UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANIDADE

GEISA BARBOZA BANDIL

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO FRUTO DE CAFÉ (*Coffea arabica*) EM DOIS ESTÁDIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO

PONTA GROSSA

2008

GEISA BARBOZA BANDIL

ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO FRUTO DE CAFÉ (*Coffea arabica*) EM DOIS ESTÁDIOS INICIAIS DE DESENVOLVIMENTO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de concentração: Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub
Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina W. Galvão

PONTA GROSSA

2008

AGRADECIMENTOS

Para realizar este trabalho contei com a colaboração e o apoio de diversas pessoas e instituições.

Inicialmente agradeço ao orientador, mestre e amigo Ricardo Antonio Ayub que não mediu esforços para que este trabalho fosse realizado, pela oportunidade de orientação, pelos conhecimentos repassados e pelo incentivo constante.

À professora Carolina W. Galvão pela disponibilidade, empenho e amizade, indicando sempre a direção a ser tomada.

À UEPG por todo apoio e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Ao IAPAR, em nome do Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira e Dr. Luiz Filipe Protásio Pereira pela parceria na realização deste trabalho.

Ao grupo de fixação de nitrogênio (UFPR), em nome do Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Dr. Emanuel Maltempi de Souza, por todos os recursos disponibilizados.

Ao Humberto Ramos e Daniela Fojo Seixas Chaves pelas inúmeras e valiosas contribuições e pela ajuda incondicional.

Á professora Silvana Ohse pela amizade e ajuda em todos os momentos solicitados.

À Nilcélia, Wilson e Mariludes sempre dispostos a auxiliar em tudo que fosse necessário.

Aos meus pais Elaine e João Luiz pela minha formação como pessoa, por me proporcionarem a continuidade nos estudos até a pós-graduação, pela compreensão, paciência, incentivo e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Às minhas irmãs Joice e Jessica pelo apoio, carinho e compreensão, principalmente quando não podiam usar o computador.

Ao meu noivo Bruno pela paciência, compreensão, carinho, estímulo, ajuda e por estar sempre presente, mesmo que distante.

Aos colegas do mestrado, pelos momentos de estudo e descontração, principalmente à minha “dupla” Adri.

Aos colegas do laboratório de etileno, dos laboratórios vizinhos, do laboratório de biotecnologia vegetal (IAPAR) e do grupo de fixação de nitrogênio (UFPR) pelo agradável convívio.

Aos meus queridos amigos de longa data que entenderam minha ausência inúmeras vezes.

Principalmente a Deus, pela presença constante na minha vida, por iluminar minhas escolhas, me confortar nas horas não tão boas e me dar forças para seguir sempre em frente.

E a todos que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas, ocupando o segundo lugar no mercado internacional de 'commodities'. Existem muitas pesquisas em café, mas o conhecimento molecular sobre desenvolvimento e amadurecimento de fruto ainda é limitado. O Projeto Genoma Café fornece recursos requeridos para o estudo proteômico de café, para adicionar resultados derivados do estudo de microarranjos de DNA e ESTs. Este trabalho relata uma investigação proteômica comparativa do fruto imaturo de *Coffea arabica* em dois estádios de desenvolvimento: chumbinho, intensa divisão celular, e expansão do fruto, intensa expansão celular. As proteínas foram extraídas usando o método SDS-Fenol modificado e separadas por eletroforese bidimensional. Os géis corados com Coomassie blue revelaram aproximadamente 300 spots bem resolvidos na faixa de pH entre 3-10 e 500 spots na faixa de pH 4-7. O método de identificação de proteínas por padrão de massas peptídicas foi aplicado nos 16 spots que apresentaram maior diferença de expressão na faixa de pH 3-10, utilizando-se um espectrômetro de massa (MS) do tipo MALDI-TOF e comparando os espectros de digestão tríptica contra bancos de dados baseados em ESTs de Coffea. Foram identificadas seis prováveis proteínas que foram classificadas de acordo com sua função e vias biossintéticas conhecidas: as enzimas *frutose bifosfato aldolase*, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* e *malato desidrogenase* fazem parte da via glicolítica; a proteína *11S* possui função de reserva, a *taumatina-like* sinaliza resposta a um estresse, e *precursor de cloroplasto*, encontra-se envolvida na via fotossintetizante. Essas proteínas, exceto a taumatina-like, tiveram sua expressão aumentada no estádio de expansão do fruto indicando que são mais requeridas à medida que o fruto se desenvolve.

Palavras-chave: proteína, fruto imaturo, crescimento, proteoma.

ABSTRACT

Coffee is one of the most valuable agricultural commodities, ranking second on international trade exchanges. There is much agronomic research on coffee, but molecular knowledge of its fruit development and ripening is limited. The Brazilian Coffee Genome Project provides the genomic resources required to study the proteomics of *Coffea arabica*, to add to results derived from DNA microarray and EST studies. This work reports a comparative proteomic investigation of immature coffee fruit in two developmental stages: stage 1, intense cell division, and stage 2, intense cell expansion. Proteins were extracted using a modified SDS-Phenol method and two-dimensional electrophoresis gels stained with Coomassie blue revealed about 300 well-resolved polypeptide spots in the pH range 3-10 and 500 well-resolved polypeptide spots in the pH range 4-7. Nineteen variable polypeptides were excised, trypsin-digested and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Peptide MS data were searched against the coffee EST database and six protein spots were identified, according to their putative and assigned functions in known biosynthetic pathways: *Fructose bifosfato aldolase*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* and *malate dehydrogenase* enzymes are part of glycolytic pathway, *11S storage globulin* protein has the reserve function, the *thaumatin-like protein* signals a response to stress, and *chloroplast precursor* is involved in pathway photosynthesis. These proteins, except taumatina-like, had increased their expression at the stage of expansion of the fruit indicating that they are more required with the fruit development.

Key words: protein, immature fuit, growth, proteomic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Primeiros estádios de desenvolvimento do fruto de cafeeiro..... 28

FIGURA 2 – Evolução dos tecidos durante o desenvolvimento e maturação do fruto de café..... 29

FIGURA 3 - Géis de referência..... 47

FIGURA 4 - Sobreposição dos géis de referência..... 48

FIGURA 5 - Diferença na separação dos spots com a utilização de diferentes faixas de pH..... 49

FIGURA 6 - Géis bidimensionais com perda de proteína..... 51

FIGURA 7 - Sobreposição dos géis contendo proteínas do chumbinho e do estádio de expansão do fruto..... 52

FIGURA 8 - Perfis protéicos do fruto de cafeeiro em diferentes estádios de desenvolvimento na faixa de pH 3-10..... 53

FIGURA 9 - Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão diferencial em diferentes estágios de desenvolvimento..... 54

FIGURA 10 - Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão apenas em um estádio de desenvolvimento: chumbinho..... 55

TABELA 1 - Proteínas do fruto do café expressas diferencialmente nos diferentes estádios de desenvolvimento, chumbinho e expansão de frutos, na faixa de pH 3-10..... 56

FIGURA 12 - Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão apenas em um estádio de desenvolvimento na faixa de pH 4-7 56

TABELA 2 - Proteínas do fruto do café expressas diferencialmente nos diferentes

estádios de desenvolvimento, chumbinho e expansão de frutos, na faixa de pH4-7 60

FIGURA 13 - Espectros obtidos após análise no MALDI-TOF..... 62

TABELA 3 - Proteínas identificadas..... 63

FIGURA 14 - Glicólise: uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas de piruvato..... 65

FIGURA 15 - Ciclo de Krebs: seqüência circular de oito reações onde os grupos acetil são degradados em duas moléculas de gás carbônico..... 66

FIGURA 16 – Ciclo do glioxilato: os seis carbonos de isocitrato originam succinato (quatro carbonos) e glioxilato (dois carbonos)..... 67

FIGURA 17 – Segunda fase do ciclo de Calvin: redução do 3-fosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ACO	1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase
CHAPS	Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonado
2D	Eletroforese bidimensional
Da	Dalton
DPA	Dias após florescimento
DTT	Ditiotreitol
ESI	do inglês: “electron spray ionization” Ionização por “Eletronspray”
ESTs	do inglês: “expressed sequence tags” Etiquetas de seqüência transcrita
HCCA	Ácido ciano-4-hidroxicinamínico
IEF	Isoeletrofocalização
IPG	do inglês: “Immobilized pH gel” Gradiente de pH Imobilizado
kDa	Quilodalton
mA	Milianper
MALDI	do inglês: “matrix assisted laser desorption ionization” Ionização desaborção a laser assistida por matriz
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanograma
PAGE	do inglês: “Polyacrylamide Gel Electrophoresis” Eletroforese em gel de poliacrilamida

pI	Ponto isoelétrico
PMF	do inglês “peptide mass fingerprint” Impressão digital de peptídeos
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoreto
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QTLs	Lócus de caráter quantitativo
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBP	Tributilfosfina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N-Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TLP	do inglês: “Thaumatin-like protein”
TOF	do inglês: “Time of flight” Tempo de vôo
V	Volts
Vhr	Voltagem/hora
VhT	Voltagem/hora total
Vn	Volume normatizado
W	Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 13

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 15

2.1 PROTEÔMICA..... 15

2.1.1 Eletroforese Bidimensional..... 17

2.1.2 Extração das Proteínas Totais..... 17

2.1.3 Rehidratação das Tiras de Gel..... 20

2.1.4 Focalização Isoelétrica..... 21

2.1.5 Equilíbrio das Tiras de Gel..... 22

2.1.6 Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida..... 23

2.1.7 Coloração..... 23

2.1.8 Análise dos Géis Bidimensionais..... 24

2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA..... 24

2.3 O CAFEEIRO..... 25

2.3.1 Estádios Fenológicos..... 26

2.3.2 O Fruto..... 26

2.4 ESTUDO MOLECULAR EM FRUTOS DE CAFEEIRO..... 29

3. OBJETIVOS..... 34

3.1 OBJETIVO GERAL..... 34

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 34

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 35

4.1 MATERIAL VEGETAL..... 35

4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DOS FRUTOS DE CAFÉ..... 35

4.3 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS..... 37
4.4 PRIMEIRA DIMENSÃO..... 38
4.4.1 Rehidratação das Tiras de Gradiente de pH Imobilizado..... 38
4.4.2 Isoeletrofocalização..... 39
4.5 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO..... 40
4.6 SEGUNDA DIMENSÃO..... 40
4.7 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO. 41
4.8 ANÁLISE DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO..... 41
4.9 RETIRADA DAS PROTEÍNAS DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MALDI-TOF MS/MS..... 42
4.10 ANÁLISE NO MALDI-TOF E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS..... 44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 46
5.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FRUTO IMATURO DE CAFÉ..... 46
5.2 REPRODUTIBILIDADE DOS GÉIS..... 46
5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO..... 48
5.4 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA..... 48
5.5 CONCENTRAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA..... 50
5.6 DETECÇÃO DOS SPOTS..... 51
5.7 ESTUDO COMPARATIVO DE PROTEOMAS DE FRUTO DO CAFEEIRO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO..... 53
5.7.1 Análises Comparativas na Faixa de pH 3 a 10..... 53
5.7.2 Análises comparativas da faixa de pH 4 a 7..... 56
5.8 DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS..... 60
5.9 IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS 61

6. CONCLUSÕES..... 72

7. REFERÊNCIAS..... 73

1. INTRODUÇÃO

A proteômica estuda os processos biológicos através da análise sistemática das proteínas expressas nas células ou tecidos em condições fisiológicas específicas. Sendo assim, o proteoma reflete o estado atual de funcionamento do sistema, ou seja, a expressão funcional do genoma (PEREIRA et al., 2005a). Atualmente, existem muitos recursos que podem ser utilizados para identificar e caracterizar proteínas expressas num determinado sistema biológico. A proteômica surgiu devido ao progresso da bioquímica e foi impulsionada pelo desenvolvimento no campo da espectrometria de massa (MS) (FERNANDEZ-LIMA et al., 2005). A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite a determinação qualitativa e quantitativa de vários componentes de uma amostra através da sua relação massa/carga dos íons resultantes da sua ionização (NAVARRO, 2007). A eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa, aliadas à análise computacional de imagens e a um banco de consulta de dados são as principais ferramentas usadas na proteômica (WILDGRUBER et al., 2000).

Os avanços na pesquisa proteômica têm gerado conhecimentos em diversas áreas, principalmente por ser a fase posterior ao estudo genômico. O Projeto Genoma Café, concluído recentemente, fornece recursos genômicos requeridos para estudos proteômicos do café. Devido à importância econômica do cafeeiro, é grande o número de pesquisas relacionadas a características agronômicas (ROGERS et al.,1999), entretanto trabalhos em nível molecular sobre o desenvolvimento e maturação dos frutos do café são escassos (RIBEIRO, 2004).

O desenvolvimento do fruto do cafeeiro é marcado por um rápido crescimento inicial, com aumento do tamanho em um curto período de tempo. Esse estádio corresponde à

fase em que ocorre expansão celular. Os caminhos envolvidos nesses processos são únicos para plantas, apesar disso, diferenças na composição bioquímica e estrutural, e no desenvolvimento fisiológico e anatômico podem levar a descoberta de genes e proteínas únicos para cada espécie (KATZ et al., 2007). A elucidação das bases moleculares de cada evento comum representa um grande avanço nas pesquisas de desenvolvimento de fruto (GIOVANNONI, 2001).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÔMICA

As proteínas são polímeros constituídos de aminoácidos, responsáveis pela formação, regulação e funcionamento de todos os organismos vivos. Essas moléculas são sintetizadas com base na informação contida nos genes e são essenciais para a viabilidade celular (LEHNINGER et al., 2002).

O estudo das proteínas expressas nas células ou tecidos, ou seja, o estudo do proteoma de células ou tecidos se torna um grande desafio, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica, dependendo do estado de desenvolvimento, da presença de ativadores ou inibidores e também das condições do meio ambiente. Apesar disso, a proteômica é a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma (PANDEY; MANN, 2000).

O recente desenvolvimento de tecnologias aplicadas na biologia tem gerado grande produção de informações na área de genômica de plantas, através do seqüenciamento de diferentes organismos, gerando dados que permitiram a identificação de prováveis novos genes (VIEIRA et al., 2006). Entretanto, é impossível estudar o comportamento dos sistemas biológicos enfocando exclusivamente o genoma, pois são as proteínas e não os genes que determinam o fenótipo de um organismo (PEREIRA et al., 2005a). O nível de proteína celular é resultante dos processos pós-transcricional e pós-traducional que modulam a quantidade, localização e atividade de seus produtos finais na célula. Estas informações podem assim ser incluídas à anotação do gene correspondente (BAGINSKY; GRUISSEM, 2006). Desse modo, dados proteômicos podem ser usados para melhorar anotações genômicas (DESIERE et al.,

2004), pois permitem validar ESTs (‘Expressed sequence tags’) através da comparação da proteína expressa com o transcrito do gene correspondente (VIEIRA et al., 2006). A proteômica nos fornece dados sobre os atores reais na célula e, portanto, também está numa posição única para integrar os dados de toda a genômica funcional em uma imagem coerente da função celular (GÖRG et al., 2001).

Embora a identificação de todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo pareça uma tarefa bastante difícil de realizar, mesmo em organismos simples, são cada vez mais completas as informações obtidas através de estudos proteômicos (SURESH et al., 2005). Esses novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, bem como outras informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (ROCHA et al., 2005).

O estudo da proteômica tem uma ampla aplicação: (1) permite descobrir vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (2) permite identificar novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos; e (3) permite também identificar e caracterizar marcadores biológicos, ou seja, proteínas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (ROCHA et al., 2005).

A proteômica está se tornando uma das mais promissoras áreas da pesquisa, conduzida por grandes avanços da tecnologia e cada vez mais sofisticadas aplicações para quase todas as áreas da biologia e biomedicina (GÖRG et al., 2001). Diversas pesquisas vem sendo realizadas nesse sentido, como por exemplo, análise da resposta de plantas à estresses ambientais: baixas temperaturas (BAE et al., 2003), salino (DANI et al., 2005), hídrico (PROTEOPAR, 2007) ou ainda alterações no perfil padrão de expressão de proteínas em

células cancerosas possibilitando um diagnóstico precoce da existência de tumores (WULFKUHLE et al., 2003; GHARBI et al., 2002).

Estudos proteômicos requerem técnicas altamente reprodutíveis para visualizar e analisar milhões de proteínas num determinado tempo (WILDGRUBER et al., 2000). Atualmente, as principais técnicas usadas na proteômica são eletroforese bidimensional (2D) e a espectrometria de massa (ROCHA et al., 2005) que combinadas com análise computacional de imagens e base de consulta de dados são poderosas ferramentas para identificação e caracterização de proteínas (WILDGRUBER et al., 2000).

2.1.1 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese bidimensional (2D) é uma técnica para estimar o número de proteínas sintetizadas em um sistema biológico. É um sistema que pode resolver proteínas que diferem em uma simples carga e consequentemente pode ser usada para analisar modificações *in vivo* resultantes de mudança de carga. A reprodutibilidade da separação é suficiente para permitir a comparação dos pontos protéicos (‘spots’) em diferentes géis (O’FARRELL, 1975). A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida foi criado em 1975 por O' Farrel e J. Klose, e desde então é considerada um poderoso método para a análise em larga escala de amostras complexas de proteínas de uma amostra biológica. As etapas da eletroforese bidimencional serão descritas a seguir.

2.1.2 Extração das Proteínas Totais

A extração das proteínas é um procedimento muito importante para garantir o sucesso da eletroforese bidimensional. Não existe um único método de extração das proteínas totais que possa ser aplicado universalmente para todos os tipos de amostras analisadas em 2D (DUNN, 1993). Os protocolos devem ser adaptados e otimizados para cada tipo de amostra a

ser analisada (GÖRG et al., 2004). Isto significa que deve-se considerar o material biológico utilizado e a característica das proteínas de interesse. Apesar disso, existem alguns passos básicos que devem ser seguidos:

O primeiro deles é o rompimento da membrana celular para liberar as organelas e os constituintes químicos: sais, carboidratos, lipídeos, proteínas, enzimas, ácidos nucléicos e fenóis (LEHNINGER et al., 2002). A lise osmótica, lise por detergente, lise enzimática da parede celular, sonicação ou maceração com nitrogênio líquido são procedimentos que podem ser utilizados para este fim. Tecidos de plantas requerem condições mais duras para a lise devido à robustez da parede celular (GÖRG et al., 2004). Neste caso, muitos pesquisadores têm utilizado uma combinação de dois ou mais métodos para quebrar a parede celular e romper a membrana plasmática (FAUROBERT et al., 2007; KATZ et al., 2007).

