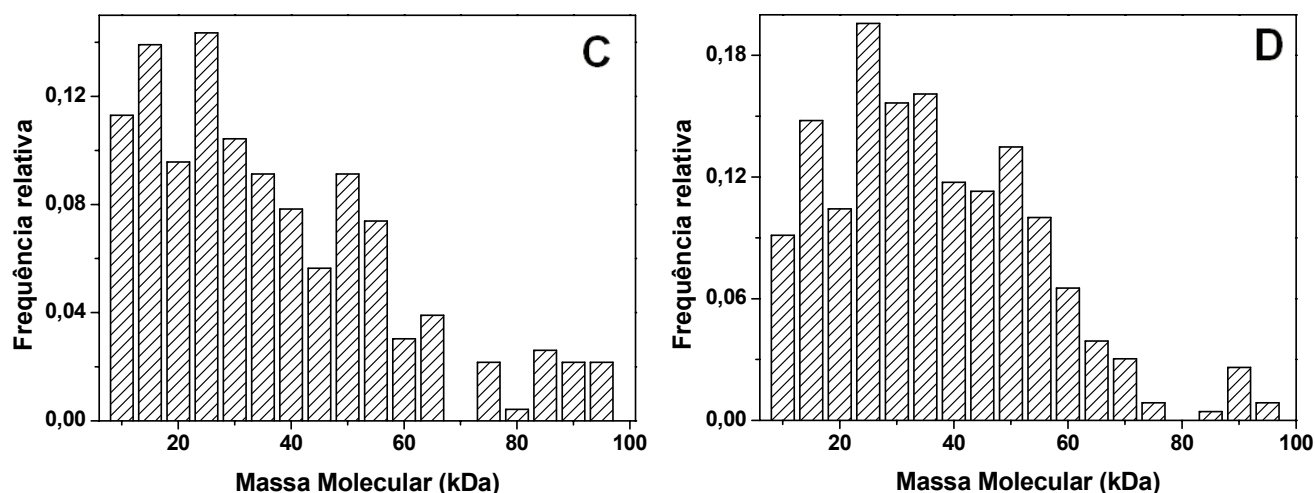


Fig. 5: Histograma de distribuição das proteínas nos géis. C e D são a distribuição em relação a massa molecular em géis de 3-10 e 4-7 (fig. 3), respectivamente. A linha vermelha representa o valor médio de cada distribuição.

Conforme percebe-se, a avaliação da distribuição dos *spots* nos géis fornece resultados apenas qualitativos. No entanto, estes são de grande utilidade, pois possibilitam ao analista decidir sobre a necessidade de se estudar o conjunto de proteínas em diferentes faixas de pH e MM, uma vez que as variações quanto a homogeneidade de distribuição podem ser verificadas em diferentes faixas. Outro ponto importante diz respeito a melhora na resolução de separação dos *spots* para regiões de alta frequência (histogramas “A” e “B”), a qual pode ampliar significativamente o universo de proteínas em estudos comparativos de análise de imagens.

Após estas avaliações, fez-se a contagem dos *spots* em ambos os géis (3-10 e 4-7) para todos os pares de réplicas. Estes resultados são apresentados na tabela 2. Como pode ser verificado, houve um aumento significativo no número de *spots* detectados para os géis com gradiente de pH de 4-7, em relação aos géis com gradiente de pH de 3-10, o que corrobora com a hipótese de que poderia haver *spots* sobrepostos na região de pl de alta frequência (fig. 4). Também pode-se afirmar que não ocorre variação significativa em termos do número total de *spots* para ambos os géis (3-10 e 4-7) entre as amostras de sementes de soja transgênica e não-transgênica.

Tab. 2: Número de *spots* detectados nas amostras de sementes de soja ($\bar{x} \pm s$, n = 4).

Gradiente de gel	NT	T
3-10	216 $\pm$ 50	217 $\pm$ 41
4-7	375 $\pm$ 42	369 $\pm$ 46

(NT) não-transgênica; (T) transgênica

4.3.3 Avaliação e comparação das imagens dos géis

Para se realizar a comparação das imagens entre pares de géis é preciso efetuar o processo de *matching*, ou seja, identificar quais *spots* são equivalentes entre estes pares [8,9]. Conforme descrito no item 3.7, foi indicado manualmente apenas 03 *spots* (*landmarks*) em cada um dos pares de géis no processamento do *matching*. Conseguir-se obter um bom *matching* a partir da indicação de poucos *landmarks* já é um indicativo

de que os pares de géis não sofreram distorções e/ou desalinhamentos muito significativos [32]. A partir de então, o programa efetuou a comparação entre o par de géis para o restante dos *spots*, a fim de identificar aqueles que seriam equivalentes. Este processo pode ser ilustrado pela figura 6. Nesta figura, as regiões demarcadas em vermelho correspondem à forma e localização dos *spots* no gel de semente de soja com maior número de *spots* (*master gel*), e as regiões demarcadas em azul indicam a forma e a localização dos *spots* no gel que foi submetido ao processo de *matching*, este apresenta menor número de *spots* e aparece sobreposto ao gel *master*.

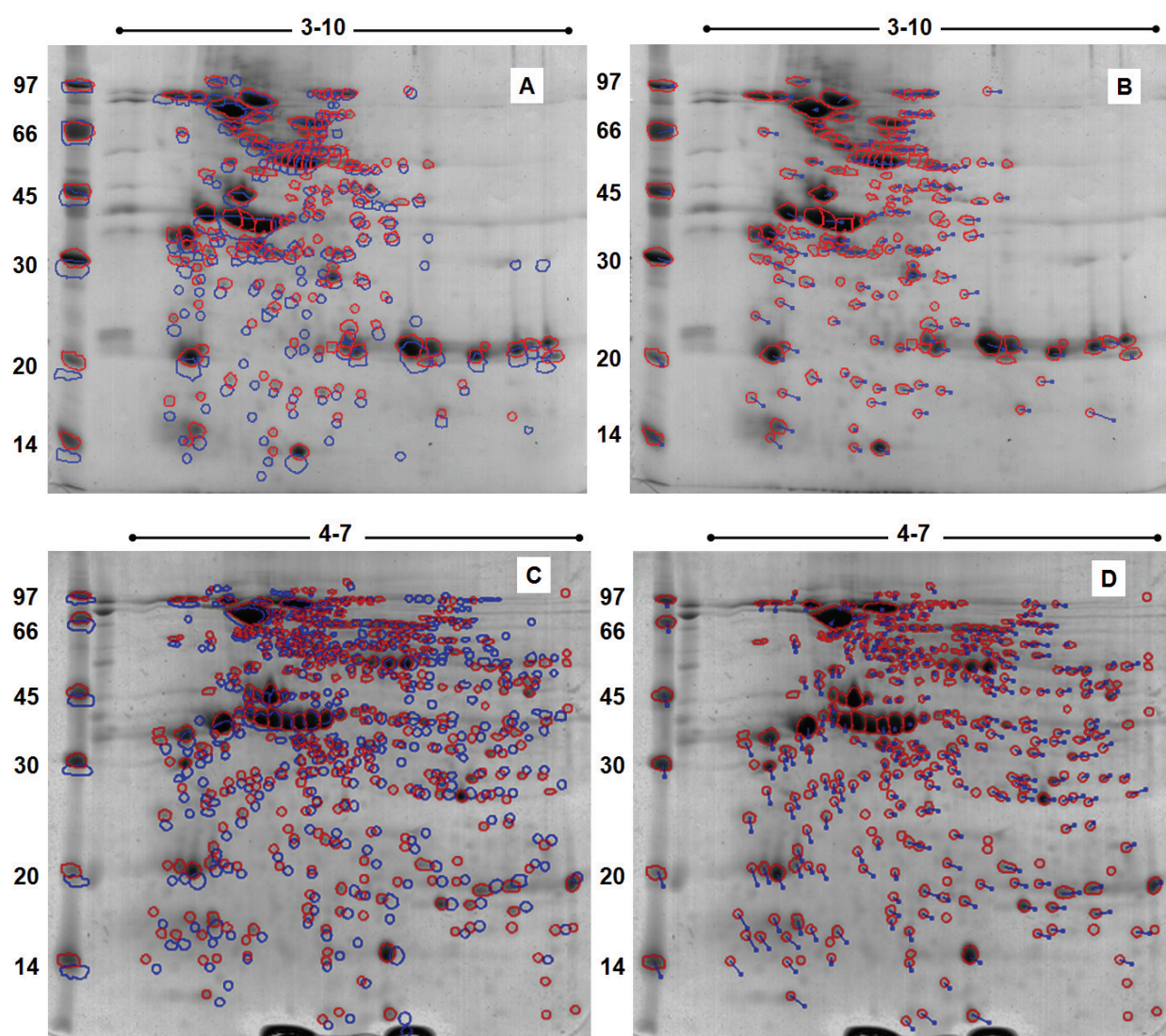


Fig. 6: Comparação dos géis (*matching*). Em A e B são apresentadas as sobreposições das imagens de géis de 3-10, nas quais identifica-se, respectivamente, a forma e a posição dos *spots* no par. Em C e D são apresentadas as sobreposições das imagens de géis de 4-7, nas quais identifica-se a forma e a posição dos *spots* no par, respectivamente.

Como resultado deste processo, e também por identificação manual, foi possível efetuar a correlação de 164 ± 37 spots ($79 \pm 4\%$) para os pares de géis com gradiente de pH de 3-10 e 287 ± 28 spots ($77 \pm 2\%$) para os pares de géis com gradiente de pH de 4-7. Valores de *matching* desta magnitude ($> 70\%$) indicam que os pares de géis são bastante semelhantes entre si e, portanto, pode-se afirmar que as amostras de soja transgênica e não-transgênica apresentam um perfil protéico bastante similar.

Antes de prosseguir no estudo comparativo entre as amostras de soja transgênica e não-transgênica, cabe aqui destacar a importância de se efetuar as separações eletroforéticas, concomitantemente, para os pares de géis. Foi feito o processo de *matching* para amostras de um mesmo tipo (somente transgênicas e somente não-transgênicas) que foram submetidas ao processo de separação eletroforética em dias diferentes, portanto, não concomitantemente. Obteve-se para os géis de soja transgênica um percentual de correlação de $58 \pm 13\%$ para géis de 4-7 e $39 \pm 6\%$ para géis de 3-10; e, para os géis de soja não-transgênica também obteve-se valores similares, sendo $62 \pm 18\%$ para géis de 4-7 e $40 \pm 10\%$ para géis de 3-10. Estas baixas similaridades e alta variações para amostras de um mesmo tipo corroboram com a hipótese de que efetuar comparações entre géis submetidos ao processo de separação eletroforética em dias diferentes, e portanto, condições diferentes, podem trazer resultados equivocados; uma vez as diferenças encontradas para os géis de mesmo tipo podem ser justificadas por variações quanto ao grau de polimerização do gel de policrilamida (principal fator), variações de temperatura, corrente, etc e não devido as amostras já que estas foram as mesmas durante todo o experimento [8, 21]. Contudo, é necessário destacar que resultados de *matching* de mesma magnitude podem ser verificados para amostras, de um único tipo, que foram submetidas a uma mesma corrida eletroforética conforme verificado por Sussulini *et al* [36].

Continuando o estudo comparativo entre as amostras de soja fez-se para cada par de réplicas de ambos os gradientes de géis a correlação entre os spots dos pares de géis para volume e intensidade normalizados, ou seja, volume relativo (%V) e intensidade relativa (%I), figura 7. Cabe destacar que a comparação entre grandezas normalizadas é mais representativa e confiável para estudos de avaliação de diferença de expressão entre proteínas, pois é feita uma correção pelo algoritmo do programa para

a intensidade de fundo do gel, bem como para pequenas variações quanto a quantidade de proteínas totais aplicada no gel [32,9].

