

MARIA JOSÉ DE JESUS SILVA

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CRISTALINO DE *Felis catus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S586a
2018 Silva, Maria José de Jesus, 1979-
Análise proteômica de cristalino de *Felis catus* / Maria José
de Jesus Silva. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 95f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-54.

1. Proteômica. 2. Cristalinos. 3. Gatos. 4. Espectrometria de
massa. 5. Cromatografia a líquido. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.6

MARIA JOSÉ DE JESUS SILVA

ANÁLISE PROTEÔMICA DE CRISTALINO DE *Felis catus*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada, para
obtenção do título de Magister
Scientiae.

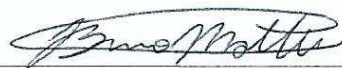
APROVADA: 27 de junho de 2018.



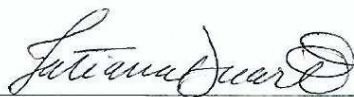
Edvaldo Barros
(Coorientador)




Maria Cristina Baracat Pereira



Bruno Mattei



Tatiana Schmitz Duarte



Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus que me deu vida e saúde para seguir sempre em frente. Aos meus pais José Maria e Maria Joana, ao meu amado esposo Angelo Bruno, ao meu filho Víctor e a todos que de alguma forma contribuíram nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela vida e saúde para sempre seguir em frente.
- À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade e aos professores e funcionários pelo apoio e compreensão.
- Ao professor e orientador Cláudio Mafra, o meu respeito, admiração, amizade, além de agradecimentos pelos anos de apoio, força, paciência e orientação em meus momentos difíceis.
- Ao Edvaldo Barros que esteve comigo nesta jornada do início ao fim. Obrigada pela paciência, amizade e tranquilidade quando eu mais precisava.
- Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) e ao Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) pela disponibilidade e pelos equipamentos.
- Aos Senhores Eduardo Pereira Monteiro e Marco Aurélio Ferreira de Oliveira, secretários da Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, pela amizade, apoio e paciência.
- Aos amigos do NUBIOMOL: Nívea, Cláudia, Pedro, Camilo e ao Professor Humberto Josué de Oliveira Ramos.
- Ao Sávio Guimarães Britto, pelo trabalho, esforço e parceria.
- À Professora Alessandra Sayegh Arreguy Silva (HVT/FAVIÇOSA) pela parceria.
- Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo do Hospital veterinário da UFV, pela parceria.
- À Professora Maria Cristina Baracat Pereira pela disponibilidade de ceder o Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP) para parte do experimento.
- Ao Dr. Guilherme Oliveira Thiebaut pelo apoio.
- Aos alunos do LPBP: Lavínia, Wassali, Renato, Camilo e Hugo, pelo apoio e carinho durante o convívio no laboratório.
- Ao Prof. Dr. William de Castro Borges e Dr. Bruno Mattei da UFOP, pela parceria.
- Aos membros da banca Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, Dr. Edvaldo Barros, Dr. Bruno Mattei, Dra. Maria Cristina Baracat Pereira e Dra. Tatiana

Schmitz Duarte pela disponibilidade e pronto atendimento em aceitar o convite para participar desse processo avaliativo.

- Aos colegas do LAPEM: Fernanda e Ananda pelo apoio.
- Aos meus pais José Maria da Silva e Maria Joana de Jesus Silva, que me ajudam em todos os detalhes e sempre fizeram parte de cada sonho e de cada momento. Sem eles eu não teria conseguido chegar onde estou hoje.
- Ao meu amado marido Angelo Bruno Nunes Oliveira, que amo tanto, pelo apoio, companheirismo e paciência em todos esses anos que estamos juntos.
- Ao meu filho Vítor Nunes Silva, que é minha vida e sempre alegra cada momento, me dando forças para sempre seguir em frente.

BIOGRAFIA

Maria José de Jesus Silva, filha de José Maria da Silva e de Maria Joana de Jesus Silva, nascida em 21 de junho de 1979, na cidade de Viçosa - Minas Gerais. Em 25 de julho de 2009, casou-se com Angelo Bruno Nunes Oliveira, com quem tem um filho, Víctor Nunes Silva, nascido em 4 de junho de 2013.

No ano de 2000, ingressou no Curso de Química pela Universidade Federal de Viçosa, obtendo o título de Bacharel e Licenciado em Química em 5 de maio de 2006. Lecionou na rede particular, e estadual de ensino em Belo Horizonte até 2013. Em março de 2016, iniciou suas atividades no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 -INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 -REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 - O olho	3
2.2 - O cristalino.....	3
2.2.1 -Proteínas do cristalino	5
2.3 - Espectrometria de massas	6
3 -OBJETIVOS.....	10
3.1 - Objetivo geral	10
3.2 - Objetivos específicos.....	10
4 -MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 - Obtenção dos cristalinos	12
4.2 - Extração e quantificação de proteínas totais de cristalino	13
4.3 - Separação das proteínas totais por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 1D).....	13
4.4 - Separação das proteínas totais por eletroforese bidimensional (2-DE).....	14
4.5 - Revelação das proteínas de cristalino de gato e análise das imagens	15
4.6 - Excisão e preparo dos spots dos géis mais abundantes para a espectrometria de massas.....	16
4.7 - Espectrometria de massas	18
4.7.1 -Análise por LC-MS/MS Orbitrap	18
4.7.2 -Análise por MALDI-TOF/TOF	19
4.8 - Identificação das Proteínas	20
4.9 - Caracterização das proteínas identificadas por ferramentas de bioinformática	22
5 -RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 - Preparo e separação das proteínas.....	24
5.2 - Identificação das proteínas dos cristalinos de gatos pela abordagem LC MS/MS Orbitrap utilizando os algoritmos PEAKS.....	25
5.3 - Análise da classificação funcional das proteínas dos cristalinos de gatos identificados pelo LC MS/MS Orbitrap com o software KOG.....	29

