



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA EMBRIOGÊNESE
SOMÁTICA E DA AQUISIÇÃO DE COMPETÊNCIA
EMBRIOGÊNICA DE *Ocotea catharinensis* MEZ.
(LAURACEAE)**

Flávia Melissa de Souza Moraes

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart.

Brasília, agosto de 2006.

**"Eu não me envergonho de corrigir meus erros e mudar as opiniões,
porque não me envergonho de raciocinar e aprender."
(Alexandre Herculano)**

À minha mãe Cleide, por todo o seu carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, disposição e coragem para viver plenamente todas as fases da minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos André Ornelas Ricart pela oportunidade a mim concedida, pela confiança e apoio e, principalmente, pela paciência inabalável ao longo desses 5 anos de convivência.

Ao professor Dr. Marcelo Valle de Sousa, coordenador do Centro Brasileiro de Pesquisas em Proteínas pelo interesse e confiança na execução desse trabalho.

À professora Dr^a. Consuelo Rodrigues Lima, responsável pela minha iniciação na bioquímica e pela amizade sempre presente.

Aos professores Dr. Ricardo Bastos Cunha, Msc. Pedro Portugal Zanotta, Dr^a. Maria Sousa Castro, Dr. Wagner Fontes pela ótima convivência do dia-a-dia e pelas valiosas contribuições à minha formação.

Um agradecimento especial ao Jaime Paba e Rafael Augusto Pontes Guércio, pelas orientações técnicas fornecidas com paciência e pela amizade.

Agradeço ao Andej Shevchenko e Magno Junqueira do *Max Planck Institute* pelas análises de MS/MS.

Agradeço ao Dr. Sebastián Charneau o grande auxílio nas análises no MALDI-TOF e também por esclarecer minhas dúvidas de francês.

Aos professores Walter Handro e Eny Floh do BIOCEL/USP pela confiança no CBSP e pelo apoio para a produção deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Vanildo Silveira e Dr^a. Claudete Santa Catarina pela confiança, colaboração, orientação, fornecimento do material de estudo e principalmente, pela amizade que foi construída.

Aos colegas e amigos do CBSP: Adriana, Alexandre, Aline, Anna, Ana Carol, Carlos Garcia, Carlos Morris, Fábio, Flávia Fernanda, Higor, Karina, Elaine, Lanuse, Leandro, Liz, Luciano, Luiz Felipe, Mirta, Pollyana, Pedro Ivo, Perla, Renan e Liudy por todos esses anos de convivência, pelas discussões científicas e pela amizade.

À minha família que mora em Goiânia e Brasília por tantos momentos de alegria e pelo orgulho que demonstram sentir.

À minha segunda família pelo mesmo motivo acima: Arnaldo, Anália, Bruna e Breno.

Aos meus queridos amigos Kennya, Letícia, Wiliam Bastiani, Luiz Felipe McCartney , Ana Carolina Melo Araújo, Lanuse Zanotta, Cláudio Celso, dentre outros.

Ao amigo Rodrigo Gonzaga Sagastume pelo verdadeiro significado da palavra amizade e por tantas sessões de cinema e comentários literários compartilhados que ajudaram a tornar este período menos estressante.

À Ana Flávia Borges Moreira por ter me acompanhado e me encorajado desde quando tudo era só um projeto, me mantendo de cabeça erguida e sempre pronta para luta.

Aos funcionários Nuno Manuel Domingues, Fábio Coelho e Antônio Rufino por serem muito prestativos e pelo apoio técnico.

Agradeço também à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos durante a fase de execução deste trabalho. A todos os meus profundos e sinceros agradecimentos.

RESUMO

Ocotea catharinensis é uma espécie lenhosa florestal nativa da Mata Atlântica que possui grande importância econômica devida à sua madeira e à produção de óleos essenciais. Por causa de sua intensa exploração comercial e da baixa reprodução e viabilidade de suas sementes, *O. catharinensis* tornou-se ameaçada de extinção. O objetivo deste trabalho foi estudar a embriogênese somática de *O. catharinensis* por meio da análise proteômica comparativa dos diferentes estágios embriogênicos e também de agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura que produzem células com distintas competências embriogênicas. Para isso, os extratos de proteínas dos agregados celulares cultivados em diferentes meios (WPM, MS, MS+2,4-D) e dos embriões somáticos nos estágios globular (E1), cotiledonar inicial (E2), cotiledonar intermediário (E3) e embrião maduro (E4) foram submetidos à eletroforese bidimensional (2-DE). As amostras foram maceradas em N₂ líquido e pó de vidro e precipitadas com solução de TCA/acetona seguida pela extração e solubilização em tampão 2-DE. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se Plus One 2D QuantKit (GE Healthcare). As amostras foram submetidas à focalização isoeletrica utilizando-se géis de gradiente imobilizados de pH (IPG) na faixa de 4-7. Também foram realizados géis bidimensionais “dois-em-um” dos agregados celulares, nos quais os géis IPG com a mesma faixa de pH para duas diferentes amostras foram colocados lado-a-lado no topo de um gel para SDS-PAGE vertical para a separação na segunda dimensão (Wang *et al.*, 2003). Após a coloração com nitrato de prata, as imagens dos géis foram digitalizadas e submetidas à análises computacionais para se determinar o número e a intensidade dos *spots*, levando à informação da expressão diferencial de proteínas. Poucos *spots* mostraram mudanças de intensidade durante o desenvolvimento e nos meios de cultura testados. Estes *spots* foram analisados por espectrometria de massa utilizando-se espectrômetros de massa tipo MALDI-TOF e nano-LC MS/MS (LTQ Orbitrap). Somente um spot foi identificado por MALDI-TOF e oito por LTQ Orbitrap. Entre os diferentes polipeptídeos identificados estão proteínas estruturais como a actina, proteínas antioxidantes como tioredoxina, superóxido dismutase e outras como proteínas da família 14-3-3, germina e enzima biossintética de tiamina.

ABSTRACT

Ocotea catharinensis is a forest tree species from Mata Atlântica that has economic importance due to its wood and essential oils. *O. catharinensis* became an endangered species mostly because of its intense exploitation and its low seed production and viability. The objective of this work was to study *O. catharinensis* somatic embryogenesis through the comparative proteome analysis of different embryogenic stages as well as cell aggregates maintained in different culture media that produce distinct cell embryogenic competence. For that, the protein extracts of cell aggregates (*calus*) cultured in different medias (WPM, MS, MS+2,4-D) and of the somatic embryos in globular (E1), initial cotyledonary (E2), intermediary cotyledonary (E3) and mature embryo (E4) stages were subjected to two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The samples were ground in liquid N₂ and glass powder, and the proteins precipitated with TCA/acetone solution followed by extraction and solubilization in 2-DE buffer. The protein concentration was determined using Plus One 2D QuantKit (GE Healthcare). The samples were submitted to isoelectric focusing using pH 4-7 immobilized pH gradient (IPG) strips. We also carried out “two-in-one” gels (Wang *et al.*, 2003) of cell aggregates, where IPG strips with the same pH range for two different samples were loaded side by side on top of a vertical SDS-PAGE gel for separation in the second dimension. After silver staining, the gel images were digitalized and subjected to computational analyses in order to determine the number and intensity of the spots, allowing the determination of protein differential expression. Few protein spots showed different intensities during the development and in the different culture media tested. These spots were analyzed by mass spectrometry using MALDI-TOF and nano-LC MS/MS (LTQ Orbitrap). Just one spot were identified by MALDI-TOF and eight by LTQ-Orbitrap. Among the identified polypeptides, there were structural proteins like actin, antioxidant proteins like tioredoxin, superoxide dismutase and others like the 14-3-3 family, germin and thiamine biosynthetic enzyme.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Mata Atlântica	2
1.2 <i>Ocotea catharinensis</i>	3
1.3 Embriogênese	5
1.3.1 Aspectos bioquímicos da embriogênese	11
1.3.2 Marcadores moleculares da embriogênese somática	14
1.3.3 Expressão gênica envolvida na Embriogênese Somática	15
1.3.4 Competência embriogênica dos agregados celulares	16
1.4 Proteômica	18
1.4.1 Proteômica Vegetal	21
1.5. OBJETIVOS	24
1.5.1. Objetivos específicos.	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Roteiro da pesquisa proteômica	27
2.2. Material Vegetal	28
2.3. Extração e Quantificação de proteínas	29
2.4. Eletroforese unidimensional	31
2.5. Eletroforese bidimensional	32
2.6. Coloração dos géis com nitrato de prata	33
2.7. Análise de Imagens	33
2.8. Digestão de proteínas em gel para MALDI-TOF	34
2.9. Digestão de proteínas em gel para nano-LC MS/MS	34
2.10. Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF	35

2.11 Análise por nano-LC MS/MS acoplada a LTQ Orbitrap	36
2.11.1 Identificação de proteínas por buscas em bancos de dados do Mascot	37
2.11.2 Sequenciamento <i>de novo</i> de peptídeo e buscas no MS BLAST	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Adequação do protocolo de extração de material vegetal	40
3.2 Dosagem de proteína	40
3.3 Eletroforese unidimensional	42
3.4 Padronização das condições da 2D-PAGE	44
3.5. Comparação dos perfis bidimensionais dos estágios de desenvolvimento da embriogênese somática	44
3.5.1 Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos estágios embrionários	49
3.6. Comparação dos perfis protéicos bidimensionais dos agregados celulares em meios distintos	52
3.6.1 Análise dos perfis protéicos bidimensionais pela técnica do gel “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura	55
3.6.2 Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura	61
4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	69
5. REFERÊNCIAS	73

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabelas	Página
Tabela 1. Dosagem de proteína dos estágios embriogênicos e dos agregados celulares de <i>Ocotea catharinensis</i> .	42
Tabela 2. Identificação dos principais <i>spots</i> diferencialmente expressos nos géis 2-DE de extratos protéicos dos estágios embrionários.	61
Tabela 3. Identificação dos principais <i>spots</i> diferencialmente expressos nos géis 2-DE de extratos protéicos dos agregados celulares.	62
 Figuras	
Figura 1. A Mata Atlântica. Remanescentes florestais.	3
Figura 2. <i>Ocotea catharinensis</i> Mez, família Lauraceae, árvore adulta.	5
Figura 3. Visão geral do desenvolvimento zigótico de <i>Arabidopsis thaliana</i> , mostrando seus estágios de desenvolvimento.	6
Figura 4. Diferentes estágios de desenvolvimento do embrião durante as embriogêneses somática e a zigótica.	7
Figura 5. Esquema de aplicação da embriogênese somática em programas de reflorestamento.	8
Figura 6. Aspecto de semente sintética de café: embrião somático encapsulado em um estágio bastante imaturo.	8
Figura 7. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática.	9
Figura 8. Fluxograma da embriogênese somática desenvolvida para <i>O. catharinensis</i> .	10
Figura 9. Principais hormônios vegetais.	13
Figura 10. Representação esquemática dos vários grupos de genes identificados que influenciam a embriogênese somática nas plantas superiores.	16
Figura 11. Esquema ilustrativo do princípio da técnica do gel “dois-em-um” (<i>two in one gel</i>).	20

Figura 12. Esquema do LTQ-Orbitap utilizado no estudo.	21
Figura 13. Fluxograma das etapas da análise proteômica que será utilizado neste trabalho.	27
Figura 14. Fotografia mostrando a morfologia dos agregados celulares de <i>O. catharinensis</i> .	29
Figura 15. Fotografia mostrando a morfologia de embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i> observados ao estereomicroscópio,	29
Figura 16. Fluxograma do procedimento de extração de proteína dos estágios embrionários e dos agregados celulares de <i>O. catharinensis</i> .	31
Figura 17. A) Perfil bidimensional de proteínas de <i>O. catharinensis</i> extraídas com tampão fosfato, IPG de pH 3-10 não linear, 200 µg de proteína e a segunda dimensão em gel de gradiente de poliacrilamida de 8 a 15% T. Coloração com nitrato de prata.	41
Figura 18. Perfis unidimensionais (SDS-PAGE) dos estágios embrionários e dos agregados celulares em gradiente de 8 a 15% T.	43
Figura 19. Mapas proteômicos bidimensionais de <i>O. catharinensis</i> ao longo do desenvolvimento embrionário.	46/47
Figura 20. Relação de alguns <i>spots</i> diferencialmente expressos nos estágios embrionários de <i>O. catharinensis</i> .	6
Figura 21. A arquitetura do hexâmero de germina mostrando os seus seis íons de magnésio como esferas verdes.	51
Figura 22. Mapas proteômicos bidimensionais de agregados celulares (células indiferenciadas) de <i>O. catharinensis</i> .	53/54
Figura 23 A. Perfis protéicos 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e MS+2,4-D. Faixa de pH de 4 a 5,5.	56
Figura 23 B. Perfis protéicos 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e MS+2,4-D. Faixas de pH de 5,5 a 7.	57
Figura 24 A. Perfis protéicos 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e WPM. Faixa de pH de 4 a 5,5.	58
Figura 24 B. Perfis protéicos 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e WPM. Faixas de pH de 5,5 a 7.	59

Figura 25. Relação dos <i>spots</i> de proteínas diferencialmente expressos referentes aos géis da Figura 21 dos agregados celulares de <i>O. catharinensis</i> em diferentes meios.	60
Figura 26. Relação dos <i>spots</i> de proteínas diferencialmente expressos referentes aos géis realizados utilizando-se a técnica “dois-em-um” dos agregados celulares de <i>O. catharinensis</i> cultivados em diferentes meios	61
Figura 27. A transdução multiplexada de sinal envolvendo as proteínas 14-3-3.	65
Figura 28. Representação do mecanismo de ação das tiorredoxinas.	66
Figura 29. Estrutura cristalográfica da tiorredoxina h de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	67

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
α -HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
AIA	ácido indol acético
TCA	ácido tricloro acético
TFA	ácido trifluoracético
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa <i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
PSD	decaimento após a fonte <i>post source decay</i>
DTT	ditiotreitól
SDS	dodecil sulfato de sódio
2-DE	eletroforese bidimensional
SDS-PAGE	eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
ESI	espectrometria de massa de ionização por eletropulverização <i>electrospray spectrometry ionization</i>
ESI-Q-TOF	espectrometria de massa por ionização por eletropulverização em quadropolo-tempo de vôo (<i>electrospray spectrometry ionization- quadrupole-time of flight</i>)
MALDI-TOF	espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz <i>matrix-assisted laser desorption / ionization-time of flight</i>
MS/MS	espectrometria de massa em seqüência <i>tandem mass spectrometry.</i>

IEF	focalização isoelétrica <i>isoelectric focusing</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
IPG	gradiente imobilizado de pH <i>immobilized pH gradient</i>
KDa	kilodalton
WPM	meio de cultura desenvolvido por Lloyd; McCown (1981)
MS	meio de cultura desenvolvido por Murashige; Skoog (1962)
EST	pequenas seqüências expressas <i>(expressed sequence tag)</i>
PEG	polietileno glicol
LEA	proteínas abundantes ao final da embriogênese <i>late embryogenesis abundant</i>
PMF	impressão digital da massa peptídica <i>peptide mass fingerprinting</i>
ORF	seqüência aberta de leitura <i>open reading frame</i>
SERK	receptor quinase da embriogênese somática <i>somatic embryogenesis receptor kinase</i>
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
TOF	tempo de voo <i>time-of-flight</i>
Tris	tris-hidroximetilaminoetano

1.INTRODUÇÃO

1. 1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica localizada na encosta Atlântica entre as latitudes 6°S e 30°S e longitudes 30°W e 50°W, com altitudes variando do nível do mar até 2.700 metros (Lima & Capobianco, 1997), é considerada atualmente como um dos mais ricos conjuntos de ecossistemas em termos de diversidade biológica do planeta. Esse Bioma é composto de uma série de fitofisionomias bastante diversificadas tendo como consequência, a evolução de um complexo biótico de natureza vegetal e animal muito rico (Apremavi, 2002).

Considerando-se apenas o grupo das angiospermas, acredita-se que o Brasil possua por volta de 60.000 espécies, ou seja, 22 a 24% do total que se estima existir no planeta. Deste total, as projeções são de que a Mata Atlântica possua cerca de 20.000 espécies, ou seja, entre 33 e 36% das existentes no país. A verdade é que, em um país em que a biodiversidade é pouco conhecida como o nosso, há espécies que podem ter sido extintas antes mesmo de terem sido catalogadas pelos cientistas e outras que, ao serem descobertas, entram imediatamente para a trágica lista das ameaçadas de extinção (Apremavi, 2002).

Esta floresta é o segundo ecossistema mais ameaçado no mundo, restando somente 7,84 % da floresta original após 500 anos de idade do país (Figura 1). Dean (1996) fez um dos relatos mais impressionantes do seu processo de destruição, mostrando que as políticas governamentais brasileiras tinham como imperativo o “desenvolvimento econômico” acima do preservacionismo. A Mata Atlântica possui uma importância fundamental, pois exerce influência direta na vida de mais de 80% da população brasileira que vive em seu domínio e é garantia de abastecimento de água para mais de 120 milhões de pessoas. Projetos que visem à sua preservação e à utilização sustentável de seus recursos devem ser estimulados e estabelecidos, visando à proteção do remanescente natural desse importante ecossistema.

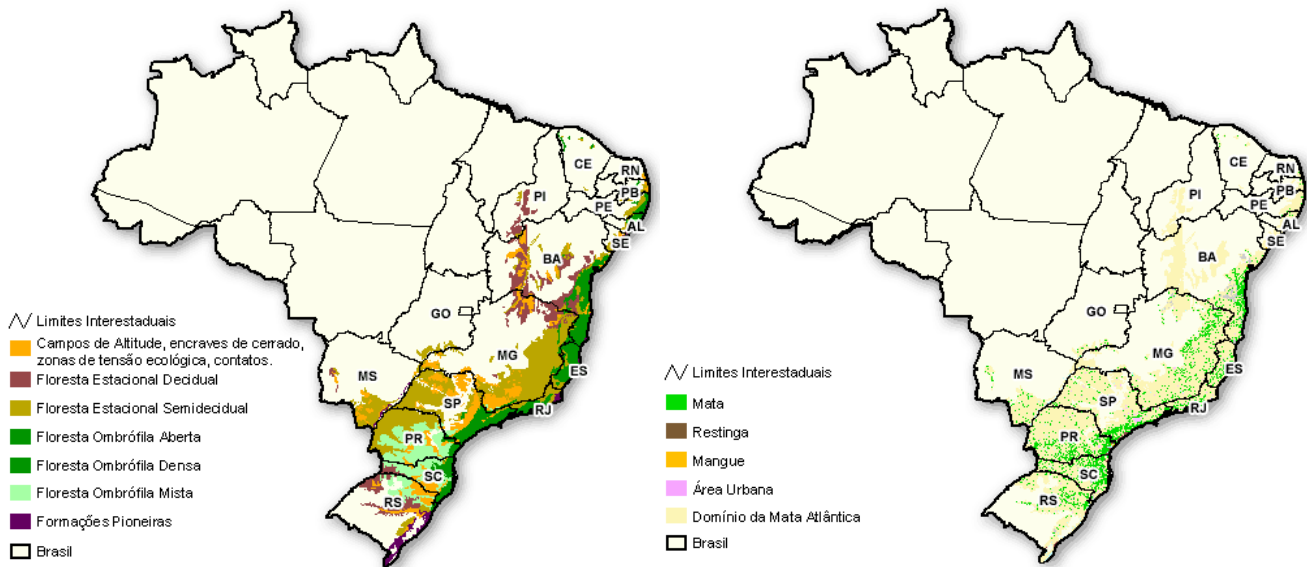


Figura 1. A Mata Atlântica. O mapa à esquerda mostra a situação original do domínio da Mata Atlântica. O mapa à direita mostra os remanescentes florestais em 2000. Fonte: Fundação S.O.S. Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

1.2 *Ocotea catharinensis*

A espécie *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae) (Figura 2), conhecida popularmente pelo nome de “canela-preta”, é originária da Mata Atlântica, com ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo (Carvalho, 1994). A árvore pode atingir 30 metros de altura e 100 centímetros de diâmetro. Possui copa larga e bastante densa e distingui-se da “canela-branca” (*Ocotea spixiana*) pelo cheiro que é mais suave. Sua área de maior ocorrência é a Floresta Ombrófila Densa constituída de formação vegetal exuberante (Carvalho, 1994).

Segundo Klein (1980), antes de 1980, a *O. catharinensis* era a espécie era mais abundante na Floresta Atlântica no Estado de Santa Catarina em altitudes entre 300 metros e 700 metros, representando aproximadamente um terço do total de biomassa vegetal. Essa espécie possui importância econômica pela produção de madeira, principalmente a madeira serrada e roliça, muito valorizada na construção civil, naval e na indústria moveleira (Carvalho, 1994). Também é importante, como outras espécies da família

Lauraceae, pela produção de quantidades significativas de óleos essenciais utilizados em perfumaria na indústria cosmética (Sakiat & Yatagai, 1992; Carvalho, 1994). Além disso, produz lignanas e neolignanas, que são compostos biologicamente ativos, com efeito citotóxico em células tumorais (Lordello, 1996; Funasaki, 2006). Esses compostos também foram isolados de outras espécies da família Lauraceae, como a *Endlicheria dysodantha* Mez. e a *Aniba megaphylla* Mez. (Ma *et al.*, 1991). Devido a sua intensa exploração econômica nas décadas de 1940 a 1970, a espécie possui, atualmente, um reduzido número de indivíduos e, com isso, seus mecanismos naturais de reprodução estão sendo afetados. Consequentemente, a espécie foi incluída na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (Brasil, 1992).

Adicionalmente, *O. catharinensis* produz esporadicamente flores e sementes, as quais apresentam baixa viabilidade e resistem a poucos meses de armazenamento (Viana, 1998). Essa característica, na prática, se traduz por uma dificuldade para a obtenção de mudas a partir de sementes, comprometendo o estabelecimento de projetos de reflorestamento em suas áreas de ocorrência natural. Esses fatos apontam a urgência de se desenvolver métodos alternativos de propagação e conservação, visto que os métodos convencionais de propagação vegetativa para esta espécie não têm apresentado resultados satisfatórios (Silva, 2001). Assim, necessita-se urgentemente do estabelecimento de programas de conservação, incluindo o desenvolvimento de métodos não convencionais para a propagação e conservação dessa espécie, como por exemplo, o da embriogênese somática.

Técnicas biotecnológicas, como a embriogênese somática, podem ser aplicadas para espécies lenhosas que são caracterizadas por um longo período de maturação e baixa viabilidade de sementes, bem como para espécies de difícil propagação através de métodos convencionais (Jain & Ishii, 1998). A cultura de tecidos vegetais é de grande importância na propagação, em larga escala, de espécies florestais de interesse para futuros programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas (Viana *et al.*, 1999).



Figura 2. *Ocotea catharinensis* Mez, família Lauraceae, árvore adulta (Lorenzi, 1992).

1.3 Embriogênese

A embriogênese é o processo que inicia o desenvolvimento vegetal e, em geral, começa quando os gametas se unem formando o zigoto. Em angiospermas, a fecundação é dupla, pois também ocorre a união de um gameta masculino com dois núcleos polares formando o endosperma que consistirá no tecido de nutrição do embrião em desenvolvimento (Taiz & Zeiger, 2004).

Nos estudos de embriogênese, a *Arabidopsis thaliana* é uma espécie modelo e o seu padrão de desenvolvimento do embrião zigótico tem sido amplamente estudado. Os estágios mais importantes da sua embriogênese zigótica são: globular (embrião de oito células), cordiforme (primórdios do cotilédone), torpedo (alongamento celular e desenvolvimento dos cotilédones) e o estágio de maturação (perda de água e metabolicamente quiescentes) (Figura 3). A diferenciação dos meristemas já pode ser observada no estágio cordiforme, onde a região apical originará meristema apical e os cotilédones; e a região central originará o hipocótilo e a região basal originará a raiz.

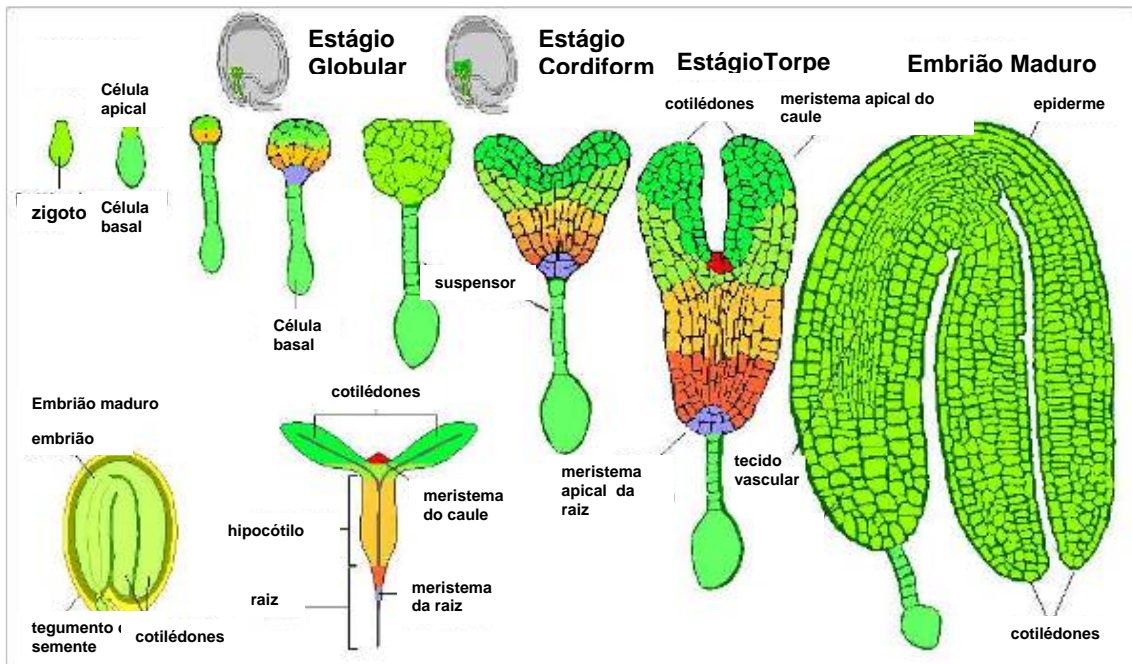


Figura 3. Visão geral do desenvolvimento zigótico de *A. thaliana*, mostrando seus estágios de desenvolvimento.