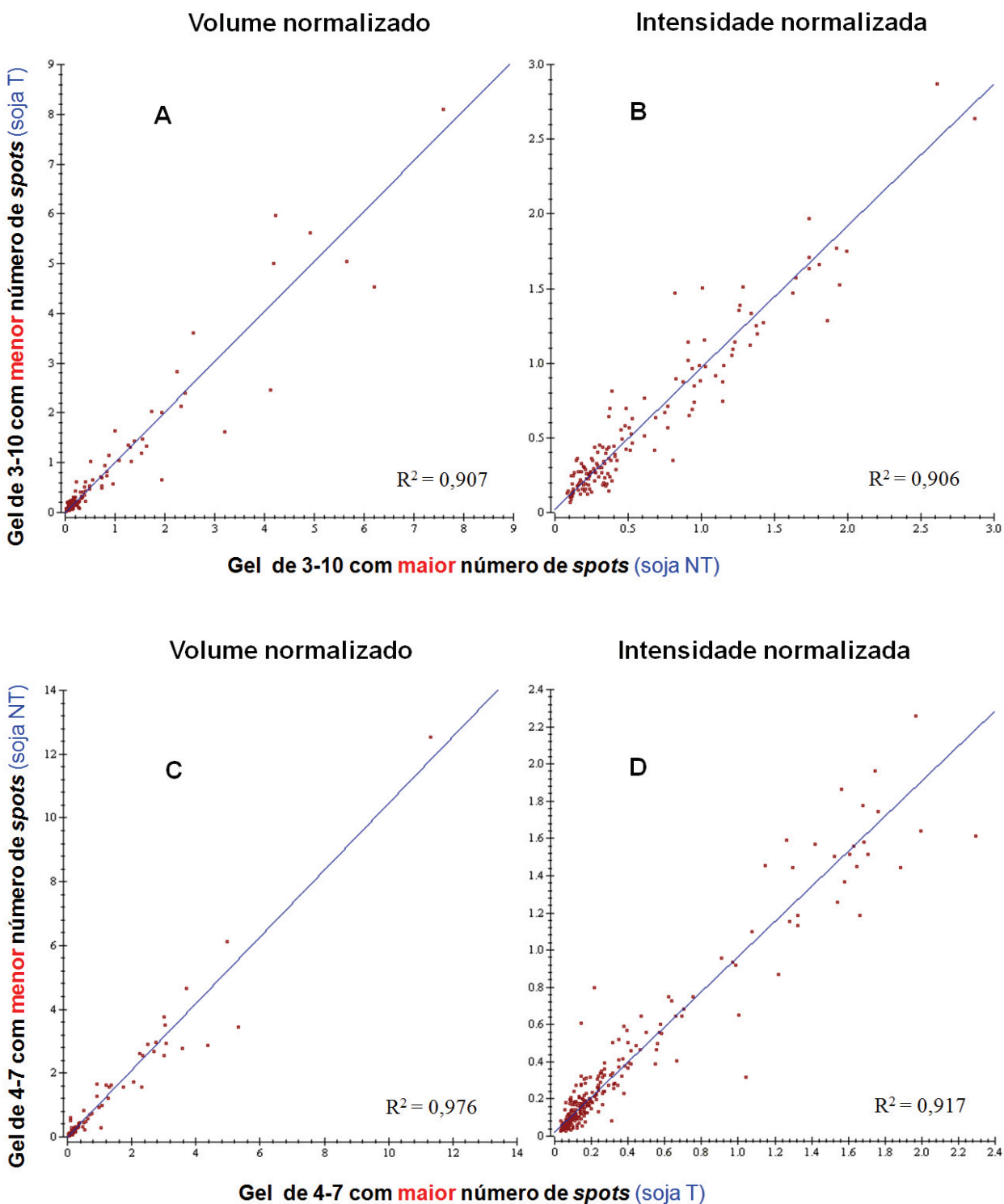


Fig. 7: Correlação entre os *spots* dos pares de géis (*scatter plot*). Em A e B são apresentadas as correlações para os géis com gradiente de pH de 3-10, nas quais o volume relativo e a intensidade relativa, respectivamente, são comparadas para cada *spot* no par. Em C e D são apresentadas as correlações para os géis com gradiente de pH de 4-7, nas quais o volume relativo e a intensidade relativa são comparadas para cada *spot* no par respectivamente.

Nesta figura, cada ponto do gráfico representa a relação entre o volume normalizado ou intensidade normalizada dos *spots* correlacionados durante o processo de *matching*. Percebe-se que há uma boa correlação ($R^2 > 0,9$) entre os *spots* dos pares de géis para as duas grandezas avaliadas (%V e %I) em ambos os gradientes de gel estudados. Nesta figura, quanto mais próximo o ponto estiver da curva, menor será a diferença de volume normalizado ou intensidade normalizada entre *spots* equivalentes; portanto, somente alguns *spots* poderão apresentar diferença de expressão entre os pares de géis, pois não são observados muitos pontos distantes das curvas (razão $> 1,8$ vezes), tanto de volume normalizado quanto de intensidade normalizada. A partir de então, os valores de %V e %I para cada *spot* que pudesse ser feita a correlação foram coletados para os pares de géis (ca. de 107 *spots* para cada um dos géis com gradiente de pH de 3-10 e 295 *spots* para cada um dos géis com gradiente de pH de 4-7). Estes valores foram transferidos para uma planilha do programa *Excel (Microsoft)*, e, então, construídas fórmulas matemáticas para o cálculo da razão dos valores de %V e %I entre as amostras de semente de soja, média das razões, desvio padrão e seleção dos *spots* que apresentariam variação significativa de expressão.

Ainda não está estabelecido na literatura um valor de referência para uma variação significativa de expressão entre *spots*, portanto, decidiu-se adotar um valor intermediário entre aqueles reportados [21, 24, 25], item 2.3. Assim, considerou-se uma variação significativamente diferente, aquela que fosse igual ou superior a 90% (1,8 vezes). Em nosso estudo esta condição será alcançada para situações nas quais a razão entre as grandezas %V e %I entre os pares de *spots* seja inferior a 0,55 ou superior a 1,8. Os *spots* com diferença de expressão são mostrados na figura 8, e seus respectivos valores são indicados na tabela 3.

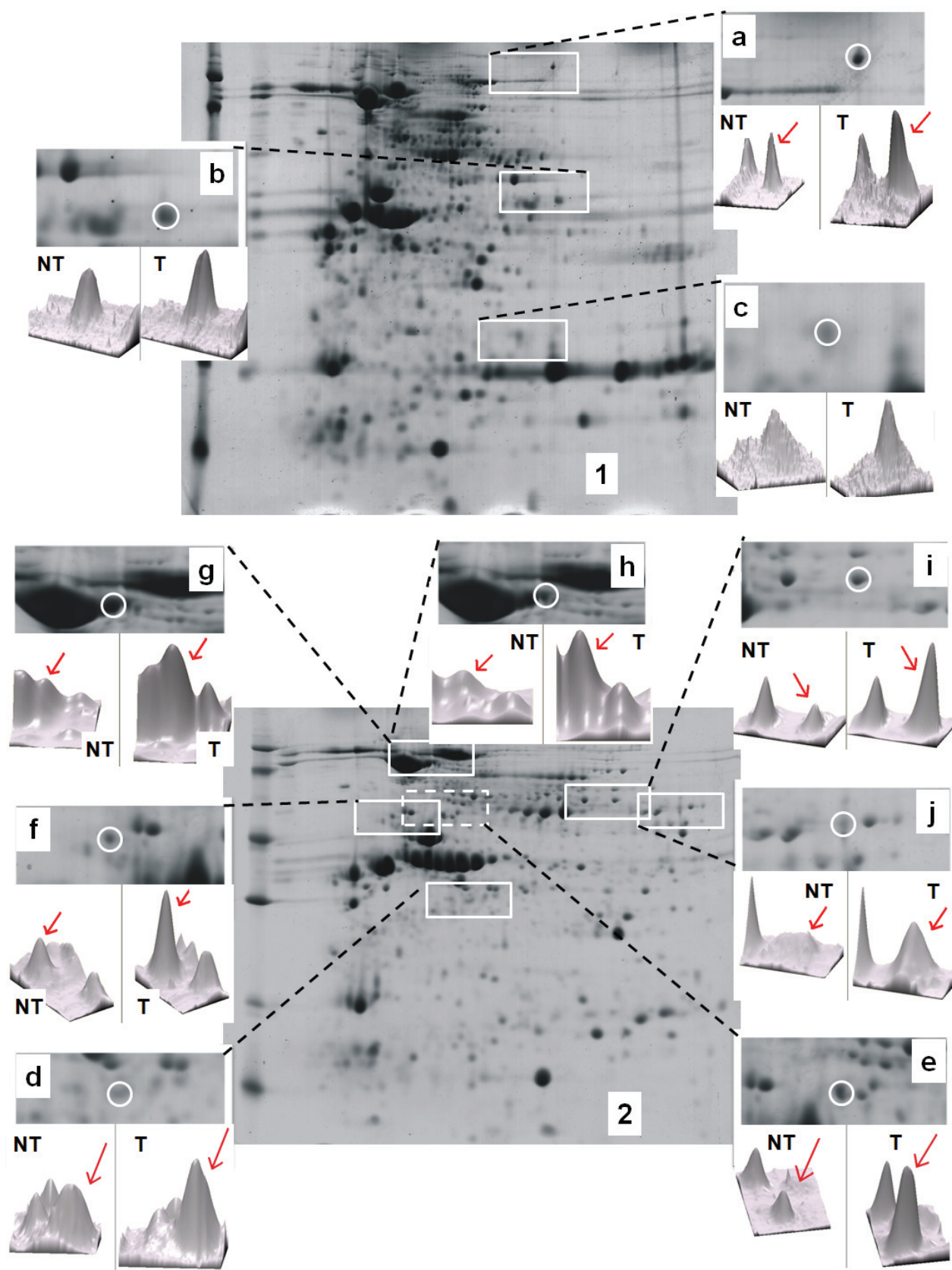


Fig. 8: Spots com variação de expressão de %V e/ou %I a um nível de 90%. Em 1, destacam-se 03 spots no gel de 3-10 e em 2 destacam-se 07 spots no gel de 4-7.

Tab. 3: *Spots* com variação de 90% (1,8 vezes) em volume relativo e/ou intensidade relativa ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$).

Gradiente de gel	Spot			Razão NT/T	
	<i>pI</i>	<i>MM</i> (kDa)	%V	%I	
3-10	a	7,4 ± 0,0	101 ± 9	0,33 ± 0,15	0,53 ± 0,30
	b	7,5 ± 0,1	41 ± 3	0,44 ± 0,20	x
	c	7,0 ± 0,1	23 ± 1	0,54 ± 0,25	x
4-7	d	5,2 ± 0,1	30 ± 1	x	0,52 ± 0,03
	e	5,0 ± 0,1	46 ± 4	0,34 ± 0,02	0,48 ± 0,09
	f	4,7 ± 0,1	46 ± 3	0,35 ± 0,09	x
	g	4,9 ± 0,1	68 ± 4	0,31 ± 0,07	0,29 ± 0,05
	h	5,0 ± 0,1	69 ± 6	x	0,49 ± 0,19
	i	6,2 ± 0,1	63 ± 3	0,51 ± 0,02	x
	j	5,7 ± 0,1	50 ± 4	0,45 ± 0,33	x

x – O valor não atende a condição fixada de variação (90%).