Os próximos passos são a inativação das enzimas proteolíticas e a remoção dos compostos interferentes tais como sais, lipídeos, ácidos nucléicos, polissacarídeos e fenóis. A atividade das enzimas proteolíticas pode resultar em 'spots' artificiais e perda da massa molecular das proteínas (GÖRG et al., 2004). As proteases podem ser inativadas utilizando fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) no tampão de lise (WANG et al., 2003) ou precipitando a amostra através da redução do pH adicionando ácido tricloroacético (TCA) em acetona gelada (GÖRG et al., 2004).

Altas concentrações de sal aumentam a condutividade do gel na isoeletrofocalização (IEF) prolongando o tempo requerido para atingir o estado de equilíbrio. O sal pode ser removido precipitando as proteínas com solventes orgânicos como álcool e acetona (GÖRG et al., 2004). Outros interferentes são os lipídeos que podem interagir com proteínas de membrana e consumir detergentes. Os lipídeos podem ser removidos por centrifugações em alta velocidade (FOUNTOULAKIS et al., 2004) e/ou utilização de álcool ou acetona,

entretanto pode ocorrer perda de certas proteínas solúveis em solventes orgânicos (GÖRG et al., 2004).

Polissacarídeos e ácidos nucléicos, além de aumentarem a viscosidade da solução, podem interagir com anfólitos (utilizados na 1ª dimensão) e proteínas obstruindo assim os poros do gel de poliacrilamida. A precipitação de proteínas com TCA em acetona remove esses interferentes.

Compostos fenólicos estão presentes em materiais de plantas e podem interferir no padrão do gel 2D devido à interação com proteínas. Os fenóis podem ser removidos com a utilização de polivinilpolipirolidona (PVPP) ou pela precipitação de proteínas com TCA em acetona gelada (GÖRG et al., 2004).

Após a remoção dos compostos interferentes, as proteínas devem ser completamente solubilizadas, desagregadas, desnaturadas e reduzidas (GÖRG et al., 2004). O processo de solubilização tem como objetivos quebrar as interações macromoleculares (incluindo todas as interações não covalentes e as pontes dissulfeto), prevenir modificações nas proteínas e mantê-las em solução durante a eletroforese da segunda dimensão (ROCHA et al., 2005) para garantir que cada 'spot' represente um polipeptídeo individual (GÖRG et al., 2004).

A solubilização das proteínas é geralmente realizada em um tampão contendo agentes caotrópicos (uréia/tiouréia), detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (Triton X-100/CHAPS), agentes redutores (DTT) e anfólitos. O tampão de solubilização mais popular é baseado no tampão de lise de O'Farrell's com algumas modificações (9 mol/L uréia, 2-4% CHAPS, 1% DTT e 2% v/v anfólitos) (GÖRG et al., 2004).

Para o rompimento de interações não covalentes são utilizados agentes caotrópicos, como a uréia, que altera os parâmetros do solvente e exerce profundos efeitos sobre todos os tipos de interações não covalentes. A tiouréia é um agente caotrópico mais eficiente do que a

uréia, mas pouco solúvel em água. Dessa forma, a mistura uréia-tiouréia tem sido muito utilizada, pois é mais eficiente do que a uréia (RABILLOUD et al., 1997).

A redução das pontes dissulfeto é também um passo crítico na preparação da amostra (GÖRG et al., 2004). O β-mercaptoetanol foi o agente redutor mais usado no princípio da técnica de 2D. Sua ação tamponante, contudo, destrói o gradiente de pH na região básica das tiras de gel ("strips"). A tributilfosfina (TBP) é o mais potente agente redutor disponível no mercado atualmente, mas é volátil, tóxica e requer solvente orgânico para dissolver em água. O ditiotreitol (DTT) passou a ser utilizado por ser mais eficiente e apresentar melhores resultados (ROCHA et al., 2005).

Para romper as interações hidrofóbicas, são usados detergentes não-iônicos ou zwitteriônicos (com carga líquida neutra), como o Triton X-100 e, mais recentemente, o CHAPS (ROCHA et al., 2005). Após a solubilização a amostra contendo as proteínas está pronta para ser conduzida na eletroforese bidimensional.

2.1.3 Rehidratação das Tiras de Gel

O pré-requisito para análise proteômica é a separação das proteínas de amostras biológicas complexas em géis de poliacrilamida com alta reprodutibilidade e alta resolução. A reprodutibilidade dos resultados é possível devido à utilização de tiras de gel de pH imobilizado (IPG - immobilized pH gel). Nessas tiras, uma série de reativos são copolimerizados com uma matriz de acrilamida gerando um gradiente de pH extremamente estável permitido um verdadeiro estado de equilíbrio na isoeletrofocalização. Outra vantagem do uso das tiras IPG é o aumento da resolução devido à capacidade de gerar diferentes gradientes de pH (GÖRG et al., 2004).

As tiras de IPG são obtidas comercialmente na forma desidratada com diversas faixas de pH e tamanhos e devem ser rehidratadas antes da focalização isoelétrica. A função

da solução de rehidratação, além de rehidratar o gel da tira para permitir a entrada das proteínas, é manter as proteínas em solução durante o processo de isoeletrofocalização. A solução de rehidratação contém 8mol/L uréia para solubilizar e desnaturar as proteínas, 0,5% CHAPS para minimizar a agregação entre proteínas e 2% anfólitos ('IPG Buffer') para produzir uma condutividade mais uniforme em todo gradiente de pH (BERKELMAN e STENSTED, 2004). As amostras podem ser misturadas à solução de rehidratação ou aplicadas diretamente sobre a tira usando o acessório denominado copo de carregamento ('sample cups'). O primeiro procedimento permite a aplicação de uma maior quantidade de proteínas (~1 mg) e minimiza a precipitação durante a entrada no gel, principalmente para proteínas de membrana. O período necessário para a rehidratação das tiras é de, no mínimo, 10 horas e deve ser realizada a temperatura ambiente (ROCHA et al., 2005).

2.1.4 Focalização Isoelétrica

O ponto isoelétrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual à zero. Esta propriedade depende da força iônica, da natureza do tampão usado e qualquer outro soluto presente no meio, mas não depende da concentração de proteína. Na focalização isoelétrica, ou isoeletrofocalização as proteínas são separadas eletroforeticamente de acordo com as diferenças de seus pontos isoelétricos. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (BERKELMAN; STENSTED, 2004).

A quantidade de proteína que pode ser utilizada para se obter uma ótima resolução, o máximo de 'spots' e o mínimo de arraste nos géis depende do gradiente de pH utilizado, da distância de separação e da complexidade das proteínas na amostra (GÖRG et al., 2004).

Um dos aparelhos utilizados nessa etapa é denominado IPGphor II, fabricado pela GE Healthcare, que possui fonte de eletroforese e regulador de temperatura integrados em um só sistema. Nele é possível fazer a rehidratação e, imediatamente, a focalização isoelétrica, evitando perda de tempo e manipulações desnecessárias das tiras de IPG ou, após a rehidratação, posicionar as tiras nas canaletas do 'manifold' sobre o IPGphor, encaixar os eletrodos e iniciar a isoeletrofocalização (ROCHA et al., 2005).

A corrida é realizada em etapas, geralmente com a amperagem limitada a 50μA por tira. Nos primeiros passos a voltagem é usualmente baixa porque a condutividade é inicialmente alta devido à presença de sal. Os sais migram para os eletrodos resultando em queda da condutividade permitindo a aplicação de altas voltagens nos passos seguintes. O melhor tempo de focalização requerido para alcançar a melhor qualidade e reprodutibilidade é o tempo necessário para obter um padrão de separação estável. O tempo ótimo de focalização deve ser estabelecido empiricamente considerando cada amostra de proteína, a faixa de pH e o comprimento das tiras de pH usadas (GÖRG et al., 2004). Atualmente existe uma série de protocolos com o tempo de focalização determinado para cada caso.

Após a isoeletrofocalização, as tiras podem ser congeladas a -80ºC para posteriormente realizar a segunda dimensão (ROCHA et al., 2005).

2.1.5 Equilíbrio das Tiras de Gel

Antes da separação na segunda dimensão, é essencial que as tiras de IPG sejam equilibradas para permitir a separação das proteínas para que elas interajam completamente com o SDS. Para isso são utilizados DTT e iodoacetamida. O DTT desfaz as pontes dissulfetos, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos peptídeos e a iodoacetamida é utilizada após o tratamento com DTT, pois possui a capacidade de alquilar grupos sulfidril e previnir sua reoxidação (GÖRG et al., 2004).

O equilíbrio é feito utilizando um tampão originalmente descrito por (GÖRG et al., 1988) contendo uréia e glicerol. Esses reagentes reduzem os efeitos eletroendosmóticos permitindo a transferência das proteínas da primeira para a segunda dimensão.

2.1.6 Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

Como as bandas protéicas tendem a se sobrepor, os métodos unidimensionais de separação, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas em um único gel. Na primeira dimensão (IEF), as proteínas são separadas em função das suas cargas nativas (pI). Posteriormente, a tira de gel é mergulhada no tampão de corrida (tampão SDS-PAGE) e depois colocada no topo de um gel de poliacrilamida – cuja espessura é geralmente de 1mm – para a realização da eletroforese de segunda dimensão, através da qual cada cadeira polipeptídica migra em função de sua massa molecular (ROCHA et al., 2005). A eletroforese é conduzida em corrente constante, em dois passos. Durante a migração inicial e período de empilhamento (passo 1) a corrente é aproximadamente metade do valor requerido para separação das proteínas (passo 2) (BERKELMAN; STENSTED, 2004). O resultado final consiste em um gel com diversos pontos (‘spots’) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína particular. O poder de separação é tão grande que duas proteínas que diferem em apenas um aminoácido carregado podem ser prontamente distinguidas (ROCHA et al., 2005).

2.1.7 Coloração

As proteínas separadas eletroforeticamente podem ser visualizadas por métodos gerais de coloração (ROCHA et al., 2005). Os métodos de coloração mais utilizados são

Coomassie Brilliant Blue, prata e fluorescência. A coloração com prata possui sensibilidade para detectar 0,1 ng de proteína por ponto protéico, entretanto a falta de linearidade e o problema de gerar coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas (CHASSAIGNE et al., 2004) dificultam muito a quantificação e as análises comparativas de expressão (CHAVES, 2004). *Coomassie* é menos sensível podendo detectar de 30 a 100 ng de proteína (PATTON, 2002), portanto, exige uma maior quantidade de amostra para visualização das proteínas. A vantagem da coloração com Coomassie é que permite uma melhor quantificação da abundância relativa da cada proteína, além de se compatível com a espectrometria de massa (SANTOS et al., 2008). A coloração por fluorescência é atualmente a melhor alternativa devido a sua alta sensibilidade, linearidade e compatibilidade com espectrometria de massa (PATTON, 2002).

2.1.8 Análise dos Géis Bidimensionais

Os géis de eletroforese bidimensionais corados são digitalizados com o auxílio de um scanner específico. As imagens geradas são analisadas através de programas desenvolvidos para a análise dos resultados obtidos em géis 2D. Atualmente no mercado existem vários softwares, como por exemplo, Phoretix 2D e SameSpots v2.0 (Nonlinear Dynamics), PDQuest (Biorad), Melanie (GeneBio); Decyder e ImageMaster Platinum (GE Healthcare). Estes softwares permitem a contagem do número de "spots", a caracterização automática dos valores de pI e massa molecular, a análise dos níveis de expressão, assim como diversos outros recursos para o melhoramento da qualidade da imagem (ROCHA et al., 2005).

2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após a detecção das proteínas, o procedimento subseqüente consiste em identificar as macromoléculas de interesse. A espectrometria de massa tornou-se uma inestimável

ferramenta para a caracterização das proteínas, usada para medir a massa molecular de polipeptídeos (YERGEY et al., 2002). O espectrômetro de massa é um instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-las de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), utilizando para isso campos eletromagnéticos. Recentemente foram desenvolvidas duas técnicas capazes de ionizar biomoléculas de alto peso molecular, como oligopeptídeos e proteínas, sem degradá-las. Tais técnicas foram denominadas ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI - *matrix assisted laser desorption ionization*) e ionização branda utilizada em ionização por eletronspray (ESI - *electron spray ionization*) (CARVALHO et al., 2006). O equipamento MALDI acoplado a um analisador de massas tipo tempo de vôo (ToF – Time of Flying) é uma das principais técnicas empregadas para a análise dessas moléculas biológicas. Esta técnica analisa a massa de fragmentos peptídicos obtidos da digestão das proteínas com uma enzima proteolítica, como a tripsina. O padrão das massas obtido (‘peptides mass fingerprint’) é comparado com bancos de dados para a identificação das proteínas (ROCHA et al., 2005).

2.3 O CAFEEIRO

O cafeeiro, planta perene, pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* (AGUIAR et al., 2005) é uma importante cultura com mais de 7 milhões de toneladas de grãos produzidas todo ano em aproximadamente 11 milhões de hectares em todo o mundo. As principais espécies cultivadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* que representam, respectivamente, 70% e 30% da produção mundial (GEROMEL et al., 2006).

Em termos de qualidade de bebida, *C. arabica* (Arábica) é apreciada por uma maior extensão de consumidores por apresentar gosto menos amargo e melhor sabor quando comparado com *C. canephora* (Robusta) (GEROMEL et al., 2006).

2.3.1 Estádios Fenológicos

O cafeeiro passa por estádios fenológicos que determinam fases importantes que, bem caracterizados, podem auxiliar em pesquisas como, por exemplo, os programas de melhoramento do cafeeiro (PEZZOPANE et al., 2003).

O cafeeiro Arábica (*Coffea arabica L.*) é uma planta que leva dois anos para completar o ciclo fenológico (CAMARGO e CAMARGO, 2001). No primeiro ano fenológico, formam-se os ramos vegetativos, com gemas axilares nos nós, que depois são induzidas a se transformarem em gemas reprodutivas (GOUVEIA, 1984). Posteriormente, essas gemas florais amadurecem, entram em dormência e se tornam aptas para a antese, causada principalmente por chuva ou irrigação (CAMARGO, 1985). O segundo ano fenológico inicia-se com a florada, seguida pela formação dos frutos e expansão dos grãos, até seu tamanho normal. Depois, ocorre a granação dos frutos e a fase de maturação (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

No gênero *Coffea*, há algumas variações entre as espécies no que diz respeito ao tempo de desenvolvimento do fruto, desde a antese até a maturação. Enquanto em algumas espécies o desenvolvimento do fruto leva poucas semanas, como é o caso de *C. racemosa* e *C. pseudozanguebariae* (10 a 12 semanas), na espécie *C. liberica* leva mais de um ano. Já as espécies de alto valor econômico *C. arabica* e *C. canephora* têm o desenvolvimento do fruto em 6 a 8 meses e 9 a 11 meses, respectivamente (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

2.3.2 O Fruto

O fruto do cafeeiro é carnoso, do tipo drupa, caracterizado por um endocarpo lignificado, mesocarpo polposo e exocarpo fino (ESAU, 1998; DE CASTRO e

MARRACCINI, 2006). Em cafeeiro arábica o crescimento das drupas ocorre em três fases: inicialmente o diâmetro do fruto aumenta rapidamente de tamanho, no segundo estágio o crescimento é relativamente lento e o último é um período de crescimento rápido à maturidade (CUTTER, 1987).

No cafeeiro, inicialmente os pequenos frutos, de cor verde, recebem o nome de chumbinhos. Este estádio compreende a fase inicial do desenvolvimento do fruto e tem duração aproximada de 5-6 semanas. A fase de chumbinho se caracteriza por intensa divisão celular e ausência de crescimento expressivo no tamanho do fruto. Esta ausência de crescimento está associada ao nível endógeno elevado de ácido abscísico e baixo de ácido giberélico (THOMAZIELLO et al., 2000). Isto está de acordo com RAVEN el al. (2004) que afirma que o nível de ácido abscísico aumenta durante o início do desenvolvimento das sementes em várias espécies vegetais estimulando a produção de proteínas de reserva das sementes e também prevenindo a germinação prematura. Já as giberelinas, estimulam o alongamento celular, mas apesar de serem encontradas em sementes imaturas (RAVEN et al., 2004) apresentam baixo conteúdo no desenvolvimento inicial, contribuindo para a ausência de crescimento citada por THOMAZIELLO et al. (2000).

No segundo estádio, denominado de rápida expansão, a divisão celular é menos intensa, ocorrendo expansão celular. O fruto no final desse estádio, ou seja, em média trinta dias (PEZZOPANE et al., 2003), atinge metade do tamanho máximo (LAVIOLA et al., 2007). Pezzopane et al., em 2003, propôs uma escala de avaliação de desenvolvimento de estádios fenológicos do cafeeiro arábico onde é possível observar estes dois estádios de desenvolvimento do fruto, os quais ele denominou de chumbinho e expansão dos frutos (Fig. 1). O fruto verde cresce até atingir seu tamanho final e cessa seu crescimento. No início da maturação, quando o crescimento se reinicia, o fruto aumenta rapidamente de tamanho até atingir seu tamanho máximo. O período que vai desde a antese até esta fase compreende 4-6

meses e a maturação em torno de 2 meses (RENA; MAESTRI, 1986). O crescimento do fruto é assíncrono durante o desenvolvimento, com diferentes proporções de tamanho de fruto na mesma planta (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

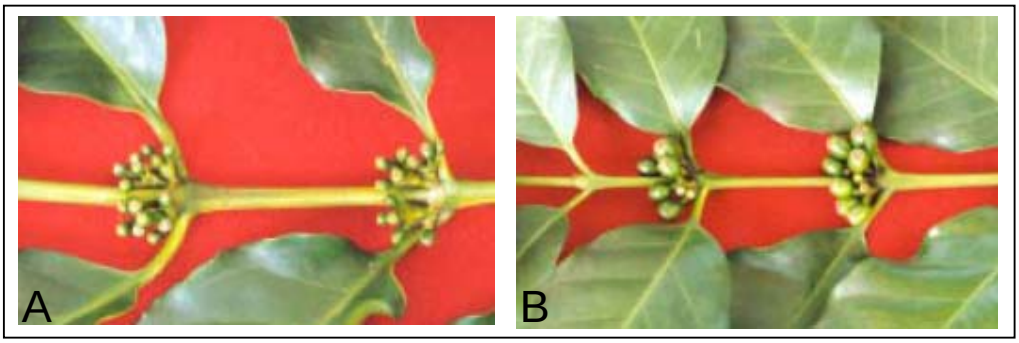

FIGURA 1 – Primeiros estádios de desenvolvimento do fruto de cafeeiro. Em A chumbinho e B expansão do fruto.