(www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch07/DBNPlant.html).

A embriogênese somática, por outro lado, é o processo pelo qual, através da técnica de cultivo *in vitro*, células isoladas ou um pequeno grupo de células somáticas dão origem a embriões somáticos, num processo morfo genético que se aproxima da seqüência de eventos representativos da embriogênese zigótica, (Tautorus *et al.*, 1991; Zimmerman, 1993), apresentando, inclusive, estágios de desenvolvimento embrionário similares (Figura 4). A embriogênese somática *in vitro* foi descrita pela primeira vez, independentemente, por Steward e Reinert em 1958, em cenoura (*Daucus carota*) e tem sido utilizada em várias espécies de plantas partindo-se de uma grande variedade de materiais, tais como micrósporos, protoplastos, embriões imaturos, explantes de tecidos e células cultivados *in vitro* (Schmidt, 1997).

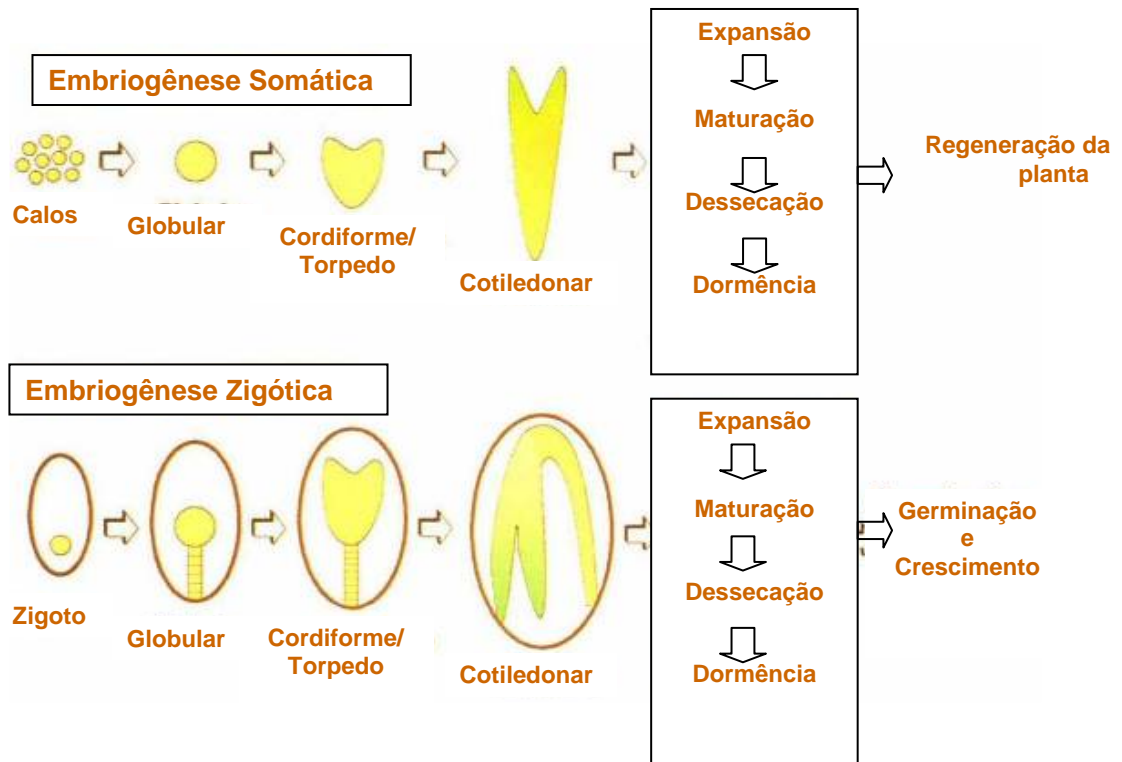


Figura 4. Diferentes estágios de desenvolvimento do embrião durante as embriogêneses somática e a zigótica. Adaptado de Zimmerman, 1993.

O emprego da embriogênese somática na cultura de tecidos é um método bastante promissor com uma série de aplicações biotecnológicas. Este processo morfogênético, além de permitir o estudo de aspectos básicos da embriogênese somática, tem contribuído para garantir a propagação de espécies lenhosas de difícil propagação por métodos convencionais (Jain & Ishii, 1998), permitindo a obtenção de um grande número de indivíduos para programas de reflorestamento (Figura 5).

Em comparação às outras técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta as seguintes vantagens e aplicações: permite a obtenção de uma grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); possibilita um alto grau de automatização do sistema, permitindo baixar o custo efetivo da produção em larga escala de plântulas somáticas; os propágulos (embriões somáticos) podem ser produzidos de forma sincronizada (com a otimização do sistema); possibilidade de armazenamento dos propágulos por um longo prazo através da criopreservação; possibilidade de

produção de sementes artificiais (Figura 6); utilização das culturas para o isolamento e fusão dos protoplastos; e as culturas são passíveis de transformação genética e podem ser utilizadas como ferramenta integrada em programas de melhoramento florestal (Högberg *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 1999).

Reflorestamento e Embriogênese Somática

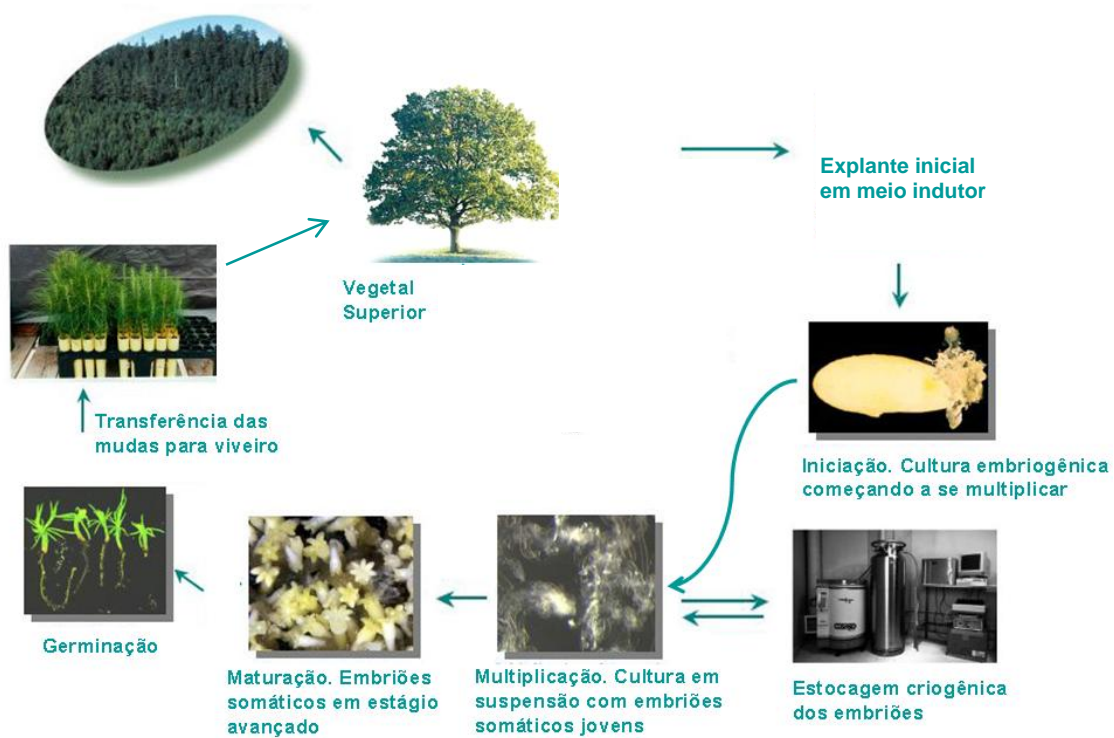


Figura 5. Esquema de aplicação da embriogênese somática em programas de reflorestamento.



Figura 6. Aspecto de semente sintética de café: embrião somático encapsulado (Cid, 2004).

O processo básico para a embriogênese somática realizada com gimnospermas, principalmente coníferas, consiste de dois ciclos repetitivos característicos evidenciados na Figura 7. No primeiro, embriões zigóticos em estágio inicial de desenvolvimento são inoculados em meios de cultura contendo hormônio vegetal auxina, sendo a mais utilizada o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Estas culturas geram complexos ou massas celulares pró-embriônicas, que por processos de embriogênese repetitiva, resultam em um ciclo repetitivo de divisões celulares, formando embriões somáticos globulares. No segundo ciclo, chamado de ciclo de maturação, esses pró-embriões são estimulados a prosseguir o seu desenvolvimento pela retirada da auxina do meio de cultura, ou pela inclusão de ácido abscísico (ABA), citocininas e de agentes que promovam estresse osmótico. Nesta fase as culturas são mantidas em condições de luminosidade. Esse ciclo de maturação forma embriões somáticos que podem ser convertidos a plantas (Guerra *et al*, 1999).

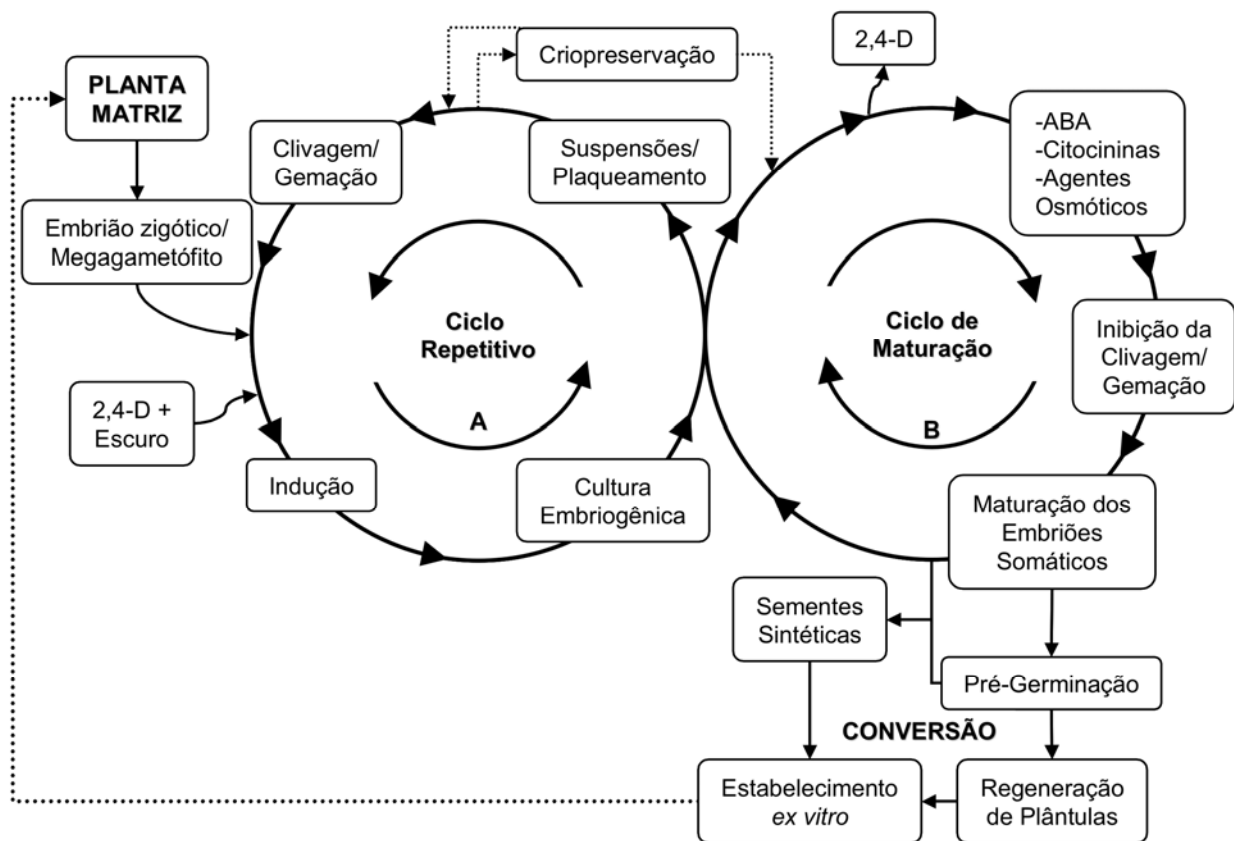


Figura 7. Processo de dois ciclos para a indução e modulação da embriogênese somática em gimnospermas (Vanildo Silveira).

Para *O. catharinensis* foi desenvolvido um sistema de embriogênese somática de alta frequência a partir da cultura de embriões zigóticos maduros (Figura 8) (Moura-Costa *et al.*, 1993). De acordo com Viana e Mantell (1999), a embriogênese somática para essa espécie possui as seguintes fases: a) indução de agregados celulares embriogênicos (embriogênese indireta) e de embriões somáticos globulares (embriogênese direta) a partir de embriões zigóticos maduros; b) diferenciação dos agregados celulares para os estágios globular e cotiledonar; c) maturação; d) desidratação, e e) germinação. A manutenção das culturas no estágio de agregados celulares indiferenciados ocorre na presença de 2,4-D, e as culturas embriogênicas diferenciadas são mantidas em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento, em estágio cotiledonar inicial, a partir da embriogênese secundária repetitiva. Este processo consiste na produção de novos embriões somáticos a partir de embriões somáticos nos estágios globular e cotiledonar inicial, inoculados a cada 25 dias para o novo meio de cultura (Viana & Mantell, 1999). Entretanto, uma limitação deste sistema é a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas (Viana, 1998).

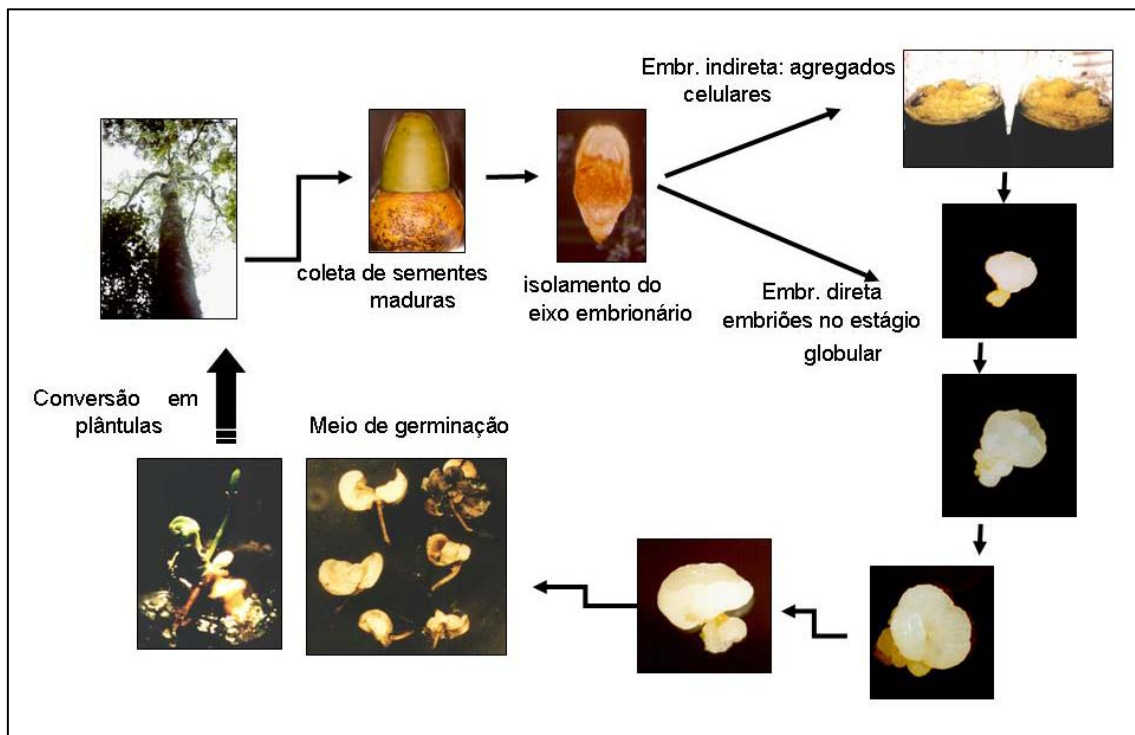


Figura 8. Fluxograma da embriogênese somática desenvolvida para *O. catharinensis*. (Adaptado de Viana & Mantell, 1999; Santa-Catarina, 2005).

Vários aspectos deste sistema de embriogênese somática foram estudados, tais como o crescimento das culturas e a caracterização morfológica, citoquímica e bioquímica dos embriões somáticos em diferentes fases de desenvolvimento (Santa-Catarina, 2001; Santa-Catarina *et al.*, 2003; Santa-Catarina, 2005); o estabelecimento e manutenção de suspensões celulares a partir de culturas embriogênicas na fase de agregados celulares (Moser *et al.*, 2003); os fatores que promovem a embriogênese repetitiva (Santa-Catarina *et al.*, 2004b); a análise da competência embriogênica através da expressão do homólogo do gene *SERK* em agregados celulares mantidos em diferentes meios de cultura e na presença ou ausência de 2,4-D (Santa-Catarina *et al.*, 2004a). Além disso, estudos fisiológicos e bioquímicos foram realizados durante a fase de multiplicação das culturas embriogênicas e durante o desenvolvimento do embrião zigótico de *O. catharinensis* (Santa-Catarina, 2005).

1.3.1 Aspectos bioquímicos da embriogênese

Acredita-se que em todos os sistemas vegetais, os processos de desenvolvimento são o resultado de um complexo controle espacial e temporal, onde vários hormônios atuam na regulação da expressão de múltiplos genes (Barendse & Peeters, 1995). Os hormônios vegetais são reguladores químicos de ocorrência natural que produzem respostas metabólicas e fisiológicas e que são efetivos em quantidades muito pequenas e são, provavelmente, os mais importantes mediadores na transdução de sinais. O mesmo hormônio pode ocasionar respostas diferentes em tecidos diferentes ou em diferentes fases de desenvolvimento de um mesmo tecido (Taiz & Zeiger, 2004).

Os fitormônios exercem sua ação por meio do reconhecimento de receptores específicos presentes em células responsivas, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (Guerra *et al.*, 1999). Tradicionalmente, quatro grupos de fitormônios (Figura 9) estão presentes durante o desenvolvimento de várias espécies de angiospermas: auxinas, citocininas, ABA e giberelinas. Fitorreguladores ou reguladores de crescimento

são substâncias sintéticas que mimetizam os efeitos dos hormônios no metabolismo celular (Taiz & Zeiger, 2004).

O hormônio conhecido como AIA (ácido indol acético), é a principal auxina presente em sementes de angiospermas em desenvolvimento (Bewley & Black, 1994). O AIA é uma das principais substâncias envolvidas no controle do desenvolvimento da semente, determinando a orientação do eixo embrionário nas fases iniciais da embriogênese (Rock & Quatrano, 1995) e controlando a formação dos cotilédones (Liu *et al.*, 1993; Astarita *et al.*, 2003). Segundo Rock & Quatrano (1995), quando os cotilédones completam a sua formação tem início a etapa de maturação da semente, que é caracterizada pela diminuição dos níveis de AIA e giberelinas e aumento da concentração do ABA. Nesta fase ocorre o acúmulo de substâncias de reserva e a progressiva perda de água (desidratação), completando-se o processo de formação das sementes (Bewley & Black, 1994; Rock & Quatrano, 1995).

Vários estudos sobre a biossíntese, metabolismo e transporte de AIA foram realizados durante a embriogênese somática de cenoura e mostraram que essa auxina tem um importante papel na indução e na subsequente morfogênese do embrião em cultura (Zimmerman, 1993). Hipóteses sugerem que na presença contínua de auxina, as massas pró-embriogênicas sintetizam os produtos gênicos necessários para iniciar a embriogênese até o estágio globular e inibir a sua diferenciação para os demais estágios de desenvolvimento embrionário. Por esta razão, a remoção de auxina do meio de cultura resulta na inativação dos genes repressores e o programa embriogênico pode prosseguir. Deste modo, o papel da auxina é alterado e o embrião passa a sintetizar sua própria auxina, possivelmente por uma via alternativa (Zimmerman, 1993).

Durante o início do desenvolvimento das sementes em várias espécies vegetais, ocorre um aumento no nível de ABA, o qual estimula a produção de proteínas de reserva LEA (*late embryogenesis abundant*) e também previne a germinação precoce (Raven, 2001). Nos embriões maduros e desidratados de várias espécies há indícios do acúmulo de ABA impondo um estado de dormência por um período de tempo (Bewley & Black, 1994; Rock & Quatrano, 1995). De acordo com estes autores, os efeitos inibitórios do ABA estão ligados ao papel que desempenha na prevenção da germinação precoce e na

dormência de curta duração durante a maturação. Desta forma, a quebra da dormência em muitas espécies está correlacionada com uma queda nos níveis de ABA nas sementes (Raven, 2001).

Vários trabalhos indicam a importância do ABA na maturação de embriões somáticos, sendo que a sua adição ao meio de cultura durante a maturação promove o desenvolvimento normal dos embriões e a sua conversão em plântulas em várias espécies (Stasolla & Yeung, 2003). Além do ABA, a utilização de agentes osmóticos no meio de maturação tem contribuído para a otimização dos sistemas de embriogênese somática, sendo o PEG (polietilenoglicol) o agente osmótico preferido em relação aos agentes plasmolisantes (sacarose, sais, manitol), devido ao seu caráter não-plasmolisante (Tautorus *et al.*, 1991; Attree & Fowke, 1993; Stasolla & Yeung, 2003). Estudos com diferentes sistemas experimentais demonstram um aumento na qualidade e na quantidade de embriões somáticos quando o meio de cultura utilizado na maturação contém ABA e PEG (Attree & Fowke, 1993; Capuana & Debergh, 1997; Klimaszewska & Smith, 1997; Guerra *et al.*, 2000).

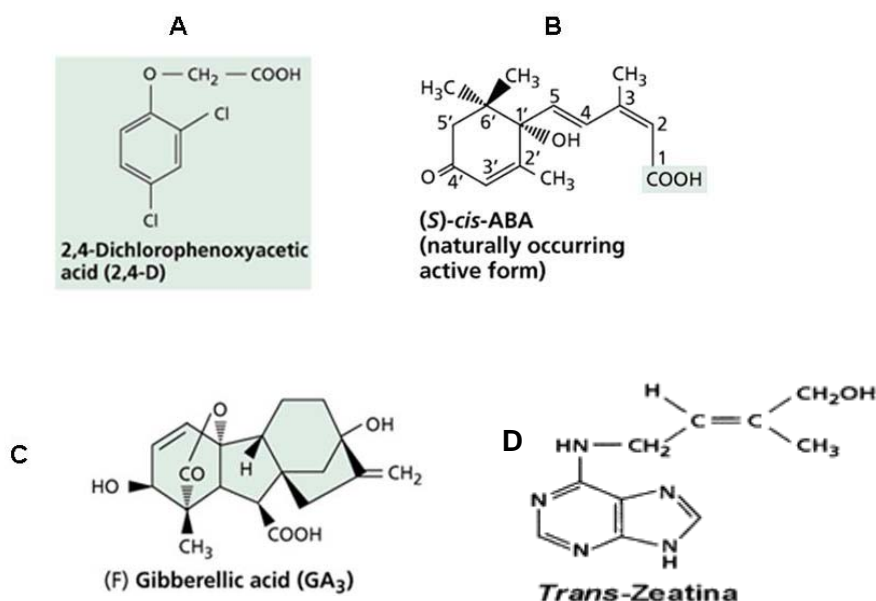


Figura 9. Principais hormônios vegetais. A) Ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D), B) Ácido abscísico (ABA); C) Giberelina e D) Citocinina trans-zeatina.

1.3.2 Marcadores moleculares da embriogênese somática

As pesquisas sobre o desenvolvimento do embrião somático começaram nos últimos 20 anos, mas a maior parte destes estudos tem sido biologicamente descritiva ou focada no melhoramento das metodologias de cultivo. Recentemente, esforços têm sido feitos para se descrever a embriogênese no nível molecular. Exemplos se estendem da investigação de processos biológicos durante o desenvolvimento normal aos efeitos da mudança das condições do meio de cultura na expressão gênica global (Lippert *et al.*, 2005). Poucos estudos têm se focado na expressão protéica durante a embriogênese em coníferas. Em *Picea glauca*, Dong *et al.* (1997) relataram o aparecimento de várias proteínas novas em resposta à remoção de fitormônios do meio de cultura após a estimulação por ABA. Outros estudos realizados por Flinn *et al.* (1993) mostraram que os níveis de transcritos, particularmente àqueles relacionados ao acúmulo de proteínas de reserva na embriogênese somática, eram similares àqueles encontrados na embriogênese zigótica.