Como pode ser verificado, 03 *spots* apresentaram variação de expressão a um nível de 90% entre os pares de géis com gradiente de pH de 3-10 e 07 *spots* apresentaram variações quanto a expressão, no mesmo nível, para géis com gradiente de pH de 4-7. A partir de então, procedeu-se a caracterização das proteínas do conjunto de *spots* conforme descrito no item 3.8 e o resultado é apreseto na tabela 4. Conseguiu-se caracterizar com sucesso 08 *spots* deste grupo de 10 que apresentou variação de expressão. Alguns *spots* apresentaram mais de uma isoforma resultante do processo de busca em banco de dados (a, f, h e j), todavia, é necessário representar apenas a classe destas, sendo que o *score* e a *MM* teórica indicados corresponde àquela isoforma que apresentou maior *score* e/ou maior cobertura, nesta ordem. O *spot* “j” além de apresentar isoformas, encontrou-se também mais de uma possibilidade possível para a sequência de peptídeos sequenciada e, por isso, é indicado na tabela as duas possibilidades.

Tab. 4: Identificação das proteínas para os *spots* que apresentaram variação de expressão em %V e/ou %I no nível de 90% (1,8 vezes).

Spot	Banco de dados	Proteína	score	Massa (kDa)		pI		Cobertura (%)	Sequência identificada
				teórica	experim.	teórico	experim.		
a	MSDB	<i>Glycinin</i>	113	55	101 ± 9	5,5	7,4 ± 0,0	7	LSAQ YGLR SQSDNFE YVSFK
b	MSDB	<i>Glycinin</i>	126	56	41 ± 3	5,9	7,5 ± 0,1	3	LSAE FGSLR VFDGELQEGR
c	MSDB	<i>Allergen Gly m Bd 28k</i>	146	53	23 ± 1	5,7	7,0 ± 0,1	7	Q GDVFWVPR DG PLEFFGFSTS AR- NKPQFLA GAASLLR
d	MSDB	<i>β-Conglycinin</i>	131	73	30 ± 1	5,3	5,2 ± 0,1	7	TISSE DKPFNLR F FEITPEK EQQQ EEQQEEQPLE VR ESYFVDAQ PK
e	MSDB	<i>Actin</i>	65	37	46 ± 4	5,6	5,0 ± 0,1	9	LSY IALDYEQELE TAR SYELPDGQVI TIGDER
f	MSDB	<i>β-Conglycinin</i>	175	71	46 ± 3	5,1	4,7 ± 0,1	7	EEQEWPR GSEEE DEDEDEEQDE R KQEEDE EDEEQQR SPQLQNL R
g	MSDB	não identificada			68 ± 4		4,9 ± 0,1		
h	MSDB	<i>β-Conglycinin</i>	260	71	69 ± 6	5,1	5,0 ± 0,1	9	QFPFPRPPH QK NPFLFGS SPQLQNL R TIS SEDKPFNLR EQ QQEQQQEEQP LEVR
i	MSDB	não identificada			63 ± 3		6,2 ± 0,1		
j	MSDB	<i>Sucrose binding protein</i>	55	56		6,3		3	FEEFFGPG GR E SLFFPFELSPS EER
		<i>Embrionic abundant protein</i>	52	51	50 ± 4	6,3	5,7 ± 0,1	6	VEESRPGAIA ETLKAADQIA GQTFNDVGR

As proteínas *Glycinin* e β -*conglycinin* são as principais proteínas relacionadas ao processo de armazenamento da soja. As proteínas *Allergen Gly m Bd 28k* e *Sucrose binding protein* possuem como principal função a reserva de nutrientes, a sucrose ainda está envolvida no transporte de açúcar. A proteína *Actin* está envolvida em vários tipos de motilidade celular, é essencial no citoesqueleto da célula, tem importante papel no processo de divisão celular entre outros. Até este momento não foram encontradas informações sobre a função da proteína *Embryonic abundant protein*. As informações sobre a função ou em que processo biológico as proteínas identificadas estão envolvidas foram obtidas do endereço de banco de dados de proteínas mais tradicional e confiável disponível (*SwissProt*) [38].

5 Conclusões parciais

Os principais aspectos proteômicos tratam da otimização da quantidade em massa de proteínas totais a serem aplicadas nos géis com gradiente de pH de 3-10 e 4-7 – 300 µg e 500 µg, respectivamente – da equivalência em termos da quantidade de proteínas totais e do número de *spots* detectados entre as amostras.

Por meio dos estudos de análise de imagens conclui-se que ambos os pares de géis com gradiente de pH de 3-10 e 4-7 apresentaram uma ótima similaridade (> 70%). Pôde-se verificar, também, uma alta equivalência entre os *spots* detectados nos géis ($79 \pm 4\%$ e $77 \pm 2\%$ para os géis com gradiente de pH de 3-10 e 4-7, respectivamente). Por meio dos histogramas pode-se verificar que os géis com gradiente de pH de 4-7 apresentaram maior homogeneidade quanto a distribuição das proteínas nos géis, o que permite maior facilidade para a delimitação da região correspondente ao *spot*. E por fim, foram encontrados 03 *spots* para os géis com gradiente de pH de 3-10 e 07 *spots* para os géis com gradiente de pH de 4-7 com variações significativas de %V e/ou %I para a condição adotada, ou seja, variações da superiores a 90% (1,8 vezes) entre os pares de *spots* dos géis para as amostras de soja não-transgênica e transgênica.

Conseguiu-se ainda efetuar a identificação e caracterização de 08 proteínas que apresentaram variação de expressão nas condições realizadas.

Capítulo II

Aspectos enzimáticos e metaloproteômicos

6 Objetivo

Os objetivos deste capítulo buscam destacar possíveis variações entre as amostras de semente de soja transgênica e não-transgênica quanto a atividade enzimática, bem como uma avaliação das espécies metálicas no conjunto de proteínas que apresentaram diferenças de expressão. Com o estudo de atividade enzimática busca-se verificar se ocorre alguma situação de estresse oxidativo entre ambas as sementes. Com o estudo de avaliação das espécies metálicas, procura-se por diferenças quanto ao tipo e a quantidade destas entre ambas as sementes e, caso ocorra, buscar pelo entendimento/função das espécies metálicas para as proteínas alvo.

7 Revisão bibliográfica

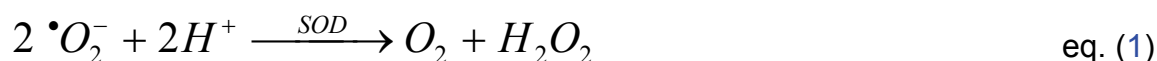
7.1 Estresse oxidativo em vegetais

Limitações nutricionais, temperaturas extremas, exposição a altas concentrações de metais, dentre outros fatores, podem levar um vegetal a uma condição de estresse. Um ponto em comum para estas condições adversas é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem inativar proteínas ou danificar importantes componentes celulares [10]. Para controlar a produção destas espécies reativas de oxigênio as plantas desenvolveram alguns mecanismos capazes de reduzir sua concentração. Por exemplo, alguns peptídeos como as fitoquelatinas e metalotioneínas podem sequestrar íons metálicos presentes em excesso no organismo por meio da ligação com o enxofre (S) das cisteínas levando, então, a uma diminuição na produção de ROS [39].

As espécies de ROS mais comumente produzidas incluem: o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($^{\cdot}\text{O}_2^-$) e o radical hidroxila ($^{\cdot}\text{OH}$). No entanto, tão logo o desequilíbrio na produção de ROS seja percebido pela planta, seu sistema antioxidante é prontamente ativado. Os principais compostos

antioxidantes são as enzimas antioxidantes, as vitaminas C e E, o β -caroteno e os flavonóides. Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) e a catalase (CAT – EC 1.11.1.6) como as mais eficientes na conversão das ROS em espécies menos reativas. Além destas, outras enzimas como a glutathiona redutase (GR - EC 1.6.4.2), a peroxidase (EC 1.11.1.7), entre outras, também participam do controle na produção das ROS de forma satisfatória [39].

A SOD constitui-se de uma família de metaloenzimas multiméricas (Mn/SOD – localizada na mitocôndria e peroxisomo; Fe/SOD – associada com o cloroplasto; e CuZn/SOD – presente no citosol, cloroplasto e peroxisomo), as quais atuam de forma a catalisar a formação de H_2O_2 a partir de radicais superóxidos ($\cdot O_2^-$), conforme indicado na equação 1 abaixo [39].



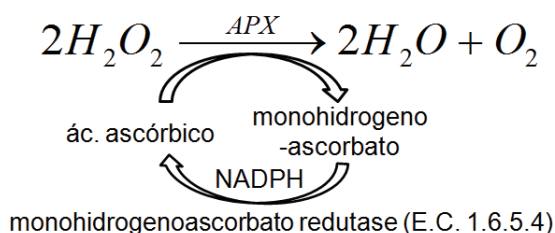
A CAT também apresenta isoformas (CAT1, CAT2 e CAT3) e é encontrada em tecidos vasculares e peroxisomos. Esta é uma das enzimas mais eficientes quanto a capacidade de degradar o H_2O_2 conforme indicado pela equação 2 e, portanto, atua em conjunto com a SOD [39].



A GR, encontrada no cloroplasto e na mitocôndria, contém um grupo prostético (FAD - flavina adenina dinucleotídeo), que transfere elétrons e que atua de forma a converter a glutiona oxidada (GSSG) à glutathiona reduzida (GSH) [39], equação 3. Esta também é bastante importante no combate às ROS como, por exemplo, radicais superóxidos ($\cdot O_2^-$) e H_2O_2 .



A ascorbato peroxidase (APX) é também bastante abundante em plantas, e é encontrada, principalmente, no cloroplasto e citosol. Esta atua de forma a reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio por meio da oxidação do ácido ascórbico a monodehidroascorbato [10], conforme apresentado pela equação 4.



eq. (4)

7.2 Espécies metálicas em sistemas biológicos

Diversos estudos têm apresentado a relevância da análise de espécies metálicas em amostras biológicas ressaltando seus benefícios e malefícios. Trabalhos da literatura destacam que algumas espécies metálicas (Cu^+ , Cu^{2+} e Fe^{2+} , Fe^{3+}) estão diretamente relacionadas com reações de transferência de elétrons em processos celulares como, por exemplo, respiração e fotossíntese [40, 41]. Alguns oligopeptídeos como as metalotioneínas podem sequestrar íons metálicos como Zn^{2+} e Cu^{2+} no organismo, caso estes se apresentem em excesso, prevenindo-o, assim, de alguma provável contaminação, conforme reportado por Finney e O'Halloran [42].

A interação entre espécies metálicas e proteínas ocorre em diferentes níveis, por exemplo, íons monovalentes como K^+ e Na^+ interagem fracamente; alguns íons divalentes como Mg^{2+} e Ca^{2+} interagem moderadamente; outros, como os íons de metais de transição Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} , interagem fortemente. Esta maior interação pode ser atribuída ao fato dos metais de transição apresentarem pequenos raios atômicos, promoverem interações eletrostáticas, entre outras, e, portanto, podem ser mais facilmente encontrados nas metaloproteínas [43].

Wilson *et al* [40] destacaram que o entendimento sobre a interação entre os cofatores metálicos e as proteínas e/ou peptídeos podem auxiliar no tratamento de

doenças relacionadas ao metabolismo de espécies metálicas em um organismo, como por exemplo, a Síndrome de Menkes e doença de Wilson, nas quais verifica-se a existência de interações errôneas entre cofator e biomolécula.

Desta forma, a análise de espécies metálicas em sistemas biológicos é bastante relevante, pois pode contribuir para o entendimento de seu papel nestes organismos.