O desenvolvimento e crescimento do fruto é resultado da evolução dos tecidos que o formam. A expansão inicial da semente que ocorre de 0 a 90 dias após o florescimento (DAF) é devido ao rápido crescimento do perisperma (SALMONA et al., 2008). O perisperma é um tecido desenvolvido do núcleo do óvulo logo após a fecundação e ocupa o volume inteiro do lóculo no estádio 1 que corresponde ao chumbinho (Fig. 2) e permanece até o estádio 3 onde dá lugar ao desenvolvimento do endosperma (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). O endosperma é um tecido que inicia seu desenvolvimento no estádio 2, que corresponde ao estádio de expansão do fruto e progressivamente substitui o perisperma, restringindo-o a uma fina película circundando o endosperma em 120 a 150 DAF (SALMONA et al., 2008). O período entre 130 e 190 DAF corresponde à fase de armazenameno (de proteínas 11S, triacilgliceróis, cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, entre outros compostos). Finalmente a fase de maturação inicia por volta de 200 DAF onde ocorre maturação da semente associada com o amolecimento e pigmentação do pericarpo (SALMONA et al., 2008) tecido externo que envolve o perisperma e o endosperma (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

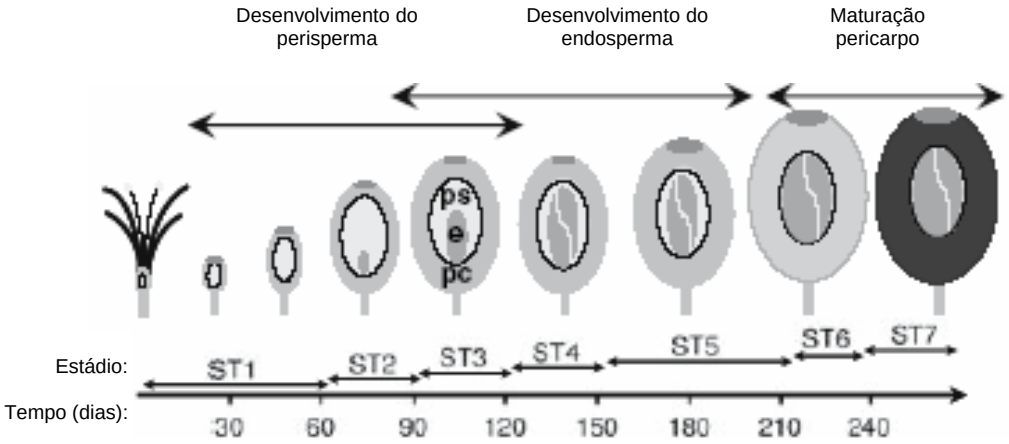

FIGURA 2 – Evolução dos tecidos durante o desenvolvimento e maturação do fruto de café. e: endosperma; ps: perisperma; pc: pericarpo. Adaptado de DE CASTRO e MARRACCINI (2006); extraído de SALMONA et al., (2008).

2.4 ESTUDO MOLECULAR EM FRUTOS DO CAFEEIRO

Devido à importância econômica do cafeeiro, é grande o número de pesquisas relacionadas a características agronômicas (ROGERS et al., 1999), entretanto trabalhos a nível molecular sobre o desenvolvimento e maturação dos frutos do café são escassos (RIBEIRO, 2004).

As proteínas são alvos de alguns estudos, pois elas são precursoras dos compostos nitrogenados envolvidos no sabor dos frutos (RIBEIRO, 2004). Rogers et al. (1999) caracterizou a família de proteínas mais abundante no fruto de café. São as proteínas de reserva da família 11S que representam aproximadamente 45% do total de proteínas no fruto. A presença desta proteína, de aproximadamente 55kDa, foi explorada por eletroforese bidimensional onde verificou-se as subunidades (β arms – 20kDa e α arms – 32kDa) que as formam. As proteínas de reserva 11S acumulam-se gradativamente no endosperma durante o desenvolvimento dos frutos, mas nenhuma evidência foi encontrada no perisperma, tecido

abundante na primeira metade do período de maturação de frutos – aproximadamente 14 semanas após o florescimento (ROGERS et al., 1999).

Rogers et al. (1999), também demonstrou através de 2D que vários peptídeos de 12 a 16 kDa foram encontrados em extrações de proteínas de fruto de café maduro. Estes peptídeos correspondem à degradação de produtos da subunidade α das proteínas de reserva 11S geradas pela ação de proteases.

Outras proteínas encontradas em alta quantidade em frutos, principalmente em perispermas jovens são as β-tubulinas. Estas proteínas estão presentes nos microtúbulos e por isso são consideradas marcadoras indicando divisão e expansão celular (ESTANISLAU, 2002).

Existem ainda algumas análises acerca dos componentes de frutos maduros de café. Em geral, esses estudos priorizam compostos relacionados com a qualidade da bebida (RIBEIRO, 2004), como a cafeína, os ácidos clorogênicos, a trigonelina, os diterpenos, a sacarose, e compostos fenólicos (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; MONTAVON et al., 2003a; MAZZAFERA; ROBINSON, 2000; GEROMEL et al., 2006). Mudanças no conteúdo de açúcares, mioinositol, ácidos carboxílicos e íons inorgânicos também foram estudados visando identificar mecanismos de transporte e de acúmulo desses componentes durante a maturação dos frutos de café (ROGERS et al., 1999).

Recentemente, Pereira et al. (2005b), descreveu a produção de etileno em frutos de café durante os estágios de maturação, a partir de frutos verde-cana após o final da formação do endosperma. Existem 3 enzimas controlando a biossíntese de etileno. O último passo para a biossíntese desse fitormônio é catalisado pela enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO). O fitormônio etileno desempenha um papel central na fisiologia e nos processos de desenvolvimento como germinação, crescimento, iniciação floral, senescência de flores e folhas, abscisão e amadurecimento de fruto (ABELES et al., 1992).

Na literatura existem poucos relatos das proteínas encontradas nos estágios iniciais, chumbinho e expansão do fruto, tampouco o papel que essas moléculas podem exercer em vias bioquímicas importantes para o desenvolvimento do fruto. O entendimento dos pontos gerais e específicos do desenvolvimento e da maturação dos frutos do café poderá permitir a manipulação das características associadas a esses processos (RIBEIRO, 2004).

O Projeto Genoma Café, concluído em 2004, teve como objetivo disponibilizar os modernos recursos da genômica à comunidade científica e aos diferentes segmentos da cadeia produtiva do café (VIEIRA et al., 2004). Foram seqüenciados apenas genes transcritos (ESTs – 'Expressed Sequence Tag') em diversos órgãos e tecidos, tais como folhas, raiz, flores e frutos, não só em diferentes estádios de desenvolvimento mas também a partir de plantas submetidas a diferentes situações de estresses bióticos e abióticos (MALUF; OLIVEIRA, 2007). Os 200.000 ESTs obtidos resultaram na identificação de 33.000 unigenes (VIEIRA et al., 2004). Os dados obtidos no sequenciamento permitem o desenvolvimento da Genômica Funcional, onde a expressão dos genes de interesse é comparada com genótipos que apresentem diferenças fenotípicas para uma determinada característica. Assim, o papel de um gene no processo de maturação do fruto pode, por exemplo, ser determinado através da comparação de sua expressão em frutos em diferentes estádios de desenvolvimento (MALUF; OLIVEIRA, 2007).

O tomate tem servido como sistema modelo para genética de plantas, desenvolvimento e amadurecimento de frutos. Sua importância reside ainda no fato de ser uma das principais plantas utilizadas para pesquisas fundamentais de crescimento e desenvolvimento de órgãos vegetais (MOURA et al., 2004).

LEMAIRE-CHAMLEY et al. (2005) estudaram os genes que são expressos durante os primeiros estágios de desenvolvimento de frutos de tomate, através de microarranjos ('microarrays'), e encontraram alta proporção de genes com função desconhecida no período de transição da divisão para a expansão celular (8 dias após a antese), sugerindo que estudos

futuros priorizassem esta fase. Um estudo proteômico revelou que as proteínas altamente expressas durante o desenvolvimento inicial dos frutos de tomate são principalmente relacionadas ao metabolismo de açúcar: Fructokinase 2 (implicada no acúmulo de amido) e Kunitz-type inhibitor (envolvida no mecanismo de defesa da planta contra doenças), ou ao metabolismo de aminoácidos: *β*-chain (biossíntese do triptofano) e 3-phosphoglycerate dehydrogenase (biossíntese da serina). Muitas proteínas relacionadas à fotossíntese foram identificadas: PSII, subunidade ribossomal 30S de plastídeo e Rubisco. A enzima AdoMet (S-adenosyl-Met) envolvida em vários processos celulares atuando como precursor da síntese de etileno e de fenilpropanóides (constituintes da parede celular), também foi identificada nesta fase inicial do desenvolvimento do fruto de tomate (FAUROBERT et al., 2007).

A expansão celular depende do aumento da parede celular causada pelo acúmulo de açúcares, ácidos orgânicos, íons K+ e água no vacúolo celular. Nesse sentido as Extensinas, Expansinas, Pectase lyase, Endo-β-1,4glucanase, enzimas glicolíticas entre outras proteínas de parede celular identificadas por LEMAIRE-CHAMLEY et al., (2005) contribuem para este processo.

Ainda em tomate, análises de QTLs (Locus de Caráter Quantitativo) têm resultado na identificação de locus que regulam a forma e o tamanho de frutos (GIOVANNONI, 2001) como os genes *ovate* e *sun* envolvidos na elongação celular e o gene *fw2.2*, repressor da divisão celular no desenvolvimento de fruto. Proteínas homólogas a estas expressas por estes genes podem ser encontradas em outras espécies, mas nenhuma apresenta função conhecida (TANKSLEY, 2004).

Os caminhos envolvidos nos processos de desenvolvimento e amadurecimento de frutos são únicos para plantas. Apesar de diferentes espécies partilharem caminhos comuns, diferenças na composição bioquímica e estrutural, e no desenvolvimento fisiológico e anatômico podem levar à descoberta de genes e proteínas únicos para cada espécie (KATZ, et

al., 2007). A elucidação das bases moleculares de cada evento comum representa um grande passo nas pesquisas de desenvolvimento de fruto (GIOVANNONI, 2001).

Nesse sentido, devido à importância econômica do cafeeiro arábica, o estudo das proteínas expressas nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto, mais especificamente na fase em que não ocorre crescimento visível no tamanho do fruto, pode levar ao entendimento de quais vias metabólicas estão sendo utilizadas e qual a importância da fase estacionária durante o desenvolvimento do fruto de cafeeiro arábica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar análise proteômica comparativa em dois estádios iniciais do desenvolvimento do fruto de café (*Coffea arabica*), chumbinho e expansão do fruto, correspondentes à divisão e expansão celular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar proteínas expressas diferencialmente nos dois estádios de desenvolvimento chumbinho e expansão do fruto;
- Relacionar as proteínas identificadas às vias metabólicas que participam;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado neste estudo foi o fruto de café (*Coffee arabica*), variedade IAPAR 59, nos primeiros estádios de desenvolvimento: Chumbinho (com comprimento entre 0,4 e 0,6 mm) e Expansão do fruto (com comprimento entre 1,0 e 1,2 mm). Os frutos foram coletados no campo experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) em Londrina de diversos pés de cafés no dia 7 de maio de 2007, entre 10h e 13h, após uma florada fora de época devido a um choque hídrico causado por chuva. O material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80ºC.

4.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DOS FRUTOS DE CAFÉ

A extração das proteínas totais dos frutos de café foi realizada em duas etapas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal no IAPAR em Londrina-PR. O método utilizado foi o SDS-Fenol modificado (WANG et al., 2003) também utilizado para extração de proteínas totais de folhas e raízes do cafeeiro no projeto PROTEOPAR.

Na primeira etapa, os frutos coletados foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi aliquotado em tubos Falcon de 50 mL até a marca de 20 mL e armazenado em freezer -80ºC até o momento do uso.

Para a extração das proteínas totais foi adicionado ao tubo Falcon, contendo o material vegetal macerado, 20mL de tampão I (1% PVPP, 2% β-mercaptoetanol, 1mmol/L

PMSF, em acetona). O tubo foi agitado imediatamente em vortex (Daigger Vortex Genie 2 model G-560) e mantido em gelo para não oxidar a amostra.

Para quebrar o DNA e romper a membrana e a parede celular, as amostras foram sonicadas em banho de gelo, 4 vezes de 20 s na potência de 30% para amostras de chumbinho e 5 vezes de 20 s na potência de 30% para amostras de estágio 2, pois estas ainda apresentavam "grumos" de material vegetal. O sonicador utilizado foi um Fisher Scientific Sonic Dismembrator model 500. Posteriormente, o material foi transferido para tubos de centrífuga de polipropileno com tampa de rosca e centrifugado (Centrífuga Hitachi Modelo Himac CR21G) a 10.000 rpm por 15 min a 4ºC para garantir um precipitado bem firme e evitar perda do material. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido 2 vezes em 15mL de acetona absoluta gelada após centrifugações a 10.000 rpm, por 5 min a 4ºC.

O precipitado foi ressuspendido em 15mL de TCA 10% em acetona absoluta gelada, utilizando o vortex. Depois a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min a 4ºC, descartando o sobrenadante. Este procedimento foi repetido 3 vezes ou até o precipitado ficar esbranquiçado. Em seguida, duas ressuspensões do precipitado foram feitas utilizando 15 mL de TCA 10% em água destilada gelada, duas utilizando 15 mL de acetona 80% gelada e mais uma ressuspensão do precipitado com 15 mL de etanol 80% gelado. Todas as ressuspensões da amostra foram realizadas no vortex, seguidas de centrifugações a 10.000 rpm por 5 min. a 4ºC e descarte do sobrenadante. O precipitado ficou secando durante 16h a temperatura ambiente ou até todo o etanol evaporar.

Ao precipitado obtido nesta primeira etapa foi adicionado 10mL de tampão II (30% sacarose, 2% SDS, 0,1 mol/L Tris-HCl pH 8,0, 2% β-mercaptoetanol e 1 mmol/L PMSF). As amostras foram imediatamente homogeneizadas em vortex por 30 s, e deixadas à temperatura ambiente por 20 min, agitando em vortex algumas vezes. Então, foi adicionado à amostra

12mL de fenol tamponado e os tubos foram agitados 3 vezes em vortex por 40 s. As amostras foram deixadas por 5 min a 30ºC, depois foram agitadas em vortex por 20 s e deixadas 5 min no gelo para precipitar o SDS.

Após a precipitação do SDS, os tubos contendo a amostra foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 4ºC para separar as fases. A fase fenólica (aproximadamente 10mL), contendo as proteínas solubilizadas, foi transferida para um tubo de centrífuga novo. Então, à fase fenólica foram adicionados 3 volumes de acetato de amônio em metanol absoluto gelado na concentração de 0,1 mol/L. Os tubos foram deixados por 40 min em freezer -20ºC para que houvesse precipitação das proteínas, depois foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4ºC e o sobrenadante contendo o fenol e interferentes foi descartado.

O precipitado foi ressuspendido duas vezes em 15 mL de acetato de amônio em metanol absoluto gelado na concentração de 0,1 mol/L, centrifugando a 6000 rpm, por 5 min a 4ºC. Outras três ressuspensões utilizando 15mL de acetona 80% e três com 15 mL de etanol 80% foram feitas através de homogeneização das amostras em vortex, centrifugações a 10.000 rpm a 4ºC e descarte do sobrenadante.

O precipitado ficou secando por aproximadamente 24h a temperatura ambiente. Para ressuspender o precipitado foi utilizado 400 μL de tampão de lise (7 mol/L uréia, 2 mol/L tiouréia, 4% CHAPS, 40 mmol/L DTT) e estocado em freezer -20ºC.

4.3 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS

A dosagem das proteínas foi feita pelo método de BRADFORD (1976) em triplicata. O método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante ‘Coomassie Brilliant Blue’ G250. O princípio deste método esta baseado no fato que esse corante coexiste em duas formas de cores diferentes, a cor vermelha e a cor azul. A

forma da cor vermelha é rapidamente convertida na outra forma, devido à interação entre o corante e proteínas que contém aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas (ZAIA et al., 1998). Como padrão foi utilizada a albumina bovina (Q-bio). As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-16508C) a 595 nm. A comparação dos resultados de absorbância com a curva padrão permite a determinação da concentração da proteína.

4.4 PRIMEIRA DIMENSÃO

Para a isoeletrofocalização foram utilizadas tiras comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG). As faixas de pH utilizadas foram pH 3-10 linear em tiras de 11 cm e pH 4-7 linear em tiras de 13 cm. Tais tiras foram rehidratadas e posteriormente submetidas a isoeletrofocalização, como descrito detalhadamente a seguir.

4.4.1 Rehidratação das Tiras de Gradiente de pH Imobilizado

Para a rehidratação das tiras de gradiente de pH 3-10 foi adicionado ao volume das amostras correspondente a 600 μg de proteína (57,58 μL para chumbinho e 46,76 μL para expansão do fruto), 1,25 μL de anfólitos '*IPG buffer pH3-10'* e tampão de rehidratação ('*DeStreak Rehydration Solution'***)** para completar o volume de 200 μL nas tiras de 11 cm, segundo recomendações do fabricante. Para as tiras de pH 4-7 foram utilizados 1200 μg de proteína (115,16 μL para chumbinho e 93,52 μL para expansão do fruto),1,25 μL de anfólitos '*IPG buffer pH4-7'* e tampão de rehidratação para completar o volume de 250 μl nas tiras de 13 cm.

A rehidratação foi feita em um suporte com canaletas ('*Reswelling Tray'*) da seguinte forma: após aplicar a amostra em uma das canaletas o plástico que protege o gel das

tiras de IPG foi retirado cuidadosamente e as tiras foram posicionadas com o gel voltado para baixo na canaleta sobre a amostra tomando o cuidado para não ficarem bolhas entre a tira e a canaleta. Esse processo foi repetido para cada uma das amostras a serem analisadas. Feito isso, cada canaleta foi coberta com 1mL de óleo mineral (‘*Dry Strip Cover Fluid’).* Para que o gel absorvesse a solução contendo as proteínas, o suporte com canaletas carregado foi deixado à temperatura ambiente durante 15 horas.