5.3.1 -Metabolismo e transporte de carboidratos	32
5.3.2 -Modificação pós-traducional, proteína turnover e chaperonas	36
5.3.3 -Conversão e produção de energia	38
5.3.4 -Função geral	39
5.3.5 -Proteínas sem alinhamento funcional.....	40
5.4 - Identificação das proteínas dos Cristalinos de gatos pela abordagem MALDI-TOF/TOF utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD....	42
5.4.1 -Separação das proteínas	42
6 -CONCLUSÃO	47
7 -REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
Anexos	55
8 -Anexo I - Tabelas.....	56
9 -Anexo II – Certificação CEUA-UFV.....	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem esquemática do olho com seus componentes..... 3
- Figura 2: Células fibrosas do cristalino; (A) Esquema da lente seccionada ao longo do eixo ótico mostrando as células epiteliais. (B-D) Análise de imunofluorescência da lente de rato com anticorpos para as alfa cristalinas e as células fibrosas (ANDLEY, 2008). 4
- Figura 3: Proteínas do cristalino: alfa, beta e gama cristalinas (<https://pdb101.rcsb.org/motm/127>) 5
- Figura 4: Proteínas do cristalino: delta, eta e lambda (<https://pdb101.rcsb.org/motm/127>). 6
- Figura 7: (A) obtenção dos cristalinos; (B) liofilização e armazenamento da amostra; (C) extração das proteínas totais do cristalino; (D) processamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida; (E) excisão dos spots dos géis com as proteínas; (F) redução, alquilação e digestão das proteínas em gel e recuperação dos peptídeos trípticos; análise dos peptídeos por MALDI-TOF/TOF(G) e LC MS/MS Orbitrap (H); identificação das proteínas pelo PEAKS (I) e pelo MASCOT (J); (K) validação dos resultados do MASCOT pelo SCAFFOLD; (L) análise dos resultados. 11
- Figura 8: Separação das proteínas das 5 réplicas biológicas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 1D com gel 12,5%, coradas com Coomassie Brillante Blue G-250. 24
- Figura 9: Estratégia short run sem separação das proteínas das 5 amostras biológicas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 1D com gel 12,5%, coradas com Coomassie Brillante Blue G-250. 25
- Figura 10: Diagrama de Venn que ilustra a distribuição das proteínas identificadas pelo algoritmo PEAKS DB, PEAKS PTM e PEAKS SPIDER. Fonte: Software InteractiviVenn (HEBERLE et al., 2015). 26
- Figura 11: Abundância relativa das proteínas identificadas de *Felis catus*, por análise LC MS/MS Orbitrap. (Abundância relativa das proteínas foi obtida pela média da aferição das áreas integradas dos picos de três peptídeos mais intensos detectados para cada proteína) 27
- Figura 12: (A) Abundância relativa das cristalinas identificadas em cristalino de *Felis catus*. Representação da soma das médias das áreas de picos integrados para cada proteína, entre as três amostras biológicas e (B) Proporção entre as alfa, beta e gama cristalinas encontradas..... 28
- Figura 13: Distribuição das proteínas em classes pelo KOG: Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho), Sinalização e Processo Celular (verde), Metabolismo (azul), Pobremente Caracterizados (amarelo) e NO HIT (preto). (A) Porcentagem em classes das proteínas identificadas do cristalino de gato pelo KOG e (B) Porcentagem da abundância relativa das proteínas