7.3 Fluorescência de raios X – SR-XRF

Na técnica de fluorescência de raios X (XRF), um feixe de radiação X ($\lambda \sim 10^{-10}$ m) é incidido sobre a amostra sólida. Em decorrência disso, os elétrons da camada interna (K) são excitados pela absorção do feixe irradiado, passando, portanto, para um estado excitado num curto período de tempo; logo em seguida, retornam ao estado fundamental pela emissão de radiação que corresponde a(s) linha(s) característica(s) de cada elemento (emissão de fluorescência), a radiação esta [26].

Para a fluorescência de raios X com radiação síncrotron (SR-XRF), o feixe de raios X possui maior intensidade e também é altamente colimado. Estas características possibilitam a detecção de espécies metálicas em um período de tempo inferior ao usual, e também permite que ótimos limites de detecção sejam alcançados (100 ng/g) [44].

Verbi *et al* [45] empregaram fluorescência de raios X com radiação síncrotron para a avaliação de espécies metálicas (Ca^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} e Zn^{2+}) em calo de citrus (*Citrus sinensis* L. Osbeck), após o processo de separação das proteínas por SDS PAGE. A avaliação quantitativa foi realizada empregando SR-TXRF, FAAS e FAES. Os autores afirmam ser possível obter informações acerca da distribuição das espécies metálicas na banda de proteínas, bem como quantificá-las.

Além de amostras vegetais, outras amostras biológicas também podem ser exploradas por SR-XRF. Kühbacher *et al.* [46] avaliaram de espécies metálicas e metalóides em proteínas de rato previamente separadas por SDS PAGE, além disso avaliam também alguns metais em seções do cérebro. Da separação por SDS PAGE os autores identificaram selênio por SR XRF de forma bastante clara em uma selenoenzima com MM de 20 kDa (*phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase* –

PHGPx). Da distribuição espacial os autores conseguiram detectar K, Fe, Cu e Zn na região do cérebro estudada. Os autores estavam mais dedicados ao monitoramento de Cu em uma região específica do cérebro entre ratos saudáveis e ratos submetidos a uma situação de estresse, pois este está presente em uma proteína que é indicadora desta situação (*copper-binding prion protein – PrP*). Desta forma, os autores indicam a técnica como sendo promissora para a pesquisa de metaloproteínas bem como no estudo de elementos traços relacionados a doenças.

7.4 Espectrometria de massas – ICP MS

Embora a espectrometria de massas atômica seja similar à espectrometria de massas molecular, uma vez que o princípio de seu funcionamento também se fundamenta em 04 unidades principais (item 2.4); a diferença primordial reside na primeira delas – a fonte de ionização – no caso do ICP, esta fonte (o plasma) possui energia suficiente para romper as ligações de uma molécula e ionizar os átomos resultantes, ou seja, o processo de ionização não é brando como no caso do MALDI, no qual se procura preservar a integridade da molécula. As etapas de separação dos elementos ionizados, aquisição do sinal e armazenamento são similares ao descrito anteriormente (item 2.4) [26].

O que torna esta técnica tão atrativa e conveniente para se estudar a composição elementar de amostras nas mais diferentes matrizes é, principalmente, devido ao fato de possibilitar análises multielementares. Outros aspectos como ampla faixa linear dinâmica (até 05 ordens de grandeza), baixos limites de detecção (ng/g) e rapidez nas análises também são méritos que merecem destaque para esta técnica [26]. Além disso, a técnica de ICP MS tem sido, cada vez mais, solicitada em estudos bioanalíticos, pois, apresenta enorme facilidade de acoplamento com técnicas “complementares” de separação (HPLC, CE) e amostragem (LA) [47].

Becker *et al* [48] avaliaram elementos essenciais e potencialmente tóxicos (Zn, Cu, Fe, Ni, Cr, Cd e Pb) em rins e fígado de rato utilizando LA-ICP MS após separação em condições não-desnaturante por PAGE. De todos os elementos avaliados o Zn

apresentou valores de contagens mais consideráveis (> 1000) para avaliação nas bandas de 95, 80 e 65 kDa da amostra de rim. Na amostra de fígado, os elementos Zn e Cu puderam ser detectados nas bandas de 200 e 65 kDa e Fe somente na banda de 200 kDa. Segundo os autores a quantificação destes elementos poderá ser realizada em estudo futuro. Os autores salientam também que a combinação das técnicas LA-ICP MS e MALDI-QTOF MS representa uma estratégia poderosa para o estudo de metais e proteínas em sistemas biológicos.

Algumas dificuldades e orientações para a determinação de espécies metálicas em proteínas após o processo de separação por eletroforese em gel são apresentadas no trabalho de Raab *et al.* [49]. Neste, os autores destacam que a estabilidade do complexo metal-proteína durante a separação eletroforética é dependente da natureza dessa interação (metal-proteína) e do princípio da separação. Segundo os autores, a separação eletroforética em condição não desnaturante é a mais apropriada para a manutenção da espécie metálica na proteína (ex. Zn-Anidrase Carbônica, Fe-Transferrina) conforme avaliado por LA-ICP MS, pois o emprego de SDS ou outros agentes desnaturantes podem desestabilizar o complexo metal-proteína. Eles também sugerem que a avaliação das espécies metálicas no gel seja feita anteriormente ao processo de revelação das proteínas, uma vez que esta etapa pode influenciar negativamente o resultado encontrado, pois a perda de espécies é bem comum, ou ainda, a contaminação. Embora vários cuidados devam ser tomados, a detecção de espécies metálicas em metaloproteínas pode ser realizada por meio da combinação da eletroforese em gel e ICP MS.

8 Parte experimental

Outros equipamentos e acessórios utilizados na segunda parte desta dissertação são apresentados a seguir.

8.1 Equipamentos e acessórios

- ✓ Autobalança, modelo AD6 (Perkin-Elmer);
- ✓ Banho maria, modelo MA127 (Marconi);
- ✓ Espectrômetro de fluorescência de raios X com radiação síncrotron, (disponível no LNLS⁸);
- ✓ Espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado e nebulizador com câmara ciclônica, modelo ELAN DRC-e (Perkin-Elmer);
- ✓ Forno de microondas tipo cavidade, modelo DGT100 Plus (Provecto Analítica).

8.2 Reagentes e soluções

Outros reagentes de grau analítico empregados nesta segunda parte do trabalho são citados a seguir.

⁸ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

- ✓ 2,6-Dicloroindofenol de sódio (**DPIP**), $C_{12}H_6NCl_2O_2Na$ – MM = 290,1 g/mol (Sigma Aldrich);
- ✓ Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (**DNTB**), $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ – MM = 396,3 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Ácido ascórbico (L+), $C_6H_8O_6$ – MM = 176,13 g/mol (Merck);
- ✓ Ácido etilenodiaminotetracético sal disódico dihidratado (**EDTA**), $Na_2[CH_2N(CH_2CO_2)_2]_2 \cdot 2H_2O$ – MM = 372,24 g/mol (Merck);
- ✓ Ácido nítrico 65% (v/v), HNO_3 – MM = 63,01 g/mol (Merck);
- ✓ Ascobato peroxidase (**APX**) (Sigma-Aldrich);
- ✓ Cianeto de potássio, KCN – MM = 65,12 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Cloreto férrico, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – MM = 270,3 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Ferricianeto de potássio, $K_3Fe(CN)_6$ – MM = 329,26 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazólio (**MTT**), $C_{18}H_{16}N_5SBr$ – MM = 414,3 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Catalase de fígado bovino (**CAT**), (Sigma-Aldrich);
- ✓ Cloreto de Nitrozol de tetrazólio (**NBT**), $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$ – MM = 817,6 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Glutathione redutase de fermento de confeitaria (**GR**), (Sigma-Aldrich);
- ✓ L-glutathione oxidada (**GSSG**), $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ – MM = 612,6 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Peróxido de hidrogênio 30% (v/v), H_2O_2 – MM = 34,02 g/mol (Merck);
- ✓ Polivinilpirrolidona (**PVPP**), C_6H_9NO – MM = 111,14 g/mol (Merck);
- ✓ Riboflavina, $C_{17}H_{20}N_4O_6$ – MM = 376,4 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Monohidrogenofosfato de potássio – K_2HPO_4 – MM = 174,17 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato sal tetrasódico (**NADPH**), $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$ – MM = 833,4 g/mol (Sigma-Aldrich);
- ✓ Superóxido dismutase de fígado bovino (**SOD**), (Sigma-Aldrich);
- ✓ Soluções padrão de V (SRM 3165 NIST – USA), Cd (SRM 3108 NIST – USA) e Se (SRM 3749 NIST – USA) (Hexis Científica).

8.3 Extração das proteínas para análise de atividade enzimática

O procedimento de extração empregado foi baseado no protocolo utilizado por Ferreira *et al.* [50]. Neste caso, também foi utilizado cerca de 0,50 g de ambas as amostras, as quais foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas, separadamente, com auxílio de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó bastante fino.

O emprego de éter de petróleo ao pó fino e agitação por 15 min para remoção do excesso de óleo também foi feito. A extração das proteínas foi realizada por meio de uma solução extratora contendo K_2HPO_4 – 100 mmol/L (pH 7,5), EDTA – 1,0 mmol/L, DTT – 3,0 mmol/L e PVPP – 0,8% (m/v) na proporção de 10:1 (mL/g). Também fez-se a extração sob agitação lenta por 10 min em banho de gelo. O extrato protéico foi centrifugado a 16000 g por 30 min a 4 °C. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf® e armazenados a – 80 °C.

8.4 Quantificação de proteínas totais no extrato

A estimativa da concentração de proteínas totais foi realizada de forma semelhante ao descrito no item 3.5.

8.5 Separação por PAGE nativa para avaliar atividade enzimática

A diferença entre a eletroforese SDS PAGE e PAGE nativa é que, nesta última, a separação das proteínas ocorre em condições não desnaturantes (sem SDS). Logo, a proteína pode ser mantida íntegra.

Géis de poliacrilamida de dimensões 7,3 cm x 6,5 cm x 0,15 cm, foram utilizados para o estudo de atividade enzimática. Estes eram constituídos de um gel de resolução e um gel de empacotamento. O gel de resolução (14% m/v) e o gel de empacotamento (4% m/v) são similares ao gel de SDS PAGE.

Para o estudo das enzimas CAT e GR as quantidades de proteínas foram adequadamente calculadas para que fosse aplicada nos géis as massas de 20 e 40 µg. Para a SOD, as quantidades de proteínas aplicadas foram 40 e 80 µg. A diluição do extrato protéico foi realizada utilizando uma solução constituída de tris – 0,50 mol/L, glicerol – 0,3% (v/v) e azul de bromofenol – 0,04% (m/v). Um padrão de cada uma das

enzimas foi adicionado para se poder realizar a análise comparativa. Em seguida, fez-se a corrida eletroforética aplicando uma corrente de 10 mA por gel durante 12 h.

Após a corrida eletroforética em PAGE nativa, o gel foi enxaguado com água desionizada e levado para revelação em solução específica para cada enzima que se pretendia avaliar.

8.5.1 Revelação para CAT

O gel utilizado para a avaliação da atividade enzimática da CAT, após o enxágue com água desionizada, foi imerso em uma solução de H_2O_2 – 0,003% (v/v) por 10 min. Em seguida, foi enxaguado novamente e imerso em solução reveladora compreendida por FeCl_3 – 1% (m/v) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – 1% (m/v) por 15 min. Por fim, o gel foi enxaguado com água desionizada e armazenado em solução de ácido acético 7% (v/v) para posterior registro da imagem. Todo o processo de revelação foi conduzido no escuro.