4.4.2 Isoeletrofocalização

Depois de rehidratadas as tiras de IPG foram transferidas das canaletas para um suporte de cerâmica com óxido de alumínio (‘*Manifold’*), posicionado sobre o aparelho IPGphor II (GE Healthcare) onde a isoeletrofocalização foi conduzida. Cada tira foi colocada com o gel voltado para cima fazendo contato com os eletrodos que foram encaixados nas extremidades básicas e ácidas do gel, sobre pedaços de papel filtro umedecidos, e então cobertas com 4 mL de óleo mineral.

As condições para a isoeletrofocalização (IEF) foram: temperatura de 20ºC e amperagem de 50 μA por tira. A IEF ocorreu em quatro etapas de 500 Volts/hora (Vh), 800Vh, 7000Vh e 3700Vh, totalizando 12000Vh para as tiras de IPG de 11 cm, e em cinco etapas de 200Vh, 500Vh, 800Vh, 11300Vh e 18000Vh, totalizando 30800Vh para as tiras de IPG de 13 cm, pois para estas foi utilizado o dobro de proteínas, ou seja, 1200μg. Após a IEF as tiras de IPG foram colocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca e imediatamente congeladas a -20ºC onde permaneceram armazenadas até posterior utilização.

4.5 EQUILÍBRIO DAS TIRAS DE GRADIENTE DE pH IMOBILIZADO

Para a realização da segunda dimensão, os tubos de ensaio contendo as tiras de IPG submetidas à primeira dimensão foram retirados do freezer -20ºC. Em cada um dos tubos foram adicionados 5mL de tampão de equilíbrio (6 mol/L uréia, 75 mmol/L Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol, 2% SDS e 0,002% bromofenol) contendo 125 mg de DTT. Após agitação leve durante 20 min em agitador orbit shaker (Lab-Line), a solução de cada um dos tubos foi substituída por 5 mL de tampão de equilíbrio contendo 200 mg de iodoacetamida. Nessa solução, as tiras foram deixadas por mais 20 min sob agitação.

Após o equilíbrio, as tiras de IPG foram submersas por 10 s em tampão Tris-glicina (250mmol/L Tris base, 1,92mol/L glicina e 1% SDS) e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

4.6 SEGUNDA DIMENSÃO

A segunda dimensão, que envolve a realização de uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), foi realizada em cuba tipo "*SE 600 Ruby"* da GE Healthcare. Foram preparados géis de separação na concentração de 11,7% (38,67% acrilamida, 1,33% bisacrilamida, 1,5 mol/L Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, 10% persulfato de amônio, temed) no dia anterior. As tiras de IPG foram posicionadas horizontalmente no topo dos géis em contato com os mesmos. A manutenção da tira junto à superfície do gel foi garantida pela adição de 5mL de gel de agarose 0,5% em tampão Tris-glicina contendo 0,002% de bromofenol.

A corrente, durante a eletroforese, foi limitada a 30 μA/gel na primeira meia hora da corrida e a 60μA/gel até o azul de bromofenol atingir 1 cm da parte inferior do gel. As demais

condições fixadas foram 270V, 50W e temperatura de 12ºC mantida por refrigeração com circulador termostático (Banho Ultratermostatizado MA-184 da Marconi).

4.7 VISUALIZAÇÃO DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO

As proteínas nos géis bidimensionais foram coradas utilizando o corante Coomassie Blue R250 como descrito a seguir. Após a eletroforese, os géis foram deixados por 30 min sob agitação num recipiente contendo solução de fixação (40% etanol e 10% ácido acético). Essa solução foi então descartada e os géis foram cobertos com a solução 0,02% de Coomassie R250, preparada conforme recomendações do fabricante (GE Healthcare), permanecendo sob agitação durante toda a noite (*overnight*). Em seguida os géis foram descorados com solução descorante (20% etanol e 5% ácido acético) sob agitação, trocando a solução nos primeiros 15 min e depois de 1 h, ou até que o corante de fundo tenha sido reduzido e conseqüentemente os pontos protéicos (*spots*) fossem visualizados.

4.8 ANÁLISE DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO

As imagens dos géis bidimensionais foram digitalizadas utilizando o scanner '*Biochemi UVP'* da GE Healthcare e as imagens obtidas foram posteriormente analisadas no Programa ImageMaster Platinum da mesma empresa. Os pontos protéicos foram detectados automaticamente pelo programa e em seguida foram feitas correções manuais. Os spots foram quantificados em unidades de volume (área *versus* intensidade) e a normalização foi efetuada dividindo-se o volume de cada spot pela soma total dos volumes de todos os spots, de forma que cada volume normalizado representa uma porcentagem do volume total. Para a determinação do peso molecular e do ponto isoelétrico (pI), utilizaram-se padrões GE

Healthcare, os quais foram plotados em coordenadas y e x dos géis de segunda dimensão. Através do programa o peso molecular e do pI (ponto isoelétrico) de cada spot foi determinado.

Os géis representativos de cada condição foram comparados para verificar diferença de expressão. Para considerar uma proteína expressa apenas em um dos estádios de desenvolvimento o critério utilizado foi o aparecimento ou desaparecimento da proteína do gel. Para considerar diferença quantitativa de expressão, foi considerado aumento ou diminuição de pelo menos uma vez e meia o volume normalizado.

4.9 RETIRADA DAS PROTEÍNAS DOS GÉIS OBTIDOS APÓS A SEGUNDA DIMENSÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA MALDI-TOF MS/MS

As proteínas foram recortadas dos géis, com o auxílio de ponteiras (1mL) estéreis cortadas na ponta de forma que o diâmetro fosse do tamanho dos pontos proteicos. Os fragmentos de gel contendo as proteínas recortadas foram colocados em placas de 96 poços para serem desidratados e descorados a partir da adição de 80 μL de uma solução contendo 50% acetonitrila e 25 mmol/L bicarbonato de amônio em cada poço, e incubação à temperatura ambiente, trocando a solução a cada 30 min até a retirada completa do corante. Após a retirada da solução de acetonitrila e bicarbonato de amônio, os fragmentos de gel foram tratados por mais 10 min com 20 μL de acetonitrila 100% ou até ficarem brancos e petrificados. A solução de acetronitrila 100% foi removida e os fragmentos secaram completamente à temperatura ambiente. Os fragmentos de gel foram trasferidos para tubos de microcentrífuga (0,5 mL) de polipropileno (PP) translúcido para dar continuidade aos procedimentos. Foram adicionados 30 μL de 10 mmol/L de DTT e deixado por 30 min à temperatura ambiente para reduzir as proteínas. Em seguida, para alquilar as proteínas, a

solução das placas foi substituída por 100 mmol/L de iodoacetamida, deixado por 30 min à temperatura ambiente e então, esta solução foi removida. Duzentos microlitros de acetonitrila 100% foram adicionados em cada poço para desitratar os fragmentos. Esta solução foi removida completamente depois dos fragmentos terem se tornado brancos e petrificados (aproximadamente 5 min à temperatura ambiente). Os fragmentos foram rehidratados com 200 μL de 100 mmol/L de bicarbonato de amônio por 10 min à temperatura ambiente, e então, esta solução foi removida. Mais uma vez os fragmentos foram desitratados por 5 min através da adição de 200 μL de acetonitrila 100%. O excesso de acetronitrila foi removido e os tubos foram colocados abertos numa centrífuga à vácuo para que os fragmentos secassem completamente (aproximadamente 3 min). Enquanto isso, a solução contendo trispina foi preparada (1000 μL de 50 mmol/L bicarbonato de amônio gelado para 20 μg de tripsina) e mantida gelada até o uso. Trinta microlitros desta solução foram adicionados a cada tubo contendo as amostras de forma a cobrir os fragmentos de gel. Estes ficaram incubados por 10 min em gelo para que a tripsina penetrasse no gel sem que a digestão tivesse iniciado. As amostras foram centrifugadas por 30 s e então, o excesso da solução de tripsina foi removido. Foram adicionados 5 μL de 50 mmol/L bicarbonato de amônio nas amostras, os tubos foram agitados em vortex, centrifugados por 30 s e deixados durante a noite (aproximadamente 15 h) à 37ºC para realizar a digestão.

A extração dos peptídeos produzidos pela digestão foi feita em três passos: 1) 30 μL de 50 mmol/L bicarbonato de amônio foram adicionados aos tubos contendo os fragmentos de gel e incubados por 10 min agitando ocasionalmente em vortex. Então, foram feitas as centrifugações das amostras por 30 s e os sobrenadantes foram tranferidos para novos tubos de microcentrífiga (de PP); 2) 30 μL do tampão de extração (50% acetonitrila e 5% ácido fórmico) foi adicionado aos tubos contendo os fragmentos de gel e a solução de bicarbonato de amônio. As amostras foram encubadas por 10 min, agitando ocasionalmente em vortex. Em seguida, os

tubos foram centrifugados por 30 s e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos; 3) Novamente, 30 μL do tampão de extração foram adicionados aos tubos, seguindo o mesmo procedimento do passo 2. O volume do extrato foi então reduzido a aproximadamente 20 μL por evaporação na centrífuga à vácuo a temperatura ambiente, por cerca de 2 h. Enquanto isso, a solução matriz saturada (~10 g/L) de ácido 4-hydroxy-a-cyanocinnamic (GE Healthcare) foi preparada. Uma alíquota da matriz (pó seco) foi solubilizada em 200 μL de solução de matriz em um tubo de microcentrífuga, e agitado em vortex por 60 s. Depois, o excesso não solubilizado da matriz precipitou e apenas o sobrenadante foi utilizado. Um μL da matriz foi misturado à 1 μL do extrato, através de várias ressuspenssões, e os dois microlitros foram então *spotados* na placa do MALDI-TOF (Shimadzu - Brucker Autoflex). Depois de secos, a placa foi colocada no MALDI-TOF para análise dos peptídeos.

4.10 ANÁLISE NO MALDI-TOF E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

O programa utilizado para a obtenção dos espectros foi o Flex Control 2.0 (Shimadzu) no método padrão que vem sendo utilizado no Laboratório de Bioquímica (Núcleo Fixação de Nitrogênio) da UFPR com bons resultados de espectros. Espectros de vários tiros a laser de nitrogênio foram somados para gerar o perfil de massa dos peptídeos para cada proteína digerida. Os espectros obtidos foram analisados no programa Flex Analysis 2.0 (Shimadzu) e as massas correspondentes aos picos de cada amostra foram exportadas para o programa PIUMS (Protein Identification Using Mass Spectrum), onde através de consulta aos bancos de dados baseados em ESTs de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (http://harvest.ucr.edu/) foi possível obter a sequência da proteína que corresponde cada amostra. Os parâmetros usados para a busca de dados foram: a) carbomido-metilação da cisteína; b) oxidação parcial de resíduos de metionina; c) uma clivagem tríptica perdida; e d)

sem limitar a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas. A busca da função conhecida da proteína correspondente à seqüência obtida no PIUMS foi realizada no NCBI-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), através da comparação desta, com a seqüência publicada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO FRUTO IMATURO DE CAFÉ

O método permitiu a extração de uma grande quantidade total de proteínas, pois foi observada nos géis bidimensionais a presença de proteínas ácidas, básicas, de altas e de baixas massas moleculares.

As várias etapas desse método, apesar de torná-lo longo e laborioso, possibilitaram a eliminação de muitos interferentes, garantindo géis de boa qualidade. Outro aspecto favorável foi o fato de que a solução usada para solubilizar as proteínas do precipitado extraído possui constituição praticamente igual à solução de rehidratação. Isso facilitou a absorção das proteínas no gel de poliacrilamida durante a etapa de rehidratação das tiras de IPG.

5.2 REPRODUTIBILIDADE DOS GÉIS

Após a digitalização das imagens dos géis bidimensionais, cada gel foi analisado individualmente. A detecção automática dos spots, realizada através do programa de análise de imagens, é muito sensível. Ela considera toda e qualquer alteração de intensidade do gel de poliacrilamida (manchas, por exemplo) como spot, mascarando resultados. Por esse motivo são necessárias correções manuais para garantir que os spots marcados representem somente pontos protéicos.

Para cada estádio de desenvolvimento avaliado (chumbinho e expansão do fruto) foram feitos três géis bidimensionais utilizando a mesma amostra devido ao pouco material vegetal disponível para coleta. Essas repetições foram necessárias para analisar cada condição

fisiológica individualmente. O gel que apresentou maior número de spots foi escolhido como gel de referência para comparação entre as diferentes condições (Fig. 3). Se um spot foi detectado apenas em uma das repetições ele não foi considerado expresso na condição analisada e, portanto, não foi marcado no gel de referência. Nesse sentido, foram considerados apenas spots presentes nas três repetições do mesmo estádio de desenvolvimento do fruto.

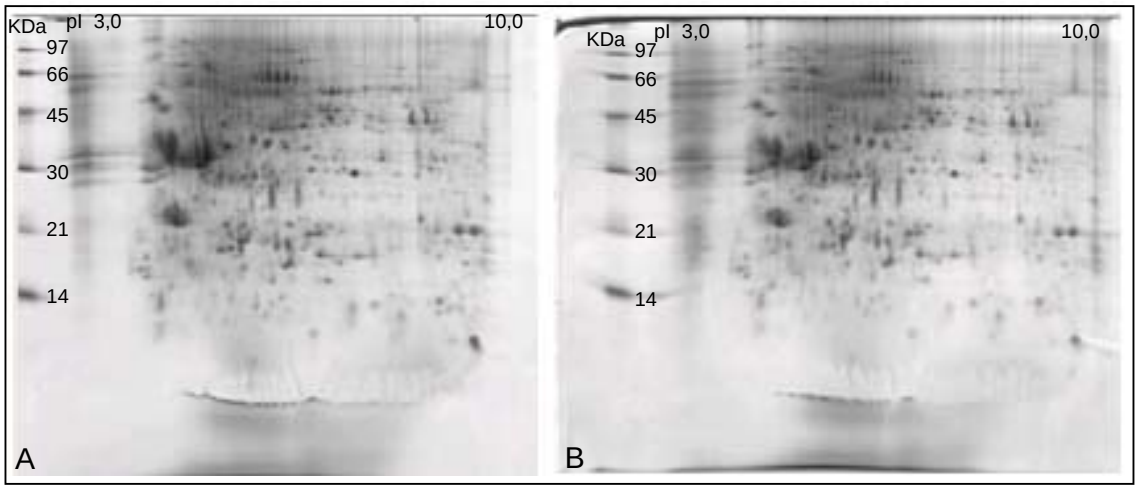

FIGURA 3 – Géis de referência. Imagem dos géis de referência para cada estádio de desenvolvimento do fruto de cafeeiro: em A chumbinho e B expansão do fruto. A figura apresenta o perfil padrão em cada condição. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 11 cm com um gradiente de pH 3-10, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue.

A boa reprodutibilidade dos géis, ou seja, a semelhança do perfil protéico padrão (Fig. 3) é essencial para a análise de comparação dos géis bidimensionais. A reprodutibilidade entre as repetições do mesmo estádio de desenvolvimento do fruto, mas principalmente no caso da comparação entre os dois estádios de desenvolvimento, possibilita a visualização de perfis protéicos diferentes e facilita a sobreposição de imagens feitas no programa de análise dos géis (Fig 4).

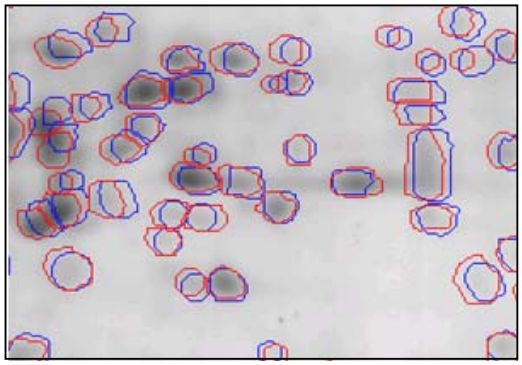

FIGURA 4 – Sobreposição dos géis de referência. Imagem aproximada da sobreposição dos spots: os círculos em vermelho representam os spots correspondentes ao estádio chumbinho e os círculos em azul representam os spots correspondentes ao estádio de expansão do fruto. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, pH 3-10, 11 cm; a SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 11,7% e as proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

5.3 MÉTODO DE COLORAÇÃO

Embora o uso de apenas um método para detectar proteínas em géis bidimensionais possa excluir algumas proteínas (GIOMETTI et al., 2002), a escolha do corante Coomassie Blue para visualizar as proteínas nos géis bidimensionais foi feita devido aos bons resultados obtidos com o uso deste corante em outros projetos desenvolvidos no laboratório. Além disso, o método de coloração com Coomassie Blue permite a utilização de maior quantidade de amostra no gel e garante a existência de quantidade suficiente de proteína para a sua subseqüente identificação, portanto facilita a quantificação (abundância relativa de cada proteína) e as análises comparativas de expressão.

5.4 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Nos géis de poliacrilamida que compreendiam faixas de pH entre 3 e 10 foram utilizados 600 µg/gel de proteína. Esta quantidade permitiu a visualização de spots bem definidos nos géis bidimensionais.

Görg et al. (2004) sugerem que até 1 mg de proteína pode ser utilizado sem poluir a imagem dos géis com spots sobrepostos e, apesar de relatos na literatura de que altas concentrações de proteínas reduzem a resolução dos géis (O'FAREEL 1975; CHANG et al.; 2003; HESKETH et al.; 2002), foram utilizados 1200 μg/gel de proteínas na tentativa de aumentar o número de spots detectados na faixa de pH entre 4 e 7. Enquanto a tira de IPG pH 3-10 utilizada possuía esse intervalo de pH distribuído linearmente em 11 cm, a tira de IPG pH 4-7 utilizada possuía esse intervalo de pH distribuído linearmente em 13 cm, ou seja, o espaço em que as proteínas foram separadas aumentou 2 vezes de tamanho (Fig 5).