Um resultado de fundamental importância utilizando o sistema de embriogênese somática no estudo do desenvolvimento embrionário é a geração de marcadores moleculares relacionados com os eventos de diferenciação celular durante a formação e desenvolvimento do embrião (Zimmerman, 1993). O uso de proteínas como marcadores para embriogênese somática tem sido descrito para várias espécies (Hvoslef-Eide & Corke, 1997), tentando relacionar os estágios embriogênicos com as alterações nos perfis protéicos. A identificação de proteínas estágio-específicas poderá contribuir para o entendimento do desenvolvimento embrionário de *O. catharinensis* e para o melhoramento dos protocolos de embriogênese somática. Estes estudos são de importância fundamental para a utilização da embriogênese somática como metodologia alternativa de propagação, conservação de germoplasma, reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e como ferramenta em futuros programas de melhoramento genético destas e de outras espécies arbóreas. Esta identificação pode ser realizada utilizando-se ferramentas proteômicas.

1.3.3 Expressão gênica envolvida na embriogênese somática

É conhecido que para a formação do embrião vegetal é requisitada a indução e ativação de uma variedade de genes e muitos estudos têm empregado diferentes técnicas de *screening* para identificá-los (Schmidt *et al.*, 1997). O processo de embriogênese envolve a expressão gênica diferencial conferindo às células somáticas a habilidade de demonstrarem seu potencial embriogênico. A embriogênese somática também envolve várias vias de transdução de sinal para a indução e/ou repressão de um grande número de variedades gênicas (Chugh & Khurana, 2002). Os genes que foram relacionados à regulação da embriogênese somática foram reunidos em vários grupos em função de características comuns entre si (Figura 10) Dentre estes, podemos citar os genes *housekeeping* que estão envolvidos na expressão de outros genes como *H3-1* (histonas), *Top I* (DNA topoisomerase) e outros. Uma outra classe é a dos genes de resposta aos hormônios como os das *heat shock proteins (hsps)* e *pJCW1* e *2*, todos induzíveis por auxina (Chugh & Khurana, 2002)..

O mecanismo preciso que controla a expressão gênica vegetal e os passos detalhados pelos quais estes genes dirigem o processo específico da embriogênese vegetal ainda não estão completamente entendidos.

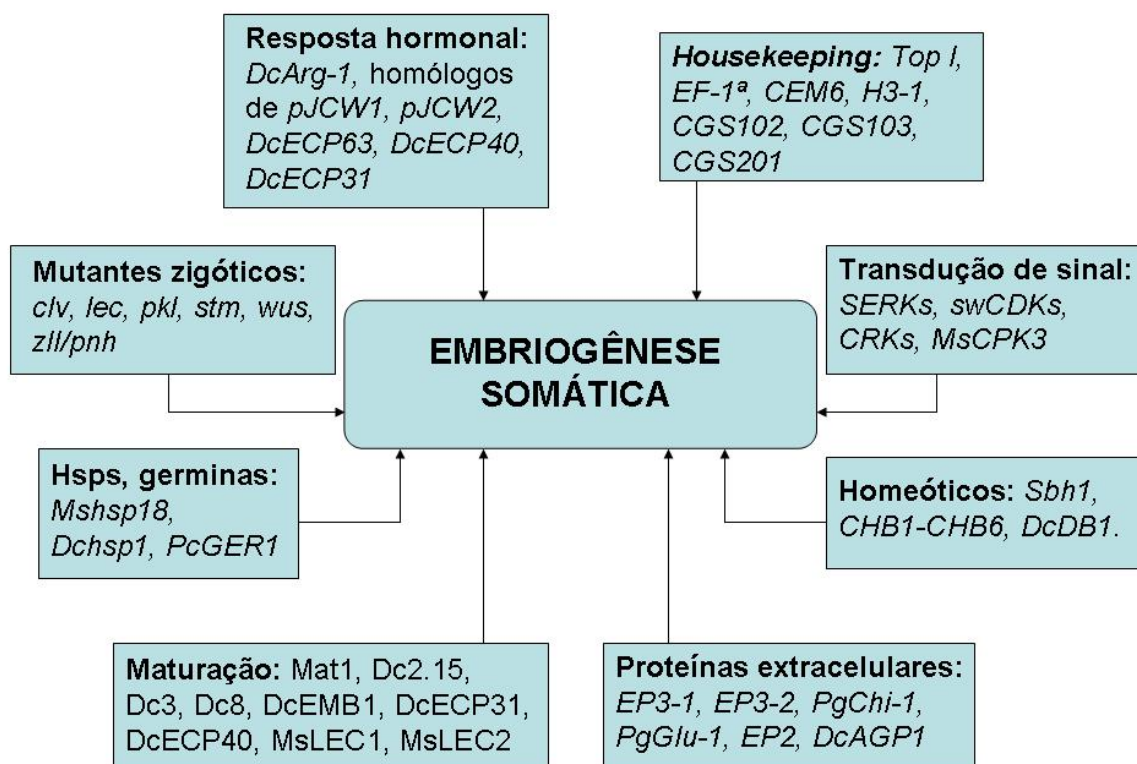


Figura 10. Representação esquemática dos vários grupos de genes identificados que influenciam a embriogênese somática nas plantas superiores (Adaptado de Chugh & Khurana, 2002).

1.3.4 Competência Embriogênica dos Agregados Celulares

Os eventos mais precoces e que acontecem durante os períodos nos quais as células vegetais somáticas tornam-se embriogênicas têm sido pouco estudados. Células em transição do estado somático para o embriogênico são chamadas de células competentes (determinadas para a embriogênese), ou seja, capazes de reagir a sinais específicos do desenvolvimento (Schmidt *et al.*, 1997). O termo embriogênico é definido como a habilidade para a formação do embrião somático sem a necessidade de aplicação exógena de auxina (De Jong *et al.*, 1993). Em explantes de tecidos de várias espécies, a primeira resposta é notada por uma rápida mudança de localização do vacúolo no

citoplasma, seguida pela primeira divisão. Em outras espécies, como *Medicago sativa* e *Ranunculus sceleratus*, a resposta acontece em outros tecidos como o epidérmico (Schmidt *et al.*, 1997). Células competentes devem conter um receptor inativo, o qual seria ativado pela presença de um ligante próprio para disparar o programa embriogênico (Fehér *et al.*, 2003).

O gene *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*) foi primeiramente descrito em culturas de células competentes de cenoura (*DcSERK*) (Schmidt, 1997). Células individuais de cenoura destinadas a se desenvolverem em embriões somáticos expressam o gene luciferase como repórter sob o controle de *DcSERK*, demonstrando que este gene é um marcador para a competência das células somáticas se tornarem embriogênicas. Outros homólogos deste gene foram encontrados em *Arabidopsis thaliana* (*AtSERK1*) (Hecht *et al.*, 2001), *Dactylus glomerulata* (*DgSERK*) (Somleva *et al.*, 2000) e *Medicago truncatula* (*MtSERK*) (Nolan *et al.*, 2003).

De acordo com Santa-Catarina *et al.* (2004), a análise por *Northen Blot* e hibridização *in situ* mostraram que, nos agregados celulares cultivados nos meios de cultura MS suplementado com 2,4-D (MS+2,4-D) e no meio WPM, a expressão do gene *SERK* foi detectada. Culturas mantidas em meio MS sem 2,4-D (MS-2,4-D) não apresentaram esta resposta, sugerindo que a adição do 2,4-D ao meio de cultura MS contribuiu para a ativação da expressão do gene *SERK*. A expressão do gene em meio WPM sugere também que outros componentes do meio de cultura possam ativar a expressão do gene *SERK*.

A importância da presença do 2,4-D na indução da embriogênese somática foi intensamente estudada e descrita na literatura (Dudits *et al.*, 1995). Acredita-se que o 2,4-D atue como um agente metilador do DNA nuclear (De Klerk *et al.*, 1997), alterando o conteúdo endógeno de hormônios, como o AIA, através de um distúrbio no metabolismo endógeno de auxinas (Fehér *et al.*, 2003). Em agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em meio MS, a expressão do homólogo do gene *SERK* somente foi detectada quando o 2,4-D foi incorporado ao meio de cultura. A indução da expressão de um homólogo do gene *SERK* por auxina foi também recentemente observada em culturas embriogênicas de *M. truncatula* (Nolan *et al.*, 2003).

1.4 Proteômica

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas presentes em um material biológico e que ao contrário do genoma, está em contínua mudança em resposta aos estímulos internos e externos sofridos pelo organismo (Wilkins *et al.*, 1994). Foi Marc Wilkins, em 1994, quem batizou este importante ramo da genômica funcional com o termo proteoma –análogo PROTÉico do genOMA.

Proteomas celulares são muito complexos e compostos de milhares de proteínas e estão em contínua mudança em resposta aos estímulos internos e externos do organismo. Proteômica é uma nova área da ciência que tem como objeto estudar os proteomas e seu objetivo inicial foi a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consiste na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (Westermeier & Naven, 2001). Seus objetivos se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, atividades e estruturas. O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, diagnósticos, terapias, microbiologia, bioquímica. A análise de proteomas geralmente começa com a eletroforese em géis de poliacrilamida, principalmente os géis bidimensionais (2-DE), e técnicas de espectrometria de massa. Na última década, tem sido grandemente facilitada pelo desenvolvimento de novas técnicas de espectrometria de massa (MS) e a disponibilidade de informação genômica (Westermeier & Naven, 2001).

Pela técnica de 2-DE as proteínas são separadas em função dos seus pontos isoelétricos (pI) na primeira dimensão e, posteriormente, de acordo com suas massas moleculares na segunda dimensão. A técnica de 2-DE ainda é a principal plataforma para a separação de proteínas e possui limitações técnicas inerentes, como a habilidade limitada para fracionar classes específicas de proteínas (Rabilloud, 2002) e a dificuldade de automatização (Rose, 2004), o que resulta em grande variabilidade experimental pela manipulação necessária. A 2-DE é um processo caro, trabalhoso e demorado, limitando análises em larga escala da expressão protéica (Park, 2004).

No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar-se diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2-DE é geralmente o método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas) e fornece comparações quantitativas (Rabilloud, 2002).

Ainda em relação à reprodutibilidade da 2-DE, existem problemas que podem comprometer uma comparação eficiente entre duas amostras diferentes: o tamanho do gel e a intensidade de coloração, esta podendo fornecer resultados errôneos em relação à intensidade de expressão protéica. Dentro dos métodos que podem ser utilizados na 2-DE para se prevenir este tipo de variação tem-se a técnica do gel “dois-em-um” (*two-in-one gel*) descrita por Wang *et al.* (2003) e ainda pouco utilizada na pesquisa proteômica (Figura 11). Nesta técnica quantidades iguais de duas amostras a serem comparadas são focalizadas separadamente. Os mesmos *strips* são então cortados ao meio e as metades de *strips* com a mesma faixa de pH são colocadas lado a lado no topo de um gel para SDS-PAGE para a separação por massa na segunda dimensão.

A proteômica também avançou com o desenvolvimento da espectrometria de massa (MS) voltada aos aspectos biológicos e o aumento do número de seqüências armazenadas em bancos de dados. O princípio da MS é a medição da razão massa/carga (m/z) dos íons na fase gasosa resultantes da ionização da amostra e constitui sempre um método analítico destrutivo, significando que a amostra é consumida pela ionização de biomoléculas termicamente lábeis, no caso peptídeos, que são transferidos para a fase gasosa sem dissociação (Jonsson, 2002).

As técnicas de ionização que foram desenvolvidas para a ionização de proteínas e peptídeos incluem MALDI (*matrix assisted laser desorption/ionization* – desorção/ionização a laser auxiliadas por matriz) e ESI (*electro spray ionization*- ionização por eletrovaporização). Combinadas com analisadores de massa TOF (*time of flight* - tempo de voo) e quadropolos, aumentaram a sensibilidade e a acurácia na determinação da massa (Aebersold & Mann, 2003). A escolha do analisador de massa irá fornecer mais ou menos acurácia, resolução, sensibilidade e custo dependendo do objetivo a ser alcançado.

Um importante componente para se analisar misturas complexas de peptídeos é o espectrômetro de massa em seqüência, com diferentes analisadores de massa acoplados no mesmo equipamento. Um espectrômetro de massa híbrido combina características de dois diferentes tipos de espectrômetros de massa para aumentar a capacidade ou performance do instrumento.

Em nosso trabalho foi utilizado um espectrômetro de massa híbrido que conjugou um armazenador de íons (*ion trap*, Orbitrap) com três quadrupolos em seqüência linear (LTQ) (Figura 12). O Orbitrap consiste em um eletrodo central e um externo que armazenam os íons e os fazem oscilar harmonicamente ao longo do eixo do eletrodo central com freqüência característica de seus valores m/z . As imagens destes sinais de oscilação são convertidas em uma freqüência usando a transformada de Fourier. Este aparelho tem demonstrado alta resolução e acurácia na determinação da massa (Yates *et al.*, 2006).

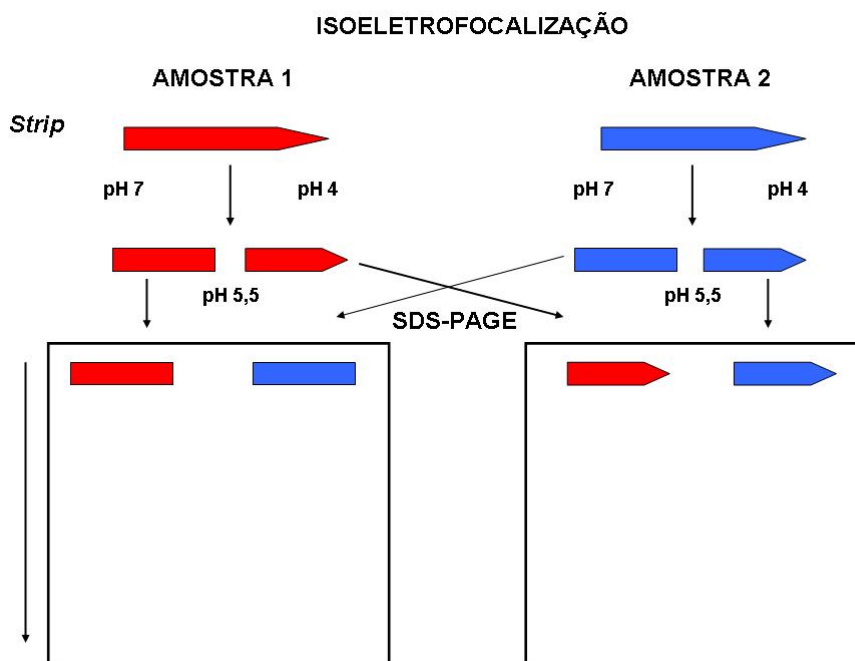


Figura 11. Esquema ilustrativo do princípio da técnica “dois-em-um” (*two-in-one gel*) (Adaptado de Wang *et al.*, 2003).

A identificação baseada na homologia com dados de MS é possível, mas requer uma grande quantidade de dados experimentais de *sequence tags* ou PMFs. Uma limitação da MS é a incapacidade para conseguir o pareamento da maior parte do espectro às seqüências de leituras abertas (ORFs) preditas. Dois fatos podem contribuir para esta dificuldade. Em primeiro lugar estariam as modificações pós-traducionais das proteínas que resultam em alteração das massas aparentes que diferem dos bancos de dados. Embora ainda passíveis de erro, estas modificações podem ser reconhecidas pela análise de MS/MS das seqüências peptídicas. Em segundo lugar, a falta de acurácia da determinação dos limites de íntrons e éxons de genes individuais do genoma.

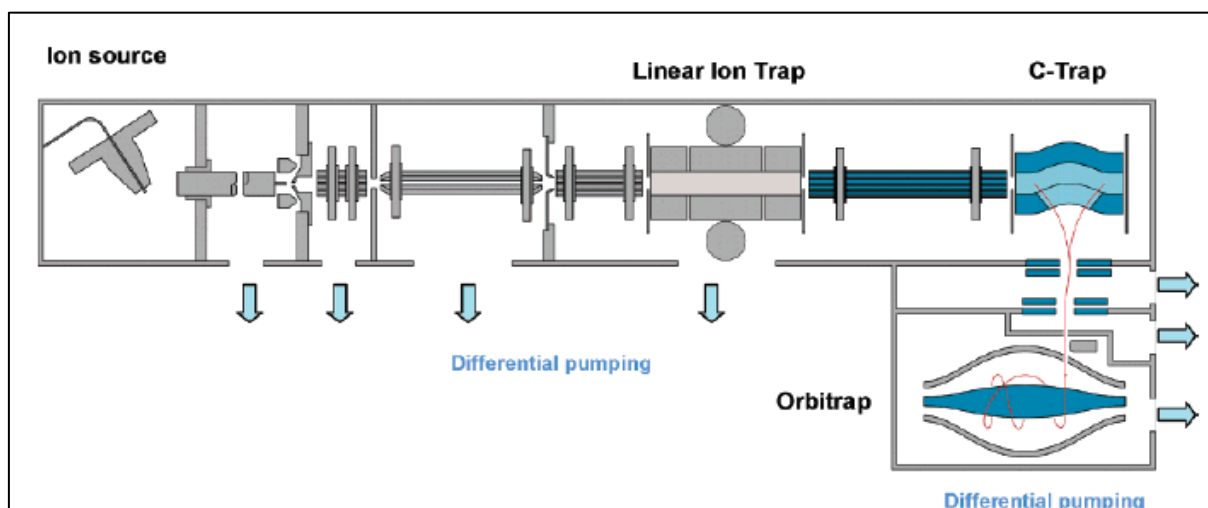


Figura 11. Esquema do LTQ-Orbitrap utilizado neste estudo. Íons são transmitidos do armazenador de íons linear (ion trap) para o C-trap e deste para o Orbitrap (Yates *et al.*, 2006).

1.4.1 Proteômica Vegetal

Segundo Park (2004), a proteômica vegetal encontra-se menos avançada em relação à pesquisa proteômica para os organismos unicelulares e leveduras. Grande parte do maior avanço no caso destes organismos pode ser explicada pela rápida disponibilidade de suas seqüências genômicas completas

e menor complexidade do seu proteoma. Com o seqüenciamento completo dos 25.000 genes do genoma de *Arabidopsis thaliana* (Agrawal *et al.*, 2005) e de outras plantas e obtenção de dados EST, acredita-se que em pouco tempo a proteômica vegetal tornar-se-á um campo bastante explorado. A análise proteômica em plantas foi iniciada com milho (*Zea mays*) (Touzet *et al.*, 1996) e *A. thaliana* (Sahnoun *et al.*, 2000), mas a primeira revisão em proteômica vegetal foi publicada somente em 1999 (Thiellement *et al.*), à qual se seguiram mais algumas outras. A maioria destes estudos baseava-se na comparação dos níveis de expressão sem a atual identificação das proteínas e tinham como objetivo a identificação de marcadores para diferentes situações.

Além dessas plantas, estudos têm sido realizados em outras espécies de dicotiledôneas tais como feijão, uva, linho, ervilha, papoula, batata, tabaco, tomate, espinafre, etc. Estes estudos têm fornecido um grande número de aplicações de novas tecnologias para a preparação da amostra, e proteomas de materiais vegetais de diferentes estágios do desenvolvimento passando por estresses ambientais e interações planta-micróbio (Agrawal *et al.*, 2005).

Atualmente, com o desenvolvimento e surgimento de novas técnicas, vários estudos têm sido realizados objetivando-se a determinação de proteomas sub-celulares ou complexos protéicos como proteínas de membrana, núcleo, mitocôndria e cloroplastos (Van Wijk, 2001) para se diminuir a complexidade da amostra. Isto é consequência do grande número de proteínas celulares presentes em níveis variáveis de abundância e diversidade de *pI*, hidrofobicidade e massa. Além disso, esse tipo de abordagem fornece a caracterização de organelas individuais e a localização da proteína relacionando-a a sua função. Espécies florestais também têm sido objetos de estudo (Cánovas, 2004), onde o estabelecimento de bancos de dados de ESTs de espécies arbóreas tem propiciado análises globais para se avaliar e estudar mudanças na expressão gênica associada a processos importantes nas espécies arbóreas como a diferenciação do xilema, embriogênese e o crescimento.

Uma das maiores dificuldades da proteômica vegetal é a capacidade de identificação de proteínas em genomas não seqüenciados. A identificação e caracterização de proteínas são aceleradas pela disponibilidade de seqüências genômicas e de ESTs. O genoma da *Arabidopsis* foi o primeiro genoma de

planta totalmente seqüenciado (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Contudo, *Arabidopsis* não é uma espécie de interesse agrícola, nem um legume ou espécie arbórea. Para contornar os problemas de falta de seqüências genômicas, duas alternativas são possíveis: se seqüências EST estão disponíveis, proteínas podem ser identificadas por seqüências *tags* obtidas por ESI-MS/MS ou usando-se MALDI-TOF PSD (*post source decay* – decaimento após a fonte), mas é fortemente dependente do tamanho e qualidade dos bancos de dados EST. Um outro caminho seria realizar buscas baseadas na homologia, preferencialmente usando-se seqüências obtidas de MS/MS, MALDI-TOF PSD, ou seqüenciamento de Edman. Proteínas vegetais, em geral, compartilham uma quantidade significativa de identidade/homologia entre elas (Van Wijk, 2001).

Boa preparação da amostra- “extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo” (Wilkins *et al.*, 1996) – é o mais importante passo para a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas. A preparação de amostras de material vegetal é reconhecidamente mais difícil devido à rigidez das paredes celulares e ao acúmulo de uma ampla gama de metabólitos secundários no vacúolo central. A prevalência destes compostos possivelmente representa o problema mais significativo associado com a análise de proteomas vegetais (Rose *et al.*, 2004). A baixa concentração de proteína neste material também representa outro obstáculo. Um protocolo de extração ideal reproduziria a captura e solubilização do total de proteínas em uma dada amostra, minimizando artefatos pós-extração e contaminantes não protéicos (Rose *et al.*, 2004). Vários métodos de preparação estão disponíveis para diferentes materiais vegetais (Rabilloud, 1996). Um dos métodos mais comuns utilizados é o que utiliza ácido tricloroacético (TCA) e acetona (TCA/acetona) para a precipitação direta da proteína de um dado material (Granier, 1988). Uma vantagem é a precipitação imediata das proteínas e a inativação simultânea de componentes envolvidos na degradação protéica, como as proteases. Entretanto, este método também envolve a precipitação de outras substâncias (sais, pigmentos e polifenóis) que interferem com a focalização isoeletrica (IEF) das proteínas.

A utilização de ferramentas proteômicas na investigação dos estágios da embriogênese somática e agregados celulares em meios diferenciais de *O.*

catharinensis e a identificação de suas possíveis proteínas específicas ou diferencialmente expressas, além de contribuir para o entendimento do desenvolvimento da embriogênese nessa espécie, pode também ser utilizada para definir marcadores biológicos para acompanhar o desenvolvimento dos embriões somáticos.

1.5. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal realizar a análise proteômica comparativa de agregados celulares de *O. catharinensis* em diferentes fases da embriogênese somática, assim como de agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura. Pretende-se assim contribuir para a compreensão do processo da embriogênese somática de *O. catharinensis* visando o aperfeiçoamento das técnicas de propagação destas e de outras espécies lenhosas.

1.5.1 Objetivos específicos

- Padronizar as condições para separação das proteínas das amostras vegetais por eletroforese bidimensional.
- Obter perfis protéicos bidimensionais de cada estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos.
- Obter perfis protéicos bidimensionais de agregados celulares mantidos em diferentes meios de cultura.
- Realizar a análise digital comparativa dos diferentes perfis bidimensionais obtidos.
- Comparar os mapas proteômicos dos diferentes estágios de desenvolvimento do embrião somático em busca de proteínas específicas de cada estágio ou diferencialmente expressas.

- Comparar os mapas proteômicos dos agregados celulares mantidos nos diferentes meios de cultura buscando-se correlacionar diferenças na expressão de proteínas específicas ou diferencialmente expressas com a competência embriogênica.
- Identificar os *spots* por espectrometria de massa selecionados nos géis bidimensionais
- Tentar relacionar a expressão diferencial de proteínas com o processo de embriogênese somática

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fluxograma da pesquisa proteômica

O fluxograma para uma análise proteômica (Figura 13) consiste primeiramente na extração das proteínas do organismo de interesse utilizando-se o método adequado, seguida pela separação das proteínas com o uso de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), sua digitalização e análise. Posteriormente, selecionam-se *spots* dos géis que serão digeridos e identificados por espectrometria de massa e cruzamento em bancos de dados disponíveis (Park, 2004; Cánovas *et al.*, 2004).