8.5.2 Revelação para GR

De forma semelhante ao gel de CAT o gel de GR foi submetido ao enxágue com água desionizada e o processo de revelação também foi conduzido no escuro. Este, por sua vez, foi imerso em uma solução que continha tris – 0,25 mol/L (pH 7.5), MTT – 0,020% (m/v), DPIP – 0,020% (m/v), GSSG – 0,20% (m/v) e NADPH – 0,042% (m/v) por aproximadamente 30 min. Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida mergulhando-se o gel em uma solução de ácido acético 7% (v/v), na qual permaneceu armazenado até o registro da imagem.

8.5.3 Revelação para SOD

Após o enxágue com água desionizada o gel de SOD foi imerso em uma solução contendo K_2HPO_4 – 0,10 mol/L (pH 7,5), EDTA – 1 mmol/L, riboflavina – 0,05 mmol/L,

NBT – 0,1 mmol/L e TEMED – 0,3% (v/v) por aproximadamente 40 min. Em seguida, o gel foi enxaguado e exposto à luz branca até o aparecimento de bandas negativas sob o fundo roxo. A reação de fotoxidação foi interrompida pela imersão do gel em uma solução de ácido acético 7% (v/v). É importante destacar que, neste caso, tem-se uma revelação negativa, sendo similar à revelação da CAT no gel, o qual apresenta fundo esverdeado.

Ainda no caso da SOD, também foi feita a identificação de suas isoformas. Para isto procedeu-se de maneira similar ao descrito no item 8.5, porém, com a massa de proteínas totais de 0,60 mg. Após a corrida eletroforética, o gel foi dividido em 03 partes. A primeira parte, que também continha o padrão de SOD, foi revelado de forma análoga à descrita acima (item 8.5.3). A segunda parte do gel foi imersa em uma solução contendo K_2HPO_4 – 0,10 mol/L (pH 7,5) e KCN – 2,0 mmol/L por aproximadamente 20 min; a terceira parte foi imersa em uma solução compreendida por K_2HPO_4 – 0,10 mol/L (pH 7,5) e H_2O_2 – 5,0 mol/L pelo mesmo tempo; por fim, ambas as partes foram lavadas rapidamente empregando água desionizada e reveladas para SOD conforme descrito acima.

Em seguida, todos os géis foram levados para registro e análise de imagens.

8.6 Determinação da atividade enzimática por espectrofotometria

Foi realizada, também, a medida da atividade enzimática por espectrofotometria para as enzimas CAT, GR e APX.

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente a 25 °C pelo monitoramento da medida da absorvância a 240 nm durante 1 min de reação utilizando cubetas de quartzo. A mistura reacional consistiu da adição de 25 µL do extrato protéico diluído em tampão fosfato (K_2HPO_4 – 0,10 mmol/L pH 7,5) a 1 mL de uma solução contendo K_2HPO_4 – 0,10 mol/L (pH 7,5) e 2,5 µL de H_2O_2 – 30% (v/v), preparada recentemente.

A atividade da GR foi conduzida de maneira similar a CAT, porém, com o monitoramento da absorvância em 412 nm e a uma temperatura de 30 °C. A mistura

reacional consistiu na adição de 50 μL do extrato protéico diluído adequadamente a 3 mL de uma solução contendo K_2HPO_4 – 0,10 mmol/L (pH 7,5), DTNB – 1 mmol/L, GSSG – 1 mmol/L e NADPH – 0,1 mmol/L.

A atividade da APX foi determinada espectrofotometricamente a 25 °C pelo monitoramento da medida da absorvância a 290 nm durante 1 min de reação utilizando cubetas de quartzo. A mistura reacional consistiu da adição de 50 μL do extrato protéico diluído em tampão fosfato (K_2HPO_4 – 0,50 mmol/L pH 7,5) a 1 mL de uma solução compreendida por K_2HPO_4 – 0,10 mol/L (pH 7,5), ácido ascórbico 0,5 mmol/L, EDTA – 0,1 mmol/L e H_2O_2 – 0,1 mmol/L.

Todos os valores de atividade enzimática para a determinação espectrofotométrica foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

8.7 Mapeamento e quantificação das espécies metálicas nos spots

8.7.1 Mapeamento das espécies metálicas por SR-XRF

As medidas de fluorescência de raios X foram realizadas no LNLS, Campinas – SP, e os seguintes elementos foram selecionados para monitoramento: Si, P, S, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se e Ce. As medidas foram realizadas de forma similar ao reportado por Verbi *et al* [45].

Alguns *spots* previamente selecionados (mais intensos) foram recortados do gel com auxílio de uma ponteira de micropipeta e levados para secar sob radiação no infravermelho (IV) por 30 min. Em seguida, os *spots* foram fixados em uma plataforma de alumínio utilizando fita adesiva e submetidos a um feixe de raios X de 500 x 500 μm em um único ponto do *spot* por um tempo de 400 ms. Fez-se a normalização dos dados por meio do tratamento dos espectros coletados com o programa AXIL⁹, utilizando o valor de contagens referente a área do pico de Ar, possibilitando, assim, corrigir pequenas variações do feixe.

⁹ Informações: www2.if.usp.br/~lamfi/guia-axil-v3.pdf e www.fap.if.usp.br/~gfaa/pessoas/Marcel/IC2008MDLB.pps.

8.7.2 Secagem e decomposição dos spots

Primeiramente, os *spots* foram recortados do gel com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e colocados para secagem a 40 °C até massa constante (pelo menos 5 horas). Em seguida, mediu-se a massa de cada um dos *spots* previamente selecionados (aqueles com variação de expressão a um nível de 90%) em uma autobalança para futuros cálculos de concentração em massa se necessário – as massas dos *spots* foram de aproximadamente 0,900 mg.

A partir de então, realizou a decomposição dos mesmos em forno de microondas utilizando-se mini-frascos [51]. Adicionou-se 200 µL de HNO₃ destilado concentrado e 150 µL de H₂O₂ 30% (v/v) a cada mini-frasco contendo o *spot* e, após um tempo de 20 min para pré-reação, aplicou-se o seguinte programa descrito na tabela 5, deu-se um intervalo de 02 min entre cada uma das etapas para evitar o rompimento dos mini-frascos devido ao aumento da pressão interna. Este programa foi executado 04 vezes para que houvesse uma decomposição completa do *spot*.

Tab. 5: Programa aplicado para decomposição dos *spots* protéicos.

Etapa	Tempo (s)	Potência (w)
1	60	300
2	30	500
3	60	500
4	30	800
5	30	800
6	60	500

8.7.3 Mapeamento e quantificação das espécies metálicas por ICP MS

Após a decomposição dos *spots* (item 8.7.2), ajustou-se o volume da amostra decomposta para 1,0 mL e diluiu-se de 10 vezes para efetuar-se a análise qualitativa. Para cada *spot* decomposto fez-se 01 réplica com 06 leituras de 50 ms para cada razão massa/carga. As seguintes faixas de razão massa/carga foram avaliadas: 6-15, 19-39,

42-210 e 230-240 u., com voltagem no quadrupolo da cela de reação/colisão (RPq) igual 0,4 V. As demais condições de operação do equipamento estão descritas na tabela 6. Após a efetuação das medidas, em triplicata, os dados foram transferidos para uma planilha do programa *Excel (Microsoft)* para análise estatística, e, também, para efetuar a seleção dos possível elementos a serem quantificados.

Tab. 6: Condições de operação do equipamento

Descrição	Valor
Fluxo de gás nebulizador	0,91 L/min
Fluxo de gás auxiliar	1,2 L/min
Fluxo de gás do plasma	15 L/min
Voltagem das lentes*	7,5-11 V
Potência da radiofrequência	1200 kW
Fluxo de injeção de amostra	1,5 mL/min

(*) O valor é ajustado para cada elemento por meio do emprego do *Autolens*¹⁰.

Para a análise quantitativa, selecionou-se aqueles elementos que apresentaram contagens¹¹ líquidas de aproximadamente 500 ou superiores (resultante da avaliação estatística), e que tivessem disponibilidade de soluções padrão. Avaliou-se quantitativamente $^{111,113}\text{Cd}^+$, $^{51}\text{V}^+$ e $^{80}\text{Se}^+$; nesta etapa, foram realizadas 03 réplicas com 20 leituras de 50 ms para cada *spot* decomposto e a análise efetuada em triplicata (RPq = 0,25 V para $^{111,113}\text{Cd}^+$ e $^{51}\text{V}^+$). As demais condições de operação do equipamento foram as mesmas que a utilizadas para a avaliação qualitativa (tab. 6), porém, para o $^{80}\text{Se}^+$ utilizou-se cela de reação/colisão com gás O_2 para melhorar a relação sinal/ruído e minimizar a interferência do íon Ar_2^+ (fluxo de O_2 – 1,2 L/min e RPq = 0,65). Construiu-se curvas de calibração na faixa de 10-200 ng/L para $^{51}\text{V}^+$, de 5-200 ng/L para $^{111,113}\text{Cd}^+$ e de 10-200 ng/L para $^{80}\text{Se}^+$. Os dados obtidos também foram transferidos para uma planilha do programa *Excel* para avaliação estatística.

¹⁰ Comando automático que regula a voltagem das lentes de acordo com a razão massa/carga dos elementos.

¹¹ Verificado experimentalmente

9 Resultados e Discussão

9.1 Quantificação de proteínas totais

Na soja transgênica encontrou-se 14 ± 1 mg/mL ($\bar{x} \pm s$) de proteínas totais e na soja não-transgênica encontrou-se 18 ± 2 mg/mL. Embora, para a soja transgênica tenha sido encontrado um valor menor quando comparado com a extração para 2D PAGE (item 4.1), pode-se admitir que na extração para PAGE nativa este resultado deve estar relacionado a uma maceração não homogênea das amostras. Esta hipótese fundamenta-se no fato de que são encontrados, no procedimento para 2D PAGE, resultados bastante semelhantes para extrações realizadas em dias aleatórios.

9.2 Avaliação da atividade enzimática nos géis

Para os géis de CAT e GR foram avaliadas as massas de 20 e 40 μ g de proteínas totais aplicada. Nestes, a massa que permitiu a análise posterior das imagens por meio do programa *Gel Pro-Analyser* foi de 40 μ g, conforme mostrado na figura 9. Para o gel de SOD foram avaliadas as massas de 40 e 80 μ g, sendo que esta última foi a mais adequada para o estudo de análise de imagens (figura 9).