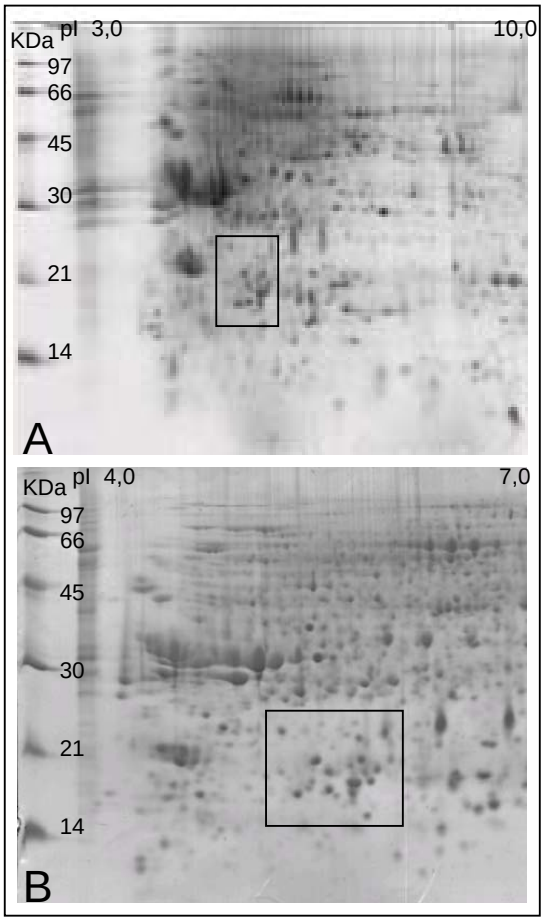

FIGURA 5 – Diferença na separação dos spots com a utilização de diferentes faixas de pH. A) Imagem de um gel onde a isoeletrofocalização foi realizada em tira de IPG pH 3-10, 11 cm. O quadrado compreende a faixa de pH 5-7. B) Imagem de um gel onde a isoeletrofocalização foi realizada em tira de IPG pH 4-7, 13 cm. A imagem mostra a separação das proteínas na faixa que compreende pH 5-7.

Como uma maior quantidade de amostra foi aplicada, o tempo para isoeletrofocalização precisou ser maior para garantir a separação das proteínas. Foi acrescentado ao programa de isofocalização um passo a mais com aplicação de alta voltagem (8.000 Volts).

Os géis bidimensionais com o dobro da concentração de proteína apresentaram boa resolução. Foram detectados spots fracos que provavelmente não seriam percebidos com o corante Coomassie Blue se fossem aplicadas amostras com menor concentração de proteína.

5.5 CONCENTRAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

A segunda dimensão da eletroforese bidimensional foi feita com géis de poliacrilamida a 11,7%, pois essa concentração já havia sido estabelecida no laboratório com amostras de proteína de folha de cafeeiro em projetos desenvolvidos anteriormente.

Nos dois primeiros géis bidimensionais, com faixas de pH entre 3 e 10, foram aplicadas amostras de diferentes estádios de desenvolvimento do fruto (chumbinho e expansão dos frutos). O tempo da corrida SDS-PAGE foi estabelecido pelo fronte de azul de bromofenol. Quando o azul de bromofenol atingiu 1 cm da parte inferior do gel a corrente foi interrompida, totalizando em média 5 horas e meia de corrida. A visualização desses géis bidimensionais mostrou que as proteínas haviam migrado bastante e que houve perda das proteínas de baixa massa molecular (Fig. 6), por isso nos demais géis a corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol atingiu 3 cm da parte inferior do gel. Os géis em que houve perda de proteína não foram utilizados na análise comparativa, pois a localização dos spots nos géis estava muito distante do perfil padrão dos demais géis (Fig. 3) e isso aumentaria as chances de erro durante as análises mascarando resultados.

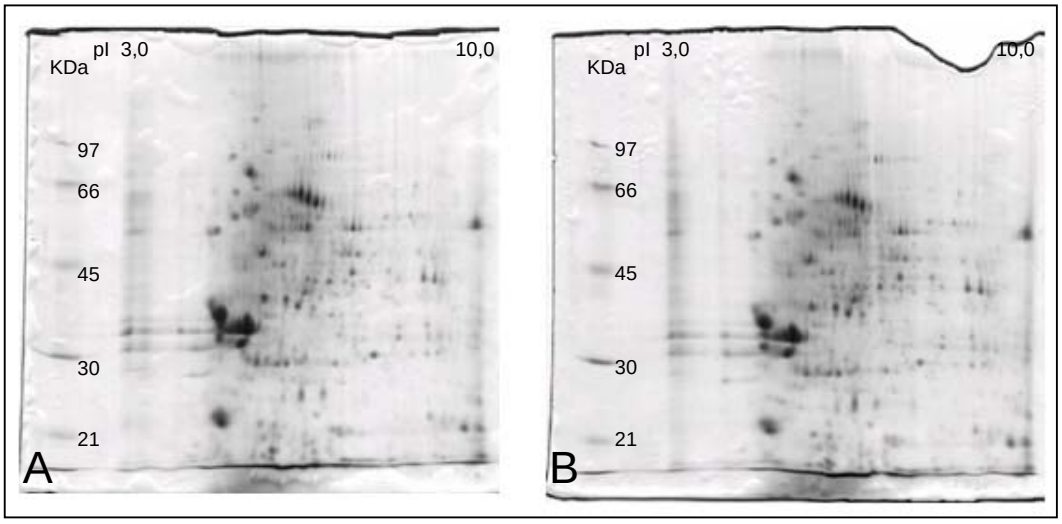

FIGURA 6 – Géis bidimensionais com perda de proteína. Imagens dos géis que apresentaram perda de proteínas de baixo peso molecular devido ao tempo de corrida. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, pH 3-10, 11 cm; a SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 11,7% e as proteínas foram coradas com Coomassie Blue. A) Chumbinho. B) Expansão do fruto.

5.6 DETECÇÃO DOS SPOTS

A figura 7 mostra os géis com o número aproximado de spots bem definidos determinados em cada gel de referência nos estádios de desenvolvimento do fruto nas diferentes faixas de pH. Inúmeros outros spots não puderam ser adequadamente contados, pois a separação não apresentou resolução suficiente para separá-los na região de massa molecular ~30 kDa e pI em torno de 5. Além disso, é difícil prever quantas proteínas estão representadas nos pontos protéicos detectados, pois frequentemente produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel bidimensional (CHAVES, 2004; GYGI et al., 2000; ZHANG; CHAIT 2000; HANCOCK et al., 2002).

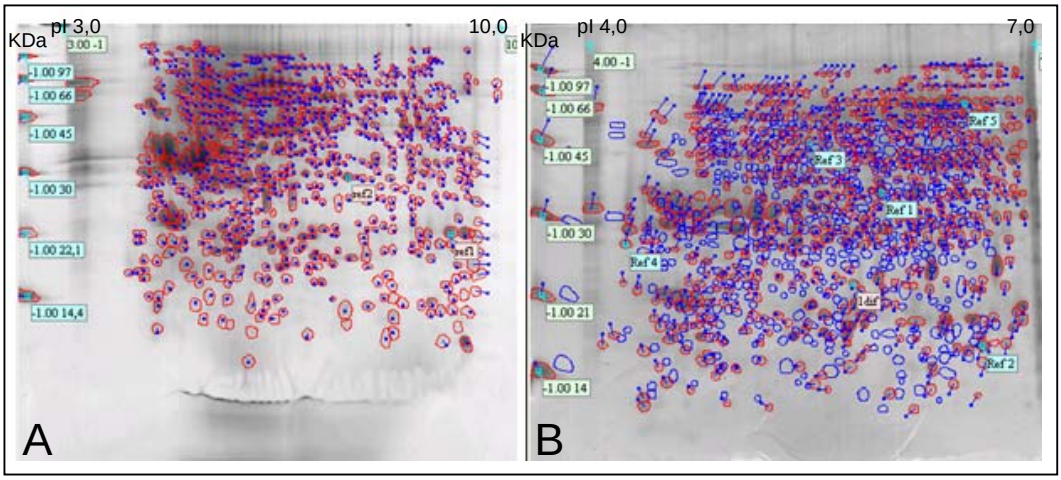

FIGURA 7 – Sobreposição dos géis contendo proteínas do chumbinho e do estádio de expansão do fruto. Análise dos géis no programa ImageMaster Platinum (GE Healthcare). Em A os círculos vermelhos representam os spots correspondentes ao estádio chumbinho e os pontos azuis representam os spots correspondentes ao estádio de expansão do fruto. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, pH 3-10, 11 cm; a SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 11,7% e as proteínas foram coradas com Coomassie Blue.. Foram detectados aproximadamente 300 spots bem definidos. Em B os círculos em vermelho representam os spots correspondentes ao estádio chumbinho e os círculos em azul representam os spots correspondentes ao estádio de expansão do fruto. A isoeletrofocalização foi feita em tiras IPG, pH 4-7, 13 cm; a SDS-PAGE foi realizada em géis de poliacrilamida 11,7% e as proteínas foram coradas com Coomassie Blue.. Foram detectados aproximadamente 500 spots bem definidos.

Outro fato observado por pesquisadores (GIOMETTI et al., 2002; LEE et al., 2003; HESKETH et al., 2002) é a presença da mesma proteína em localizações diferentes do gel referencia. Isso ocorre devido a modificações pós-traducionais, que podem alterar o ponto isoelétrico e a massa molecular das proteínas. As alterações no pI das proteínas são decorrentes da fosforilação, acetilação e adição de grupos glicosídicos. Já as modificações da massa molecular podem ser devido à ação de proteases, quando a massa molecular encontrada é menor que a esperada; ou associação com outras proteínas, quando a massa molecular é superior à esperada (CHAVES, 2004; GIOMETTI et al., 2002; LEE et al., 2003; HESKETH et al., 2002; WILDGRUBER et al., 2002).

Considerando que cada spot represente apenas uma proteína, foram obtidos, através do programa de análise de imagens, o ponto isoelétrico e a massa molecular aproximada de

cada spot encontrados nos géis de referência em cada estádio de desenvolvimento do fruto nas diferentes faixas de pH analisadas.

5.7 ESTUDO COMPARATIVO DE PROTEOMAS DE FRUTO DO CAFEEIRO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

5.7.1 Análises Comparativas na Faixa de pH 3 a 10

A figura 8 apresenta os perfis das proteínas do fruto de cafeeiro nos diferentes estádios de desenvolvimento (chumbinho e expansão dos frutos). Os géis apresentaram perfis protéicos semelhantes. As proteínas expressas pelo fruto concentraram-se no lado esquerdo do gel, o qual corresponde ao intervalo de pH ácido da tira de IPG usada na primeira dimensão, ou seja, a maioria das proteínas do fruto tem seu ponto isoelétrico (pI), entre 4 e 6. Este perfil protéico foi esperado, pois os frutos foram colhidos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar qualquer alteração no material vegetal. A faixa de pH onde ocorreu maior concentração de spots correspondeu ao pH fisiológico da célula vegetal, 7 no citoplasma e 5,5 no vacúolo (TAIZ e ZEIGER, 2004).

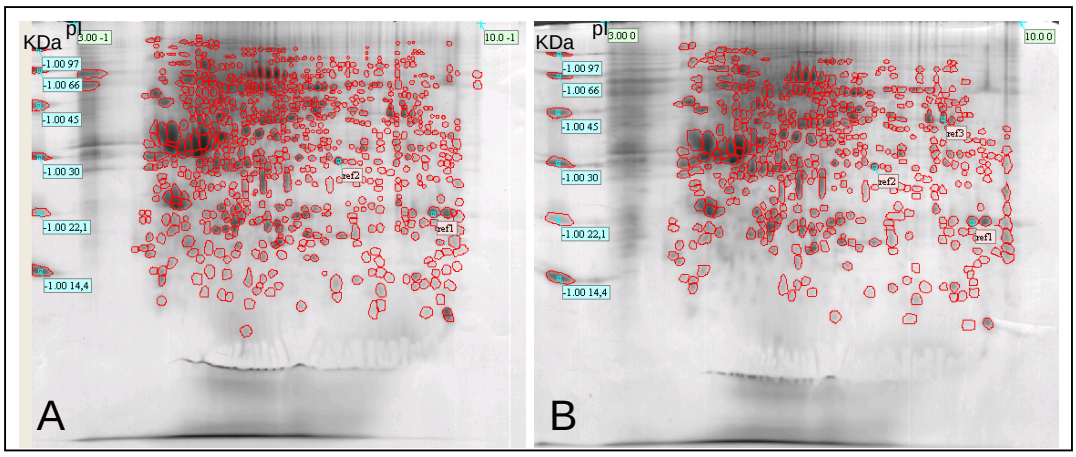

FIGURA 8 – Perfis protéicos do fruto de cafeeiro em diferentes estádios de desenvolvimento na faixa de pH 3-10. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 11 cm com um gradiente de pH 3-10, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue. A) Proteínas expressas na fase de chumbinho. B) Proteínas expressas na fase de expansão do fruto.

Todos os géis bidimensionais referentes a cada condição avaliada foram analisados fazendo o uso dos mesmos parâmetros de tonalidade, contraste e nitidez. A comparação entre os géis de referência nos dois estádios de desenvolvimento, chumbinho e expansão do fruto, apresentou alterações no nível de expressão relativa, após normalização. Alguns spots foram expressos em apenas um dos estádios de desenvolvimento do fruto.

a) Quanto ao nível de expressão relativa dos spots

As proteínas foram consideradas super-expressas quando a intensidade de um spot em um dos estádios de desenvolvimento do fruto foi pelo menos 1,5 vezes maior do que no outro estádio (Fig. 9).

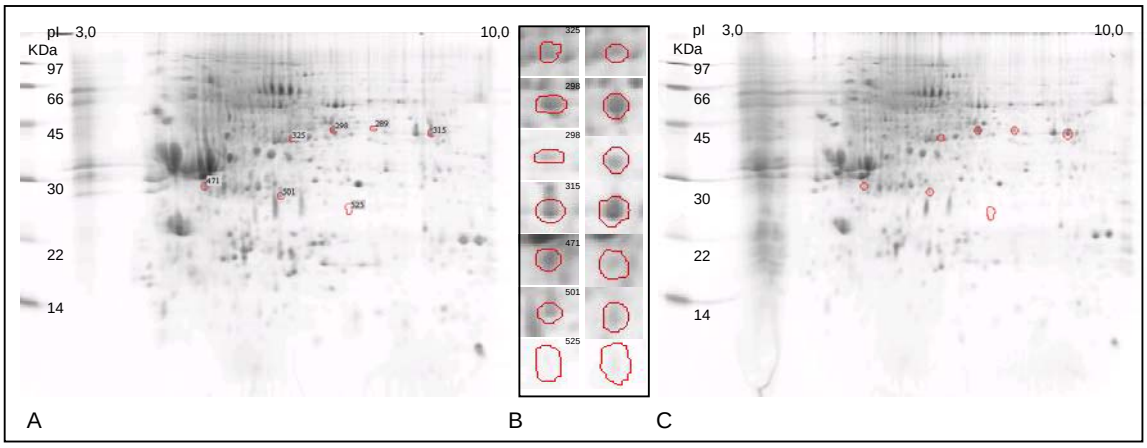

FIGURA 9 – Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão diferencial em diferentes estágios de desenvolvimento. Em A proteínas expressas na fase de chumbinho, C proteínas expressas na fase de expansão do fruto e B imagem ampliada dos spots diferencialmente expressos nas duas fases. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 11 cm com um gradiente de pH 3-10, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue.

As análises comparativas entre os dois estádios de desenvolvimento demonstraram que 12 spots apresentaram níveis de expressão com intensidade relativa variando de 1,5 a 2,0 vezes. Apenas um spot expresso diferencialmente apresentou intensidade relativa maior que

2,0 vezes. A tabela 1 mostra em qual estádio de desenvolvimento do fruto os spots apresentam nível de expressão maior e qual é a intensidade relativa de expressão de cada spot.

Este resultado foi diferente do esperado em que os spots teriam maior expressão no estádio de expansão do fruto e não expressão maior no primeiro estádio de desenvolvimento do fruto (chumbinho), como os spots 707, 174 e 471 (Tab. 1).

b) Quanto à presença ou ausência de spots

As análises comparativas demostraram que 3 spots (519, 590 e 608) tiveram expressão apenas no primeiro estádio de desenvolvimento do fruto, chumbinho (Fig. 10). Diferentemente do esperado que era que os spots fossem expressos no estádio de expansão dos frutos, aumentando ou mantendo o nível de expressão com o desenvolvimento do fruto e não que tivessem expressão apenas no primeiro estádio de desenvolvimento do fruto (Tab. 1).

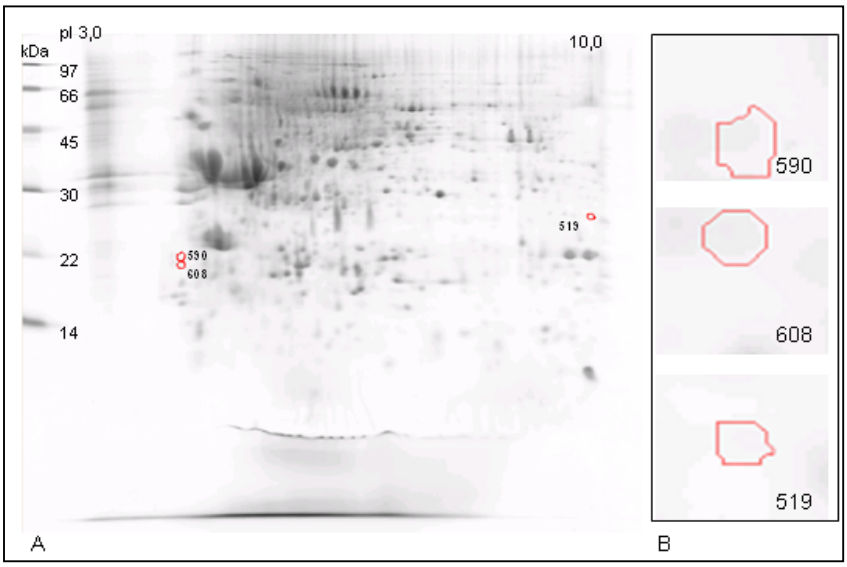

FIGURA 10 – Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão apenas em um estádio de desenvolvimento: chumbinho. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 11 cm com um gradiente de pH 3-10, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue.

TABELA 1 – Proteínas do fruto do café expressas diferencialmente nos diferentes estádios de desenvolvimento, chumbinho e expansão de frutos, na faixa de pH 3-10.