presentes em cada classe do KOG e entre parênteses com o número de proteínas presentes.	30
Figura 14: Classificação funcional das proteínas identificadas no cristalino de <i>Felis catus</i> pelo KOG (Funções x Número de Proteínas em cada função). Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho): Dinâmica e estrutura da cromatina; Tradução, estrutura ribossomal e biogênese. Sinalização e Processo Celular (verde): Estrutura nuclear, tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; Mecanismos de defesa; Parede celular/Membrana/biogênese do envelope; Controle do ciclo celular, divisão celular, partição do cromossomo, estrutura nuclear; Mecanismo de transdução de sinal; Tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular. Metabolismo (azul): Metabolismo e transporte de nucleotídeo; Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo; Metabolismo e transporte de lipídeos; Metabolismo e transporte de aminoácidos; Conversão e produção de energia; Metabolismo e transporte de carboidratos. Pobremente Caracterizados (amarelo): Somente predição geral funcional; Função desconhecida; e NO HIT (preto).	31
Figura 15: Abundância das proteínas classificadas pelo KOG como Metabolismo e transporte de carboidratos.	32
Figura 17: Representação da via metabólica de glicólise/gliconeogênese recuperada do KEGG. Em destaque estão os códigos E.C. das proteínas constituintes desta via que foram identificadas neste estudo. 2.7.1.11 – M3WJW8, M3VZZ7 e M3W043; 4.1.2.13 – M3W9A0, M3WK75; 5.3.1.1 – M3X9A1; 1.2.1.12 – A0A0A0MPZ5; 5.3.1.9 – M3W3S8; 4.2.1.11 – M3VX63 e M3WCP0; 5.4.2.11 – M3WKJ9 e M3WYZ8; 2.7.2.3 – M3WIF4; 5.4.2.4/5.4.2.11 – M3WX85.....	35
Figura 18: Separação das proteínas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 2D em tira de pH 3-10, com gel 12,5%, coradas com azul de Coomassie Brillante G-250.	43
Figura 19: Separação das proteínas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 2D em tira de pH 4-7, com gel 12,5%, coradas com azul de Coomassie Brillante G-250.	44
Figura 20: Comparação da imagem do gel com a imagem tridimensional dos spots, evidenciando a resolução entre as diferentes faixas de pH. (a) Destaque do gel de pH 3-10 na região de 20,1 kDa a 30,0 kDa e entre o pH de 4,7 a 8,3 aproximadamente. (b) Destaque do gel de pH 4-7 na região de 20,1 kDa a 30,0 kDa e entre o pH de 6,5 a 7,0 aproximadamente. (c) Imagem em 3D gerada pelo software ImageMaster referente a área de destaque do gel de pH 3-10. (d) Imagem em 3D gerada pelo software ImageMaster referente a área de destaque do gel de pH 4-7.....	44
Figura 21: Proteínas do cristalino de gatos identificadas por MALDI TOF/TOF: (A) Spots oriundos do gel de pH 3-10; (B) Spots oriundos do gel de pH 4-7.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas identificadas em Cristalinos de Gatos, pelas abordagens LC MS/MS Orbitrap utilizando o algoritmo PEAKS (DB, PTM E SPIDER).	56
Tabela 2: Proteínas identificadas como não-caracterizadas no cristalino de gatos, pela abordagem LC-MS/MS, utilizando o algoritmo PEAKS e alinhadas pela ferramenta BLASTp contra o banco de dados de proteínas depositados no NCBI.	86
Tabela 3: Proteínas identificadas em cristalinos de gatos, pelas abordagens MALDI-TOF/TOF utilizando o algoritmo mascot e scaffold com tiras de pH 3-10.	87
Tabela 4: Proteínas identificadas em cristalinos de gatos, pelas abordagens MALDI-TOF/TOF utilizando o algoritmo mascot e scaffold com tiras de pH 4-7.	90
Tabela 5: Proteínas identificadas como não-caracterizadas no cristalino de gatos, pela abordagem MALDI TOF/TOF, utilizando os algoritmos mascot/scaffold e alinhadas pela ferramenta BLASTp contra o banco de dados de proteínas depositados no NCBI.	94

RESUMO

SILVA, Maria José de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2018. **Análise proteômica de cristalino de *Felis catus***. Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientador: Edvaldo Barros.

O Cristalino, ou lente, é uma peça chave para o olho de qualquer ser vivo. A lente foca a luz na retina, a qual é conduzida ao nervo ótico e enviado para o cérebro, resultando em função visual. Isso só é possível graças às proteínas que o constitui, fornecendo a transparência e o índice de refração adequados para a passagem da luz. Qualquer alteração pode causar agregação ou o enovelamento incorreto destas proteínas e gerar deficiências, como a catarata, levando à cegueira. Este trabalho permitiu, pela primeira vez, a identificação e caracterização de proteínas presentes nos cristalinos de gatos, por meio de abordagens proteômicas. Estas proteínas foram analisadas por duas estratégias: o Short Run, seguido da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com analisador Orbitrap (LC MS/MS), e a eletroforese bidimensional, seguida da espectrometria de massas do tipo MALDI TOF/TOF. Com o auxílio do software PEAKS, analisou-se as informações geradas pelo LC MS/MS e identificou-se 99 proteínas, das quais, 14 foram caracterizadas como as cristalinas, representando 97% do total de proteínas identificadas, contra 3% do restante. O grupo beta cristalinas foi o mais representativo (52% das cristalinas), no entanto, a proteína alpha crystallin A chain apresentou maior abundância relativa em comparação com todas as demais proteínas individuais. Para a segunda estratégia, utilizou-se o software MASCOT, validado pelo SCAFFOLD, e identificou-se em diversos spots do gel SDS-PAGE 2DE, diferenças no ponto isoelétrico e na massa, indicando possíveis isoformas da alpha crystallin A chain. Analisando os dados gerados a partir do software PEAKS e pelo banco de dados do KOG, classificou-se as proteínas de acordo com suas funções. Destacaram-se aquelas envolvidas no metabolismo e transporte de carboidratos, modificações pós-traducional, turnover proteico, chaperonas, conversão e produção de energia, e proteínas de função geral. As duas estratégias empregadas se complementaram, possibilitando a obtenção do perfil proteômico do cristalino de gatos, o qual pode contribuir para um melhor entendimento das abundâncias e funções dessas proteínas, fornecendo uma base para estudos futuros, no intuito de melhor

compreender os aspectos sobre a baixa susceptibilidade do cristalino desta espécie animal à catarata.