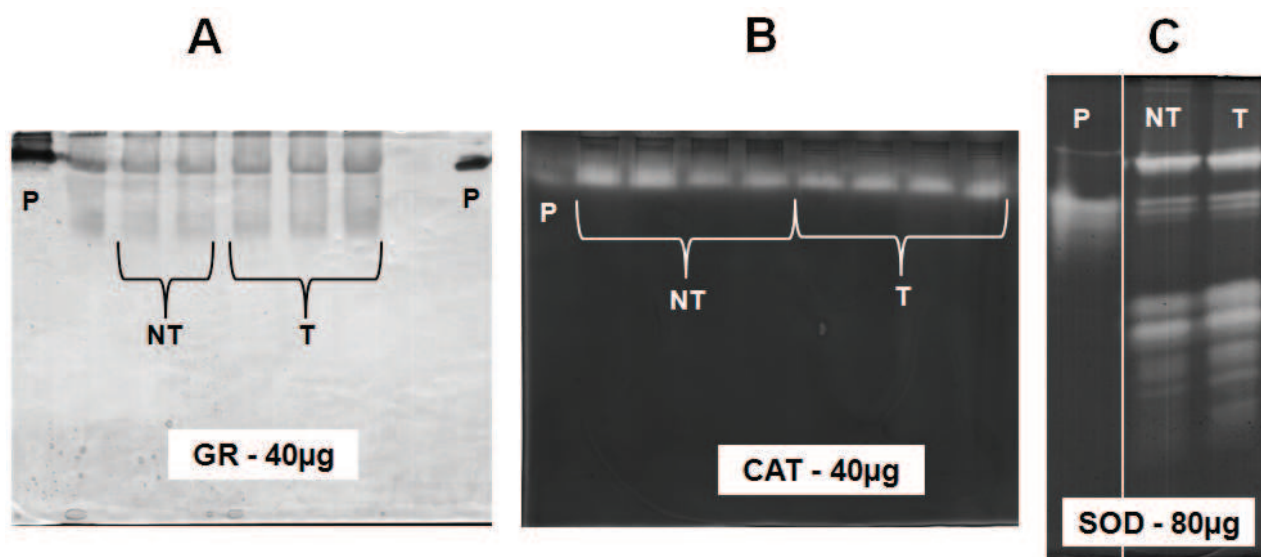


Fig. 9: Géis de poliácridamida nas condições otimizadas das massas de proteínas totais aplicada. **A**, **B** e **C** correspondem a géis de GR, CAT e SOD com 40, 40 e 80 μ g de proteínas para as amostras de soja não-transgênica (NT) e transgênica (T), sendo “P” o padrão de cada enzima.

Uma vez escolhido o gel a ser estudado, a partir da avaliação da massa de proteínas, registrou-se a imagem para estudo quantitativo. Utilizando-se o programa *Gel-Pro Analyser* pôde-se medir a intensidade das bandas no gel por meio da densidade óptica. Como pode ser verificado na figura 10, aparentemente, não foi encontrado uma variação significativa da atividade enzimática entre as amostras de semente de soja transgênica e não-transgênica para as enzimas CAT e GR quanto a expressão em gel, pois não encontrou-se variações acima de 90% – para GR, a variação encontrada foi de ca. de 12%.

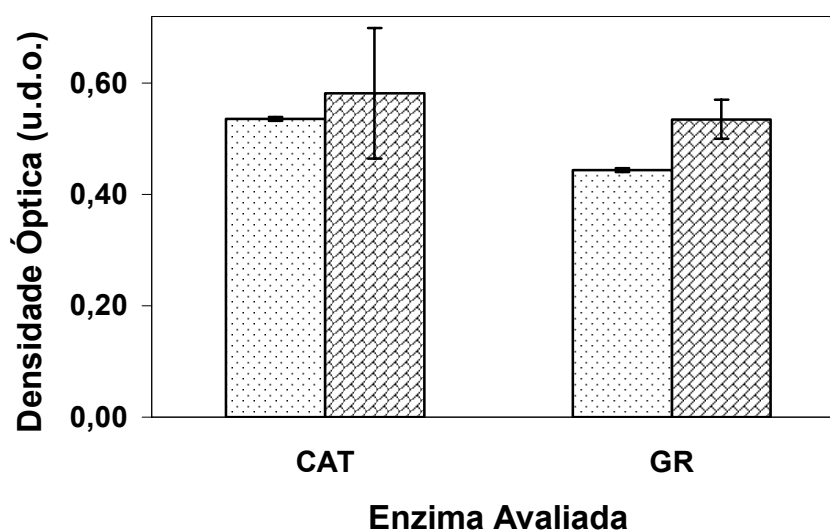


Fig. 10: Avaliação da atividade enzimática para CAT e GR a partir dos géis obtidos para soja não-transgênica () e transgênica ().

Para a SOD, figura 11, também não foi encontrada uma variação significativa da atividade enzimática entre ambas as sementes de soja para cada uma de suas famílias avaliadas no nível de 90%. Um esclarecimento acerca destas famílias e a identificação de cada uma delas é apresentado a seguir.

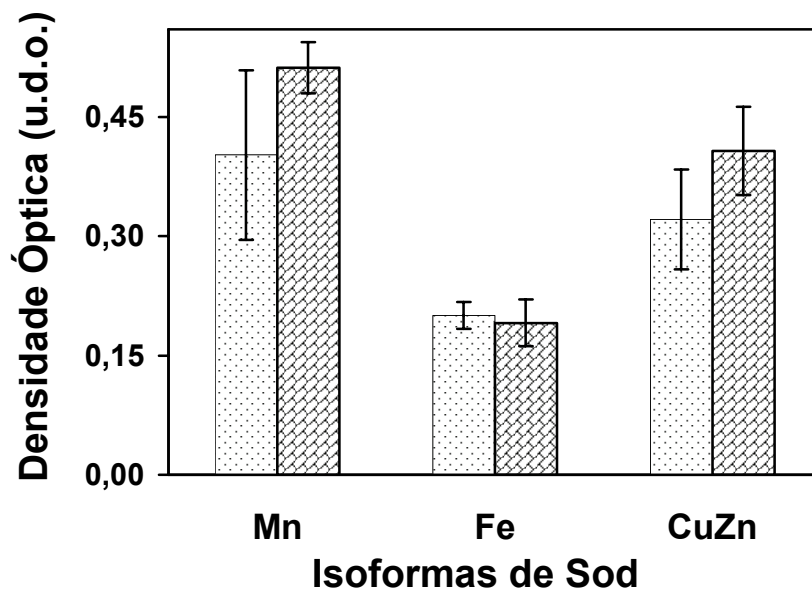


Fig. 11: Avaliação da atividade enzimática para SOD a partir do gel obtido para soja não-transgênica () e transgênica ().

A SOD constitui-se em uma família de metaloenzimas multiméricas, as quais são classificadas de acordo com o íon metálico presente em seu sítio ativo, figura 12.

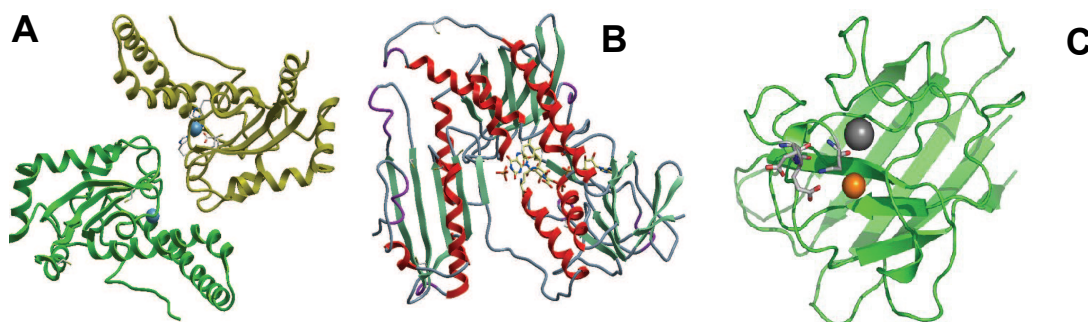


Fig. 12: Famílias de SOD. **A)** Mn/SOD, **B)** Fe/SOD e **C)** CuZn/SOD. Adaptado de [52].

Ao observar a figura 13 verifica-se que, pelo menos, 7 isoformas puderam ser indicadas por meio da análise de imagens empregando-se o programa *Gel-Pro Analyser*. O gráfico de densidade óptica apresentado está invertido, pois são identificadas bandas claras no fundo escuro do gel. A classificação das isoformas foi conseguida de acordo com seu modelo de inibição para KCN e H_2O_2 , o qual é discutido a seguir.

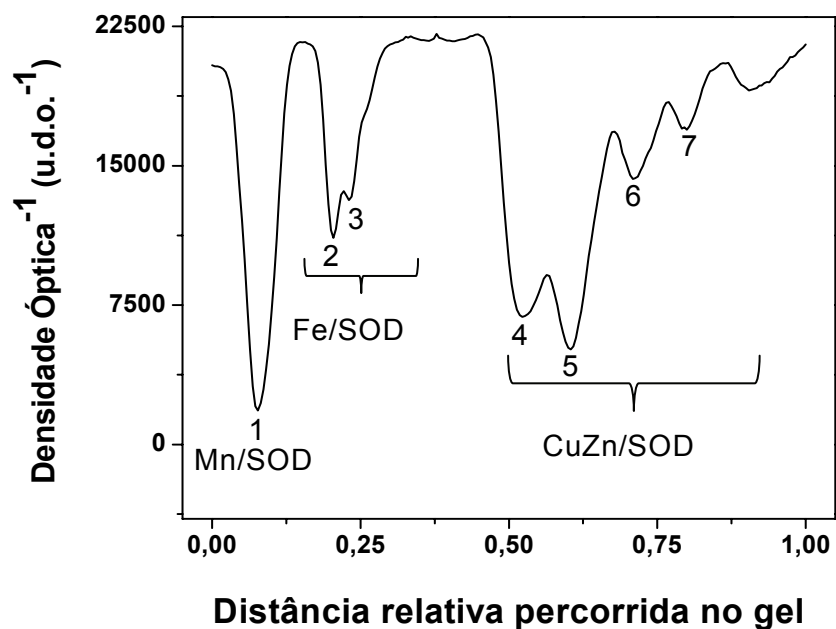


Fig. 13: Gráfico de densidade óptica das isoformas das famílias da enzima SOD.

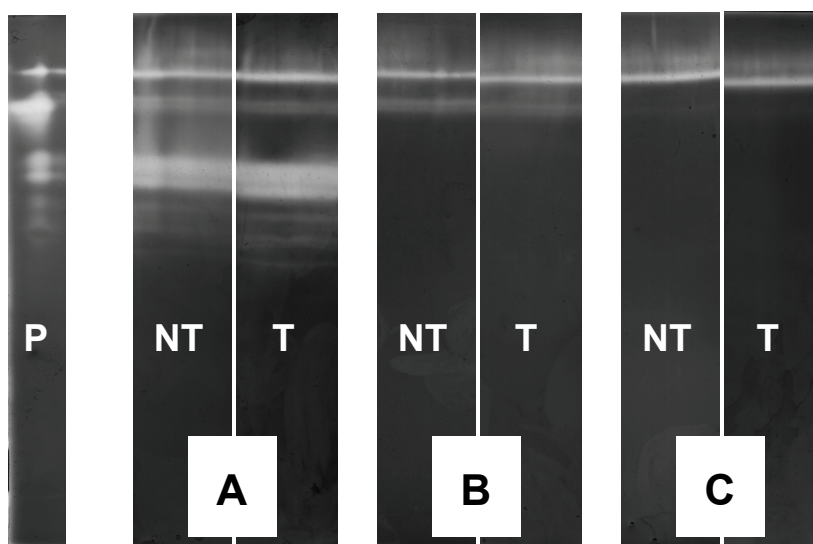


Fig. 14: Classificação das isoformas de SOD. Em **P** é indicado o padrão de SOD. Em **A** não é utilizado inibidor. Em **B** é utilizado KCN como inibidor e em **C** é utilizado H_2O_2 como inibidor.

Do total de isoformas indicadas (fig. 13), pelo menos 4 isoformas de SOD foram classificadas como sendo Cu-Zn/SOD, pois foram inativadas por ambos os inibidores (KCN e H_2O_2) utilizados, figura 14, ou seja não ocorre a degradação do substrato). Duas

isoformas de SOD foram classificadas como Fe/SOD, pois foram inativadas pelo inibidor H_2O_2 , logo, não é observado as bandas claras no fundo escuro do gel. A isoforma restante foi classificada como Mn/SOD, pois não foi inativada por nenhum dos inibidores empregados, conforme mostra a figura 14.