Número Spot	Vol (%)*	Estádio de desenvolvimento	pI aparente	MM aparente
519	---	apenas chumbinho	9	27
590	---	apenas chumbinho	4	22
608	---	apenas chumbinho	4	21
707	2,45	chumbinho	8	13
174	1,54	chumbinho	5	60
194	1,77	expansão do fruto	8	57
238	1,70	expansão do fruto	9	50
289	1,50	expansão do fruto	8	44
298	1,53	expansão do fruto	7	43
315	1,72	expansão do fruto	9	42
325	1,51	expansão do fruto	7	40
349	1,50	expansão do fruto	9	39
471	1,56	chumbinho	5	29
501	1,54	expansão do fruto	6	28
525	1,80	expansão do fruto	7	26
552	1,62	expansão do fruto	6	24

Legenda: * valor referente a quantas vezes o spot foi expresso em um estádio em relação ao outro.

5.7.2 Análises comparativas da faixa de pH 4 a 7

Devido à concentração de proteínas na faixa ácida do gel bidimensional, mais especificamente a série de proteínas com ponto isoelétrico entre 4 e 5 e massa molecular de aproximadamente 30 kDa foram utilizadas as tiras de IPG com intervalos de pH entre 4 e 7, para uma melhor separação e visualização das proteínas. Como existem poucos spots na faixa

básica dos géis bidimensionais de pH 3-10, e estes spots estavam bem definidos, optou-se por não fazer géis com faixas de pH entre 6 e 10.

Na figura 11, estão demonstrados os perfis protéicos do fruto de cafeeiro nos diferentes estádios de desenvolvimento (chumbinho e expansão dos frutos), na faixa de pH entre 4 e 7.

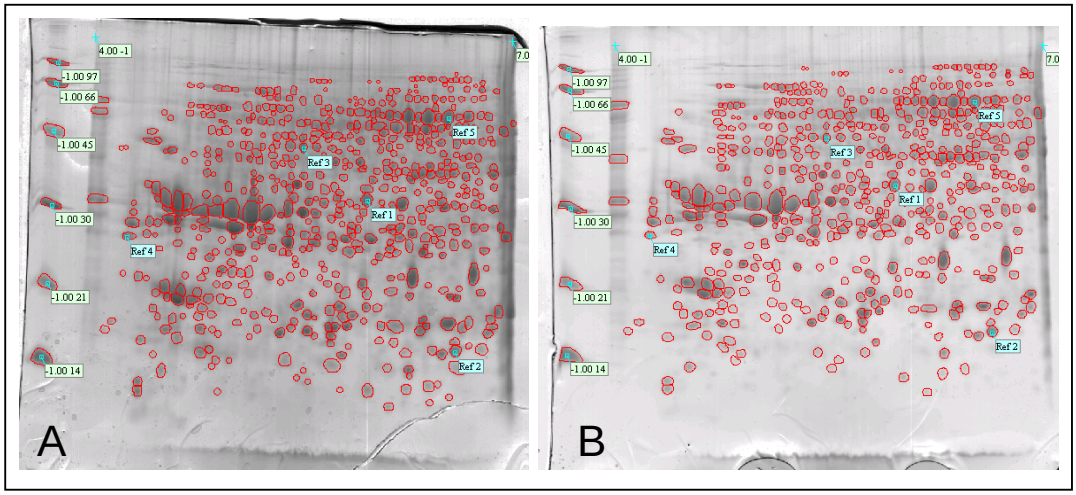

FIGURA 11 – Perfis protéicos do fruto de cafeeiro em diferentes estádios de desenvolvimento na faixa de pH 4-7. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 13 cm com um gradiente de pH 4-7, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue. A) Proteínas expressas na fase de chumbinho. B) Proteínas expressas na fase de expansão do fruto.

O número de pontos protéicos detectados na faixa de pH 4-7, que é uma faixa relativamente estreita, foi maior que o número total de spots detectados na faixa de pH mais ampla que compreende pH 3-10. Aproximadamente 300 pontos protéicos foram detectados na faixa de pH 3-10 e 500 pontos protéicos na faixa de pH 4-7. Isso é possível porque a utilização de faixas mais estreitas de pH para a isoeletrofocalização e o pré-fracionamento das amostras contribuem na diminuição da co-migração de proteínas em géis bidimensionais (CHAVES, 2004). Além disso, foi aplicado o dobro de proteínas nos géis que compreendiam a faixa de pH 4-7, pelo motivo que já foi mencionado.

Foi observado que esses géis apresentaram boa resolução, apesar de conter o dobro de proteína que os géis na faixa de pH 3-10, e que as proteínas que estavam concentradas na faixa de pH entre 4 e 6 ficaram bem resolvidas (Fig. 11).

a) Quanto ao nível de expressão dos spots

As análises comparativas entre os dois estádios de desenvolvimento demonstraram que 10 spots apresentaram níveis de expressão com intensidade relativa variando de 1,5 a 2,0 vezes. Apenas um spot expresso diferencialmente apresentou intensidade relativa maior que 2,0 vezes. A tabela 2 mostra em qual estádio de desenvolvimento do fruto os spots apresentaram nível de expressão maior e qual é a intensidade relativa de expressão de cada spot. Contrariando o esperado, os spots 9151, 9047 e 9276 apresentaram-se mais expressos no início do desenvolvimento do fruto.

b) Quanto à presença ou ausência de spots

As análises comparativas demonstraram que 3 spots tiveram expressão em apenas um dos estádios de desenvolvimento, sendo que a presença de 1 deles foi observada apenas em géis onde foram aplicadas amostras de chumbinho e 2 em géis onde foram aplicadas amostras do estádio de expansão do fruto (Fig. 12)

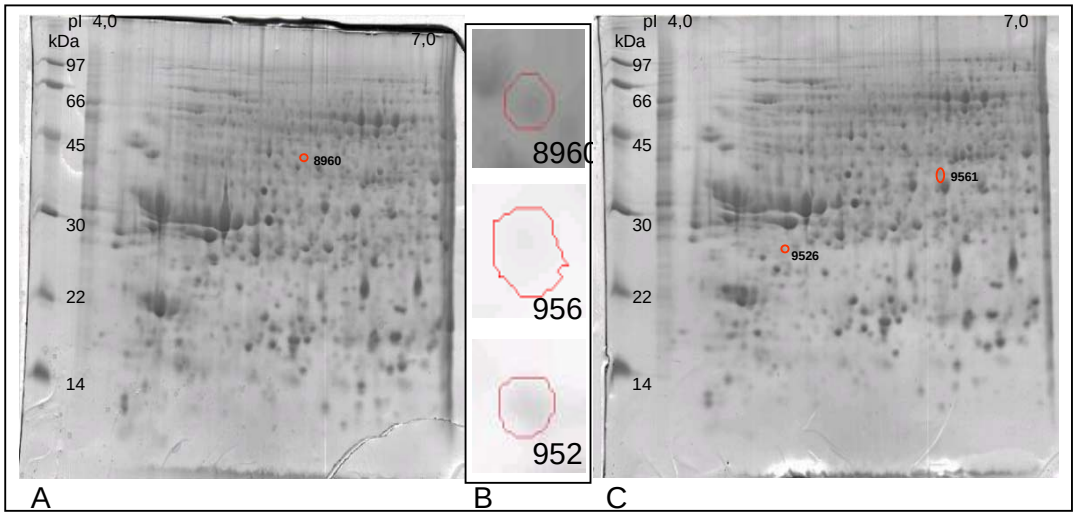

FIGURA 12 – Imagens detalhadas de proteínas de fruto de cafeeiro com expressão apenas em um estádio de desenvolvimento na faixa de pH 4-7. Extrato total de proteínas separadas em uma tira de 13 cm com um gradiente de pH 4-7, seguido de uma eletroforese vertical SDS-PAGE de 11,7% de acrilamida (18x16 cm) e corada posteriormente com Coomassie Blue.

Pode-se observar na tabela 2 a ocorrência de alguns spots com a mesma massa molecular e diferentes pontos isoelétricos, provavelmente isoformas e/ou modificações pós-traducionais de uma mesma proteína. A evidência usada para essa conclusão é a distribuição dos spots em cada uma das regiões. No entanto, a confirmação ou não da possibilidade levantada poderá ser definida após análises dos spots por MS.

Nota-se que os spots 590, 608, 174, 298, 471, 501, 525 e 552 da tabela 1 apresentam pH 4 ou pH 7 e, portanto, deveriam estar presentes nas análises da faixa de pH 4-7. A ausência deles na tabela 2 deve-se ao fato desses spots estarem muito próximos às extremidades básicas (como é o caso dos spots com pH 7) e ácidas (como é o caso dos spots com pH 4) da tira de IPG imobilizado, impossibilitando a separação nestas faixas de pH. Os demais spots podem estar mascarados com outros spots, pois a separação na faixa de pH 3-10 é mais restrita.

TABELA 2 – Proteínas do fruto do café expressas diferencialmente nos diferentes estádios de desenvolvimento, chumbinho e expansão de frutos, na faixa de pH 4-7.

Número Spot	Vol (%)*	Estádio de desenvolvimento	pI aparente	MM aparente
8960	---	apenas chumbinho	5,7	40
9526	---	Apenas expansão do fruto	6,1	37
9561	---	Apenas expansão do fruto	4,9	25
9151	2.95	chumbinho	5,0	25
8900	1.51	Expansão do fruto	6,5	47
8903	1.55	Expansão do fruto	6,7	46
8904	1.56	Expansão do fruto	6,2	34
8926	1.79	Expansão do fruto	5,8	44
8999	1.61	Expansão do fruto	6,0	36
9014	1.98	Expansão do fruto	5,9	30
9047	1.55	Chumbinho	5,4	31
9057	1.58	Expansão do fruto	6,4	31
9276	1.93	Chumbinho	4,7	14
9444	1.56	Expansão do fruto	4,6	18

Legenda: * valor referente a quantas vezes o spot foi expresso em um estádio em relação ao outro.

5.8 DISCUSSÃO DAS ANÁLISES COMPARATIVAS

As análises comparativas demonstraram que não houve diferença significativa entre os dois estádios de desenvolvimento. Poucas proteínas tiveram seu nível de expressão alterado em um estádio em relação ao outro. Estas tiveram valores de diferença de expressão muito baixos. Quanto à presença de pontos protéicos em apenas um dos estádios de

desenvolvimento, as análises comparativas demonstraram que um número muito reduzido de spots encontrava-se nesta situação.

Uma das explicações para tal fato pode ser a que os dois estádios de desenvolvimento sejam muito próximos para apresentar diferenças moleculares significativas, já que foi utilizado um material vegetal composto por frutos que apresentavam variação de tamanho, apesar do comprimento inferior e superior estabelecido para os dois estádios de desenvolvimento do fruto. Isso ocorre devido às diferentes proporções de tamanho de fruto na mesma planta resultante do crescimento assíncrono do fruto durante o desenvolvimento.

5.9 IDENTIFICAÇÃO DOS SPOTS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Após análise das imagens dos géis bidimensionais, os 16 spots dos géis na faixa de pH 3-10 que apresentaram diferença no nível de expressão em um estádio em relação ao outro foram submetidos a análises espectrométricas por MALDI-TOF. Dos 16 spots apenas 14 obtiveram espectros. Esses espectros estão apresentados na Figura 13. Os spots dos géis na faixa de pH 4-7 não foram analisados por espectrometria de massa.

Dos 16 spots analisados no espectrômetro de massa, 7 foram identificados, sendo que 2 apontaram a mesma proteína. São elas: *proteína de reserva 11S, taumatina-like, precursor de cloroplasto, frutose bifosfato aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* e *malato desidrogenase* (Tabela 3).

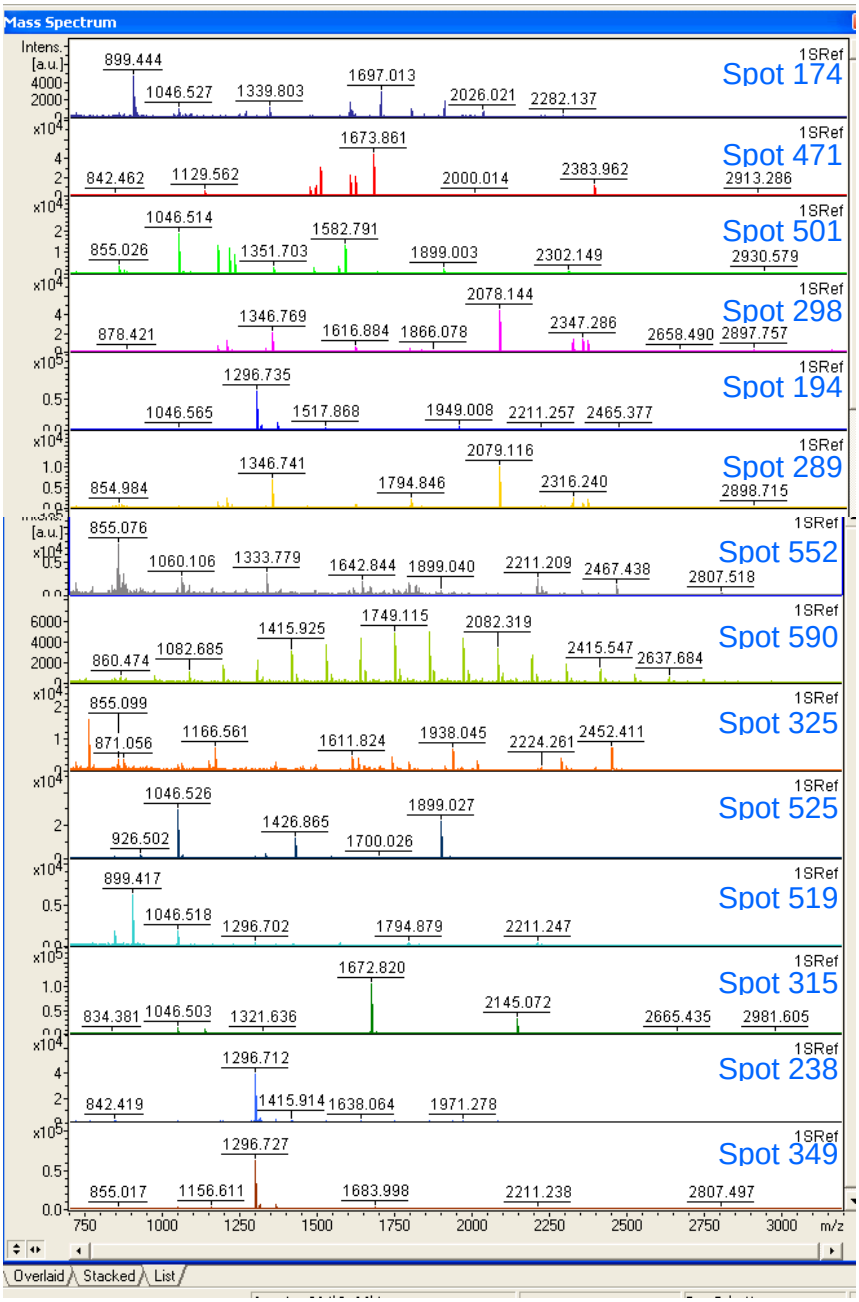

FIGURA 13 – Espectros obtidos após análise no MALDI-TOF. Os números de cada pico acima indicam o valor da massa/carga e a altura dos picos indicam sua intensidade. O programa Flex Analysis 2.0 foi usado para visualizar a impressão digital dos peptídeos (PMFs) resultantes da digestão tríptica das proteínas. Obtiveram espectros os spots 174, 194, 238, 289, 298, 315, 325, 349, 471, 501, 519, 525, 552 e 590.

TABELA 3 – Proteínas identificadas. De 16 impressões digitais de peptídeos analisadas usando o programa PIUMS e dados ESTs de Café, 7 permitiram a identificação das proteínas correspondentes.

Proteína identificada	**Nº do spot**	**Nível de expressão relativa**	**Nº de acesso NCBI**	**Espécie**	**pI observado (teórico)**	**MM observada (teórica)**	**Score**	**P-value**	**Massas idênticas**	**Cobertura**	**Via metabólica**
11S	525	1,8*	P13744	*Curcubita maxima*	7,4 (6,5)	26 (54)	23.07	0.011	7/21	14.1	Reserva
Precursor de cloroplasto	501	1,5*	Q9SLQ8	*Cucumis sativus*	6,3 (8,2)	28 (28)	28.98	0.000	8/29	42.2	Fotossíntese
Frutose bifosfato aldolase	298	1,5*	P29356	*Spinacia oleracea*	7,2 (8,0)	43 (38)	52.46	0.000	16/51	52.7	Glicólise Via das pentoses fosfato Ciclo de Calvin
Frutose bifosfato aldolase	289	1,5*	P29356	*Spinacia oleracea*	7,8 (6,9)	44 (38)	39.99	0.000	11/27	48.1	
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	315	1,7*	P25861	*Antirrihinum majus*	8,7 (8,5)	42 (36)	43.01	0.000	13/35	56.4	Glicólise Ciclo de Calvin
Malato desidrogenase	325	1,5*	Q08062	*Zea mays*	6,5 (6,0)	40 (35)	28.32	0.000	9/39	35.6	Ciclo de Krebs
Taumatina-like	471	1,6**	AAK59278.1	*Sambucus migra*	5,2 (5,2)	29 (24)	21.05	0.005	5/32	25.4	Resposta defensiva

Legenda: * Diferença no nível de expressão das proteínas após normalização no estádio expansão do fruto em relação ao chumbinho, ** Diferença no nível de expressão das proteínas no estádio chumbinho após normalização em relação ao expansão do fruto.

Frutose bifosfato aldolase, *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* e *malato desidrogenase* são enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Como se sabe, a glicose é o principal combustível da maioria dos organismos e ocupa uma posição central no metabolismo. Quando as demandas energéticas aumentam subitamente, a glicose é empregada para produzir energia na forma de ATP. Uma das principais vias de utilização da glicose nas células vegetais superiores é a oxidação da glicose num processo chamado glicólise. Na glicólise uma molécula de glicose é degradada em uma série de 10 reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas do composto piruvato, contendo cada uma delas três átomos de carbono. Durante as reações da glicólise, parte da energia liberada da glicose é conservada na forma de ATP e NADH (LEHNINGER et al., 2002).

Na figura 14 observa-se a participação da *frutose bifosfato aldolase* e da *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* durante a glicólise. A *frutose bifosfato aldolase* quebra a frutose-1,6-bifosfato para liberar duas trioses fosfato diferentes: o gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato. Este é o quarto passo da glicólise. A enzima *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* participa do sexto passo da via glicolítica, onde o gliceraldeído-3-fosfato é oxidado em 1,3-bifosfoglicerato.