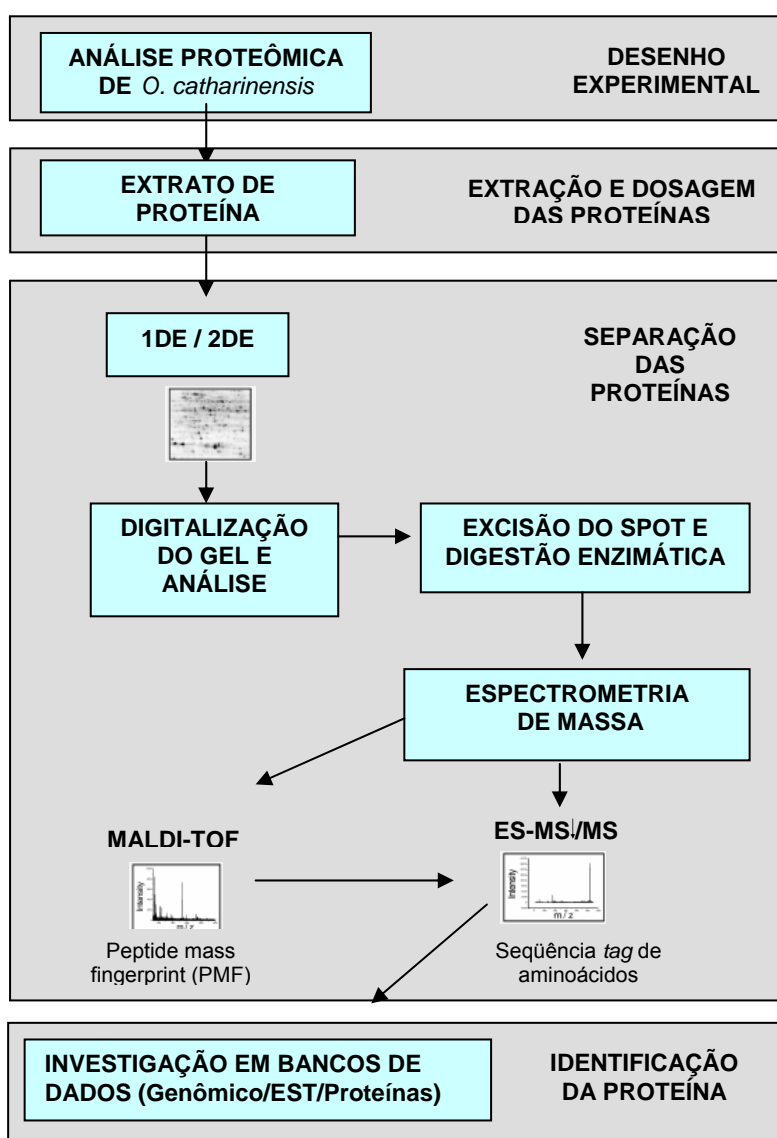


Figura 13. Fluxograma das etapas da análise proteômica que será utilizado neste trabalho. (Adaptado de Rose *et al.*, 2004).

2.2 Material vegetal

Este trabalho foi realizado em colaboração com a equipe dos professores Walter Handro e Eny Floh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). Desta forma, todas as etapas de coleta e cultivo embriogênico de *Ocotea catharinensis* foram realizadas por esta equipe e os materiais vegetais enviados para análise no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas / Centro Brasileiro de Pesquisas em Proteínas (LBQP/CBSP) da Universidade de Brasília (UnB).

Para este trabalho foram utilizadas culturas embriogênicas na fase de agregados celulares (células não diferenciadas) cultivados em diferentes meios de cultura (WPM, MS, MS+2,4-D) (Figura 14) e embriões somáticos nos estágios globular (E1), cotiledonar inicial (E2), cotiledonar intermediário (E3) e maduro (E4) (culturas embriogênicas diferenciadas) (Figura 15) mantidos em ciclos repetitivos de divisão celular conforme protocolo já estabelecido por Moura-Costa *et al.* (1993).

Os agregados celulares foram mantidos em meio de cultura MS (Murashigue & Skoog, 1962) suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), carvão ativado (3 g.L^{-1}), Phytigel® (Sigma) (2 g.L^{-1}), e na presença de 40 mg.L^{-1} de 2,4-D (MS+2,4-D) e/ou ausência (MS-2,4-D) e em meio WPM (Wood Plant Medium, Sigma Co., USA) (Lloyd & McCown, 1981) suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), sorbitol (22 g.L^{-1}), glutamina ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) e Phytigel® (Sigma) (2 g.L^{-1}).

Os diferentes estágios dos embriões somáticos foram obtidos em meio básico WPM suplementado com sacarose (20 g.L^{-1}), sorbitol (22 g.L^{-1}), glutamina ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) e Phytigel® (Sigma) (2 g.L^{-1}).

O pH dos meios MS-2,4-D, MS+2,4-D e WPM foram ajustados para 5,8 e o meio geleificado com Phytigel® (Sigma). Distribuiu-se o meio em tubos de cultura e esterilizou-se em autoclave por 15 minutos, a 120°C e 1,5 atm. As culturas foram mantidas em sala de cultura sob condições ambientais controladas: fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, com intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, no período de luz e $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no período de escuro.

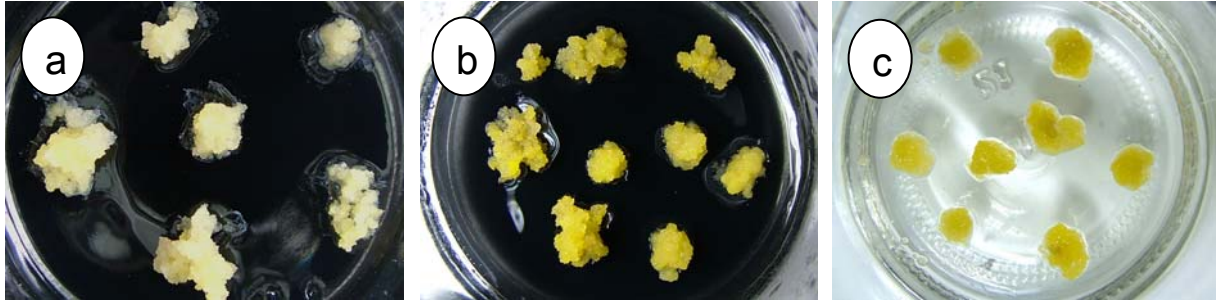


Figura 14. Fotografia mostrando a morfologia dos agregados celulares de *O. catharinensis*. A) MS-2,4-D; B) MS+2,4-D; C) WPM. Fotografia cedida por Claudete Santa-Catarina (BIOCEL/USP).

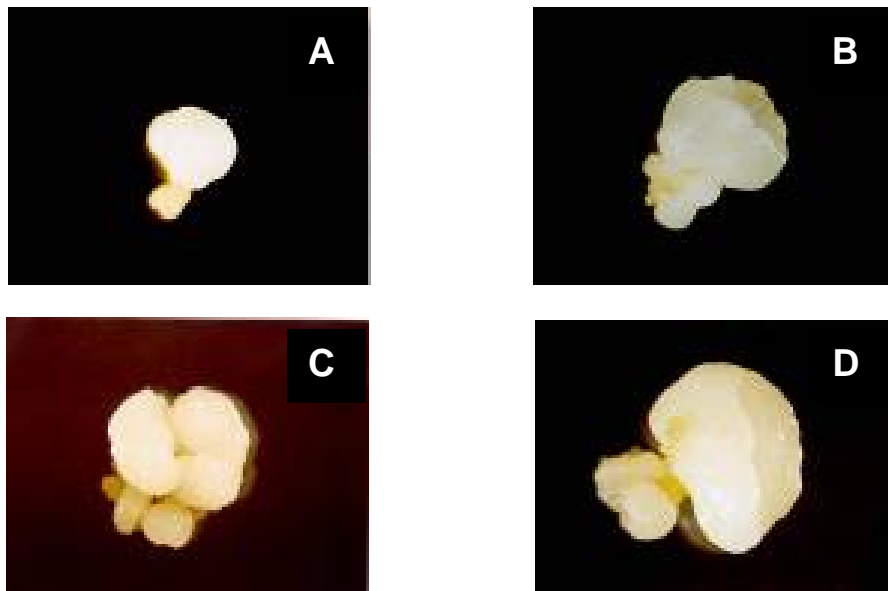


Figura 15. Fotografia mostrando a morfologia de embriões somáticos de *O. catharinensis* observados ao estereomicroscópio, nos estágios globular (A), cotiledonar inicial (B), cotiledonar intermediário (C) e maduro (D). Fotografias cedidas por Claudete Santa-Catarina (BIOCEL/USP).

2.3 Extração e quantificação de proteínas

Foram utilizados dois procedimentos para a extração das proteínas do material vegetal. O primeiro procedimento foi o método descrito por Silveira *et al.*, (2004). Este método consistiu na maceração de amostras de tecidos

(alíquotas de 250 mg) em nitrogênio líquido e posterior adição de 1,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,5 a 4°C contendo 10 mM de 2-mercaptoetanol e 100 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). O material foi homogeneizado usando-se um homogenizador Potter-Elvehjem, transferido para tubo de centrifuga, incubado sob agitação a 4°C durante 30 minutos e, finalmente, centrifugado por 30 minutos a 30.000 g a 4°C. Coletou-se e reservou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL do mesmo tampão de extração acima e submetido a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Os dois sobrenadantes juntos foram denominados de fração protéica solúvel.

O segundo procedimento utilizado para a extração de proteínas (Figura 16) consistiu na utilização de 1 g de amostra de cada estágio embrionário e dos agregados celulares nos diferentes meios de cultura. O procedimento para extração foi adaptada de Imin *et al.* (2001) e consistiu na maceração, utilizando-se um cadinho, das amostras em nitrogênio líquido e na presença de pó de vidro. Após a maceração, adicionou-se 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona contendo 0,07% de ditioneitol (DTT) (-20°C), seguido de incubação a -20°C durante 1 hora e centrifugação a 30.000 g durante 20 minutos. Cada sedimento foi ressuspenso em 4 mL de acetona contendo 0,07% de DTT, seguido de incubação a -20°C durante 30 minutos e centrifugação a 12.000 g durante 15 minutos, procedimento que foi repetido 2 vezes para a lavagem do sedimento e remoção de resíduos de TCA. Após a centrifugação, os sedimentos foram secos em *Speed-vac* e as suas massas foram estimadas. Para a solubilização, adicionou-se tampão de reidratação para 2-DE (Paba *et al.*, 2004) constituído de 7M uréia, 2M tiouréia, DTT a 1% (p/v), anfólitos a 5% (v/v) (Pharmalyte), Triton X-100 a 2% (v/v) e traços de azul de bromofenol na proporção de 50 µL de tampão para cada miligrama de *pellet*. Após a adição do tampão de reidratação, realizou-se tratamento com banho sonicator por 20 minutos, com intervalos de 30 segundos de agitação a cada 1,5 minuto de banho sonicator. Em seguida, realizou-se a centrifugação final a 12.000g durante 15 minutos à temperatura ambiente e retirada do sobrenadante, fração solúvel em tampão de reidratação. Para a estimativa do

conteúdo de proteína utilizou-se o método Plus One 2D Quant-Kit (Amersham Pharmacia) usando-se albumina de soro bovino como padrão.

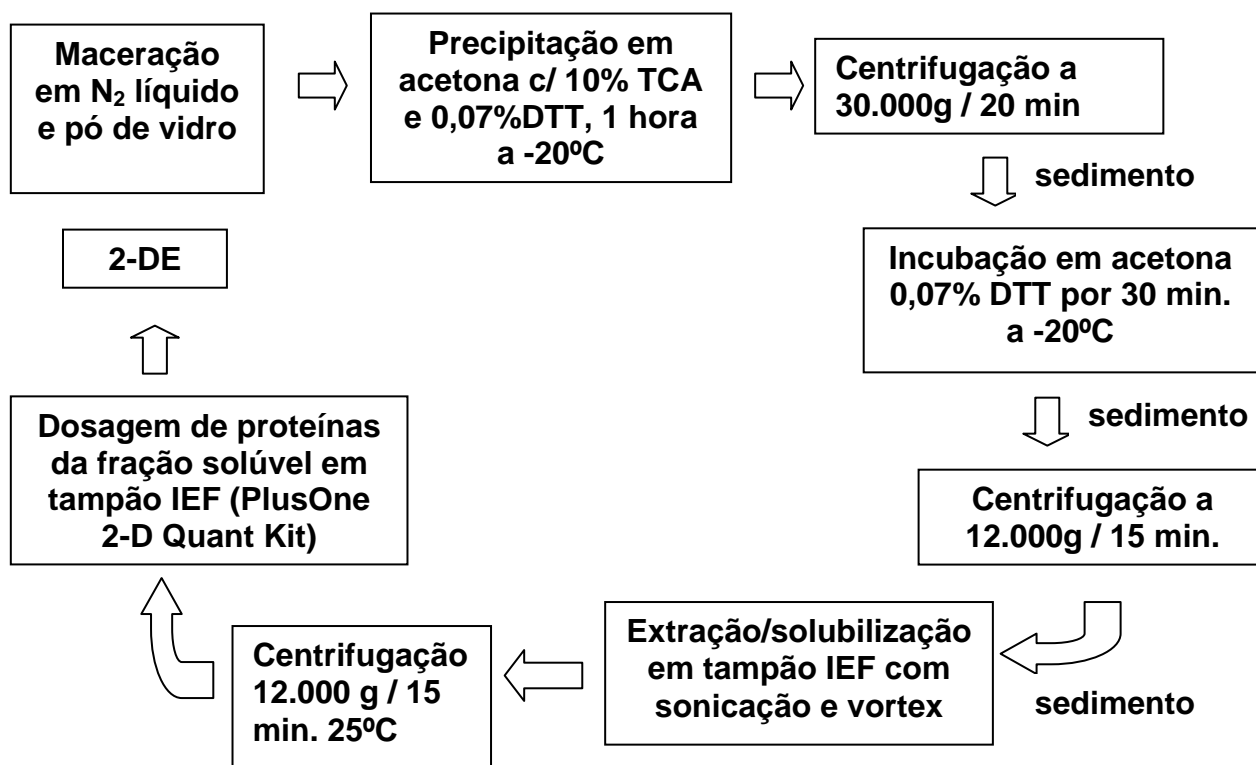


Figura 16. Fluxograma do procedimento de extração de proteína dos estágios embrionários e dos agregados celulares de *O. catharinensis*.

2.4 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes (SDS-PAGE) para a análise inicial dos perfis protéicos. A quantidade de proteínas variou de 5 a 30 µg em função da sensibilidade do corante que foi utilizado. Os géis possuíam espessura de 0,75 milímetros e gradiente de poliacrilamida de 8 a 15%. Utilizou-se o sistema Hoeffer SE-600 (Pharmacia Biotech) conectado ao resfriador MultitempII (Amersham). A separação eletroforética foi realizada a 20°C e corrente constante de 35 mA.

2.5 Eletroforese bidimensional (2-DE)

Ao volume correspondente a 250 μg de proteínas para estágios embrionários e 150 μg para agregados celulares das amostras provenientes da solubilização com tampão de reidratação foram adicionados 35 μL de isopropanol e o volume necessário de tampão de reidratação até o volume final de 350 μL . Para a focalização isoeletrica (IEF), géis de 18 cm com gradiente imobilizado (IPG) de pH 4-7 (*Immobiline Drystrip*, Amersham Biosciences), foram reidratados com as amostras durante 12 horas (Sanchez *et al.*, 1997) e submetidos à IEF em equipamento IPGPhor (Amersham Biosciences) a 20°C, 50 μA por *strip* e em três passos sucessivos: 500 Vh, 1000 Vh e 32000 Vh (*step and hold*), de acordo com as instruções do fabricante. Finalizada a IEF, os géis foram submetidos à redução e alquilação por incubação consecutiva em 3 mL de DTT 125 mMol.L^{-1} e iodoacetamida 125 mMol.L^{-1} em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mMol.L^{-1} pH 6,8, 6 M de uréia, glicerol a 30% (v/v), SDS a 4% (p/v)) durante 40 minutos cada etapa.

Para a separação na segunda dimensão foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 12% usando o sistema *PROTEAN II* (Bio-Rad®) conectado a um sistema de resfriamento MultitempII (Amersham).

Cada gel IPG foi fixado horizontalmente na extremidade superior do gel de poliacrilamida com a ajuda de aproximadamente 800 μL de gel de agarose (0,03% de agarose e traços de azul de bromofenol). Utilizou-se como padrão de massa molecular proteínas puras entre 14 e 94 kDa (Bio-Rad®). A separação eletroforética foi conduzida com corrente constante de 25 mA por gel e à temperatura de resfriamento de 10°C.

Além do método tradicional em que se posiciona o *strip* sobre o gel para SDS-PAGE da segunda dimensão como descrito acima, também utilizou-se o método do gel “dois-e-um”. Neste método do gel “dois-em-um” cada *strip* foi cortado ao meio e as metades correspondentes em termos de pH foram fixas lado a lado sobre o gel para a eletroforese desnaturante.

2.6 Coloração dos géis com nitrato de prata

Após a eletroforese, as proteínas dos géis foram coradas com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). Os géis foram fixados com metanol a 50% (v/v), ácido acético a 12% (v/v), formaldeído a 0,05% (v/v) durante a noite. Nova fixação com álcool etílico 50% a (v/v) por 20 minutos, sensibilização por tiosulfato de sódio a 0,02% (p/v) por 1 minuto, seguido de duas lavagens de 20 segundos com água Milli-Q. Posteriormente os géis foram impregnados por 20 minutos em nitrato de prata a 0,2% (v/v) e formaldeído a 0,075% (v/v), lavados por 40 segundos com água e as proteínas reveladas com carbonato de sódio a 6% (p/v) e formaldeído a 0,05% (v/v). A reação de revelação foi parada com a mesma solução utilizada para a primeira fixação e os géis foram armazenados em solução de ácido acético a 1% até a digitalização da imagem.

2.7 Análise de Imagens

Os géis corados com prata foram digitalizados usando-se um *scanner* (*ImageScanner* – Amershan Biosciences) em modo transparência com resolução de 300 dpi (*dotch per inch*) e as imagens geradas em formato *tif*, foram analisadas usando-se o programa computacional *ImageMaster Platinum v.5* (Amershan Biosciences). A detecção de cada *spot* de proteína foi validada por inspeção manual e editada quando necessário. O programa também forneceu o número de *spots* e a estimativa dos seus pI e massa molecular. Somente *spots* apresentando uma diferença de volume de pelo menos três vezes foram assinalados como diferencialmente expressos. Os géis “dois-em-um” contendo as partes ácidas foram cortados ao meio e comparados entre si, assim como os géis contendo as partes básicas do *strip*. No caso dos agregados celulares a comparação foi feita da seguinte maneira: MS-2,4-D *versus* MS+2,4-D; MS-2,4-D *versus* WPM e WPM *versus* MS+2,4-D.

2.8 Digestão de proteínas em gel para MALDI-TOF

Spots de interesse foram excisados do gel e descorados por incubação em uma solução 15 mM de ferrocianeto de potássio e 50 mM de tiosulfato de sódio durante 10 minutos. Em seguida, de acordo com Shevchenko (1996), os fragmentos de gel foram lavados 10 minutos em 100 mM de NH_4HCO_3 , e depois em água e acetonitrila a 100%, 2 vezes por 10 minutos cada uma. Na última lavagem com acetonitrila, os fragmentos de géis foram macerados com pistilo e secados em *Speed Vac* durante 20 minutos. Os macerados de géis secos foram reidratados por adição de 5 μL de solução contendo 100 mM de NH_4HCO_3 , 5 mM de CaCl_2 contendo tripsina modificada (Promega) a $12,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e incubados no gelo durante 50 minutos, e após isso, foram adicionados 10 μL do mesmo tampão de digestão sem tripsina, e incubados a 37°C durante a noite. Os digestos resultantes foram extraídos com duas lavagens com 40 μL de solução acetonitrila:água:TFA (ácido trifluoroacético), na proporção 66:33:0,1 (v/v/v), em sonicador durante 30 minutos e secos a vácuo.

2.9 Digestão de proteínas em gel para nano-LC MS/MS

Os *spots* foram excisados dos géis e descorados como descrito acima. Os *spots* também foram desidratados com acetonitrila e secos em centrifuga a vácuo. Um volume de solução contendo 10 mM de ditioneitol (DTT) em 100 mM de NH_4HCO_3 suficiente para cobrir os pedaços de géis foi adicionado e as proteínas foram reduzidas por 1 hora à 56°C . Após resfriamento à temperatura ambiente, a solução de DTT foi substituída por volume igual de solução contendo 55 mM de iodoacetamida em 100 mM de NH_4HCO_3 . Após 45 minutos de incubação à temperatura ambiente, no escuro, os *spots* foram lavados com 50-100 μL de solução contendo 100 mM de NH_4HCO_3 por 10 minutos, desidratados pela adição de acetonitrila, inchados pela reidratação em solução contendo 100 mM de NH_4HCO_3 , e desidratados novamente pela adição do mesmo volume de acetonitrila. A fase líquida foi removida e os pedaços de gel

foram completamente secos em centrífuga a vácuo. Os pedaços de gel foram hidratados em tampão de digestão contendo 50 mM de NH_4HCO_3 , 5 mM de CaCl_2 , e $12.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de tripsina (Boehringer Mannheim, grau de sequenciamento) em banho de gelo .

Após 45 minutos, o sobrenadante foi removido e substituído por 5-10 μL do mesmo tampão, mas sem tripsina, para manter os pedaços de gel úmidos durante a clivagem enzimática (37°C , durante a noite). Os peptídeos foram extraídos por uma mudança de 20 mM de NH_4HCO_3 e três mudanças de 5% ácido fórmico em 50% acetonitrila (20 minutos para cada mudança) a temperatura ambiente e secos em seguida.

2.10 Espectrometria de massa tipo MALDI-TOF

Após a secagem a vácuo, cada digesto foi solubilizado em 10 μL de TFA 0,1%. Por fim, misturou-se 1 μL do solubilizado a 1 μL de matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%) e aplicou-se na placa de aço do espectrômetro de massa usando a metodologia *dried doplet*. Os digestos também foram dessalinizados antes da aplicação na placa utilizando-se microcolunas de fase reversa Zip Tip (Millipore) de acordo com as instruções do fabricante.

A fim de se obterem os mapas peptídicos de cada amostra, análises de MALDI-TOF MS foram realizadas em um espectrômetro de massa Reflex IV (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos em modo positivo, refletor e extração retardada. Cada espectro foi calibrado internamente usando peptídeos de tripsina (842,502 ou 2211,0968 m/z) e editados manualmente usando os programas XMass e Biotools. As buscas em bancos de dados foram realizadas através do programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), usando o banco de dados não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os parâmetros de busca foram: tolerância de desvio de massa molecular entre 50-100 ppm; restrição ou não de massa molecular de acordo com a observada na separação eletroforética; reino Plantae;

carbamilação como modificação constante de cisteínas e oxidação de metionina como modificação variável.

2.11 Análise por nano-LC MS/MS acoplada a LTQ Orbitrap

Também realizou-se análise por MS utilizando-se nano-LC MS/MS acoplada a um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap (ThermoElectron Corp., San Jose, CA). Estas análises foram realizadas no Max Planck Institute, em Dresden, Alemanha, pela equipe do Dr. Andrej Shevchenko. Os digestos trípticos foram redissolvidos em 15 μL de 0,05 % TFA e 4 μL foram submetidos à cromatografia líquida acoplada à MS utilizando-se o equipamento nano-LC MS/MS Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) acoplado a um espectrômetro de massa LTQ Orbitrap (ThermoElectron Corp., San Jose, CA).

Os peptídeos foram primeiramente aplicados em uma micro-coluna (1 mm x 300 μm D.I.) empacotada com partículas C18 PepMAP100 5 μm (Dionex) em 0,05 % TFA e uma vazão de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{minutos}^{-1}$. Após 4 minutos de lavagem, a amostra foi eluída com fluxo reverso e separada em uma nano-coluna de 15 cm x 75 μm D.I. empacotada com partículas C18 PepMAP100 3 μm (Dionex) com uma vazão de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ usando o seguinte gradiente de fase móvel: de 5 a 20 % do solvente B em 20 minutos, 20 a 50 % B em 16 minutos, 50 a 100% B em 5 minutos, 100 % B durante 10 minutos, e de volta a 5 % B em 5 minutos. O solvente A se constituía de 95:5 H_2O : acetonitrila (v/v) com 0,1 % ácido fórmico; o solvente B foi constituído de 20:80 H_2O : acetonitrila (v/v) com 0,1 % ácido fórmico.

Os peptídeos foram eluídos no espectrômetro de massa através uma sonda dinâmica de eletrovaporização (Thermo Electron Corp.). Uma agulha não cortada *silicatip*TM não recoberta (20 μm D.I., 10 μm *tip* D.I.) (New Objective, Woburn, MA) foi usada com uma voltagem de vaporização de 1.8 kV, e a transferência de temperatura capilar foi mantida em 200°C. A aquisição dos dados foi controlada pelo programa de computador Xcalibur 1.4 (ThermoElectron Corp).

O espectrômetro de massa foi operado no modo dependente de dados para, automaticamente, alternar a aquisição de dados entre o Orbitrap-MS e o LTQ-MS/MS (MS). A análise completa do espectro MS (de m/z 350–1500) foi obtida no Orbitrap com resolução de 60.000 a m/z 400 (após acumulação de 500.000 cargas em um *ion trap* linear). Os quatro íons mais intensos (dependendo do sinal de intensidade) foram sequencialmente isolados para a fragmentação no *ion trap* linear utilizando a dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation*) por indução a um valor de 10.000 íons. Os fragmentos ionizados resultantes foram analisados no LTQ com baixa resolução. Os íons precursores já selecionados para MS/MS foram dinamicamente excluídos por 60 segundos. De um modo geral, as condições de MS foram: voltagem da eletrovaporização de 1.8 kV; nenhum uso de fluxo de gás auxiliar, temperatura do tubo de transferência do íon de 200°C; energia de colisão normalizada de 35% para MS2. O limiar para seleção do íon foi de 500 contagens para MS2.

2.11.1 Identificação de proteínas por buscas em bancos de dados do Mascot

O espectro MS/MS foi confrontado com um banco de dados MSDB (atualizado em 15 de Maio de 2005; contendo 2.011.425 entradas de seqüências de proteínas) pelo programa Mascot v. 2.1 (Matrix Science Ltd., London, UK) instalado em servidores locais no Laboratório. A tolerância da massa para o precursor e os fragmentos de íons foi 10ppm e 0.8 Da, respectivamente; perfil do instrumento: ESI-Trap; modificação fixa de carbamidometilação (cisteína); modificação variável de oxidação (metionina). Onde especificado, as buscas foram realizadas contra um subconjunto de proteínas em Viridiplantae (Plantas Verdes).