ABSTRACT

SILVA, Maria José de Jesus, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2018. **Crystalline proteomic analysis of *Felis catus***. Advisor: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-advisor: Edvaldo Barros.

The Crystalline, or lens, is a key piece to the eye of any animal. The lens focuses the light on the retina, which is led to the optic nerve and sent to the brain, resulting in visual function. This is only possible, due the proteins that constitute it, providing its transparency and index of refraction suitable for the passage of light. Any change on its structure may cause improper aggregation or folding of these proteins and lead to deficiencies, such as cataract, leading to blindness. This work allowed, for the first time, the identification and characterization of proteins present in the crystallins of cats through proteomic approaches. These proteins were analyzed in two strategies: Short Run followed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry with Orbitrap analyzer (LC MS/MS) and MALDI TOF/TOF. The PEAKS software analyzed the information generated by LC MS/MS and identified 99 proteins. Of these, 14 are the crystallins representing 97% of the total proteins identified, against 3% of the rest. The beta crystallins group was the most representative (52% of the crystallins), however, the alfa crystallin A chain protein showed higher relative abundance compared to all other individual proteins. For the second strategy, the MASCOT software, validated by SCAFFOLD, identified in different spots of the SDS-PAGE 2D gel, differences in the isoelectric point and mass, indicating that they are possible isoforms of the alfa crystallin A chain. Analyzing the proteins generated by PEAKS, the KOG database we classified them according to their functions, highlight those involved in metabolism and carbohydrate transport, post-translational modifications, protein turnover, chaperones, energy conversion and production, and general function proteins stand out. The two strategies complement each other and provide the proteomic profile of the cat's lens, which can contribute to a better understanding of the abundances and functions of these proteins, providing a basis for future studies in order to better understand the aspects about the low susceptibility of the lens of this animal species to cataract.

1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que 285 milhões de pessoas em todo o mundo sofriam de deficiência visual, das quais 39 milhões eram cegas, com incertezas de 10-20%. Segundo a OMS, as principais causas de deficiência visual são erros de refração não corrigidos (43%, cerca de 122 milhões de pessoas), seguidos de catarata (33%, cerca de 94 milhões de pessoas). Esta última é apontada como a principal causa de cegueira (51%, cerca de 20 milhões de pessoas) (PASCOLINI; MARIOTTI, 2012).

Embora a cirurgia de catarata seja o tratamento mais comum e efetivo contra a cegueira, estima-se que nos últimos 20 anos ela pouco alterou a proporção de pessoas cegas por causa da catarata. De acordo com dados publicados em 1990, 41,8% dos casos de cegueira derivavam de catarata; em 2002, 47,8%; em 2004, 39,1% e em 2010, 51,00%. (RESNIKOFF; KEYS, 2012).

A catarata é a opacidade na lente do olho que impede a refração da luz de forma eficaz, afetando assim a capacidade do cristalino de focar os raios de luz na retina (ADKINS E HENDRIX, 2005). A maioria dos mecanismos pelos quais as proteínas das lentes previnem a agregação destas e mantêm a transparência da lente não é completamente entendida. A agregação das principais proteínas estruturais da lente, é uma causa predominante de vários tipos de catarata (MOREAU; KING, 2012).

Gatos são geralmente referidos como tendo uma menor prevalência a catarata do que humanos (GLAZE, 2005; THORESEN et al., 2002). Contudo, a maioria das proteínas do cristalino de gatos armazenadas no UniProt são predições (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

A pretensão de estudar os mecanismos biológicos que possibilitam aos gatos prevenirem a agregação das proteínas do cristalino nos leva, primeiramente, a direcionar esforços para definir um perfil proteômico do cristalino de gato, que validaria as proteínas já preditas e anotadas no UniProt.

Para a realização desta abordagem proteômica, propôs-se a utilização de duas técnicas: A primeira, denominada “*shotgun*”, utiliza de eletroforese

monodimensional (SDS-PAGE-1D), para imobilizar as proteínas do cristalino, seguido de espectrometria de massa LC MS/MS Orbitrap. A segunda, utiliza a eletroforese bidimensional (SDS-PAGE-2-DE), para separação das proteínas, seguido de MALDI TOF-TOF. Nos dados obtidos das duas técnicas, houve a utilização de ferramentas de bioinformática, que juntas permitiram identificar e caracterizar as proteínas mais abundantes, concluindo com um perfil proteômico do cristalino de felinos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O olho

Os olhos de gatos têm funcionamento e anatomia parecidos com os olhos humanos e de outros animais (Figura 1). A luz refletida pelo objeto atravessa a córnea, iniciando-se sua refração, e segue pelo humor aquoso e pela pupila até o cristalino, que converge os raios luminosos projetando a imagem na retina, através do humor vítreo.