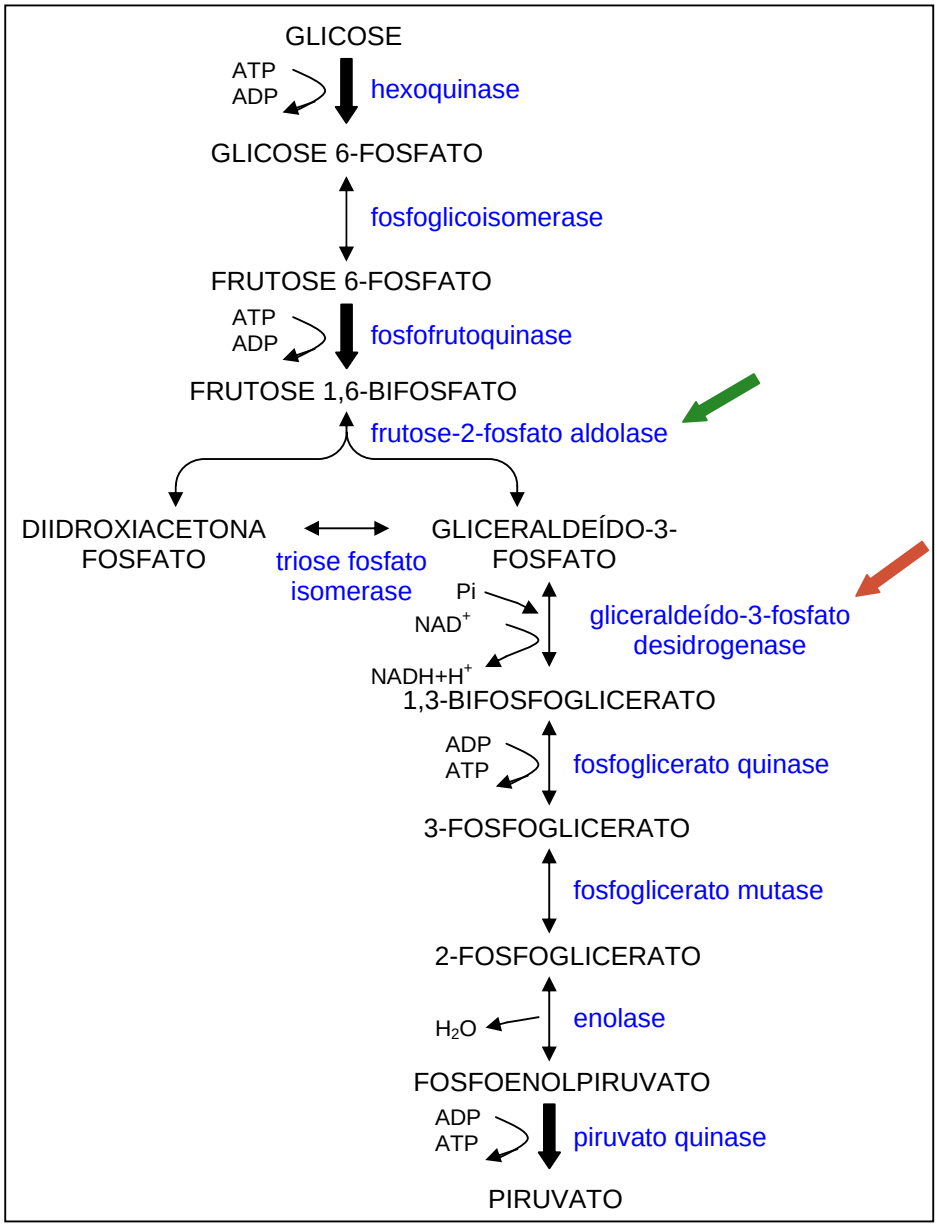

FIGURA 14 – Glicólise: uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas de piruvato. A participação da enzima frutose bifosfato aldolase está indicada pela seta verde e a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pela seta vermelha.

Continuando o metabolismo do açúcar, o piruvato originado na glicólise sofre uma descarboxilação, transformando-se no grupo acetil. Este entra numa seqüência cíclica de reações, denominada ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico (Fig. 15), onde o oxalacetato é regenerado ao final de cada volta e a enzima responsável pela conversão

do substrato malato a oxalacetato é a *malato desidrogenase* (MARZZOCO e TORRES, 2007).

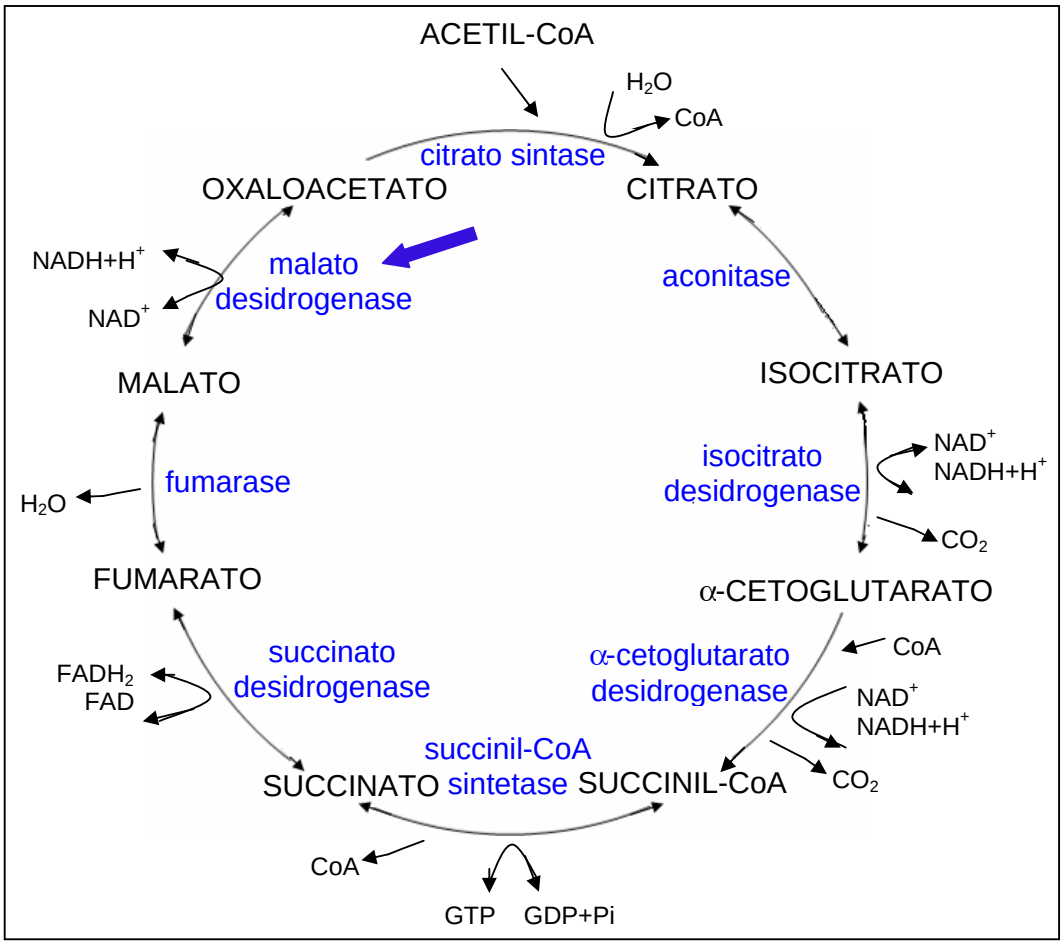

FIGURA 15 – Ciclo de Krebs: seqüência circular de oito reações onde os grupos acetil são degradados em duas moléculas de gás carbônico e o oxalacetato é regenerado. A participação da enzima malato desidrogenase está indicada pela seta azul.

Considerando os frutos nos estádios de desenvolvimento chumbinho e expansão do fruto pode-se afirmar que a via metabólica que envolve a glicólise e o ciclo de Krebs está ativa, pois o fruto encontra-se em fase de divisão e expansão celular e precisa de energia para garantir seu crescimento. O nível de expressão relativa maior, destas enzimas, no estádio de expansão do fruto confirma esta informação.

Uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA é o ciclo do glioxilato que também envolve a enzima *malato desidrogenase* na regeneração do oxalacetato (Fig.

16). O ciclo do glioxilato é exclusivo nas plantas e permite a conversão de gorduras armazenadas em carboidrato durante a germinação das sementes (LEHNINGER, 2002), ou seja, reservas lipídicas em glicose (MARZZOCO; TORRES, 2007). Por esse motivo, acredita-se que nesses dois estádios de desenvolvimento do fruto, chumbinho e expansão, as reações estejam ocorrendo no sentido de acumular reservas para garantir uma fonte de energia e precurssores biossintéticos durante a germinação e antes que os mecanismos fotossintéticos possam supri-los (LEHNINGER, 2002).

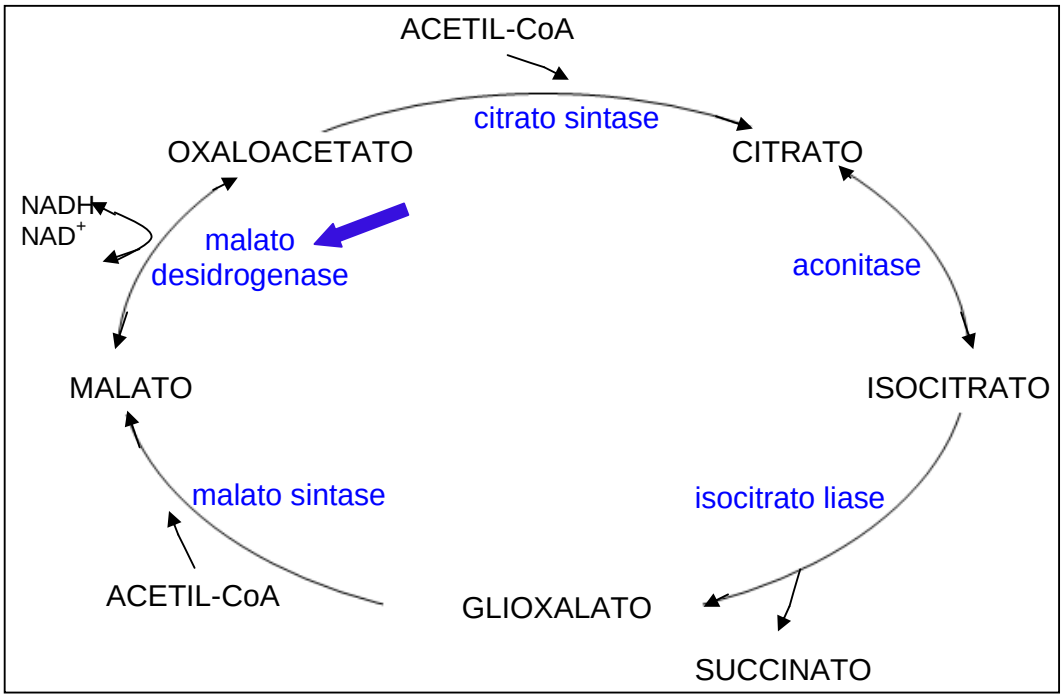

FIGURA 16 – Ciclo do glioxilato: os seis carbonos de isocitrato originam succinato (quatro carbonos) e glioxilato (dois carbonos). A participação da enzima malato desidrogenase está indicada pela seta azul.

A enzima *frutose bifosfato aldolase* participa ainda da via das pentoses fosfato, uma via alternativa de oxidação de glicose que leva à produção de ribose 5-fosfato, a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõem os ácidos nucléicos (MARZZOCO; TORRES, 2007). Como um dos estágios de desenvolvimento o fruto encontra-se em

divisão celular, provavelmente esta via das pentoses fosfato também esteja ativa para suprir as necessidades da síntese de nucleotídeos, polifenóis e aminoácidos.

A glicose e seus derivados são precursores na síntese da parede celular, nucleotídeos e uma grande variedade de outros metabólitos (LEHNINGER, 2002) essenciais à fase de divisão e expansão celular que se encontram os frutos analisados. Quando há glicose livre em excesso, ela é convertida em formas poliméricas para armazenamento e em dissacarídeos para transporte. Nos vegetais a principal forma de armazenamento da glicose é o amido (polissacarídeo de reserva). A síntese de amido ocorre nos cloroplastos como um dos produtos estáveis da fotossíntese. Os cloroplastos contém uma maquinaria enzimática única que catalisa a conversão do CO_2 em compostos orgânicos simples em um processo denominado fixação do CO_2 ou ciclo de Calvin (LEHNINGER, 2002).

A fixação do CO_2 ocorre em 3 estágios: carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato, formando o duas moléculas de 3-fosfoglicerato; redução do 3-fosfoglicerato formando o gliceraldeído-3-fosfato; e regeneração da ribulose-1,5-bifosfato a partir do gliceraldeído-3-fosfato (TAIZ; ZEIGER, 2006). A enzima *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* participa do estágio de redução de 1,3-difosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato e a enzima *frutose 1,6-bifosfato aldolase* atua no início do estágio de regeneração convertendo gliceraldeído-3-fosfato a frutose-1,6-bifosfato.

Dois compostos do ciclo de Calvin podem deixar o ciclo. A frutose-6-fosfato que leva à síntese de amido no cloroplasto e a diidroxiacetona fosfato que migra para o citosol e pode levar tanto à formação de sacarose como ser degradada por meio da glicólise para fornecer energia (Fig. 17) (LEHNINGER, 2002).

Como o fruto em fase de crescimento funciona como dreno recebendo sacarose, via floema, produzida principalmente nas folhas adultas, a sacarose que chega

no fruto é imediatamente quebrada em frutose e glicose e estas são, então, degradadas por meio da via glicolítica para fornecer energia necessária ao fruto em desenvolvimento, pois o fruto do cafeeiro não acumula amido.

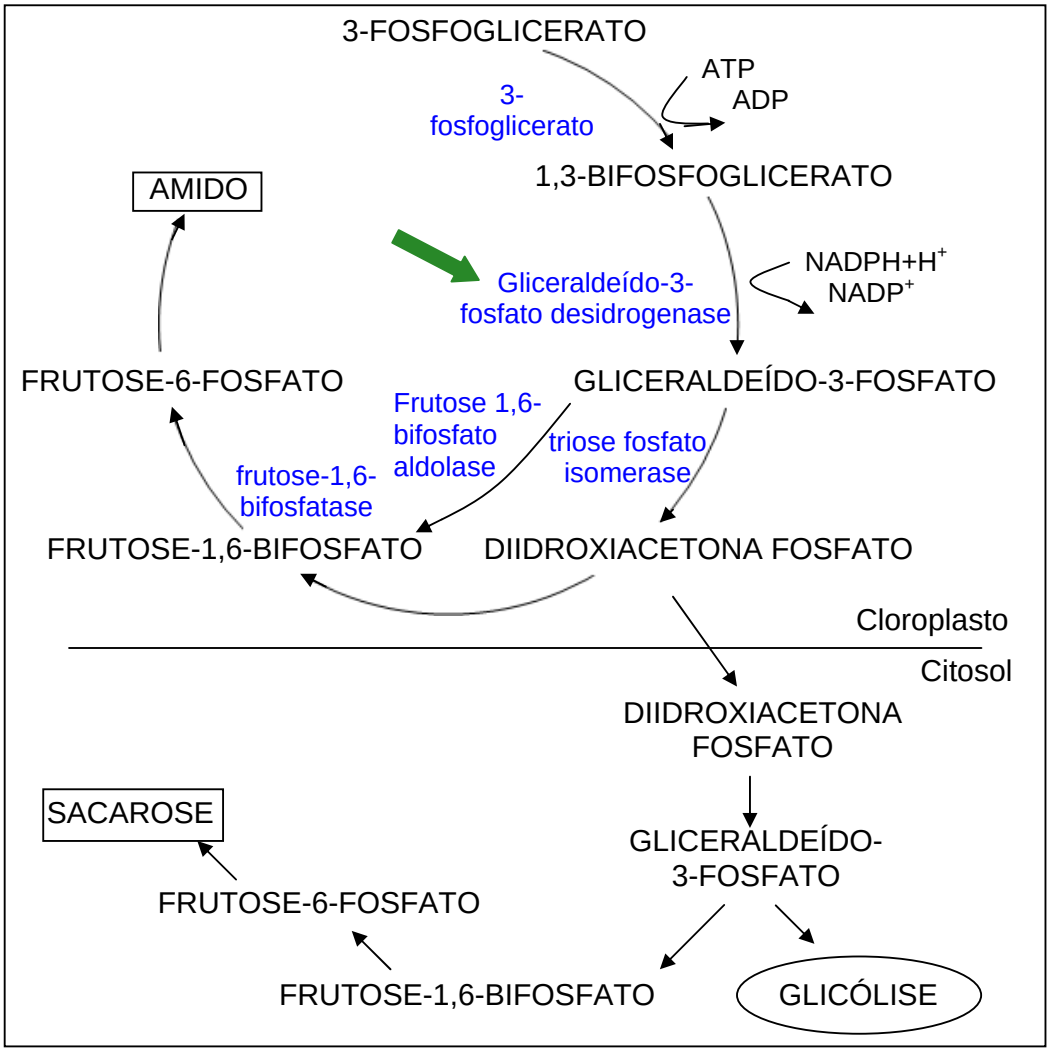

FIGURA 17 – Segunda fase do ciclo de Calvin: redução do 3-fosfoglicerato a gliceraldeído-3-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato pode ser empregado imediatamente como fonte de energia ou convertido em sacarose para transporte. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase está indicada pela seta verde.

As enzimas *frutose bifosfato aldolase* e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* também já foram identificadas em estudos proteômicos em maçã, morango (ZHENG et al., 2007) e tomate (FAUROBERT et al., 2007) e a malato desidrogenase já foi identificada em citrus (KATZ et al., 2007).

Outra proteína identificada em nosso estudo e que pode estar relacionada ao metabolismo de açúcar é a *taumatina-like* , formada por 226 aminoácidos. A taumatina-like pertence a família TLP (thaumatin-like protein) que inclui o doce sabor da taumatina-like extraída da *Thaumatococcus daniellii*, uma planta originária do Oeste Africano. Esta proteína é, em média, 100.000 vezes mais doce que o próprio açúcar (VOS et al., 1985).

Na literatura, a expressão desta proteína está relacionada com algum estresse na planta, como por exemplo, estresse osmótico em tomate (RODRIGO et al., 1991), salino em milho (FRENDO et al.; 1992) e ainda em resposta a ataque de patógenos, em feijão (YE et al., 1999). Análises têm revelado que um dos muitos genes induzidos pela seca é membro da família da taumatina-like (JUNG et al., 2005). Portanto, como se trata de material coletado no campo, a identificação da taumatina-like pode estar sinalizando uma situação de estresse na planta ou ainda a existência de algum patógeno na cultura.