2.11.2 Sequenciamento *de novo* de peptídeo e buscas no MS BLAST.

Quando especificado, arquivos no formato *dta* foram convertidos ao formato Mascot genérico (*mgf*) e seqüenciados *de novo* por uma versão modificada do programa PepNovo (Frank & Pevzner, 2005). Enquanto o espectro era interpretado, PepNovo foi ajustado para produzir até sete seqüências candidatas parcialmente redundantes e também assinalou um escore de qualidade, o qual reflete número esperado de resíduos de aminoácidos determinados com confiança na proposta de seqüência mais acurada. Este escore foi derivado da soma das probabilidades dos aminoácidos individuais estarem corretos, os quais foram computados utilizando-se um modelo de regressão logística previamente descrito (Frank *et al.*, 2005). As seqüências candidatas foram editadas de acordo com as convenções MS BLAST e agregadas em uma única busca em uma ordem arbitrária como descrito previamente (Habermann *et al.*, 2004; Shevchenko *et al.*, 2003). As buscas no MS BLAST foram realizadas contra bancos de dados não redundantes depositados em <http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast/> sob os seguintes parâmetros: *Scoring Table*: 99; *Filter*: none; *Expect*: 1000. A significância estatística dos *hits* foi avaliada de acordo com o escore fornecido pelo MS BLAST.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Adequação do protocolo de extração de material vegetal.

Inicialmente, a extração das proteínas de *O. catharinensis* seguiu o protocolo descrito por Silveira *et al.* (2004), que utilizava tampão fosfato como solvente. Um gel bidimensional resultante dessas extrações está mostrado na Figura 17. A figura mostra que tal método de extração produziu mapas bidimensionais de proteínas solúveis em tampão fosfato sub-representando proteínas hidrofóbicas, como as de membrana, entre outras. Concluiu-se que este método não era o adequado para a análise proteômica proposta, pois excluía uma parte significativa das proteínas presentes no material vegetal. Outra dificuldade que este protocolo apresentou foi a de não eliminar uma quantidade significativa de componentes não protéicos, os quais dificultavam a visualização dos *spots* e interferiam na dosagem de proteína total, além de não prevenir totalmente degradações proteolíticas. Optamos, então, por usar um método baseado no protocolo de Imin *et al.* (2001), o qual foi desenvolvido para tecidos vegetais e envolve etapas de precipitação de proteínas com TCA/acetona e re-suspensão em tampão de amostra de eletroforese bidimensional. Os resultados mostraram um perfil protéico mais completo já que houve um aumento significativo do número de *spots* detectados e também a menor presença de interferentes provenientes do metabolismo secundário vegetal (Figura 17).

3.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína em cada estágio embrionário e também nos agregados celulares foi realizada utilizando-se o *Plus One 2D QuantKit* (Amersham Pharmacia) tendo a albumina sérica bovina como padrão (Tabela 1). A concentração de proteínas não apresentou aumento ao longo dos estágios embrionários, apresentando-se no estágio mais precoce relativamente alta, caindo no estágio cotiledonar e crescendo moderadamente no estágio de embrião maduro. Uma vez que foi utilizada a mesma relação tecido/volume na extração, estes valores podem ser explicados pelo maior grau de hidratação que os estágios cotiledonar inicial

e intermediário possuíam em relação ao globular e maduro. O estágio de embrião maduro já estava mais desidratado se comparado aos estágios cotiledonares.

Quanto aos agregados celulares, observou-se que os extratos dos diferentes meios de cultura apresentaram valores próximos de concentração de proteínas.

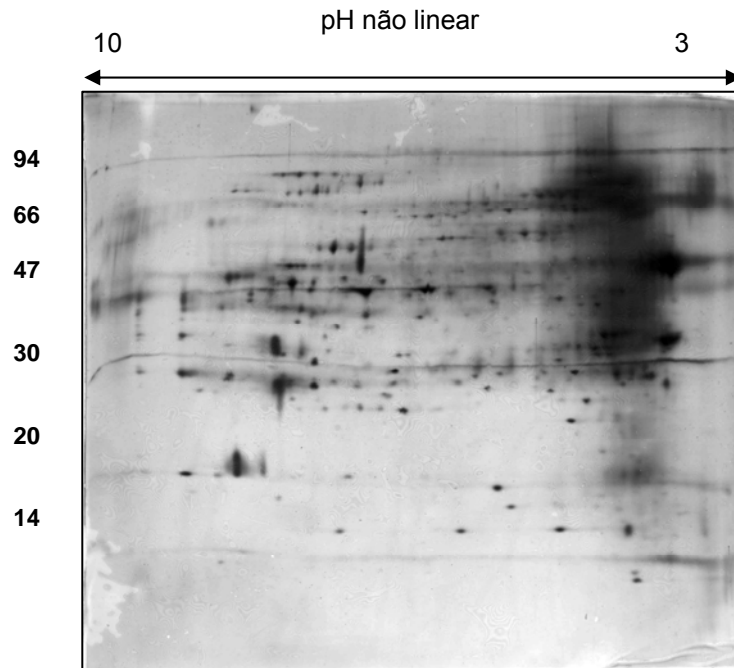


Figura 17. Perfil bidimensional de proteínas de *O. catharinensis* extraídas com tampão fosfato (Silveira *et al.*, 2004). Focalização isoelétrica usou gel de IPG de pH 3-10 não linear, 200 μ g de proteína e a segunda dimensão usou gel de gradiente de poliacrilamida de 8-15% T. Coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

Tabela 1. Dosagem de proteínas dos extratos de estágios embriogênicos e agregados celulares de *Ocotea catharinensis*.

Estágios / Agregados celulares	Concentração de Proteína (mg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
E1	2,533	0,020	3,93
E2	1,480	0,004	0,59
E3	1,099	0,001	0,12
E4	1,428	0,009	1,52
MS	2,630	0,014	3,83
MS + 2,4-D	2,837	0,025	7,34
WPM	2,325	0,020	5,11

Método: PlusOne 2D Quant Kit. Albumina sérica bovina como padrão.

Extração: 50 uL de tampão / mg de *pellet*.

E1: globular, E2: cotiledonar inicial, E3: cotiledonar intermediário, E4: embrião maduro, MS-2,4-D: meio de cultura MS desprovido de 2,4-D, MS+2,4-D: meio de cultura suplementado com 2,4-D, WPM: meio de cultura WPM.

3.3 Eletroforese unidimensional

Primeiramente, realizou-se um teste para avaliar se um procedimento de precipitação com TCA/acetona da amostra já extraída de acordo com Imin et al. (2001) iria auxiliar ainda mais na retirada de interferentes presentes na amostra. Vimos que houve diminuição geral da quantidade de proteína, especialmente para E2, principalmente as de baixa massa, e perda de algumas bandas (Figura 18 A, indicado pelos números de 1 a 4). Com esse resultado, preferiu-se aplicar a amostra diretamente do tampão de reidratação para eletroforese bidimensional (Figura 18 A, indicado pelos números de 5 a 8).

Nas análises iniciais utilizando-se a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) não foram evidenciadas diferenças qualitativas nos perfis protéicos das amostras dos diferentes estádios embrionários (Figura 18 A). No caso dos agregados celulares notam-se algumas diferenças sutis entre as amostras (Figura 18 B) que, assim como no caso dos estágios, foi necessário um aprofundamento da análise por meio da 2-DE, a qual tem o poder de resolver de uma forma muito mais eficiente cada proteína.

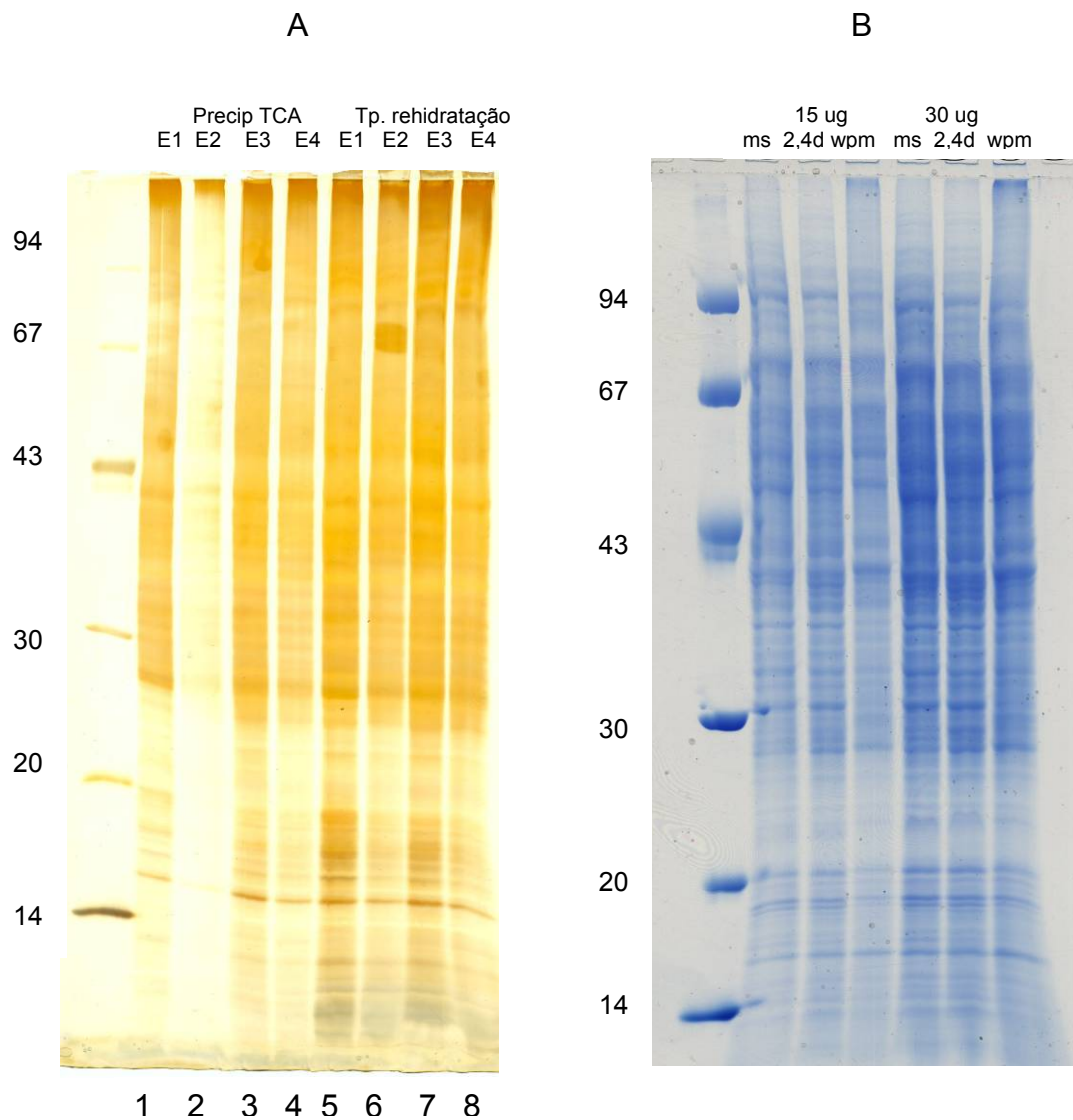


Figura 18. Perfis unidimensionais (SDS-PAGE) com gradiente de 8 a 15% T. **A)** Extratos protéicos dos estágios embrionários E1 a E4 (10 µg) com precipitação adicional em TCA e lavados com acetona (poços 1 a 4) e E1 a E4 (10 µg) retirados diretamente do estoque em tampão de reidratação (poços 5 a 8). Coloração com nitrato de prata. **B)** Extratos protéicos dos agregados celulares cultivados em meios diferentes retirados diretamente do estoque em tampão de reidratação em duas concentrações: 15 µg e 30 µg. Coloração com Coomassie Brilliant Blue coloidal.

3.4 Padronização das condições da 2-DE

O protocolo para a eletroforese bidimensional (2-DE) das amostras de embriões somáticos dos quatro estágios de desenvolvimento inicialmente utilizado foi de gradientes imobilizados de pH (IPG) na faixa de pH de 3–10 não linear. Esses apresentavam as proteínas acumuladas na sua parte ácida o que diminuía muito a resolução de *spots* específicos dessa região e dificultava a análise (Figura 16). Assim sendo, optou-se pelo uso de géis de IPG na faixa de pH 4-7. Esta faixa de pH mais estreita permitiu uma maior resolução de *spots* correspondendo a polipeptídeos com *pI* entre 4 e 7 e conseqüentemente um melhor perfil bidimensional.

Várias concentrações de acrilamida nos géis bidimensionais foram testadas (dados não mostrados), sendo que 12% de acrilamida foi a mais satisfatória, por se mostrar mais reprodutível do que as demais e a utilização de gradiente.

A coloração dos géis bidimensionais com Coomassie Brilliant Blue coloidal foi testada e não se mostrou tão sensível quanto à coloração com nitrato de prata (dados não mostrados). Por esta razão utilizou-se somente a coloração com nitrato de prata de acordo com Blum *et al.*, (1987), com algumas adaptações.

3.5. Comparação dos perfis bidimensionais dos estágios de desenvolvimento da embriogênese somática

A análise visual dos géis unidimensionais não apresentou diferenças qualitativas entre os estádios embrionários (Figura 18). Isto se deve à complexidade do perfil protéico da amostra e à relativa baixa resolução da eletroforese unidimensional. Nos géis 2-DE as diferenças entre os estágios também não foram facilmente visualizadas necessitando-se de um programa computacional específico para a análise dos géis, *Image Master 2D v.5* (GE Healthcare), que calculou a massa molecular (MM), o ponto isoelétrico (*pI*) aproximado, volume e o número de *spots* e o pareamento destes *spots* em géis submetidos à comparação. A Figura 20 exemplifica a análise computacional de

alguns dos *spots* diferencialmente expressos. Nos géis a 12% T, a contagem e o número de *spots* referem-se aos *spots* de massa molecular abaixo de aproximadamente 50kDa porque alguns *spots* de alta MM, por serem muito intensos e mal resolvidos, não puderam ser considerados na análise computacional de imagens.

Assim, ao número de *spots* detectados nos géis dos diferentes estágios foram: 436 para E1, 456 para E2, 446 para E3 e 488 para E4. Os *spots* que foram detectados apresentando uma diferença de volume de pelo menos três vezes foram assinalados como diferencialmente expressos e totalizaram 16 *spots* (Figura 19). Alguns destes *spots* foram submetidos à identificação por espectrometria de massa.

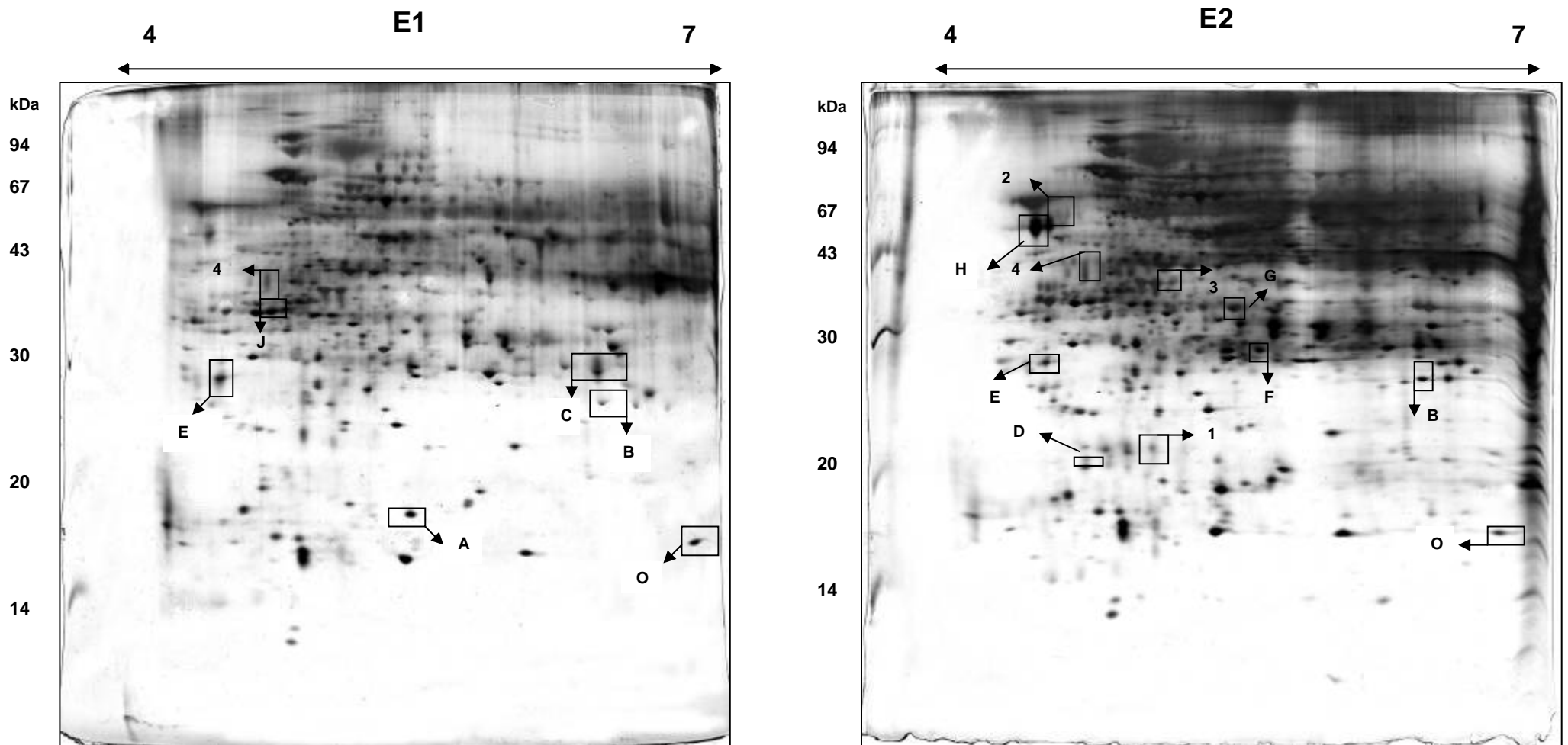


Figura 19. Mapas proteômicos bidimensionais de *O. catharinensis* ao longo do desenvolvimento embrionário. A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 4 a 7 e para a segunda dimensão os géis foram feitos a 12% T, utilizou-se 250 µg de amostra. Coloração com nitrato de prata. E1) Globular; E2) Cotiledonar inicial. As caixas evidenciam os spots diferencialmente expressos que foram submetidos à espectrometria de massa.

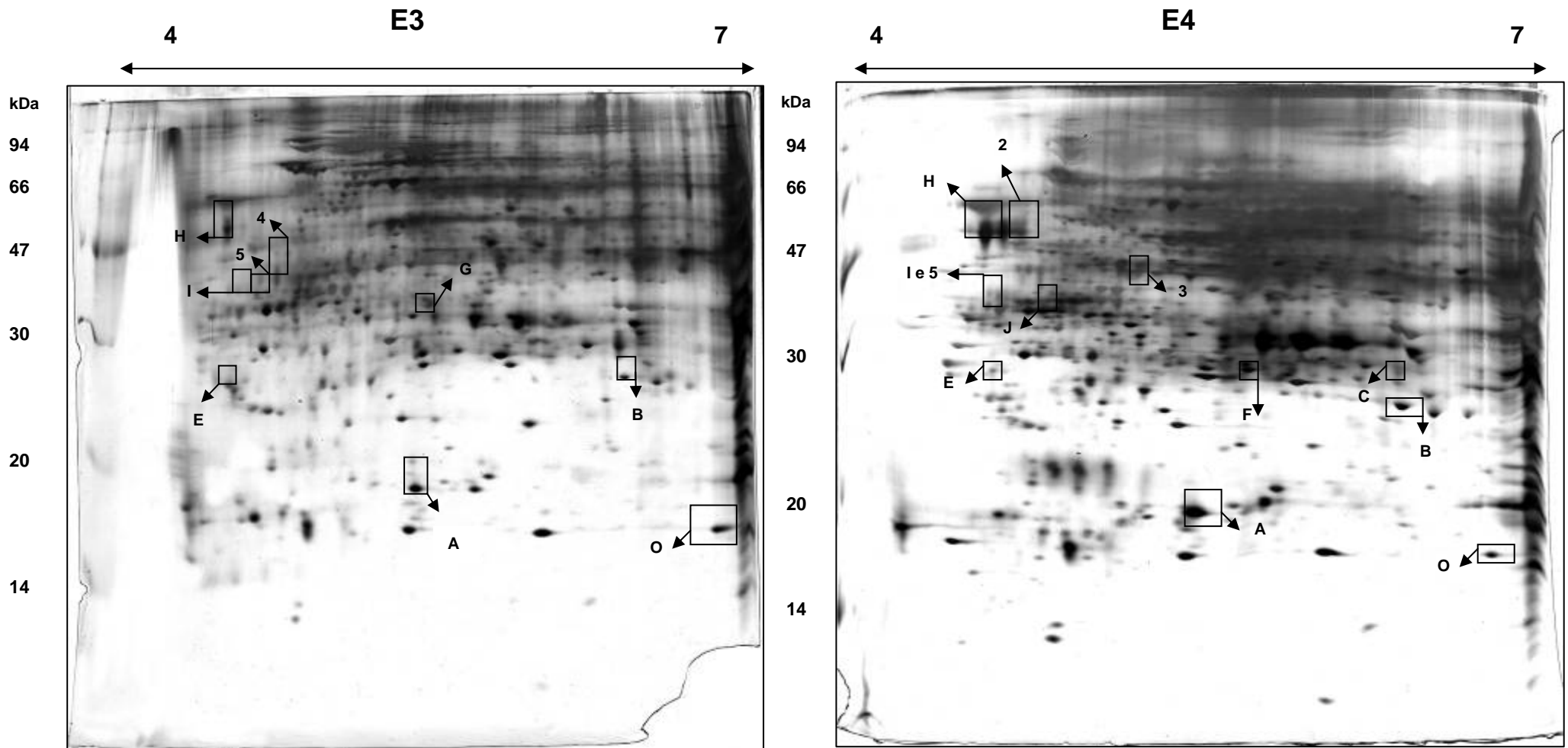


Figura 19. Mapas proteômicos bidimensionais de *O. catharinensis* ao longo do desenvolvimento embrionário. A focalização isoelétrica foi realizada com IPGs de pH 4-7 e a segunda dimensão os géis foram feitos a 12%T, e 250 µg de amostra. Coloração com nitrato de prata. E3) Cotiledonar intermediário e E4) Embrião maduro. As caixas evidenciam os *spots* diferencialmente expressos que foram submetidos à espectrometria de massa.

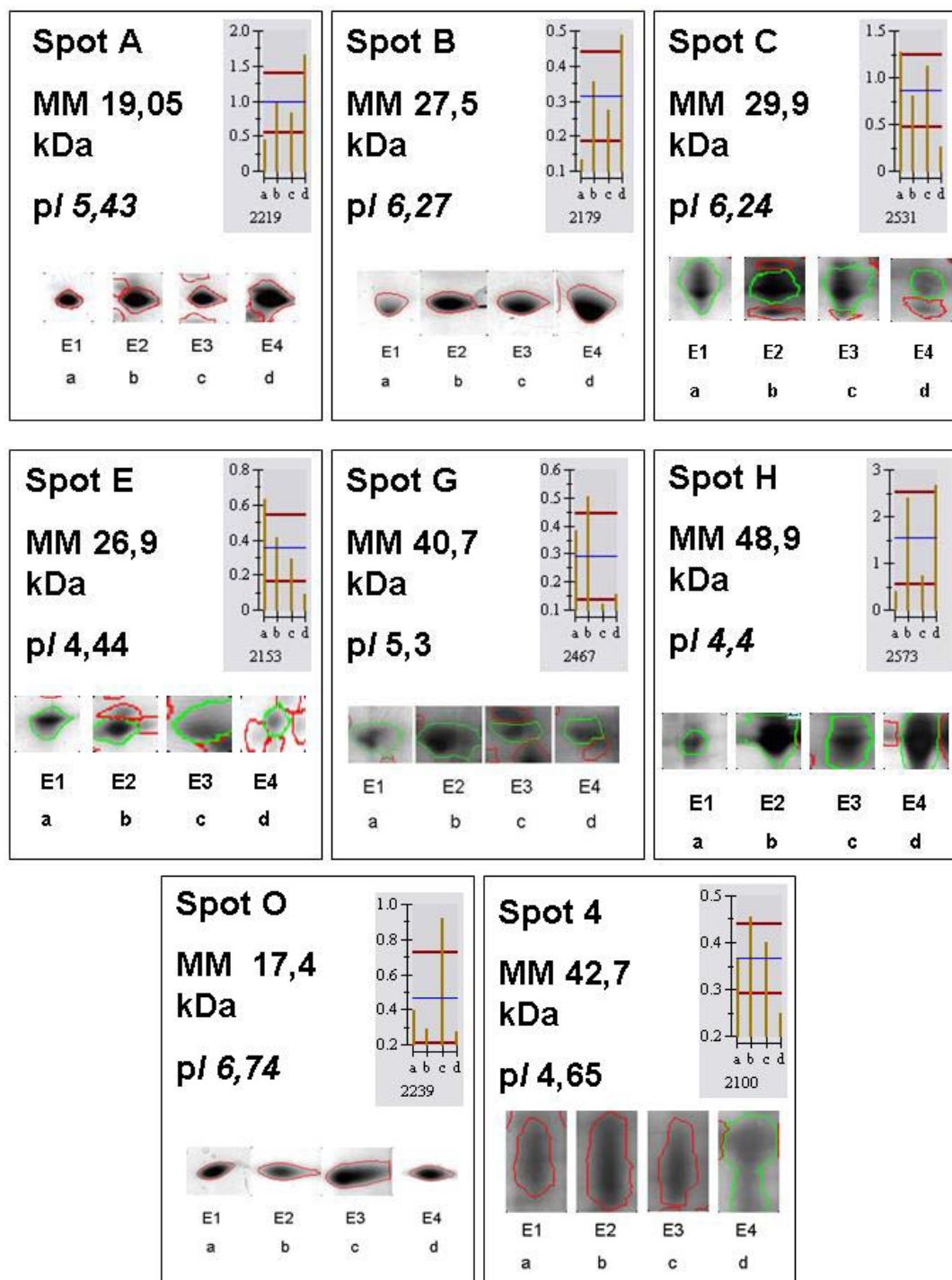


Figura 20. Resultado da análise computacional de alguns spots diferencialmente expressos nos estágios embrionários de *O. catharinensis*. Resultados obtidos utilizando-se o programa *Image Master 2D Platinum v.5* (GE Healthcare). Nos gráficos as barras vermelhas indicam o desvio padrão da média das intensidades dos volumes e a azul indica a média aritmética.