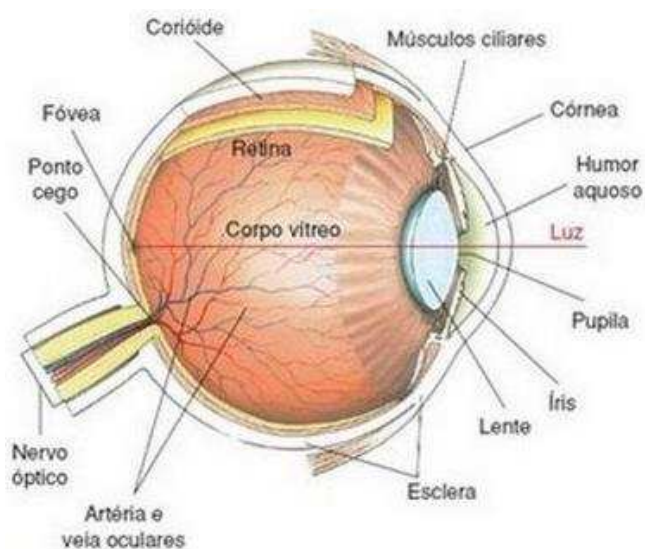


Figura 1: Imagem esquemática do olho com seus componentes.

2.2 - O cristalino

O cristalino, ou lente, é um tecido transparente e avascular composto de células epiteliais e fibrosas. Uma única camada de células epiteliais cobre a superfície anterior da lente, com as células fibrosas ocupando o restante do volume (Figura 2A). Aproximadamente 90% das proteínas da lente são proteínas estruturais fibrosas altamente abundantes (KYSELOVA, 2011).

A lente do olho foca a luz na retina, a qual é conduzida como um sinal ao nervo óptico e enviado para o cérebro, resultando em função visual. Para exercer esta função, a lente deve permanecer límpida durante todo o tempo de vida de um indivíduo (RESNIKOFF; KEYS, 2012).

A lente recebe todos os nutrientes e oxigênio do humor aquoso e do humor vítreo (CHOWDHURY et al., 2010). Na zona equatorial as células epiteliais começam a se diferenciar, alongando-se para se tornarem células fibrosas, enquanto perdem as organelas (Figura 2). Neste período, ela começa a sintetizar grandes quantidades de proteínas estruturais chamadas cristalinas (LIM et al., 2009).

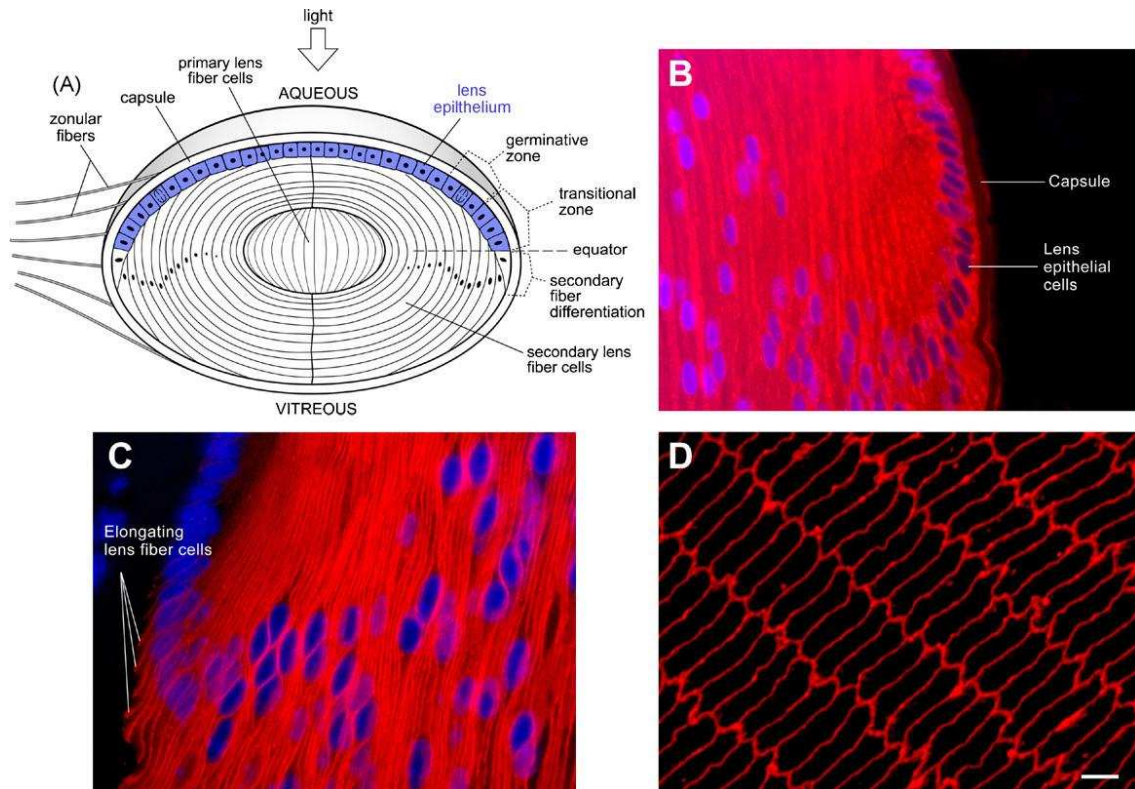


Figura 2: Células fibrosas do cristalino; (A) Esquema da lente seccionada ao longo do eixo óptico mostrando as células epiteliais. (B-D) Análise de imunofluorescência da lente de rato com anticorpos para as alfa cristalinas e as células fibrosas (ANDLEY, 2008).