Por meio da análise das imagens para a avaliação da atividade enzimática em gel das enzimas CAT, GR e SOD (incluindo isoformas), pode-se verificar que, aparentemente, não é encontrado uma situação de estresse no estágio de semente entre as amostras de soja transgênica e não-transgênica.

9.3 Atividade enzimática por espectrofotometria

A determinação da atividade enzimática para as enzimas CAT, GR e APX procedeu-se como descrito no item 8.6. Ao se observar a figura 15, pode-se perceber que, aparentemente, em nenhum dos casos há alteração significativa da atividade enzimática entre as amostras de sementes de soja transgênica e não-transgênica para estas enzimas, pois também não é atingido o nível de 90% de variação – para CAT encontrou-se uma variação de 79%.

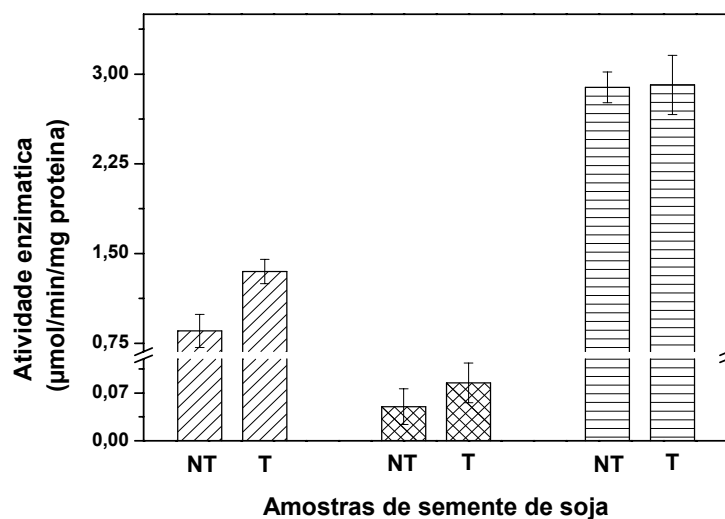


Fig. 15: Atividade enzimática das enzimas CAT (▨), GR (▩) e APX (▧) analisadas por espectrofotometria.

Estes resultados estão de acordo com àqueles encontrados em gel (item 9.2) e, portanto, confirmam os resultados previamente encontrados.

9.4 Avaliação das espécies metálica nos spots

Conforme descrito nos itens 8.7.1 e 8.7.3, fez-se o mapeamento das espécies metálicas nos *spots* protéicos por SR-XRF e ICP MS. Os resultados destas avaliações são apresentados na tabela 7.

Tab. 7: Mapeamento das espécies metálicas/metalóides para os *spots* protéicos que apresentaram variação de 90% em %V e/ou %I.

Gradiente de gel	Spot	Amostra de soja	Elementos detectados	
			SR XRF	ICP MS
3-10	a	NT	nd	nc
		T	Ca, Co, Ni, Cu, Zn	nc
	b	NT	nd	nc
		T	Co	Nb
	c	NT	nr	Cd
		T	nr	Se
4-7	d	NT	nr	Pb
		T	nr	Se
	e	NT	nr	nc
		T	nr	V, Cu, Zr
	f	NT	nr	La, Ce, Nb, Th
		T	nr	Ru
	g	NT	nr	nc
		T	nr	nc
	h	NT	nr	V, Cu, Zr
		T	nr	Th
	i	NT	nr	nc
		T	nr	nc
	j	NT	nr	Zr
		T	nr	V, Hg

nd => não detectado

nr => medida não realizada

nc => espécies que não tiveram contagens próximas ou superiores a 500

Conforme descrito no item 8.7.1, somente alguns *spots* (mais intensos) foram selecionados para as análises de fluorescência de raios X. Contudo, para aqueles *spots* em que se realizou esta análise, pode-se verificar que não houve uma concordância entre os resultados das duas técnicas (SR-XRF e ICP MS) para a avaliação qualitativa. Uma das possíveis causas para esta discrepância pode ter sido o número reduzido de brancos utilizados para a avaliação estatística dos dados – 03 brancos para SR-XRF em relação a 06 brancos utilizados para a avaliação com ICP MS – para cada amostra de soja transgênica e não-transgênica. Pois, uma vez que observa-se altas variações entre os brancos dos géis conforme verificado para as análises por ICP MS (superiores a 100%), um maior número de brancos é necessário.

No entanto, com o objetivo de avaliar com mais clareza a provável origem desta discrepância fez-se uma avaliação qualitativa da solução utilizada para a revelação das proteínas no gel por meio do ICP MS, ou seja, da solução do corante coomassie. A solução inicialmente utilizada para a revelação das proteínas no gel foi diluída por um fator de 100 vezes (100 μ L para 10,0 mL) e efetuou-se a medida em duplicata empregando-se as mesmas condições que foram utilizadas anteriormente (item 8.7.3). Verificou-se que os elementos Li, Ca, V, Co, Ga, Ge, Se, Rb, Y, Zr, Nb, Mo, Rh, Ag, Cd, In, Te, Cs, La, Ce, Pr, Nd, Tb, Lu, Ta, Re, Pt, Au, Hg, Tl, Bi, Th e U apresentaram valores baixos de contagens (1 - 500); os elementos como Sc, Mn, Ni, Cu, As, Sr e Ba apresentaram valores intermediários de contagens (500 – 5000); outros elementos como B, Mg, Al, K, Cr, Zn, Sn, Sb e Pb apresentaram valores altos de contagens (5×10^3 – 1×10^5) e, finalmente, elementos como Na, Si, Ti e Fe apresentaram valores muito elevados de contagens ($> 1 \times 10^5$). As faixas e classificações estabelecidas acima foram obtidas e avaliadas experimentalmente.

A partir desta avaliação pode-se inferir que os elementos Ni, Cu e Zn encontrados no mapeamento feito por SR-XRF, provavelmente, sejam provenientes da solução utilizada para a revelação – o corante, pois estes elementos devem ser encontrados em níveis intermediários a altos de concentração. Os elementos Ca e Co que também foram encontrados no mapeamento feito por SR-XRF, provavelmente, não devem ser oriundos do corante, uma vez que estes elementos devem ser encontrados em níveis baixos de concentração. Contudo, verificou-se, também por ICP MS, que o Ca pode ser proveniente da própria matriz de gel, pois, um valor médio das contagens provenientes

dos brancos dos géis de soja transgênica e não-transgênica foi da ordem de $7,5 \times 10^5$, portanto, bastante elevado. Para o Co não há indícios de nenhuma fonte de contaminação e, portanto, acredita-se que a sua presença possa ser resultado do número reduzido de brancos utilizados no tratamento estatístico.

Da tabela 7, dentre os elementos que apresentaram contagens líquidas próximas a 500 ou superiores e que não deveriam ser fortemente influenciados pelo corante, pode-se destacar: Hg, Nb, Cd, Se, V, Zr, La, Ce, Th, e Ru (considerou-se elementos que pudessem apresentar níveis intermediários ou superiores de concentração). Desde conjunto, selecionou-se os elementos Cd, Se e V conforme disponibilidade de soluções padrão. As curvas de calibração construídas para estes elementos apresentaram ótima correlação linear, suas equações e algumas figuras de mérito são apresentadas na tabela 8.

Tab. 8: Equação de calibração e figuras de mérito

Elemento	Parâmetros da equação					LD (ng/L)	LQ (ng/L)	Faixa de concentração (ng/L)
	a	s (a)	b	s (b)	R			
$^{111}\text{Cd}^+$	3,21	0,02	0	0	0,9999	3,0	9,9	10-200
$^{113}\text{Cd}^+$	3,164	0,04	0	0	0,9994	1,1	3,5	5-200
$^{51}\text{V}^+$	23,0	0,3	0	0	0,9997	1,5	5,0	10-200
$^{80}\text{Se}^+$	0,78	0,02	0	0	0,9948	9,8	32,7	10-200

s é o erro da medida.

As contagens líquidas dos elementos Cd e Se não foram superiores a 03 vezes o desvio padrão do branco dos géis e, portanto, não puderam ser quantificados em nenhuma das amostras avaliadas. Já as contagens líquidas do V foram superiores a 03 vezes o desvio padrão de branco dos géis e também superiores ao LQ do método para dois *spots* das amostras de semente de soja transgênica (*spots* “e” e “j”, fig. 8), logo, efetuou-se sua quantificação. Mesmo tomando-se todos os cuidados analíticos cabíveis a estes estudos os resultados apresentaram uma alta variação, para o *spot* “e” encontrou-se $67,6 \text{ ng/L} \pm 170\%$ ($\bar{x} \pm c.v.$) e para o *spot* “j” encontrou-se $85,5 \text{ ng/L} \pm 132\%$. Portanto, devido as baixas concentrações presentes e a enorme variação que é intrínseca de sistemas biológicos, aspectos conclusivos sobre suas quantificações ainda não foram possíveis.

Até este momento, não foi encontrado na literatura informações sobre a possível presença de V nas proteínas *Actin* e *Sucrose binding protein/Embrionic abundant protein*, referentes aos spots “e” e “j”, respectivamente.

De certa forma, os resultados das avaliações das espécies metálicas para estas proteínas encontrados até aqui concordam com as informações disponíveis na literatura a cerca das mesmas. Porém, não descarta a necessidade de um estudo mais completo e aprofundado sobre o assunto, uma vez que, alguns pontos ainda não estão totalmente esclarecidos como: i) não está claramente entendido se o processo de desnaturação das proteínas leva a perda das espécies metálicas que poderiam estar ligadas as mesmas durante a separação eletroforética; ii) elementos menos “comuns” em proteínas (ex. V, Th) podem, de fato, ser desconhecidos da comunidade científica, pois apenas recentemente este campo da ciência veio despertar a atenção dos pesquisadores [5]; iii) instrumentação e acoplamentos de técnicas adequados, ou seja, com alta sensibilidade e seletividade de análise são também recentes nesta área [7]; iv) e por fim, que influência ou qual o papel a espécie metálica desempenha ou exerce na proteína e no organismo? [6]. Desta forma, pode-se inferir que trabalhos nesta recente área de pesquisa estão ainda “engatinhando”.

10 Conclusões

Para os aspectos enzimáticos verificou-se que as condições otimizadas da quantidade em massa de proteínas totais aplicada para estudos de atividade enzimática em gel foram: 40 µg para os géis em que se avaliou a atividade das enzimas CAT e GR, e 80 µg para o gel em que foi avaliada a atividade da SOD. No caso da SOD, conseguiu-se realizar a identificação de suas isoformas no gel por meio de seu padrão de inibição, bem como por meio da análise de imagens.

Os resultados das determinações e da avaliação de atividade enzimática realizada por espectrofotometria e em gel, respectivamente, mostraram que não há variação significativa entre ambas as amostras de soja para todas as enzimas avaliadas, aparentemente. Portanto, a princípio, não é encontrada uma condição de estresse

oxidativo entre o organismo geneticamente modificado e o organismo não-modificado no estágio de semente.

O mapeamento das espécies metálicas mostrou que alguns elementos puderam ser detectados (Co, Nb, Cd, Se, V, La, Ce, Th, Zr e Hg). As proteínas dos *spots* “e” e “j” das amostras de soja transgênica apresentaram um teor de V acima do limite de quantificação. No entanto, devido a enorme variação, que é intrínseca de sistemas biológicos e, principalmente, variações de gel para gel, ainda não foi possível obter conclusões sobre suas quantificações.