3.5.1 Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos estágios embrionários

Vários *spots* de interesse selecionados a partir dos perfis bidimensionais de *O. catharinensis* (Figura 19) foram submetidos à técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF) usando espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF sem resultados positivos. Como o PMF é baseado nos valores exatos das massas de peptídeos gerados por uma digestão química ou enzimática da amostra, é imprescindível que a seqüência da proteína ou de seu gene esteja disponibilizada em bancos de dados. Atualmente não existem seqüências de proteínas de *O. catharinensis* nos bancos de dados disponíveis, inviabilizando as análises por PMF, o que já era previsto. Já foram relatados casos, porém, de identificação por PMF de proteínas cuja seqüência não estava depositada em banco de dados, baseada em seqüências altamente homólogas de outros organismos (Paba *et al.*, 2004). No caso do presente projeto tornou-se necessária a obtenção de seqüências *de novo* por espectrometria de massa para a identificação dos *spots*.

A falta de identificação de proteínas por *peptide mass fingerprinting* (PMF) levou-nos a buscar alternativas para as identificações e conclusão dos mapas proteômicos comparativos entre os estágios embrionários e agregados celulares. Assim, em colaboração com Dr. Andrej Shevchenko do *Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics*, Dresden, Alemanha, os peptídeos provenientes dos digestos trípticos dos *spots* foram seqüenciados usando nano LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap).

Em relação aos *spots* dos estágios embrionários escolhidos para análise por MS, somente os *spots* **C** e **H** foram submetidos à espectrometria de massa tipo LC-MS/MS (LTQ-Orbitrap) e identificados. Os demais foram submetidos à MALDI-TOF e não foram identificados.

O *spot* **C** (Figura 19 e Tabela 2) foi mais expresso nos estágios E1 e E3 em comparação com os estágios E2 e E4, decaindo nesse último ao seu mais baixo volume. Esse *spot* foi identificado como uma proteína **germina**. As germinas podem ser expressas constitutivamente ou induzidas por estresse biótico ou abiótico.

Germinas e proteínas semelhantes às germinas (GLPs) são uma classe de glicoproteínas reguladas ao longo do desenvolvimento vegetal,

caracterizadas por um núcleo em forma de barril, um peptídeo sinal, associado com a parede celular ou com a matriz extracelular. Estão presentes em fungos mixomicetos, briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (Schweizer *et al.*, 1999). Essas proteínas possuem extrema estabilidade térmica e estão envolvidas na resposta das plantas a vários patógenos e na defesa vegetal contra estresse biótico e abiótico, incluindo a exposição ao calor, sais, submersão e toxicidade ao alumínio (Woo *et al.*, 2000). Segundo Schweizer *et al.* (1999), possuem também papel significativo durante a embriogênese zigótica e somática não se conhecendo ainda os mecanismos em que estão envolvidas.

De acordo com Lane *et al.* (1993), a germina é um marcador da fase inicial de desenvolvimento no trigo e também em outros cereais como cevada, arroz e aveia. Uma das funções que as germinas teriam no desenvolvimento do embrião e germinação seria combater a alta concentração de H_2O_2 originado do oxalato que pode promover a remodelagem dos tecidos mediada pelos peroxissomos (Lane *et al.*, 1993).

A estrutura da germina de cevada, determinada com resolução 1.6 Å, está mostrada na Figura 21 (Woo *et al.*, 2000). O dímero de germina é estruturalmente equivalente ao monômero de 7S das proteínas de reserva chamadas de vicilinas, indicando evolução a partir de um ancestral comum. Um único íon de manganês está ligado por monômero de germina por ligantes similares aos da superóxido dismutase de manganês (MnSOD). Germina é também conhecida por possuir atividade de superóxido dismutase e tem-se que a defesa contra radicais superóxidos extracelulares é um papel adicional importante para as germinas e proteínas relacionadas.

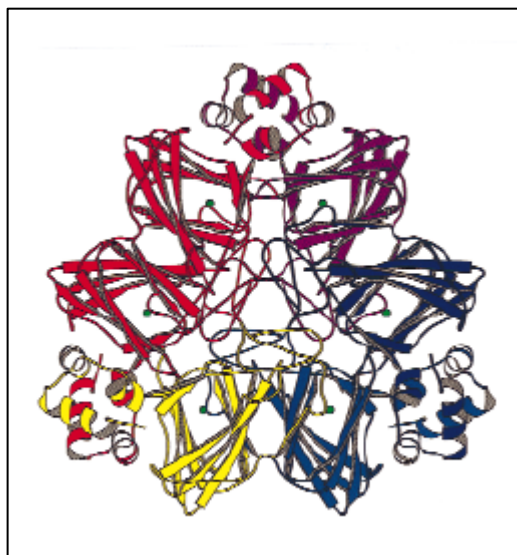


Figura 21. A arquitetura do hexâmero de germina mostrando os seus seis íons de magnésio como esferas verdes (Woo *et al.*, 2000).

Ao contrário do spot C, o *spot H* (Figura 18, 19 e Tabela 2) foi mais expresso nos estágios E2 e E4, com queda acentuada em seu volume nos estágios E1 e E3. Esse *spot* foi identificado como uma **quitinase**.

As quitinases hidrolisam as ligações glicosídicas β -1,4 da quitina e são amplamente distribuídas em vários organismos (Fukamizo, 2000). Quitinases são reguladas por uma variedade de condições de estresse, bióticas e abióticas, e por alguns fitormônios como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico (Kasprzewska, 2003). Algumas quitinases vegetais estão envolvidas na defesa contra a invasão de patógenos como os fungos que contêm parede celular de quitina (Fukamizo, 2000). Além disso, pela redução da reação de defesa da planta, quitinases proporcionam interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio ou micorrizas. Investigações recentes têm mostrado que essas enzimas estão também envolvidas em numerosos eventos fisiológicos, como os processos de desenvolvimento e crescimento (Kasprzewska, 2003).

3.6. Comparação dos perfis bidimensionais dos agregados celulares em meios distintos

Os meios de cultura utilizados possuem diferentes capacidades de tornar os agregados celulares competentes para seguirem o processo de embriogênese, sendo capazes MS+2,4-D e WPM e incapazes os agregados celulares cultivados no meio MS-2,4-D. Saliencia-se também que as composições dos meios, principalmente entre WPM e MS (com ou sem a adição de 2,4-D), são diferentes em relação à concentração salina e à presença do açúcar sorbitol. Essas duas diferenças parecem ser suficientes para causar um estresse osmótico nas células e conseqüentemente torná-las competentes embriogenicamente.

Os mapas bidimensionais produzidos a partir de amostras de agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura são mostrados na Figura 22. Os géis 2-DE apresentaram um acúmulo de proteínas de alta massa molecular dificultando a análise computacional desta região. Experimentamos géis a 10%T que resultaram em diferenças não significativas na visualização dos *spots* de alta massa molecular e também a 8%T, o que ocasionou a perda de vários *spots* de baixa massa. Decidiu-se realizar géis a 12% de acrilamida e analisar as proteínas de massa molecular abaixo de 50 kDa, aproximadamente. As amostras foram submetidas à focalização isoeétrica com *strips* de 18 centímetros e pH de 4-7 e géis a 12%T na segunda dimensão.

As imagens digitalizadas dos géis foram submetidas a processamentos computacionais utilizando-se o programa *Image Master 2D Platinum v.5* (GE Healthcare) o qual permitiu quantificar os *spots* revelados em cada gel, bem como estimar a massa molecular (MM), o ponto isoeétrico (pI) e o volume dos mesmos, sendo alguns exemplificados na Figura 25.

O número de *spots* detectados foi de 965 no gel MS-2,4-D, 997 no MS+2,4-D e 850 no WPM. Os *spots* que foram detectados apresentando uma diferença de volume de pelo menos três vezes foram assinalados como diferencialmente expressos e totalizaram 30 *spots* (Figura 22). Os meios MS-2,4-D e MS+2,4-D apresentaram-se mais homogêneos entre si do que em relação ao meio WPM. Alguns desses *spots* foram submetidos à identificação por espectrometria de massa.

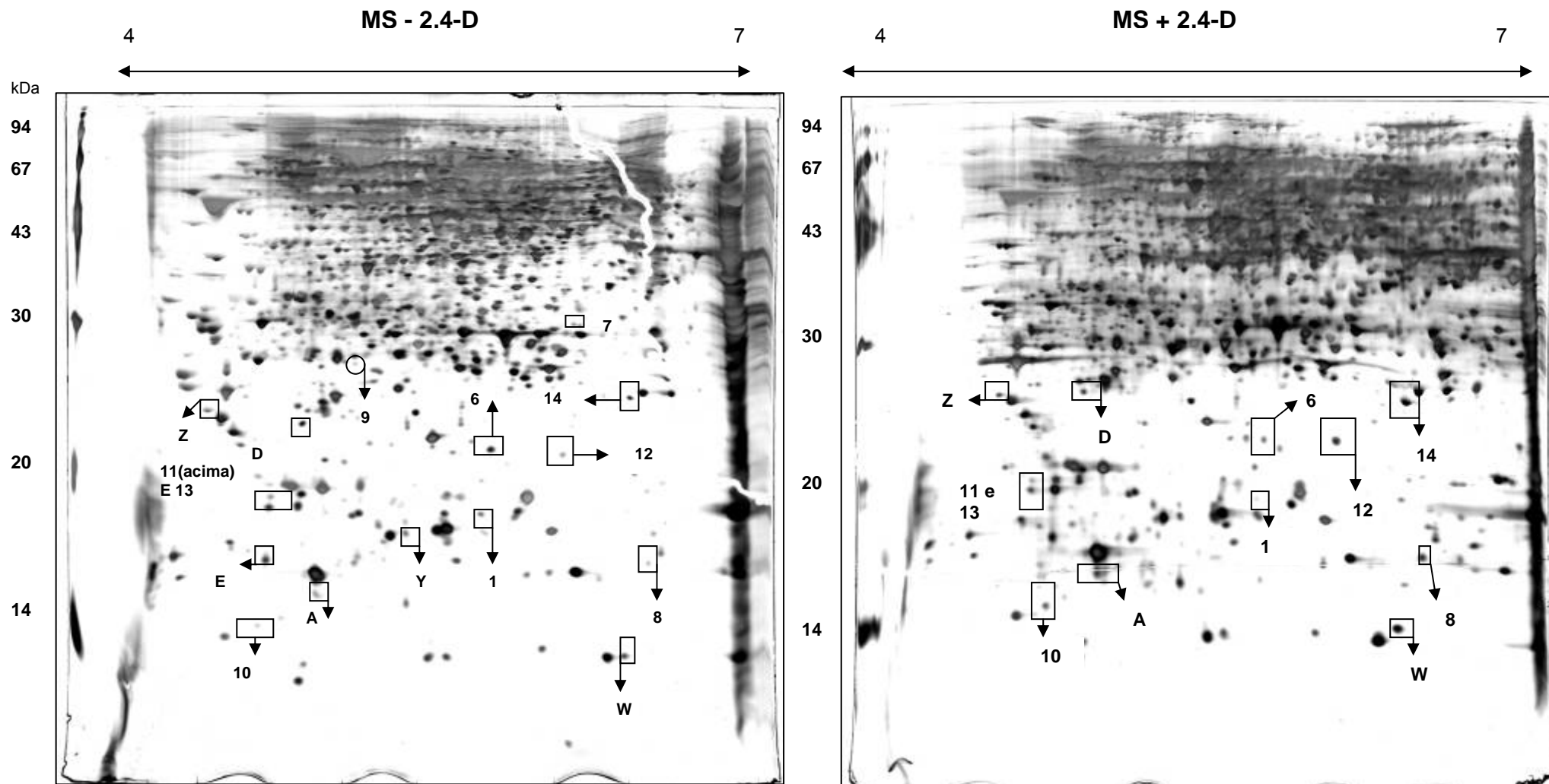


Figura 22. Mapas proteômicos bidimensionais de agregados celulares de *O. catharinensis*. A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 4-7 e na segunda dimensão os géis a 12%T. Coloração com nitrato de prata. MS-2,4-D: agregados celulares cultivados em meio MS desprovido de 2,4-D; MS+2,4-D: agregados celulares cultivados em meio MS com 2,4-D. As caixas evidenciam alguns dos *spots* diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.

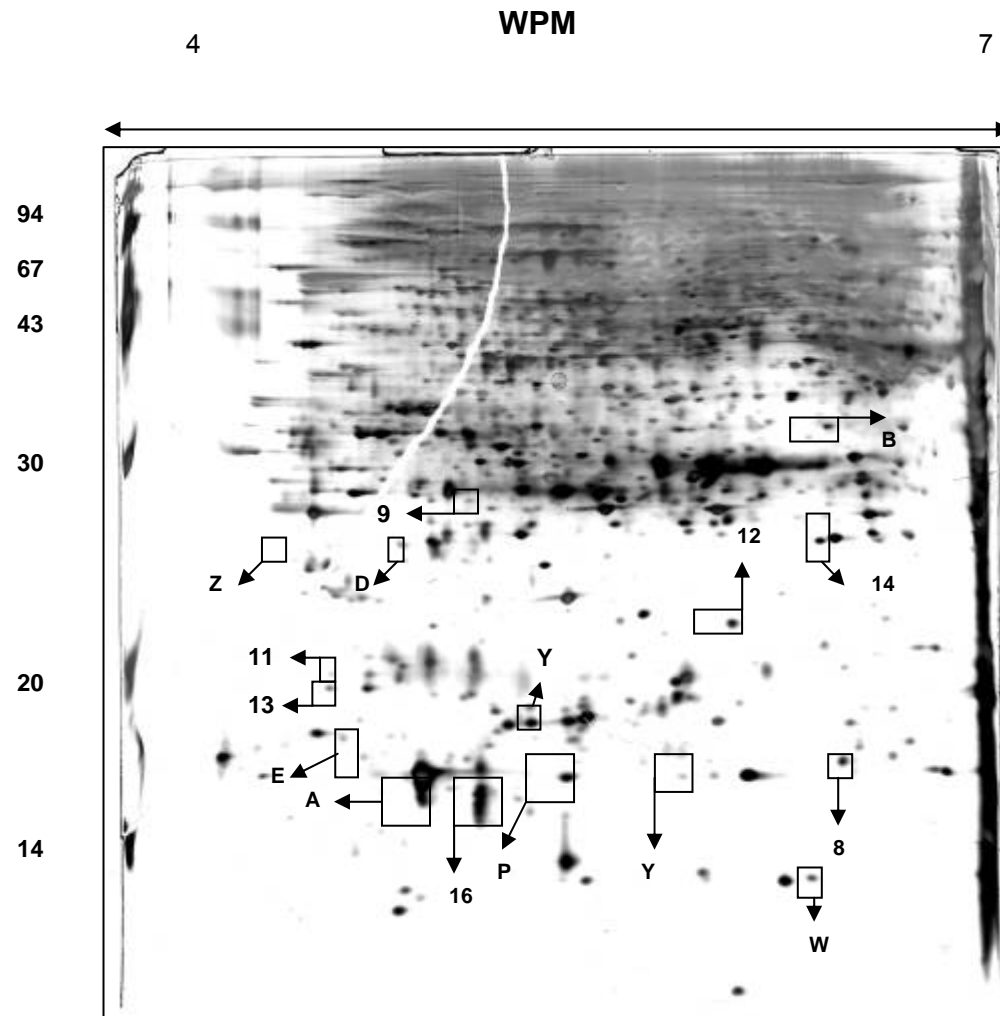


Figura 22. Mapas proteômicos bidimensionais de agregados celulares de *O. catharinensis*. A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 4-7 e na segunda dimensão os géis a 12%T. Coloração com nitrato de prata. MS-2,4-D: agregados celulares cultivados em meio MS desprovido de 2,4-D; MS+2,4-D: agregados celulares cultivados em meio MS com 2,4-D; WPM: agregados celulares cultivados em meio WPM. As caixas evidenciam alguns dos spots diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.

3.6.1 Análise dos perfis protéicos 2-DE pela técnica do gel “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados em diferentes meios de cultura

Os géis do tipo “dois-em-um” das amostras cultivadas em diferentes meios de cultura mostraram uma maior reprodutibilidade que as análises anteriores, uma vez que o método minimiza possíveis diferenças na malha do gel e outras condições da segunda dimensão além de diferenças na intensidade de coloração. Com a utilização do gel “dois-em-um” obtivemos perfis 2-DE mais confiáveis para proceder às análises de expressão. As Figuras 23 A, 23 B, 24 A e 24 B mostram os pares para comparação e a Figura 26 mostra alguns exemplos da detecção dos *spots* pelo programa computacional *Image Master 2D Platinum v.5* (GE Healthcare). Os *spots* que foram detectados apresentando uma diferença de volume de pelo menos três vezes foram assinalados como diferencialmente expressos nos géis MS-2,4-D *versus* MS+2,4-D e totalizaram 8 (Figura 23 A e B). Nos géis MS-2,4-D *versus* WPM os *spots* diferenciais detectados foram 6 (Figura 24 A e B). Esses *spots* foram submetidos à identificação por espectrometria de massa. Alguns resultados da comparação computacional estão mostrados na Figura 26.

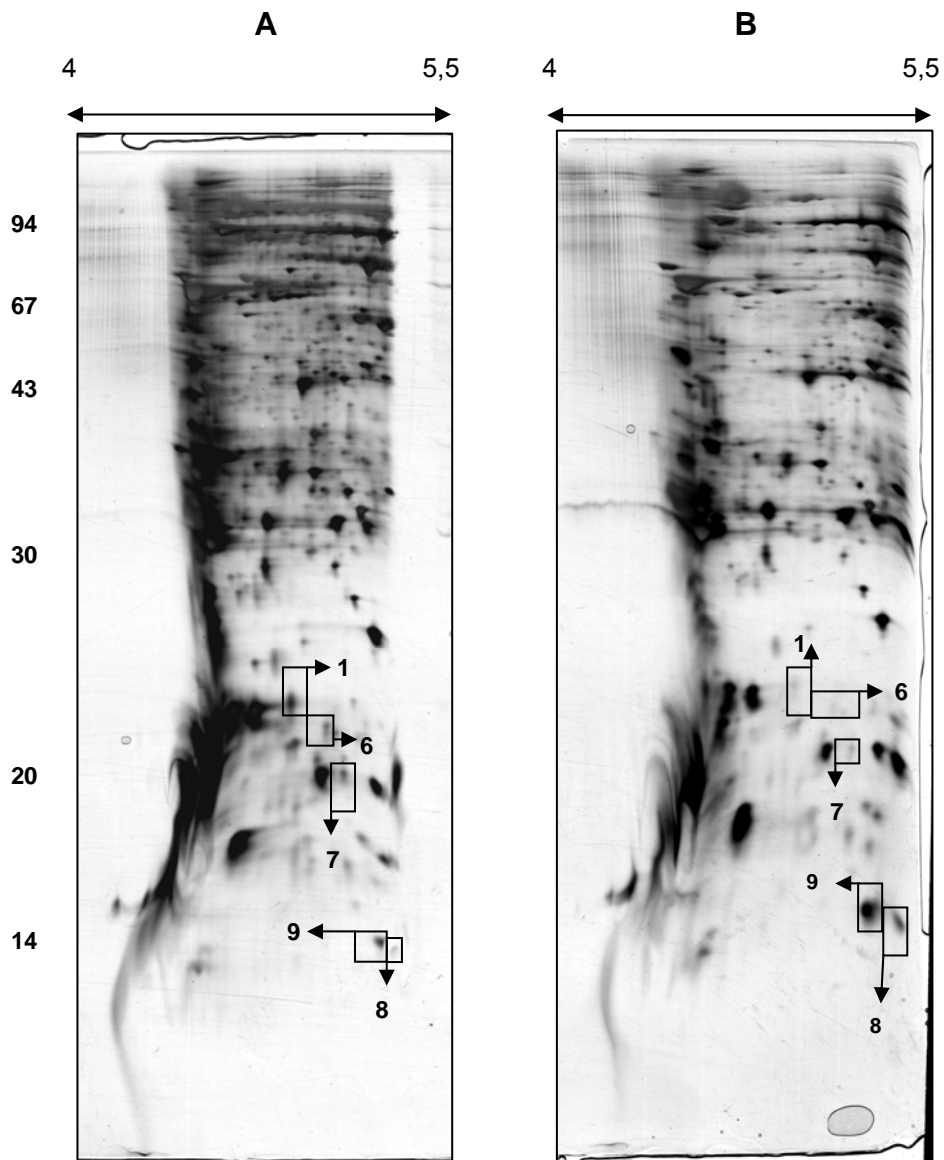


Figura 23 A. Perfis 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e MS+2,4-D. A) Faixa de pH de 4 a 5,5 da amostra MS-2,4-D, B) Faixa de pH 4 a 5,5 da amostra MS+2,4-D. Utilizaram-se *strips* pH 4-7, 150 µg de proteína, gel a 12%T. As caixas evidenciam alguns dos *spots* diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.

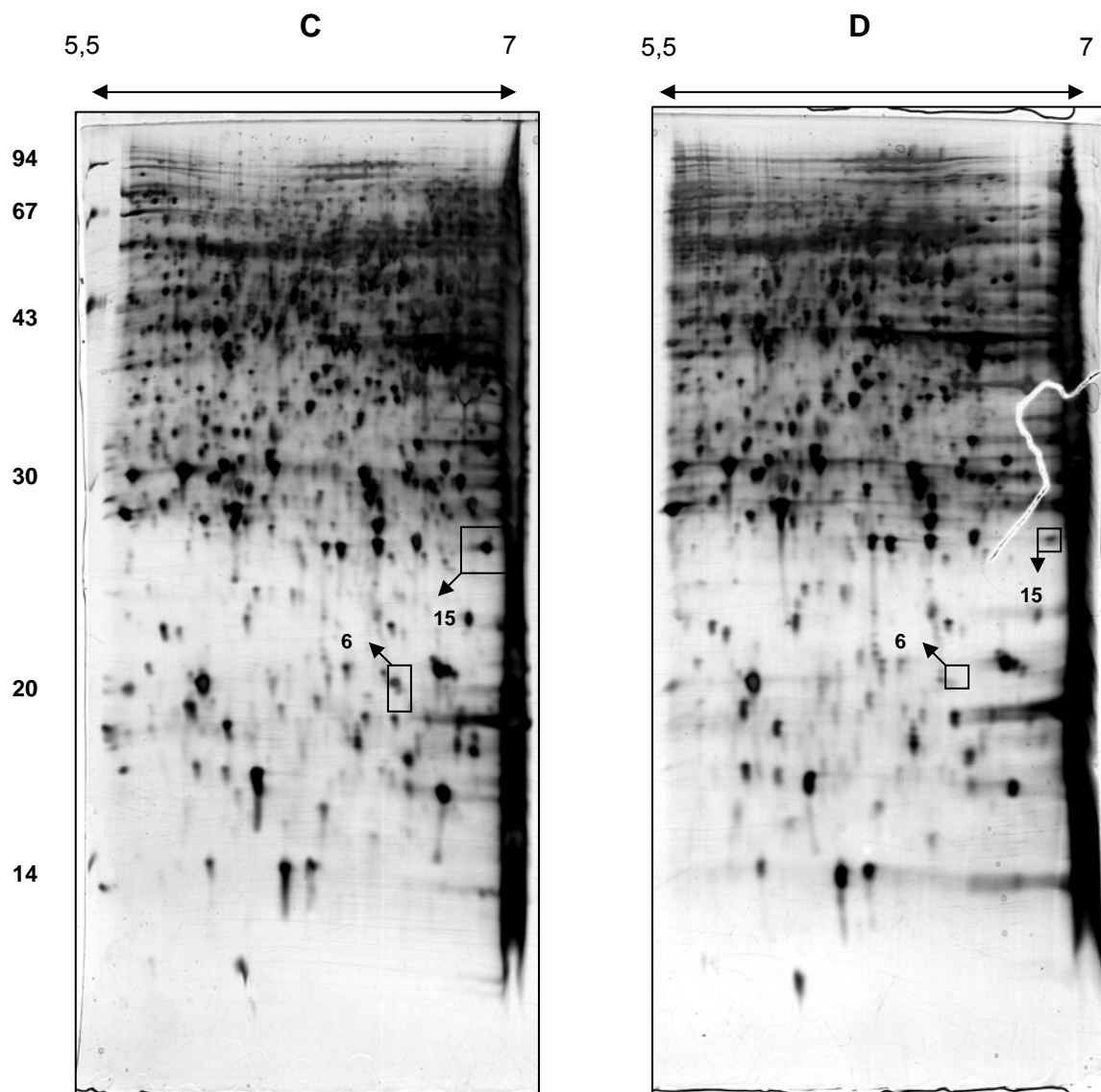


Figura 23 B. Perfis 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e MS+2,4-D. C) Faixa de pH de 5,5 a 7 da amostra MS-2,4-D e, D) Faixa de pH de 5,5 a 7 da amostra MS+2,4-D. Utilizaram-se *strips* pH 4-7, 150 μ g de proteína, gel a 12%T. As caixas evidenciam alguns dos *spots* diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.