As células epiteliais continuamente se diferenciam em células fibrosas, resultando na embalagem ordenada de camadas concêntricas de fibras, de acordo com a idade (Figura 2A). O centro, ou núcleo da lente, contém fibras mais maduras, e a periferia, ou córtex da lente, contém fibras recentemente diferenciadas (ROSE et al., 2006).

Embora a lente tenha mecanismos de proteção para preservar sua função durante toda a vida de um indivíduo, com o envelhecimento esses mecanismos começam a se deteriorar e a lente começa a acumular proteínas modificadas. Esta falha leva à agregação gradual das proteínas do cristalino, com uma perda

concomitante na qualidade ótica do cristalino, levando à catarata (HAINS; TRUSCOTT, 2008; SHARMA; SANTHOSHKUMAR, 2009; ZHU et al., 2013).

2.2.1 - Proteínas do cristalino

As células fibrosas do cristalino contêm altas concentrações de proteínas solúveis conhecidas como: alfa, beta e gama cristalinas. No entanto, proteínas de membrana são essenciais para manutenção da transparência da lente e a sua homeostase. As proteínas da membrana estão entre as proteínas mais importantes dentro de uma célula e elas mediam os principais sinais biológicos para a célula responder dinamicamente a mudanças ambientais. Essas proteínas abrangem importantes moléculas de adesão celular, enzimas associadas a membranas, transportadores e receptores de membrana, etc (WANG et al., 2013).

As proteínas alfa, beta e gama cristalinas são as principais proteínas encontradas no cristalino da maioria das espécies animais (Figura 3). As proteínas alfa são as mais comuns, sendo formadas por duas cadeias semelhantes que se associam para formar grandes complexos esféricos contendo cerca de 40 cadeias. Estas grandes esferas repelem uma a outra e se distribuem ao longo das células da lente. As proteínas beta, também formam complexos oligoméricos, sendo tipicamente formadas de duas ou seis cópias da cadeia. Existem várias proteínas beta semelhantes, as quais podem se misturar e combinar para formar diferentes tipos de oligômeros. Finalmente, as proteínas gama são monoméricas, servindo como uma cola fraca para manter suavemente as alfa cristalinas juntas (NAJMUDIN et al., 1993; NALINI et al., 1994; BAGNÉRIS et al. 2009; LAGANOWSKY et al., 2010).

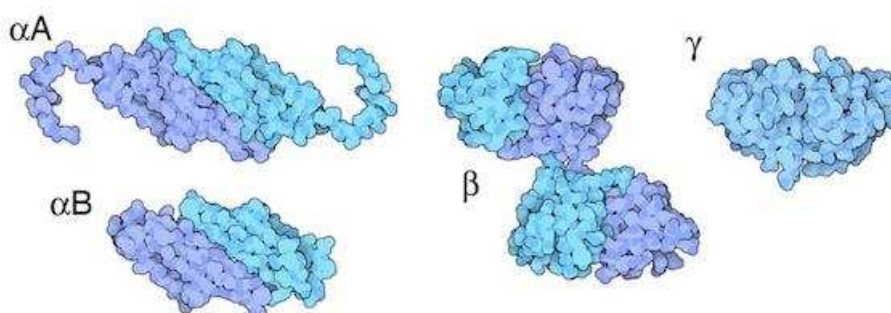


Figura 3: Proteínas do cristalino: alfa, beta e gama cristalinas (<https://pdb101.rcsb.org/motm/127>)

Muitas vezes, estas proteínas também têm outras funções em diferentes partes do corpo. Três exemplos são mostrados aqui: proteína delta de patos, também atua como uma liase enzima argininosuccinato; proteína eta de elefante, a aldeído-desidrogenase que atua na retina; e a proteína lambda de coelhos, a qual também atua como a enzima L-gulonato-3-desidrogenase (Figura 4) (SAM-PALEANU et al., 2001; BATEMAN et al., 2003; ASADA et al., 2010) .