Conclusões Gerais

Em relação aos aspectos proteômicos pode-se destacar que a otimização das massas a ser aplicada em géis é de grande importância, uma vez que diminui um pouco da complexidade do estudo de análise de imagens devido ao fundo alto que ocorre para grandes quantidades e a perda de *spots* para pequenas quantidades. Verificou-se que 300 e 500 µg de proteínas totais foram adequadas para a futura análise de imagens para os géis de 3-10 e 4-7, respectivamente. A avaliação dos histogramas permitiu verificar a homogeneidade quanto a distribuição dos *spots* nos géis; por meio desta pode-se notar que houve um aumento no número de *spots* detectados para os géis de 4-7 em relação aos géis de 3-10 possibilitando, então, um aumento no universo de proteínas a ser avaliado. Por meio do *matching* e também dos gráficos de correlação verificou-se que os géis apresentaram ótima correlação e que a grande maioria dos *spots* apresentaram valores similares de V% e I%. Contudo, conseguiu-se encontrar 10 *spots* com variação de expressão maiores ou iguais a 90% (1,8 vezes), sendo que 03 *spots* foram encontrados nos géis de 3-10 e 07 *spots* nos géis de 4-7. Desde grupo, 08 *spots* tiveram suas proteínas identificadas.

Em relação aos aspectos enzimáticos notou-se que, aparentemente, não ocorre variação em termos de atividade enzimática entre ambas as amostras de soja para as enzimas CAT, GR, APX e SOD avaliadas em gel e por espectrofotometria. No caso da SOD, ainda foi possível efetuar a identificação de suas isoformas.

Por fim, nos aspectos metaloproteômicos foi possível detectar alguns elementos com contagens consideráveis para avaliação (Nb, Cd, Se, V, La, Ce, Th, Zr e Hg). Percebeu-se que apenas na soja transgênica as proteínas dos *spots* “e” e “j” apresentaram um teor de V acima do LQ; entretanto, devido as altas variações de gel para gel e a variações que são intrínsecas de sistemas biológicos, ainda não foi possível concluir sobre suas quantificações.

Referências¹²

- [1] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (**Embrapa**), disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br>, acessado em 04 de julho de **2008**.
- [2] Herman, E.M.; Helm, R.M.; Jung, R.; Kinney, A.J., *Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean*, **Plant Physiol.** 132 (**2003**) 36-43.
- [3] Sussulini, A.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Arruda, M.A.Z., *Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans*, **J. Anal. At. Spectrom.** 22 (**2007**) 1501-1506.
- [4] Garcia, J.S.; Magalhães, C.S.; Arruda, M.A.Z.; *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (**2006**) 1-15.
- [5] Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*, **J. Anal. At. Spectrom.** 19 (**2004**) 5-14.
- [6] Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R., *Metallomics: the concept and methodology*, **Chem. Soc. Rev.** 38 (**2009**) 1119-1138.
- [7] Szpunar, J., *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*, **Analyst** 130 (**2005**) 442-465.
- [8] Berth, M.; Moser, F.M.; Kolbe, M.; Bernhardt, J., *The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 76 (**2007**) 1223-1243.
- [9] Badow, J.E.; Baker, J.D.; Berth, M.; Painter, C.; Sepulveda, O.J.; Clark, K.A.; Kilty, I.; VanBogelen, R.A., *Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies – COPD biomarker discovery study*, **Proteomics** 8 (**2008**) 3030-3041.
- [10] Arora, A.; Sairam, R.K.; Srivastava, G.C., *Oxidative stress and antioxidative system in plants*, **Cur. Sci.** 82:10 (**2002**) 1227-1238.
- [11] 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*, **J. Agric. Food Chem.** 54 (**2006**) 8623-30.
- [12] Yaklich, R.W., *Beta-conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds*, **J. Agric. Food Chem.** 49 (**2001**) 729-735.
- [13] Moraes, A.A.C. e Silva, A.L., *Valor Nutritivo e Funcional da Soja*, **Rev. Bras. Nutr. Clin.** 25:2 (**2000**) 306-315.
- [14] **Monsanto**, disponível em <http://www.monsanto.com.br/biotecnologia/publicações>, acessado em 07 de julho de **2008**.
- [15] McCann, M.C.; Liu, K.S.; Trujillo, W.A.; Dobert, R.C., *Glyphosate-tolerant soybeans remain compositionally equivalent to conventional soybeans (*Glycine max* L.) during three years of field testing*, **J. Agric. Food Chem.** 53:13 (**2005**) 5331-5335.

¹² As abreviações das revistas foram verificadas por meio do endereço abaixo:
<http://info.cas.org/expertise/cascontent/caplus/corejournals.html>

- [16] Kim, Y.; Seung, J.C.; Hyun-Ah, L.; Moon, T.W., *Quantitation of CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in soybean by two-dimensional gel electrophoresis*, **J. Microbiol. Biotechnol.** 16:1 (2006) 25-31.
- [17] Silva Jr., J.G., *Eletrofese de proteínas: guia teórico-prático*, **Interciência**, Rio de Janeiro (2001).
- [18] Berklman, T.; Stenstedt, T., *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods*, **Amershan Biosciences**, Uppsala 1998.
- [19] Ma, R.; McLeod, C.W.; Tomlinson, K.; Poole, R.K., *Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry*, **Electrophoresis** 25 (2004) 2469-2477.
- [20] Dowsey, A.W.; Dunn, M.J.; Yang, G.Z., *The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoreses*, **Proteomics** 3 (2003) 1567-1596.
- [21] Eravci, M.; Fuxius, S.; Broedel, O.; Weist, S.E.; Mansmann, U.; Schluter, H.; Tiemann, J.; Baumgartner, A., *Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis*, **Proteomics** 7 (2007) 513-523.
- [22] Cutler, P.; Heald, G.; White, I.R.; Ruan, J., *A novel aproach to spot detection for two-dimensional gel electrophoresis images using pixel value collection*, **Proteomics** 3 (2003) 392-401.
- [23] Choe, L.H.; Lee, K.H., *Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis*, **Electrophoresis** 24 (2003) 3500-3507.
- [24] Carli, M.D.; Villani, M.E.; Renzone, G.; Nardi, L.; Pasquo, A.; Franconi, R.; Scaloni, A.; Benvenuto, E.; Desiderio, A., *Leaf proteome analysis of transgenic plants expressing antiviral antibodies*, **J. Proteome Res.** 8 (2009) 838-848.
- [25] Garcia, J.S.; Souza, G.H.M.F.; Eberlin, M.N.; Arruda, M.A.Z., *Evaluation of metal-ion stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves through proteomic changes*, **Metallomics** 1 (2009) 107-113.
- [26] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A.; trad. Caracelli, I.; et al., *Princípios de análise instrumental*, 5ª ed., **Bookman** 2002.
- [27] Wind, M. and Lehmann, W.D., *Element and molecular mass spectrometry – an emerging analytical dream team in the life sciences*, **J. Anal. At. Spectrom.** 19 (2004) 20-25.
- [28] Xu, Chenping; Garrett, W.M.; Sullivan, J.; Caperna, T.J.; Natarajan, S., *Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*, **Phytochemistry** 67 (2006) 2431-2440.
- [29] Abrahão, O.S., *Rastreabilidade de soja Roundup Ready® em produtos agrícolas e derivados: produção de materiais de referência e uso de marcadores ALFP*, **Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP)**, Piracicaba – SP (2008).
- [30] Sussulini, A.; Garcia, J.S.; Mesko, M.F.; Moraes, D.P.; Flores, E.M.M.; Pérez, C.A.; Arruda, M.A.Z., *Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis*, **Microchim. Acta** 158:1-2 (2007) 173-180.
- [31] Bradford, M.M., *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.** 72 (1976) 248-254.

- [32] Manual do usuário, 11-0034-38, *Image master 2D platinum 6.0*, **GE Healthcare**, Edition AA, **2005**.
- [33] Ruebelt, M.C.; Leimgruber, N.K.; Lipp, M.; Reynolds, T.L.; Nemeth, M.A.; Astwood, J.D.; Engel, K.H.; Jany, K.D., *Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation*, **J. Agric. Food Chem.** 54 (2006) 2154-2161.
- [34] Manual do usuário, P36505, *Montage in-gel digest_{2D} kit*, **Millipore** **2003**.
- [35] Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.V.; Lichtig, J., *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, **Química Nova** 21:6 (1998) 787-793.
- [36] Sussulini, A., *Avaliação das alterações protéicas e metaloprotéicas em soja após o processo de modificação genética*, Dissertação de Mestrado, **Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)**, Campinas – SP (2007).
- [37] Meunier, B.; Bouley, J.; Piec, I.; Bernard, C.; Picard, B.; Hocquette, J.F., *Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis*, **Analyt. Biochem.** 340 (2005) 226-230.
- [38] **SwissProt**, Disponível em www.uniprot.org, acessado em 08 de julho de 2009.
- [39] Gratão, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A., *Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier*, **Funct. Plant Biol.** 32 (2005) 481-494.
- [40] Wilson, C.J.; Apiyo, D.; Wittung-Stafshede, P., *Role of cofactors in metalloprotein folding*, **Quart. Rev. Bioph.** 37:3 (2005) 1-30.
- [41] Ash, C. and Stone, R., *Metals: impacts on health and the environment – a question of dose*, **Science** 300 (2003) 925.
- [42] Finney, L.A. e O'Halloran, T.V., *Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors*, **Science** 300 (2003) 931-935.
- [43] Herald, V.L.; Heazlewood, D.A.; Day, A.H.; Millar, A.H., *Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria*, **FEBS Lett.** 537 (2003) 96-100.
- [44] Weseloh, G.; Kühbacher, M.; Bertelsmann, H.; Özaslan, M.; Kyriakopoulos, A.; Knöchel, A.; Behne, D., *Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis and synchrotron radiation X ray fluorescence*, **J. Radioanal. Nucl. Chem.** 259:3 (2003) 473-477.
- [45] Verbi, F.M.; Arruda, S.C.C.; Rodriguez, A.P.M.; Pérez, C.A.; Arruda, M.A.Z., *Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X ray fluorescence and atomic spectrometry*, **J. Biochem. Biophys. Methods** 62 (2005) 97-109.
- [46] Kühbacher, M.; Weseloh, G.; Thomzig, A.; Bertelsmann, H.; Falkenberg, G.; Radtke, M.; Riesemeier, H.; Kyriakopoulos, A.; Beekes, M.; Behne, D., *Analysis and localization of metal- and metalloid-containing proteins by synchrotron radiation X ray fluorescence spectrometry*, **X Ray Spectrom.** 34 (2005) 112-117.
- [47] Mounicou, S.; Lobinski, R., *Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions*, **Pure Appl. Chem.** 80:12 (2008) 2565-2575.
- [48] Becker, J.S.; Mounicou, S.; Zoriy, M.V.; Becker, J.S.; Lobinski, R., *Analysis of metal-binding proteins separated by non-desaturating gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass*

spectrometry (MALDI MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP MS), **Talanta** 76 (2008) 1183-1188.

[49] Raab, A.; Pioselli, B.; Munro, C.; Thomas-Oastes, J.; Feldmann, J., *Evaluation of gel electrophoresis condition for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP MS detection*, **Electrophoresis** 30 (2009) 303-314.

[50] Ferreira, R.R.; Fornazier, R.F.; Vitória, A.P.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A., *Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress*, **J. Plant Nutr.** 25:2 (2002) 327-342.

[51] Sussulini, A.; Garcia, J.S.; Arruda, M.A.Z., *Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: an auxiliary tool for metallomics studies*, **Anal. Biochem.** 361:1 (2007) 146-148.

[52] Disponível em www.chemistry.umeche.maine.edu/chy431/enzymes3.html (Cu-Zn/SOD), www.bioinfo.nist.gov/hmpd/galary/room5.html (Mn/SOD) e www.freeradicalscience.com/structure.php (Fe/SOD).