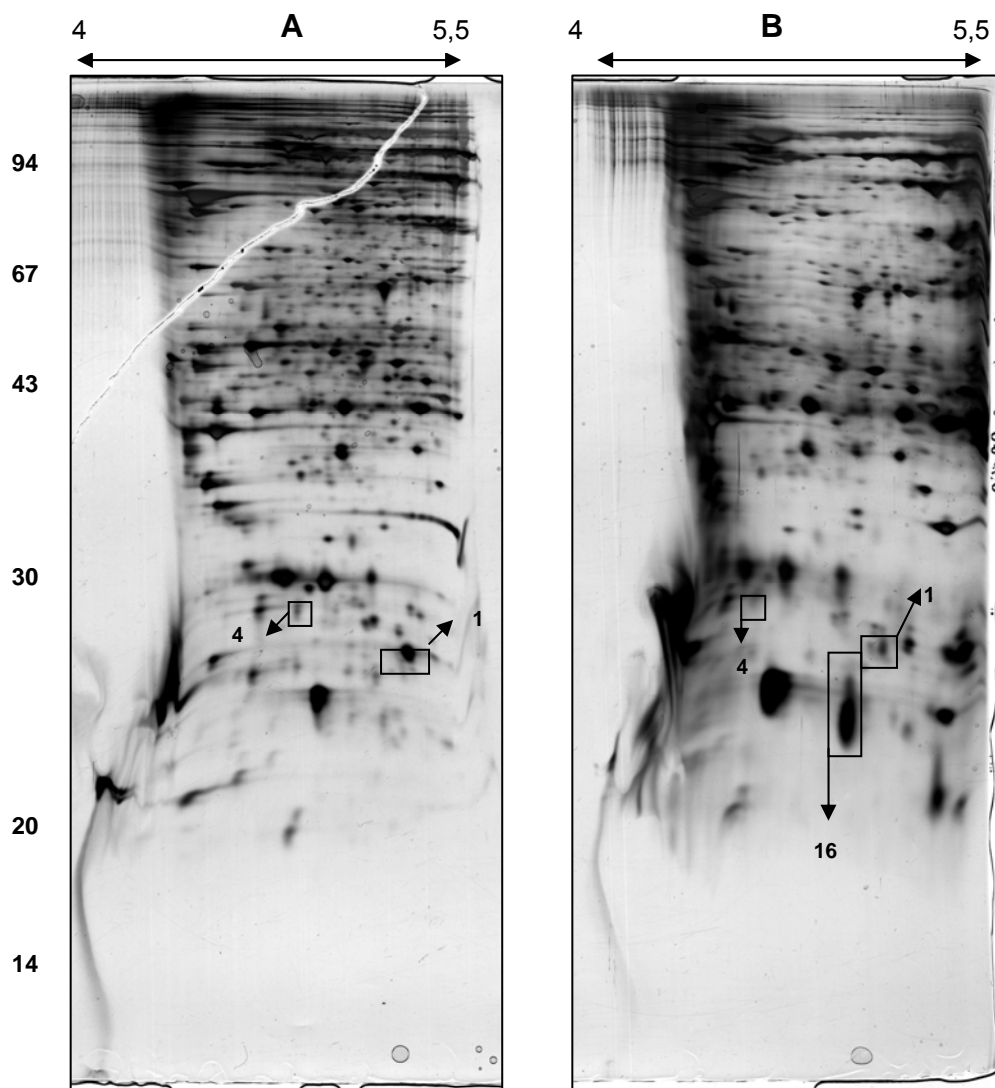


Figura 24 A. Perfis 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e WPM. A) Faixa de pH de 4 a 5,5 da amostra MS-2,4-D, B) Faixa de pH de 4 a 5,5 da amostra WPM. Utilizaram-se *strips* pH 4-7, 150 μ g de proteína, gel a 12%T. As caixas evidenciam alguns dos *spots* diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.

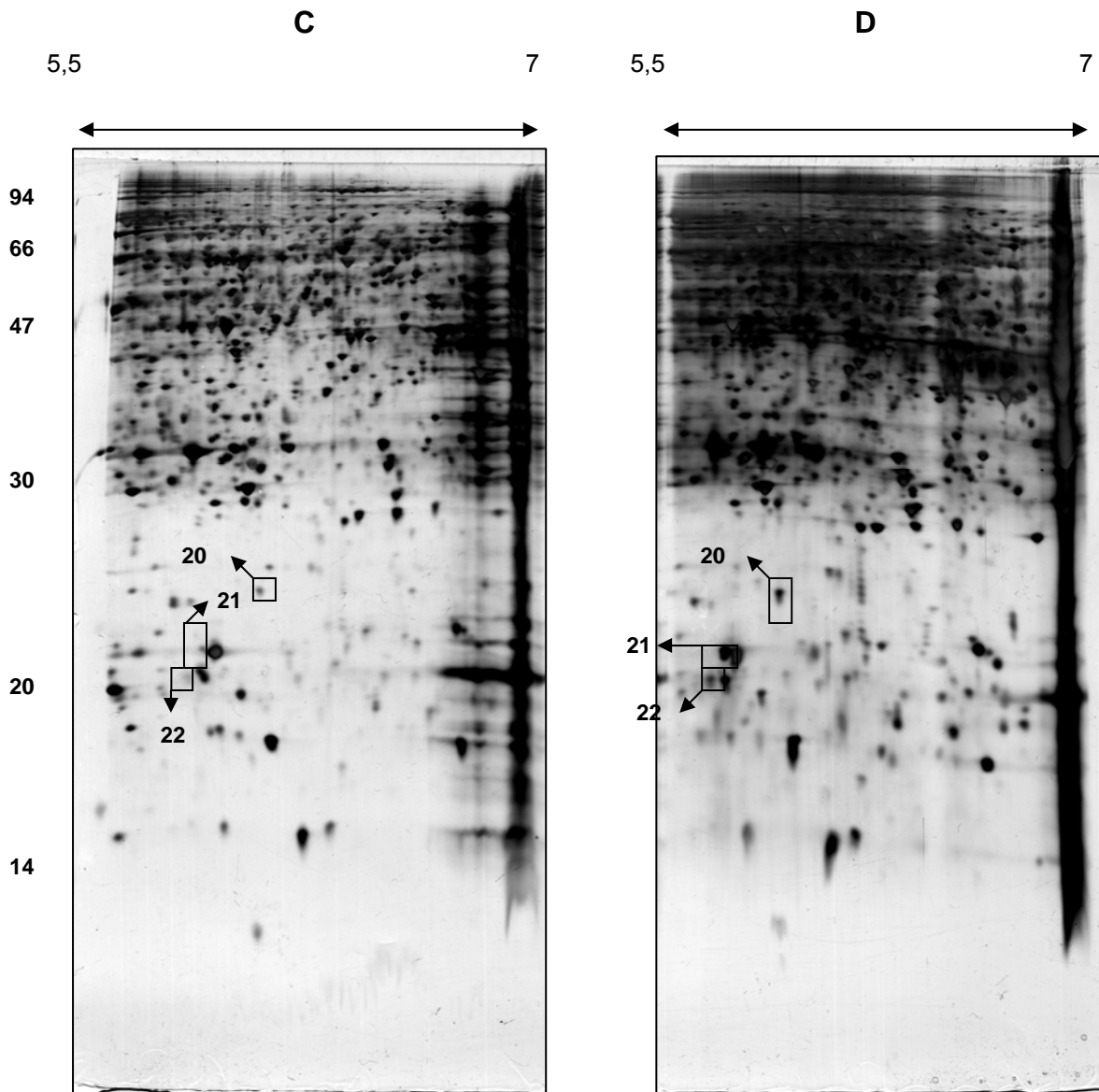


Figura 24 B. Perfis 2-DE “dois-em-um” dos agregados celulares cultivados nos meios MS-2,4-D e WPM. C) Faixa de pH de 5,5 da amostra MS-2,4-D e, D) Faixa de pH de 5,5 a 7 da amostra WPM. Utilizaram-se *strips* pH 4-7, 150 μ g de proteína, gel a 12%T. As caixas evidenciam alguns dos *spots* diferencialmente expressos e submetidos à espectrometria de massa.



Figura 25. Resultado da análise computacional de alguns spots diferencialmente expressos nos géis 2-DE dos agregados celulares em diferentes meios de *O. catharinensis*. Resultados obtidos utilizando-se o programa *Image Master 2D Platinum v.5* (GE Healthcare). Nos gráficos as barras vermelhas indicam o desvio padrão da média das intensidades dos volumes e a azul indica a média aritmética.

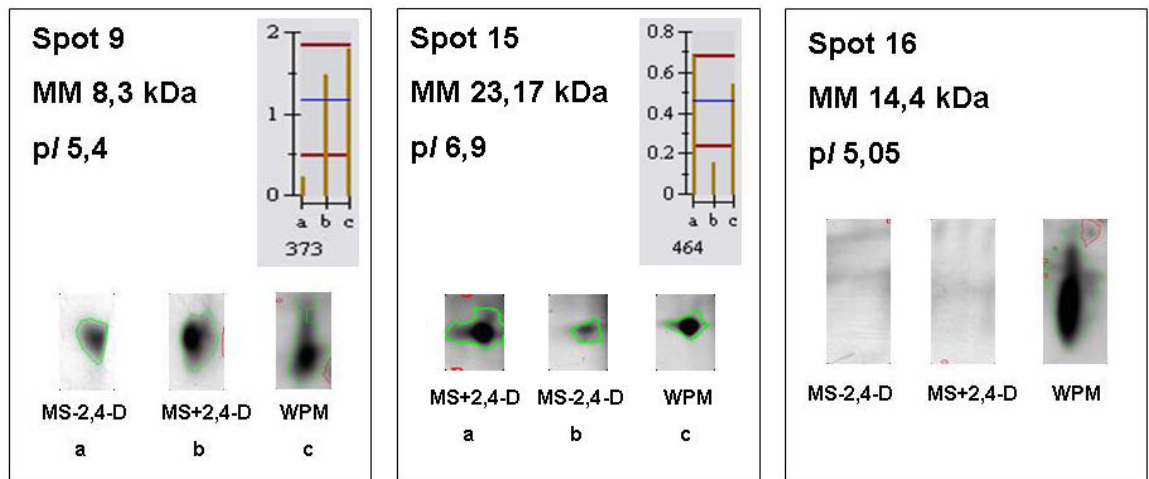


Figura 26. Resultados da análise computacional de alguns spots diferencialmente expressos referentes aos géis realizados com a técnica “dois-em-um” dos agregados celulares *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios. Resultados obtidos utilizando-se o programa *Image Master 2D Platinum v.5* (GE Healthcare). Nos gráficos as barras vermelhas indicam o desvio padrão da média das intensidades dos volumes e a azul indica a média aritmética.

3.6.2 Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos estágios embrionários e nos agregados celulares cultivados em diferentes meios.

As tabelas 2 e 3 apresentam as proteínas identificadas e suas seqüências por nano-LC MS/MS realizados em um espectrômetro LTQ-Orbitrap.

Tabela 2. Identificação dos principais *spots* diferencialmente expressos nos géis 2-DE de extratos protéicos dos estágios embrionários.

Nº/Letra do <i>spot</i> /Estágio mais expresso	Identificação	Seqüência
C E1 e E3	Germina Q6YZA9	K.AFQVDK.K K.AFQVDKK.I
H E2 e E4	Quitinase Q4PJV8	R.IGFYKR.Y K.GFYTYDAFIAAAK.A

Tabela 3. Identificação dos principais *spots* diferencialmente expressos nos géis 2-DE de extratos protéicos dos agregados celulares.

Nº/Letra do spot/Estágio ou agregado celular mais expresso	Identificação	Sequência
A MS+2,4-D e WPM	Precursor da Alfa-glicosidase Q43763	BXXLYLGLGEHTK BHSTGDLLFDTS BENYLELSSSLPADR MLGAD MVRF SSGGMD
E MS-2,4-D e MS+2,4-D	Enzima biossintética de tiamina AAV92529	K.AAHLALK.A K.ALDMNTAEDAIVR.L K.VVSSCGHDGPFVGR
P MS+2,4-D e WPM	Superóxido-dismutase [Cu-Zn] Q12548	BXXVVHGD PDDL GK
9 MS+2,4-D e WPM	Família multigênica 14-3-3 P48348; Q9SWP7	KDSTLIMQLLR BYLAE
15 MS+2,4-D e WPM	Actina citoplásmica 1 AAC16055	K.AGFAGDDAPRA R.DLTDYLMK.I R.GYSFTTTAER.E R.HQGVMVGMGQK.D K.SYELPDGQVITIGNER.F R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A
16 Exclusivo do WPM	Tiorredoxina Q6RJZ7	K.VDVDELK.T K.LVVVDFTASWCGPCR.F K.KLVVVDFTASWCGPCR.F

O *spot 15* (Figuras 23 B, 26 e Tabela 3) mostrou-se mais expresso nos meios competentes para a embriogênese: MS+2,4-D e WPM, quando comparado ao meio MS-2,4-D. O *spot* foi identificado como **actina citoplásmica 1** do organismo *Mesostigma viride*, uma alga verde unicelular pertencente à classe Carófitas.

Segundo Kandasamy *et al.*, (2004) as actinas vegetais são normalmente divididas em duas classes: as vegetativas, que são fortemente expressas em todos os órgãos vegetativos e tipos celulares; e as reprodutoras, são expressas predominantemente no pólen maduro, no óvulo e, em alguns casos, no embrião. Ambas as classes de actinas mostram diferentes padrões de expressão temporais e espaciais. Essas proteínas tomam parte em uma infinidade de processos celulares nas células vegetais quando da conversão de reações químicas em forças mecânicas como quando da reorganização do citoplasma vegetal em resposta a uma variedade de estímulos internos ou, sugerindo uma correlação direta entre a transdução de sinal e a reorganização do citoesqueleto nas plantas (Vantard, 2002). Estudos recentes em plantas revelaram que os hormônios, como auxina e ABA, e sinalizadores como Ca^{2+} e cAMP disparam cascatas sinalizadoras usando a actina como um efetor.

Além disso, as pequenas proteínas ligantes de GTP da família Rho (conhecidas como Rop em plantas) parecem ser um dos controladores típicos regulados pela actina (Vantard, 2002). Outros estudos também sugerem que a dinâmica da actina está envolvida em vários tipos de alongamento celular provocados pela morfogênese. Plantas que não possuem filamentos de actina podem se desenvolver anormalmente e apresentarem nanismo (Mathur, 2004).

Esses dados podem se relacionar a maior expressão da actina nos géis dos agregados celulares de *O. catharinensis* que são competentes para a embriogênese, como o meio MS+2,4-D que possui a presença da auxina sintética 2,4-D e o WPM com o sorbitol e o estresse osmótico.

O *spot A* (Figuras 22, 25 e Tabela 3) também possui maior expressão nos meios competentes embriogenicamente: WPM e MS+2,4-D. Esse *spot* foi identificado como **precursor da α -glicosidase** (EC 3.2.1.20). As α -glicosidases ocorrem em todas as células eucarióticas e estão envolvidas na N-glicosilação das proteínas.

Glicoproteínas que possuem asparagina ligada (N-ligadas) ocorrem em todas as células eucarióticas. A N-glicosilação pode modificar propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas como conformação, degradação, distribuição intracelular ou secreção. Em plantas, o papel da N-glicosilação é essencial, porque todas as proteínas de reserva são sintetizadas inicialmente no retículo endoplasmático e várias delas são N-glicosiladas.

Em estudos dos alelos mutantes de *A. thaliana gsc-1* e *gsc-2* que codificam α -glicosidases, Boisson *et al.* (2001) observaram a formação de sementes subdesenvolvidas bloqueadas no estágio de desenvolvimento cordiforme. As sementes mutantes tinham baixo nível de proteínas de reserva, não possuíam corpos protéicos típicos, possuíam as células alongadas anormalmente e mostraram rompimento ocasional. Análises bioquímicas confirmaram que a ligação do glicosil ligado ao α -1,2 constitutivo dos N-glicanos está bloqueada nestes mutantes. Estes resultados demonstram a importância da síntese correta das N-glicanas para a acumulação das proteínas de estoque, formação dos corpos protéicos, diferenciação celular e desenvolvimento do embrião.

O *spot 9* (Figuras 23 A, 26 e Tabela 3) mostrou-se mais expresso nos meios MS+2,4-D e WPM do que no meio MS-2,4-D e foi identificado como membro da **família multigênica 14-3-3** de *A. thaliana* com envolvimento na transdução de sinal.

Até pouco tempo atrás, o foco da pesquisa da transdução de sinal estava nas cascatas e nas quinases que propagam o processo de sinalização, acreditando-se que a fosforilação da proteína alvo por elas seria suficiente para causar a mudança no seu estado de atividade. Em várias circunstâncias exemplificadas em estudos em plantas com a enzima nitrato redutase (Huber *et al.*, 1996), concluiu-se que somente a fosforilação não era suficiente para causar uma transição na atividade de algumas proteínas-alvo e que proteínas específicas adicionais eram requeridas para completar a alteração na atividade dos alvos induzida pela transdução de sinal.

Agora é sabido que as proteínas 14-3-3 servem a este papel completando a alteração na atividade da proteína alvo induzida por um sinal multiplexado (Figura 27). As 14-3-3 parecem ser de ampla distribuição, mas são essencialmente uma família eucariótica de proteínas, e agora consideradas uma parte integrante da transdução de sinal (Ferl, 2004).

Além disso, existe o fato de que as quinases e fosfatases podem ser reguladas pelas 14-3-3 e também potencialmente as integram em vários níveis da transdução de sinal. O resultado final é um complexo de contingências e possibilidades de sinalização fazendo-se possível pela interação com as proteínas 14-3-3.

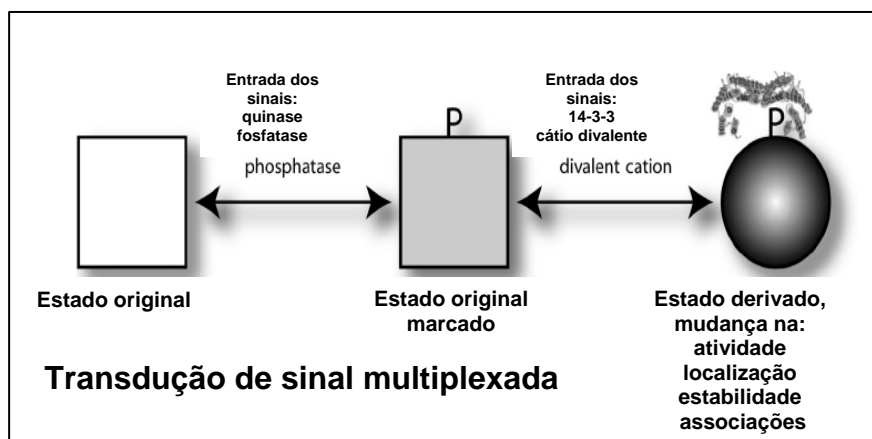


Figura 27. A transdução multiplexada de sinal é altamente regulada por um processo de dois passos envolvendo as proteínas 14-3-3. Primeiramente, o sinal é recebido e transmitido pelas quinases e fosfatases envolvidas na fosforilação da proteína-alvo, muitas vezes somente marcando a proteína para uma mudança potencial de atividade, da sua localização subcelular ou estabilidade.

O *spot E* (Figuras 22, 25 e Tabela 3) foi mais expresso nos meios MS-2,4-D e MS+2,4-D do que no meio WPM. Esse *spot* foi identificado como **enzima biossintética da tiamina**.

Tiamina ou vitamina B-1, é um constituinte essencial de todas as células por ser um cofator para dois complexos enzimáticos envolvidos no ciclo do ácido cítrico: piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. Tiamina é sintetizada pelas plantas, mas é um requerimento dietético para os animais. A via biossintética da tiamina nas plantas ainda não está bem definida e nenhuma das enzimas envolvidas foi ainda isolada.

Segundo Settembre *et al.* (2003), a síntese da tiamina é estreitamente regulada nas plantas. Estudos têm demonstrado que a expressão dos genes que codificam algumas enzimas biossintéticas da tiamina é regulada pelos níveis endógenos de tiamina.

Não foi encontrada na literatura nenhuma relação direta entre a tiamina e o desenvolvimento vegetal. Pelos níveis de expressão do *spot E* vê-se que a maior expressão da tiamina pode estar relacionada aos componentes dos meios de cultura MS, visto que a sua expressão no meio WPM foi bem menor.

O *spot 16* (Figuras 24 A, 26 e Tabela 3) foi expresso somente no meio WPM como uma proteína de expressão específica neste meio. Esse *spot* foi identificado

como **tiorredoxina** e foi o único *spot* identificado tanto por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF (PMF) como por LC/MS-MS (LTQ-Orbitrap).

As tiorredoxinas são pequenas oxirredutases dissulfeto especializadas na redução de pontes dissulfeto de outras proteínas. Geralmente, as enzimas as quais são especificamente reduzidas reversamente por estas proteínas oscilam entre uma conformação oxidada e inativa para uma conformação reduzida e ativa (Figura 28). As tiorredoxinas possuem vários papéis na célula, incluindo a regulação redox de enzimas alvo e de fatores de transcrição. Elas também servem como doadores de hidrogênios para peroxirredoxinas, peroxidases sem ferro recentemente descobertas (Jacquot *et al.*, 2002).

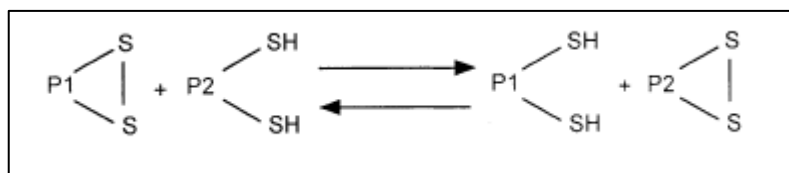


Figura 28. Representação do mecanismo de ação das tiorredoxinas, sendo P1 a tiorredoxina e P2 a enzima alvo que variam de seu estado oxidado para estado reduzido dependendo da conversão de cisteínas livres em ponte dissulfeto (Jacquot *et al.*, 2002).

As tiorredoxinas de plantas apresentam pequena massa molecular (cerca de 12 kDa), são geralmente termoestáveis e possuem por volta de 110 aminoácidos em sua forma madura (Jacquot *et al.*, 2002). Todas as tiorredoxinas possuem um sítio ativo bastante conservado com a seqüência WC[G/P]PC e no seu estado oxidado os dois átomos de enxofre dos seus resíduos de cisteína estão ligados por ponte dissulfeto. Sua estrutura 3D é conservada ao longo da evolução com uma sucessão de elementos secundários (Menchise *et al.*, 2001): β 1, α 1, β 2, α 2, β 3, α 3, β 4, β 5 e α 4 (Figura 29).

De acordo com Jacquot *et al.* (2002), as tiorredoxinas nas plantas, assim como em outros organismos, são codificadas por vários genes como, por exemplo, em *A. thaliana* que contém por volta de 20 genes para este fim. Tem-se que algumas isoformas são especificamente expressas no citosol e outras nas mitocôndrias das células vegetais.

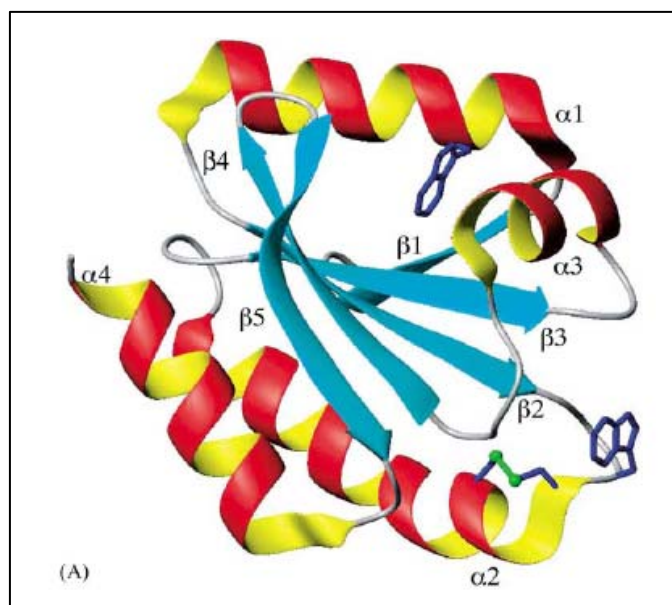


Figura 29. Estrutura cristalográfica da tiorredoxina h de *Chlamydomonas reinhardtii*. A ponte dissulfeto, sítio ativo e os átomos de enxofre são mostrados em verde. Os dois resíduos de triptofano que conferem à proteína suas características espectrais únicas são mostrados em roxo (Menchise *et al.*, 2002).

Segundo Ishiwatari *et al.* (1995), a expressão de alguns genes para tiorredoxina parece ser tecido-específica e, além disso, uma característica importante em plantas superiores é que a tiorredoxina é a principal proteína constituinte da seiva do floema, sugerindo que a proteína possua função na sinalização a longa distância. Outras funções são: desintoxicação de metais pesados, dissipação do estresse oxidativo e regulação de fatores de transcrição como nas células de mamíferos e leveduras

As tiorredoxinas dos cloroplastos servem como reguladores redox e auxiliam no controle da taxa de fixação do carbono através da via da pentose fosfato (Ishiwatari *et al.*, 1995).