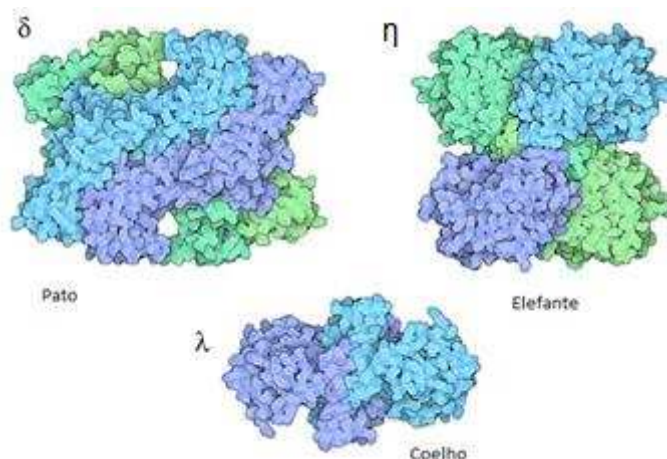


Figura 4: Proteínas do cristalino: delta, eta e lambda (<https://pdb101.rcsb.org/motm/127>).

2.3 - Espectrometria de massas

O termo proteoma foi proposto em meados dos anos 90 para designar a análise da expressão gênica baseada em proteínas. Um PROTEOMA foi definido como todo o complemento de PROTEÍNAS expressas por um genOMA de um tecido ou célula, em um determinado momento, sob uma dada condição biológica (WASINGER et al., 1995; WILKINS et al., 1996).

A área de estudo do proteoma, a proteômica, permite separar e identificar proteínas e peptídeos, com diversas técnicas de análise de biomoléculas, tais como: extração das proteínas; separação proteica por eletroforese; digestão proteolítica e técnicas cromatográficas; identificação das proteínas por espectrometria de massa; além de várias ferramentas de bioinformática. As diversas combinações destas técnicas, em suas formas mais específicas, bem como os avanços da espectrometria de massa e da bioinformática têm impulsionado a proteômica, fornecendo mais informações sobre proteínas que são fortemente associadas a doenças (WANG et al., 2013), dentre diversos outros usos.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de quantificar e identificar compostos e moléculas desconhecidas, baseando-se na formação de íons na fase gasosa (carregados positiva ou negativamente), sendo detectados pela sua razão massa/carga (m/z). O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons.

A disponibilidade de instrumentos robustos e sensíveis para analisar as proteínas e os extratos biológicos vem dos grandes avanços obtidos com o desenvolvimento de técnicas de ionização, como a técnica de ionização eletrospray (ESI-MS) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), que são técnicas capazes de transformar macromoléculas em íons (KARAS E HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988; FENN et al., 1989). No método MALDI, os peptídeos são co-cristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico que é ionizada por um feixe a laser de alta energia (ZALUZEC et al., 1995). No ESI, a solução aquosa da amostra é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas, gerando as formas ionizadas do analito, sem comprometer a integridade da amostra (NGUYEN E FENN, 2007).

O analisador de massas é a parte do instrumento que realiza a separação dos íons gerados pela sua razão massa/carga, tais como: quadrupolo (Q), baseado na estabilidade da m/z ; armadilha de íons (IT – Ion Trap) baseado na frequência de ressonância; tempo de voo (TOF – Time of flight), fundamentado no tempo de voo dos íons. Seu uso pode ser individual ou in tandem (MS/MS), onde a sequência acoplada de analisadores pode ser de mesmo tipo (triplo quadrupolo, TOF/TOF) ou híbridos (QTOF), cada qual possuindo vantagens e desvantagens na separação de íons (YATES et al., 2009). Assim como os processos de ionização apresentam-se em um enorme leque de opções, que podem realizar esta operação. Os dois equipamentos utilizados aqui foram o MALDI - TOF e o Q-Orbitrap.

O analisador de tempo de voo (TOF - Time of flight) separa os íons baseando-se na velocidade dentro do tubo de voo. Teoricamente, os íons são formados no mesmo lugar ao mesmo tempo, na fonte de íons, e então acelerados a

um potencial fixo para dentro do “TOF drift tube” – tubo de desvio TOF. Uma vez que todos os íons formados com a mesma carga obtêm a mesma energia cinética, após a aceleração, os íons com menor valor de m/z alcançarão uma maior velocidade que os íons de maior m/z . De fato, a velocidade dos íons é inversamente proporcional à raiz quadrada de m/z . Após os íons serem acelerados, eles viajam por uma distância fixa, livres de campo elétrico, geralmente entre 0,5 e 2,0 metros, antes de chegarem ao detector. Portanto, pela medida do tempo gasto pelos íons para chegar no detector, após a sua formação na fonte de íons, pode-se determinar a razão m/z do mesmo (GLISH E VACHET, 2003).