Outra proteína identificada foi a 11S. A caracterização molecular e bioquímica e a expressão da proteína de armazenamento 11S foi realizada por ROGERS et al. em 1999. A proteína de armazenamento 11S é a principal fonte de peptídeos e aminoácidos encontrados principalmente no endorperma do fruto. O acúmulo dessas proteínas ocorre ao longo do desenvolvimento do fruto com um pico de abundância na primeira metade do período de maturação do fruto, que corresponde à fase de máxima expansão do endorperma nos grãos (aproximadamente 14 semanas após o florescimento). A abundância relativa expressa como a porcentagem do total de proteínas no grão foi estimada em aproximadamente 45% em café. ROGERS et al. (1999) encontraram seqüências muito similares com proteínas de reserva de outras plantas, assegurando sua função de armazenamento no grão de café. Portanto, na fase de expansão do fruto foi iniciado o acúmulo desta proteína.

Por fim, uma proteína identificada como precursora do cloroplasto também foi observada nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto de cafeeiro. Proteínas relacionadas ao metabolismo primário (açúcar), cloroplasto, fotossíntese e metabolismo da parede celular são proteínas altamente expressas em frutos jovens (FAUROBERT et al.; 2007). Em um estudo proteômico em tomates, Faurobert et al. (2007), identificaram que vários spots relacionados à fotossíntese, como por exemplo, a proteína PSII e a rubisco, foram super expressos em frutos jovens, mas com o desenvolvimento do fruto há uma redução na expressão destas proteínas. Isso foi observado também por Rocco et al. (2006) e Carrari; Fernie (2006). Isso confirma que no início do desenvolvimento os frutos são fotossintetizantes.

Muitas outras proteínas precisam ser identificadas para compreender quais vias estão sendo utilizadas no fruto imaturo. A análise proteômica do fruto de café, junto com a identificação de suas vias metabólicas podem contribuir para um maior entendimento dos fatores que afetam o desenvolvimento de frutos permitindo novas práticas para melhorar tanto os processos de pré e pós colheita quanto a qualidade do fruto e da bebida.

6. CONCLUSÕES

1. A separação das proteínas através da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida permitiu a identificação de 16 proteínas expressas diferencialmente (pH 3-10) nos estádios chumbinho e expansão do fruto.

2. O perfil de peptídeos de 7 proteínas expressas diferencialmente (pH 3-10) possibilitaram sua identificação através de MS.

3. A maioria das proteínas identificadas estão envolvidas em vias glicolíticas do fruto imaturo de *Coffea arabica*, possivelmente devido ao requerimento de uma reserva de energia imediata necessária para seu desenvolvimento.

4. A presença da proteína taumatina-like indica a exposição a um estresse na cultura.

5. O aumento na expressão da proteína de armazenamento 11S sugere que o fruto no início do desenvolvimento inicie o acúmulo de reserva energética necessária para a germinação da semente.

6. O aumento na expressão da proteína precursora de cloroplasto confirma que os frutos no início do desenvolvimento são fotossintetizantes.

7. REFERÊNCIAS

ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature,** v. 402, p. 715-720, 1999.

ABELES, F. et al. Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. **Mol. Genet. Genomics,** v. 277, p. 701-712, 2007.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.,** v. 101, p. 269-295, 2001.

AGUIAR, A. T. da E. et al. Variação no teor de lipídios em grãos de variedades de ***Coffea canephora.*** **Pesq. agropec. bras.,** Brasília, v. 40, n. 12, p. 1251-1254, dez. 2005.

BAE, M. S. et al. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. **The Plant Journal,** v. 36, n. 5, p. 652-663, dez. 2003.

BAGINSKI, S.; GRUISSEM, W. Arabidopsis thaliana proteomics: from proteome to genome. **Journal of Experimental Botany,** v. 57, n. 9, p. 1485-1491, 2006.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D Electrophoresis: Principles and Methodos.** Edition AC (80-6429-60). GE Healthcare, 2004. Manual do fabricante.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: TIBTECH.,** v. 17, p. 121-127, 1999.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem., v. 72, p. 248-254, 1976.

BUSTAMENTE-PORRAS, J. et al. Molecular characterization of an ethylene receptor gene (CcETR1) in coffee trees, its relationship with fruit development and caffeine content. **Mol. Genet. Genomics,** v. 277, p. 701-712, 2007.

CAGNEY, G. et al. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science,** v. 1, p. 1-15, 2003.

CAHILL, D. J. et al. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S. R; DUNN, M. J. Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited,** p.1-22, 2001.

CAMARGO, Â. P. de; CAMARGO, M. B. P. de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia,** Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.

CAMARGO, A. P. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões cafeeiras do Brasil. In: CAMARGO, Â. P. de; CAMARGO, M. B. P. de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia,** Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.

CARVALHO, P. C. et al. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. **J. Bras. Patol. Med. Lab,** Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, dez. 2006.

CARRARI, F.; FERNIE, A. R. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. **Journal of Experimental Botany,** v. 57, n. 9, p. 1883-1897, 2006.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist,** v. 49, p. 58-62, 2002.

CHANG, J. et al. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. **Mech. Ageing Dev.**, v. 124, p. 33-41, 2003.

CHASSAIGNE, H. et al. 2-Dimensional gel electrophoresis technique for yeast seleniumcontaining proteins—sample preparation and MS approaches for processing 2-D gel protein spots. **J. Anal At. Spectrom,** v. 19, p. 85-95, 2004.

CHAVES, D. F. S. **Análise proteômica das estirpes selvagem, *ntrC*- e *nifA*- de *Herbaspirillum seropedicae.*** Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/ dspace /bitstream/1884/546/1/Daniela%20Chaves.pdf> Acesso em: 09 set. 2007.

CUTTER, E. G. **Anatomia Vegetal**. Tradução de Gabriela Vera Maria Caruso Catena. São Paulo: Roca, 1987.

DANI, V. et al. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress**.** Proteomics, v. 5, p. 737-745, 2005.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Braz. J. Plant Physiol.,** v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

DESIERE, F. et al. Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry. **Genome Biology,** v. 6, n. 1, 2004.

DUNN, M. J. Gel Electrophoresis: Proteins. In: GÖRG, A.; WEISS W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics,** v. 4, p. 3665-3685, 2004.

DUNN, M. J; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited,** p.43-63, 2001.

ENG, J. K.; McCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. **J. Am. Soc. Mass Spestrom,** v. 5, p. 976-989, 1994.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Tradução de Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher, 1976.

ESTANISLAU, W. T. Modelo funcional de desenvolvimento de sementes de cafeeiro, 2002. In: DE CASTO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Braz. J. Plant Physiol.,** v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

FAUROBERT, M. et. al. Major Proteome Variations Associated with Cherry Tomato Pericarp Development and Ripening. **Plant Physiology,** v. 143, p. 1327-1346, mar. 2007.

FERNANDEZ-LIMA, F. A. et al. Acoplamento das espectrometrias de mobilidade iônica e de massa maldi-tof. Revista **Brasileira de Aplicações de Vácuo,** v. 24, n. 2, p. 74-80, 2005.

FOUNTOULAKIS, M. et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics,** v. 4, p. 3665-3685, 2004.

FRENDO, P. et al. Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize; cDNA isolation and sequence analysis. **Plant Science (Ireland),** v. 85, n. 1, p. 61-69, 1992.

GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**. Ago. 2006.

GHARBI, S. et al. Evaluation of Two-dimensional Differential Gel Electrophoresis for Proteomic Expression Analysis of a Model Breast Cancer Cell System. **Molecular & Cellular Proteomics,** v. 1, p. 91-98, 2002.

GIOMETTI, C. S. et al. Global analysis of a 'simple' proteome: *Methanococcus jannaschii.* **J. Chromatography. B**, v. 782, p. 227–243, 2002.

GIOVANNONI, J. J. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. **The Plant Cell,** v. 16, p. 170-180, 2004.

GIOVANNONI, J. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. **Revista Plant. Plysiol. Plant. Mol. Biol,** v. 52, p. 725-749, 2001.

GÖRG, A. et al. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis.** Disponível em: <http://www.weihenstephan.de/blm/deg> Acesso em: 09 set. 2007.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis,** v. 9, p. 531-546, 1988.

GÖRG, A.; WEISS W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics,** v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GOUVEIA, N. M. *Estudo da diferenciação e crescimento das gemas florais de* Coffea arabica *L.: observações sobre antese e maturação dos frutos*. In: CAMARGO, Â. P. de; CAMARGO, M. B. P. de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia,** Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist´s guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.,** v. 66, p. 39-63, 2002.

GUIDE to Isoelectric Focusing. Disponível em: <http://www5.gelifesciences.com/APTRIX/upp00919.nsf/Content/00C752605F945F66C1256EB400417CD5/$file/iefproto.pdf>. Acesso em: 09 set. 2007.

GURJÃO, K. C. de O. et al. Development of tamarind fruits and seeds. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, v. 28, n. 3, dez. 2006.

GYGI, S. P. et al. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 97, p. 9390-9395, 2000.

HANCOCK, W. S. et al. Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. **Trends Biotech.,** v. 20, p. 39-44, 2002.

HERBERT, B. R. et al. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.,** v. 19, 2001.

HESKETH, A. R. et al. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of ***Streptomyces coelicor.*** **Mol. Microbiol.,** v. 46, p. 917-932, 2002.

JUNG, Y. C. et al. Drought-inducible—but ABA-independent thaumatin-like protein from carrot *(Daucus carota L.)*. **Plant Cell Rep,** v. 24, p. 366–373, 2005.

KATZ, E. et al. The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. **Planta,** v. 226, n. 4, set. 2007.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik,** v. 26, p. 231-243, 1975.

KÖPKE, A. **Proteomics – a new drug discovery tool.** Disponível em: <http://www.wita-proteomics.com> Acesso em: 15 set. 2007.

LAEMMLI, U. K. SDS-PAGE. **Nature,** v. 227, p. 680-685, 1970.

LAVIOLA, B. G. et al. Dimâmica de P e S em folhas, flores e frutos de cafeeiro arábico em três níveis de adubação. **Biosci. J.,** Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 29-40, jan./mar. 2007.

LEE, C. L. et al. Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. **Proteomics,** v. 3, p. 2472-2486, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M; **Lehninger Princípios de Bioquímica.** Tradução de Arnaldo Antônio Simões; Wilson Roberto Navego Lodi. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEMAIRE-CHAMLEY, M. et al. Changes in Transcriptional Profiles Are Associated with Early Fruit Tissue Specialization in Tomato. **Plant Physiology,** v. 139, p. 750-769, out. 2005.

LIN, C. et al. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theor Appl Genet,** v. 112, p. 114-130, 2005.

LOPEZ, M. F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **J. Chromatography B,** v. 722, p. 191-202, 1999.

MALUF, M. P.; OLIVEIRA, A. C. B. de. Genoma Café: perspectivas para o melhoramento genético da cultura. **O agronômico,** v. 59, n. 1, p. 68-70, 2007.

MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature Biotech.,** v. 21, p. 255-261, 2003.

MARRACCINI, P. et al. Biochemical and molecular characterization of _-D galactosidase from coffee beans. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 43, p. 909-920, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenol oxidase in cofee. **Phytochemistry,** v. 55, p. 285-296, 2000.

MONTAVON, P. et al. Evolution of Green Coffe Protein Profiles with Maturation and Relationship to Coffee Cup Quality**. J. Agric. Food Chem.,** v. 51, p. 2328-2334, 2003a.

MONTAVON, P.; KUKIC, K. R.; BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: Optimization, validation, and application in green coffee. **Anal. Biochem.,** v. 360, p. 207-215, 2007.

MONTAVON, P.; MAURON, A. F.; DURUZ, E. Changes in Green Coffee Protein Profiles during Roasting. **J. Agric. Food Chem,** v. 51, p. 2335-2343, 2003b.

MOURA, M. L. et al. Growth and development of 'Santa Clara' tomato fruit and its mutant 'Firme'. **Ciênc. agrotec.,** Lavras, v. 28, n. 6, p. 1284-1290, nov./dez., 2004.

NAVARRO, M. F. **Análisis de los proteomas de dos micoplasmas: Mycoplasma penetrans y Mycoplasma genitaliu.** Disponível em: <http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1121106-133429//mfn1de1.pdf >. Acesso em: 25 ago. 2007.

NOGUEIRA, Â. M. et al. Fruit ripening evaluations of Catuai Amarelo and Vermelho (*Coffea arabica* L.) lineages of coffee cultivar, planted isolated and in combinations. **Ciênc. agrotec.,** Lavras, v. 29, n. 1, p. 18-26, jan./fev. 2005.

NULTSCH, W. **Botânica geral**. Tradução de Paulo Luiz de Oliveira. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

O´FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.,** v. 250, p.4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature,** v. 405, p.837-846, 2000.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **J. Chromatography B,** v. 771, p. 3-31, 2002.

PEREIRA, A. dos S. et al. Challenges of analytical chemistry in face of the needs of the pharmaceutical industry. **Química Nova,** São Paulo, v. 28, nov./dez. 2005.

PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** Londrina, v. 17, n. 3, jul./set. 2005.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Qualidade do café (*Coffea arabica*) colhido em sete épocas diferentes na região de Lavras-MG. **Ciênc. Agrotec.,** Lavras, p. 1481-1491, dez. 2002.

PEZZOPANE, J. R. M. et al. Escala para a avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia,** Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S. R; DUNN, M. J Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited,** p. 151-169, 2001.

RABILLOUD, T. et al. Improvement of the solubization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis,** v. 18, p. 307-316, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CHHORN, E. **Biologia Vegetal.** Tradução de Jane Elizabeth Kraus. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

REDE PROTEOPAR (Programa Proteoma Paraná). **Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro.** Disponível em: <http://nfn.genopar.org:8080/proteopar/publicacoes/Resumo_5oSimposioDePesquisaDosCafesDoBrasil.pdf> Acesso em: 02 fev. 2008.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. **Cultura do cafeeiro:** fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, 1986.

RIBEIRO, F. R. **Identificação e caracterização de cDNAs expressos diferencialmente durante a maturação dos frutos de *Coffea arabica* L**. Disponível em: <http://servicos.capes.gov.br/arquivos/avaliacao/estudos/dados 1/2004/33003017/006/2004_006_33003017033P1_Teses.pdf.> Acesso em: 09 set. 2007.

ROCCO, M. et al. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening. **Proteomics,** v. 6, p. 3781-3791, 2006.

ROCHA, T. L. et al. **Comunicado Técnico: Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/ cot136.pdf> Acesso em: 12 jul. 2006.

RODRIGO, I. et al. Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. **Plant Molecular Biology,** v. 16, n. 5, mai. 1991.

ROGERS, W. J. et al. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. **Plant Physiol. Biochem,** v. 37, n. 4, p. 261-272, 1999.

SALMONA, J. et al. Deciphering transcriptional networks that govern Coffea arabica seed development using combined cDNA array and real-time RT-PCR approaches. **Plant Mol. Biol.,** v. 66, p. 105-124, 2008.

SHEN, Y.; SMITH, R. D. Proteomics based on high-efficiency capillary separations. **Electrophoresis,** v. 23, p. 3106-3124, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 93, p. 14440-14445, 1996.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry,** v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, C. L. S. P.; MACHADO, M. A.; LEMOS, E. G. M. Differencial protein expression among zygotic and apomitic seedlings of citrus. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, v. 26, n. 1, abr. 2004.

SILVA, F. G. da et al. Characterizing the Grape Transcriptome. Analysis of Expressed Sequence Tags from Multiple Vitis Species and Development of a Compendium of Gene Expression during Berry Development. **Plant Physiology,** v. 139, p. 574-597, out. 2005.

SIMKIN, A. J. et al. Oleosin gene family of *Coffea canephora*: Quantitative expression analysis of five oleosin genes in developing and germinating coffee grain. **Journal of Plant Physiology,** v. 163, p. 691-708, 2006.

SURESH, S. et al. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. **Gene,** v. 364, p. 13-18, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANKSLEY, S. D. The Genetic, Development, and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. **The Plant Cell,** v. 16, p, 181-189, 2004.

THOMAZIELLO, R. A. et al. Café Arábica: Cultura e Técnicas de Produção. **Boletim Técnico 187.** Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2000.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physio.,** v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

VOS, A. M. de. et al. Three-dimensional structure of thaumatin I, na intensely sweet protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 82, p. 1406-1409, mar. 1985.

WANG, W. et al. Protein extraction for two dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis,** v. 2, p. 2369-2375, 2003.

WANG, W. et al. **Protein identification from two-dimensional gel electrophoresis analysis of *Klebsiella pneumoniae* by combined use of mass spectrometry data and raw genome sequences**. Disponível em: <http://wwwproteomesci.com/content/1/1/6> Acesso em: 05 dez. 2007.

WILDGRUBER, R. et al. Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of Saccharomyces cerevisiae proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. **Electrophoresis,** v. 21, p. 2610-2616, 2000.

WILDGRUBER, R. et al. Web-based twodimensional database of *Saccharomyces cerevisae* proteins using immobilized pH gradient form pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry. **Proteomics,** v. 2, p. 727-732, 2002.

WILKINS, M. R. et al. Guidelines for the next 10 years of proteomic. **Proteomics,** v. 6, p. 4-8, 2006.

WULFKUHLE, J. D.; LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Early detection: Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews Cancer,** v. 3, p. 267-275, abr. 2003.

YE, X. Y.; WANG, H. X.; NG, T. B. First Chromatographic Isolation of an Antifungal Thaumatin-like Protein from French Bean Legumes and Demonstration of Its Antifungal Activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 263, n. 1, p. 130-134, set. 1999.

YERGEY, A. L. et al. De Novo Sequencing of Peptides Using MALDI/TOF-TOF. **J. Am. Mass Spectrum,** v. 13, p. 784-791, 2002.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova,** v. 21, n. 6, 1998.

ZHANG, W.; CHAIT, B. T. Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analitical Chemistry,** v. 72, p. 2482-2489, 2000.

ZHENG, Q. et al. Qualitative and Quantitative Evaluation of Protein Extraction Protocols for Apple and Strawberry Fruit Suitable for Two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry Analysis**. J. Agric. Food Chem,** v. 55, p. 1663-1673, 2007.

ZIVY, M.; VIENNE, D. de. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Molecular Biology,** v. 44, n. 5, nov. 2000.