Segundo Buchanan *et al.* (1994), estudos com trigo sugeriram que a tiorredoxina h estaria envolvida na germinação e agiria na redução da maioria das proteínas de reserva como as gliadinas e gluteninas, aumentando a sua suscetibilidade à proteólise e na redução das proteínas inibidoras de dissulfetos,

neutralizando as suas atividades e aumentando a função catalítica das suas enzimas alvo.

O *spot P* (Figuras 21, 24 e Tabela 2) foi mais expresso somente nos meios competentes, e principalmente no meio WPM. Esse *spot* foi identificado como enzima **superóxido dismutase**.

A enzima superóxido dismutase (SOD) pertence a um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação de O_2 ; são consideradas as enzimas mais importantes contra os radicais livres e a função protetora provida pelas SOD mostram mudanças relacionadas à idade nos tecidos vegetais (Droillard *et al.*, 1990). Três classes distintas de SOD têm sido descritas baseadas no seu grupo prostético metal: Cu-Zn, Mn, ou Fe. Duas isoformas de SOD têm Cu e Zn nos seus centros catalíticos e estão localizadas nos compartimentos citoplasmáticos (CuZn-SOD ou SOD1) ou nos elementos extracelulares (EC-SOD ou SOD3) (Zelko, 2002).

A SOD de Cu-Zn é inibida por cianeto e H_2O_2 . Superóxidos dismutases com Mn, Cu e Zn têm sido encontradas em várias espécies de plantas superiores e Fe-SOD estão presentes principalmente em procariotos e foram descobertas recentemente em algumas plantas. Nas plantas, SODs têm sido localizadas principalmente na mitocôndria, peroxissomos e cloroplastos (Droillard *et al.*, 1990).

Os meios de cultura competentes para a embriogênese em *O.catharinensis* podem produzir várias espécies reativas de O_2 em seu metabolismo, o que pode explicar, a presença dessas enzimas nesses meios.

4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A embriogênese é um processo complexo que envolve a regulação gênica sequencial e interativa (Dodeman *et al.*, 1997). Os eventos que cercam a embriogênese zigótica e somática têm sido estudados através de análises histológicas e morfológicas, sendo que a formação do embrião zigótico e somático tem sido descrita detalhadamente. Entretanto, os mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam a diferenciação dos vários tipos celulares ainda não estão elucidados (Dodeman *et al.*, 1997).

A análise computacional de géis bidimensionais de extratos protéicos de *O. catharinensis* revelou que a maioria das proteínas detectadas apresentou expressão conservativa ao longo do desenvolvimento embrionário sugerindo que as características que diferenciam cada estágio são provavelmente consequências da expressão diferencial de um número limitado de proteínas, talvez não detectável utilizando-se géis bidimensionais. Mas é necessário levar em consideração que apenas uma fração do proteoma total dos embriões foi extraída e outra fração desta fração foi representada nos géis-bidimensionais. Obteve-se também a identificação de proteínas diferencialmente expressas durante a embriogênese: α -glicosidase e actina, as quais já foram relacionadas como envolvidas nos processos de desenvolvimento em outras espécies vegetais.

Produziram-se mapas bidimensionais de agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios e obtiveram-se identificações de proteínas diferencialmente expressas nos diferentes meios. Algumas possuem papel nos processos de desenvolvimento vegetal tais como germina e quitinase. Dentre as proteínas identificadas também obteve-se a identificação de uma tioredoxina apresentava expressão específica no meio de cultura WPM

Os principais estudos proteômicos sobre embriogênese somática de plantas superiores foram realizados em *Picea glauca* (Lippert *et al.*, 2005) e *Medicago truncatula* (Imin *et al.*, 2005). Os trabalhos com *Picea glauca* consistiram na submissão de quatro estágios de desenvolvimento da embriogênese somática do abeto branco (*white spruce*) a 2-DE e análise subsequente em MS. Foram identificadas 38 proteínas diferencialmente acumuladas, as quais mostraram mudanças significantes já no embrião em seu desenvolvimento inicial. Muitas das proteínas ainda não tinham sido relacionadas ao processo de embriogênese como

as de transporte de elétrons. Duas proteínas que foram identificadas em nosso estudo também apareceram no trabalho de Lippert et al. (2005): a tiorredoxina e a germina.

Nos trabalhos com *Medicago truncatula* (Imin et al., 2005) também foi identificada uma tiorredoxina. Nesse trabalho partiu-se de culturas somáticas embriogênicas com 2, 5, e 8 semanas, separadas por 2-DE o que resultou em mais de 2.000 spots. Análises estatísticas mostraram a mudança na expressão somente em 54 spots e identificaram 16 proteínas.

Nesse estudo, os padrões de expressão protéicos associados ao desenvolvimento embrionário de *Ocotea catharinensis* começaram a ser investigados utilizando-se a tecnologia de 2-DE. Estes resultados serão utilizados como base para estudos complementares, que visam à compreensão dos fatores associados à embriogênese somática nessa espécie. A continuidade nas análises proteômicas durante a embriogênese somática de *O. catharinensis* abre perspectiva para a identificação de outras proteínas expressas diferencialmente, que possam servir como marcadoras do desenvolvimento embrionário.

Sabe-se que a competência embriogênica de agregados celulares de *O. catharinensis* cultivados em diferentes meios de cultura foi associada a expressão do gene SERK (Santa-Catarina et al., 2004b) e que o mesmo é ativado na presença de 2,4-D no meio de cultura.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho e suas próximas etapas abrem perspectivas para continuidade e criação de novas linhas de pesquisa em embriogênese somática de *Ocotea catharinensis* e em outras espécies de angiospermas florestais. Estas linhas de pesquisa se basearão principalmente no emprego de ferramentas proteômicas e análise da expressão gênica, visando a identificação de marcadores bioquímicos para acompanhar o desenvolvimento da embriogênese somática.

Dificuldades podem ser apontadas para cada um dos métodos usados. Na abordagem eletroforética, as principais dificuldades se relacionaram ao ajuste à amostra de um protocolo de extração que fornecesse um perfil protéico o mais completo possível. Outro ponto foi relacionado à reprodutibilidade em termos de intensidade e localização dos spots em cada mapa proteômico, ficando a otimização dos géis restrita a uma faixa estreita de pH. Na abordagem da espectrometria de

massa, a dificuldade da identificação das proteínas por peptide *mass fingerprinting* (PMF) vem do fato do organismo em estudo não possuir genoma seqüenciado.

Inicialmente, os géis 2-DE variaram muito em sua reprodutibilidade devido ao protocolo de extração do tampão fosfato que não removeu grande parte dos interferentes provenientes do metabolismo secundário vegetal, o uso da coloração de prata como método de detecção também afetada pelos interferentes citados anteriormente, e a necessária intervenção humana ao longo de todo o processo.

Devido a sua ampla difusão, a eletroforese bidimensional tem suas vantagens e deficiências bem documentadas. De forma geral, é aceito que algumas classes de proteína são excluídas ou pouco representadas em géis bidimensionais. Essas incluem proteínas muito ácidas ou básicas; proteínas com massas moleculares maiores que 200 kDa e menores de 5 kDa, assim como proteínas de membrana e/ou muito hidrofóbicas. Também, proteínas totalmente diferentes podem ter valores de ponto isoelétrico e massa molecular o suficientemente próximos para não serem resolvidas nos mapas bidimensionais ainda que usando-se IPGs de faixas estreitas de pH (Paba *et al.*, 2004). A utilização da modalidade de 2-DE em nosso trabalho, chamada “dois-em-um”, mostrou-se vantajosa para comparações entre perfis bidimensionais, uma vez que minimizou as diferenças experimentais na eletroforese bidimensional

O uso da 2-DE em nosso trabalho permitiu uma visão mais geral dos proteomas e a descoberta de possíveis *spots* marcadores moleculares. De um modo geral o mapa proteômico dos agregados celulares mostrou uma maior complexidade de *spots* que o do estágio embrionário por causa da detecção de um maior número de *spots*.

Destaca-se a necessidade de continuidade desses estudos com a padronização dos mapas proteômicos dos estágios embrionários da embriogênese zigótica, com a identificação qualitativa de proteínas específicas nos diferentes estágios de seu desenvolvimento e a sua comparação com a embriogênese somática.

Também como perspectiva de experimentos poderia-se proceder ao uso de IPGs de pH alcalino permitindo a análise das proteínas básicas. Pode-se também proceder à identificação por MS dos demais *spots* diferencialmente expressos.

Outra abordagem seria a avaliação de mudanças do proteoma sob a influência de mais parâmetros que influenciam na diferenciação dos agregados celulares e no desenvolvimento dos embriões.

5. REFERÊNCIAS

- Aebersold, R.; Mann, M. 2003. Mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, 198-207.
- Agrawal, G.K.; Yonekura, M.; Iwahashi, Y.; Iwahashi, H.; Rakwal, R. 2004. **System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part I: Technologies in proteome establishment.** *Journal of Chromatography*, v.Feb.815-(1-2), 109-123.
- Apremavi. 2002. **A Mata Atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira.** Org: Wigold Schäffer e Miriam Prochnow. Brasília.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. **Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.** *Nature*, v. 408, 796-815.
- Astarita, L.V.; Floh, E.I.S.; Handro, W. 2003. **Changes in IAA, tryptophan and activity of soluble peroxidases associated with zygotic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Brazilian pine).** *Plant Grow Reg.*, v.39, 113-118.
- Attree, S.M.; Fowke, L.C. 1993. **Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers.** *Plant Cell Tiss Org Cult.*, v.35, 1-35.
- Barendse, G.W.N.; Peeters, T.J.M. 1995. **Multiple hormonal control in plants.** *Acta Bot. Neerlandica*, v.44, 03-17.
- Bewley J.D.; Black, M. 1994. **Seeds: physiology of development and germination.** 2.ed. New York: Plenum Publishing, 445 p.
- Boisson, M.; Gomord, V.; Audran, C.; Berger, N.; Dubreucq, B.; Grannier, F.; Lerouge, P.; Faye, L.; Caboche, M.; Lepiniec, L.; 2001. ***Arabidopsis glucosidase I* mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development.** *EMBO Journal*, v.20, n.5, 1010-1019.
- Blum, H.; Bier, H.; Gross, H. J. 1987. **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels.** *Electrophoresis*, v. 8, 93-95.
- BRASIL. Portaria 006/92-N, de 15 de Janeiro de 1992. **Lista oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Buchanan, B.B.; Schürmann, P.; Decottignies, P.; Lozano, R.M. 1994. **Thioredoxin: A Multifunctional Regulatory Protein with a Bright Future in Technology and Medicine.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* v. 314, n.2, November, 257-260.
- Cánovas, F.M.; Dumas-Gaudot, E.; Recobert, G.; Jorin, J.; Mock, H.P; Rossignol, M. 2004. **Plant proteome analysis.** *Proteomics*, v. 4, 285-298.

- Capuana, M.; Debergh, P.C. 1997. **Improvement of the maturation and germination of horse chestnut somatic embryos.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.48(1), 23-29.
- Carvalho, P.E.R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo, EMBRAPA-CNPQ/SPI, 367-370.
- Chugh, A.; Khurana, P. 2002. **Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances.** *Current Science*, v.83, n.6.
- Dean, W. 1996. *A Ferro e fogo: A história e a devastação da mata atlântica brasileira.* São Paulo: Cia Das Letras,. 484 p.
- De Jong, A.J., Schmidt, E.D.L., De Vries, S.C. 1993. **Recent advances in higher-plant embryogenesis.** *Plant Molecular Biology*, v.22, n.2, 367-377.
- De Klerk, G.J.; Arnholdt-Schmitt, B.; Lieberei, R.; Neumann, K.H. 1997. **Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects.** *Biol Plant.*, v.39, 53-66.
- Droillard, M.J.; Paulin, A. 1990. **Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence.** *Plant Physiol*, v.94, 1187-1192.
- Fehér, A. Pasternak, T.P.; Dudits, D. 2003. **Transition of somatic plant cells to an embryogenic state.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.74, 201-228.
- Ferl, R.J. 2004. **14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events.** *Physiologia Plantarum*, v.120, 173–178.
- Figeys, D. 2003. **Proteomics in 2002: A Year of Technical Development and Wide-Ranging Applications.** *Anal. Chem.*, v.75, 2891-2905.
- Flinn, B.S., Roberts, D.R., Newton, C.H., Cyr, D.R., Webster, F.B. and Taylor, I.E.P. 1993. **Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce.** *Physiol. Plant*, v.89, 719-730.
- Frank, A.; Pevzner, P. 2005. **PepNovo: De Novo Peptide Sequencing via Probabilistic Network Modeling.** *Analytical Chemistry*, v.77, 964-973.
- Fukamizo, T. 2000. **Chitinolytic Enzymes: Catalysis, Substrate Binding, and their Application.** *Current Protein and Peptide Science*, v.1, 105-124.
- Funasaki, 2006. **Estrutura, atividade biológica e biossíntese de metabólitos secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 132p.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G. 2002. **A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*).** *Science*, v.296, 92–100.

- Granier, F. 1988. **Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis.** Electrophoresis, .v.9(11), 712-718.
- Guerra, M.P.; Torres, A.C.; Teixeira, J.B. 1999. **Embriogênese somática e sementes sintéticas.** In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Embrapa, Brasília. v.2, 533-568.
- Habermann, B.; Oegema, J.; Sunyaev, S.; Shevchenko, A. 2004. **The Power and the Limitations of Cross-Species Protein Identification by Mass Spectrometry-driven Sequence Similarity Searches.** Mol Cell Proteomics, v.3, 238-249.
- Hecht, V.; Vielle-Calzada, J.P.; Hartog, M.V.; Schmidt, E.D.L.; Boutilier, K.; Grossniklaus, U.; De Vries, S.C. 2001. **The *Arabidopsis somatic embryogenesis receptor kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture.** Plant Physiol, v.127, 803-816.
- Hogberg, K.A.; Ekberg, I.; Norell, L.; von Arnold, S. 1998. **Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*.** Can. J. For. Res., v.28, 1536-1545.
- Huber, S.C.; Huber, J.L.; Liao, P-C.; Gage, D.A.; McMichael, R.W.; Chourey, P.S.; Hannah, L.C.; Koch, K. 1996. **Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance.** Plant Physiol, v.112, 793-802.
- Hvoslef-Eide, A.K.; Corke, F.M.K. 1997. **Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.51, 35-41.
- Imim, N.; Kerim, T.; Weinman, J.J.; Rolfe, B.G. 2001. **Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage.** Proteomics, v.1, 1149-1161.
- Ishiwatari, Y.; Honda, C., Kawashima, I.; Nakamura, S.; Hirano, H.; Mori, S.; Fujiwara, T.; Hayashi, H.; Chino, M. 1995. **Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap.** Planta, v.195, 456-463.
- Jain, S.M.; Ishii, K. 1999. **Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees.** In: Mantell, S.H.; Bruns, S.; Tragardh, C.; Viana, A.M. Recent advances in biotechnology for conservation and management. Stockholm:International Foundation for Science, v.5, 214-231.
- Jacquot, J-P.; Gelhaye, E.; Rouhier, N.; Corbier, C.; Didierjean, C.; Aubry, A. 2002. **Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation.** Biochemical Pharmacology, v.64, 1065-1069.
- Jonsson, A.P. 2001. **Mass spectrometry for protein and peptide characterisation.** CMLS, v.58, 868-884.
- Kandasamy, M.K.; Deal, R.D.; McKinney, E.C.; Meagher, R.B. 2004. **Plant actin-related proteins.** TRENDS in Plant Science, april, v.9, n.4, 196-202.

- Kasprzewska, A. 2003. **Plant Chitinases: regulation and function.** Cell Mol Biol Lett, v.8(3), 809-824.
- Klein, R.M. 1993. **Ecologia da Flora e Vegetação do vale do Itajaí.** Sellowia, v.31/32, 9-389. In: Moura-Costa, P.H.; Viana, A.M.; Mantell, S.H. 1993. In vitro plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. Plant Cell Tissue and Organ. Cult., v.35, 279-286.
- Klimaszewska, K.; Smith, D. 1997. **Maturation of somatic embryos of *Pinus strobes* is promoted by a high concentration of gellan gum.** Physiol. Plant., 100, 949-957.
- Lane, B.G.; Dunwell, J.M., Ray, J.A.; Schmitt, M.R.; Cuming, A.C. 1993. **Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase.** J. Biol. Chem., v. 268, n.17, 12239-12242.
- Lima, A.R.; Capobianco, J.P.R. 1997. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para sua conservação.** Documentos do ISA (Instituto Sócio-Ambiental), n 4, 5-7.
- Liu, C.M.; Xu, Z.M.; Chua, N.H. 1993. **Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis.** Plant Cell.; v.5, 621-630.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1981. **Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture.** Int. Plant Prop. Soc., v.30, 421-421.
- Lordello, A.L.L. 1996. **Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 160p.
- Lorenzi, H. 1992. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil.** Plantarum.
- Ma, W.W.; Kozlowski, J.F.; McLaughlin, J.L. 1991. **Bioactive neolignans from *Endiicheria dysodantha*.** J. Nat. Prod, v.54, 1153-115.
- Mathur, J. 2004. **Cell shape development in plants.** Trends in Plant Science v.9 n.12, December, 583-590.
- Menchise, V.; Corbier, C.; Dirdierjean, C., Saviano, M.; Benedetti, E.; Jacquot, J.P.; Aubry A. 2001. **Crystal structure of the wild-type and D30A mutant thioredoxin h of *Clamydomonas reinhardtii* and implications for the catalytic mechanism.** Biochem J, v. 359, 65-75.
- Moser, J.R.; Garcia, M.G.; Viana, A.M. 2004 **Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 78, 37-42.

- Moura-Costa, P.H.; Viana, A.M.; Mantell, S.H. 1993. ***In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae), an endangered forest tree of S. Brasil.** Plant Cell Tissue and Organ. Cult, v.35, 279-286.
- Murashigue, T.; Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.** Physiol. Plant, v.15, 473-497.
- Neuhoff, V.; Norbert, A.; Dieter, T.; Ehrhardt, W. 1988. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** Electrophoresis, v.9(6), 255 – 262.
- Nolan KE, Irwanto RR, Rose RJ. 2003. **Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago trunculata* root-forming and embryogenic cultures.** Plant Physiol.; v.133, 218-230.
- Paba. J.; Santana, J.M.; Teixeira, A.R.L.; Fontes, W.; Sousa, M.V.; Ricart, C.A.O. 2004. **Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi*.** Proteomics, v.4, 1052-1059.
- Park, K.O. 2004. **Proteomic studies in plants.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v.37, 133-138.
- Rabilloud, T. 2002. **Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains.** Proteomics, v.2, 3-10.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 1996. **Biologia vegetal.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 728 p.
- Rock, C.D.; Quatrano, R.S. 1995. **The role of hormones during seed development.** In: Davies PJ. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 671-697.
- Rose, J.K.C.; Bashir, S.; Giovannoni, J.J.; Jahn, M.M.; Saranavan, R.S. 2004. **Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools.** The Plant Journal, v.39, 715-733.
- Sakiat, M.N.; Yatagai, M. 1992. **Óleo essencial da casca de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Anais do Congresso Nacional sobre Essências Florestais Nativas, v.2, 684-687.
- Sanchez, J.C.; Rouge, V.; Pisteur, M.; Ravier, F.; Tonella, L.; Moosmayer, M.; Wilkins, M.R.; Hochstrasser, D.F. 1997. **Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients.** Electrophoresis, v.18, 324-327.
- Santa-Catarina, C. 2001. **Crescimento in vitro e caracterização bioquímica, morfológica e histoquímica de culturas embriogênicas de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** [Dissertação de Mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 110p.

- Santa-Catarina, C.; Randi, A.M.; Viana, A.M. 2003. **Growth and accumulation of storage reserves by somatic embryos of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Plant Cell Tiss Org Cult., v.74, 67-71.
- Santa-Catarina, C.; Hanai, L.R.; Dornelas, M.C.; Viana, A.M.; Floh, E.I.S. 2004b. **SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** Plant Cell Tiss Org Cult., v.79, 53-61.
- Santa-Catarina, C.; Olmedo, A.S.; Meyer, G.A.; Macedo, J.; Amorim, W.; Viana, A.M. 2004a. **Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo developmental stage and dehydration.** Plant Cell Tiss Org Cult., v.78, 55-62.
- Santa-Catarina, C. 2005. **Aspectos fisiológicos, morfológicos e bioquímicos da embriogênese em *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo. 117 p.
- Santoni, V; Bellini, C.; Caboche, M. U 1994. **2-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants.** Planta, v.192, 557-566.
- Sahnoun, I.; Déhais, P; Montagu, M.V.; Rossignol, M.; Rouzé, P. 2000. **PPMdb: a plant plasma membrane database.** J Biotech, v.78, 235-246.
- Schmidt, E.D.L; Guzzo, F.; Toonen, M.A.J., De vries, S.C. 1997. **A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos.** Development, v.124, 2049-2062.
- Schweizer, P.; Christoffel, A.; Dudler, R. 1999. **Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance.** The Plant Journal, v.20(5), 541-552.
- Settembre, E.; Begley, T.P.; Ealick, S.E. 2003. **Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway.** Curr Opin Struct Biol. Dez; v.13(6), p.739-47.
- Shevchenko, A.; Sunyaev, S.; Liska, A.; Bork, P.; Shevchenko, A. 2003. **Nanoelectrospray tandem mass spectrometry and sequence similarity searching for identification of proteins from organisms with unknown genomes.** Methods Mol Biol, v.211, 221-234.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. 1996. **Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels.** Anal. Chem., v.68, 850-858.
- Silva, J.M.O.D.; Oltramari, A.C.; Maraschin, M.; Pedrotti, E.L. 2001. **Cultura de Embriões Imaturos e Organogênese.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v.20, junho, 44-48.
- Silveira, V.; Balbuena, T.S.; Santa-Catarina C.; Floh, E.I.S.; Guerra, M.P.; Handro, W. 2004. **Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L.** Plant Growth Regulation, v.44, 147-156.

- Somleva, M.N.; Schmidt, E.D.L.; De Vries, S.C. 2000. **Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression.** Plant Cell Rep., v.19, 718–726.
- Stasolla, C.; Yeung, E.C. 2003. **Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality.** Plant Cell Tiss Org Cult.; v. 74, 15-35.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2004. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto alegre: Artmed, 719 p.
- Tautorus, T.E.; Fowke, L.C.; Dunstan, D.I. 1991. **Somatic embryogenesis in conifers.** Can J Bot, v.69, 1873-1899.
- Thiellement, H.; Bahrman, N.; Damerval, C.; Plomion, C.; Rossignol, M.; Santoni, V.; De Vienne, D.; Zivy, M. 1999. **Proteomics for genetics and physiological studies in plants.** Electrophoresis, v.20, 2013-2026.
- Touzet, P.; Riccardi, F.; Morin, C.; Damerval, C. Huet, J-C.; Pernollet, J-C.; Zivy M.; De Vienne, D. 1996. **The maize two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program.** Theor. Appl. Genet., v.93, 997-1005.
- Van Wijk, K. 2001. **Challenges and prospects of plant proteomics.** Plant Physiol, v.126, 501-508.
- Vantard, M.; Blanchoin, L. 2002. **Actin polymerization processes in plant cells.** Current Opinion in Plant Biology, v. 5, 502–506.
- Viana, A.M. **Somatic embryogenesis in *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae).** 1998. In: Bruns, S; Mantell, S.H, Tragardh, C. Viana, A.M (eds.). Proceedings of the IFS workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management. International Foundation for Science, Stolckholm, 244-253.
- Viana, A.M.; Mantell, H. 1999. **Somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: an endangered tree of the mata Atlântica (S. Brazil).** In: Jain, S.; Gupta, P.; Newton R. (eds.. Somatic embryogenesis in woody plants. Kluwer Publishers, Netherlands, v.5, 3-30.
- Viana, A.M.; Mazza, M.C.; Mantell, S.H. 1999. **Plant Conservation Biotechnology: Applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from Brazilian rain forest.** In: Benson E. Plant conservation and biotechnology. Dundee: University of Abertay; 277-299.
- Yates, J.R.; Cociorva, D.; Liao, L.; Zabrouskov, V. 2006. **Performance of a Linear Ion Trap-Orbitrap Hybrid for Peptide Analysis.** Anal. Chem., v.78, 493-500.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K. *et al.* 2002. **A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*).** Science, v.296, 79–92.
- Wang, Y.Y.; Cheung, P.Y.; Wong, M.S.; Lo, S.C.L. 2003. **“Two-in-one” gel for spot matching after two-dimensional electrophoresis.** Proteomics 3, 580-583.

- Westermeier, R. 2001. **Electrophoresis in practice**. 3.ed. Weinheim: Wiley-VCH.
- Wilkins, M.R.; Pasquali, C.; Appel, R.D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J.C.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K.L.; Hochstrasser, D.F. 1996. **From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis**. *Nature Biotechnology*, v.14, 61-65.
- Wilkins, M.R.; Sanchez, J.C.; Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. 1996. **Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects**. *Electrophoresis* 17 (5), 830-838.
- Woo, E.J.; Dunwell, J.M.; Goodenough, P.W.; Marvier, A.C.; Richard W. Pickersgill, R.W. 2000. **Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities**. *Nature Structural Biology*, n.7, 1036 – 1040.
- Zelko, I.G.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. 2002. **Superoxide Dismutase Multigene Family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression**. *Free Radical Biology & Medicine*, v.33, n. 3, 337–349.
- Zimmerman, J.L. 1993. **Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants**. *The Plant Cell*, v.5, 1411-1423.