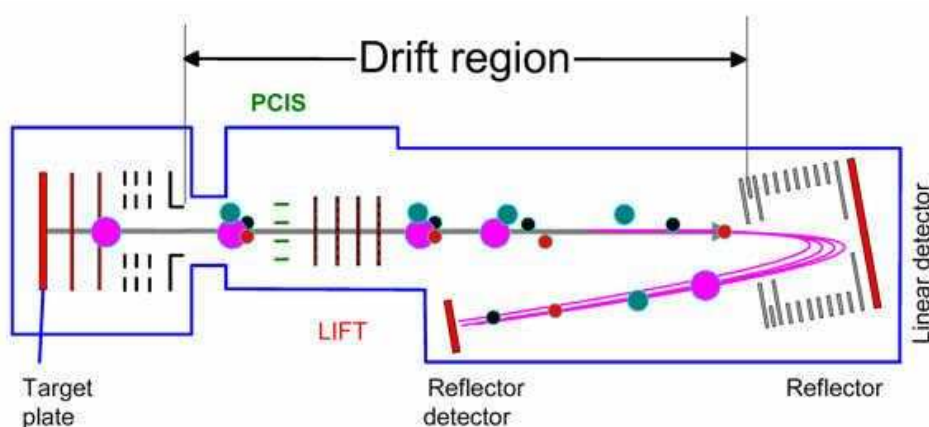


Figura 5: Espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (<http://www.mslab.ulg.ac.be/mslab/equipment/maldi-toftof-bruker-ultraflex-ii-toftof-april-2005/>).

A separação dos íons em um instrumento do tipo quadrupolo consiste de um conjunto de quatro eletrodos em bastão, que funcionam como filtros de massas. Entre esses eletrodos, um campo elétrico assegura que somente íons de uma determinada m/z sigam a trajetória ao detector enquanto os demais são desviados. Os analisadores do tipo ion trap ou armadilha de íons (IT) filtram e aprisionam em um campo elétrico tridimensional os íons de interesse, que são gradualmente liberados em ordem de m/z crescente. O Orbitrap é um tipo de analisador IT que é composto de um eletrodo central fusiforme e um eletrodo externo em forma de barril, no qual os íons oscilam ao longo e ao redor na forma de espiral quase circular dentro da armadilha. A frequência de oscilação axial é inversamente proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga e pode ser determinada com alta precisão (GLISH E VACHET, 2003).

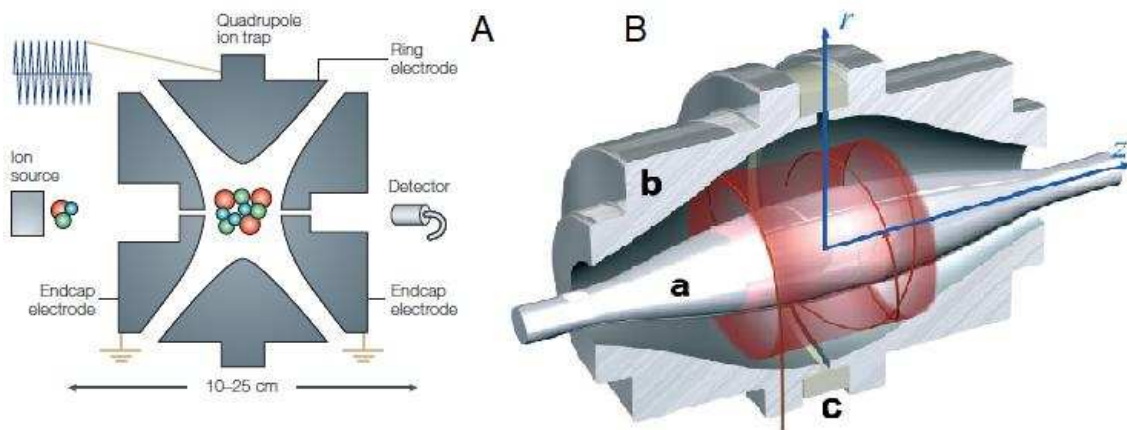


Figura 6: Estrutura interna de analisadores de massas (A) Quadrupolo. (B) Orbitrap

Para identificar as diferenças na abundância de proteínas de duas amostras distintas, pode-se fracioná-las por eletroforese bidimensional em gel de poli-acrilamida (2-DE), seguida por análise dos spots de proteína que são coradas por Coomassie Blue ou prata. Os spots revelam as diferenças na sua intensidade de coloração, para diferentes tratamentos analisados, sendo retiradas do gel e identificadas usando espectrometria de massas (VEENSTRA E YATES, 2006). Diversos autores como HAINS, ZHU e ZHOU reportaram esta metodologia, dentro de uma abordagem proteômica, utilizando diferentes analisadores de massa, in tandem, com alta capacidade de resolução (HAINS; TRUSCOTT, 2008; ZHU et al., 2013; ZHOU et al., 2015).

Assim, a associação das técnicas de proteômica, bioinformática e com o conhecimento científico específico permitirão atender aos nossos objetivos a seguir.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Identificar e caracterizar as proteínas do cristalino de gatos, por meio de ferramentas proteômicas.

3.2 - Objetivos específicos

- Extrair e dosar as proteínas totais de cristalinos de gatos;
- Purificar as proteínas totais de cristalinos de gatos por eletroforese;
- Excisar as proteínas dos géis e cliva-las enzimaticamente;
- Sequenciar os peptídeos trípticos das proteínas dos cristalinos de gatos, utilizando MALDI-TOF/TOF e LC MS/MS Orbitrap;
- Identificar as proteínas do cristalino de gato pelo confronto dos resultados de espectrometria de massas com as proteínas depositadas no banco de dados;
- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas no cristalino de gato;

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada pode ser resumida como apresentado na Figura 7:

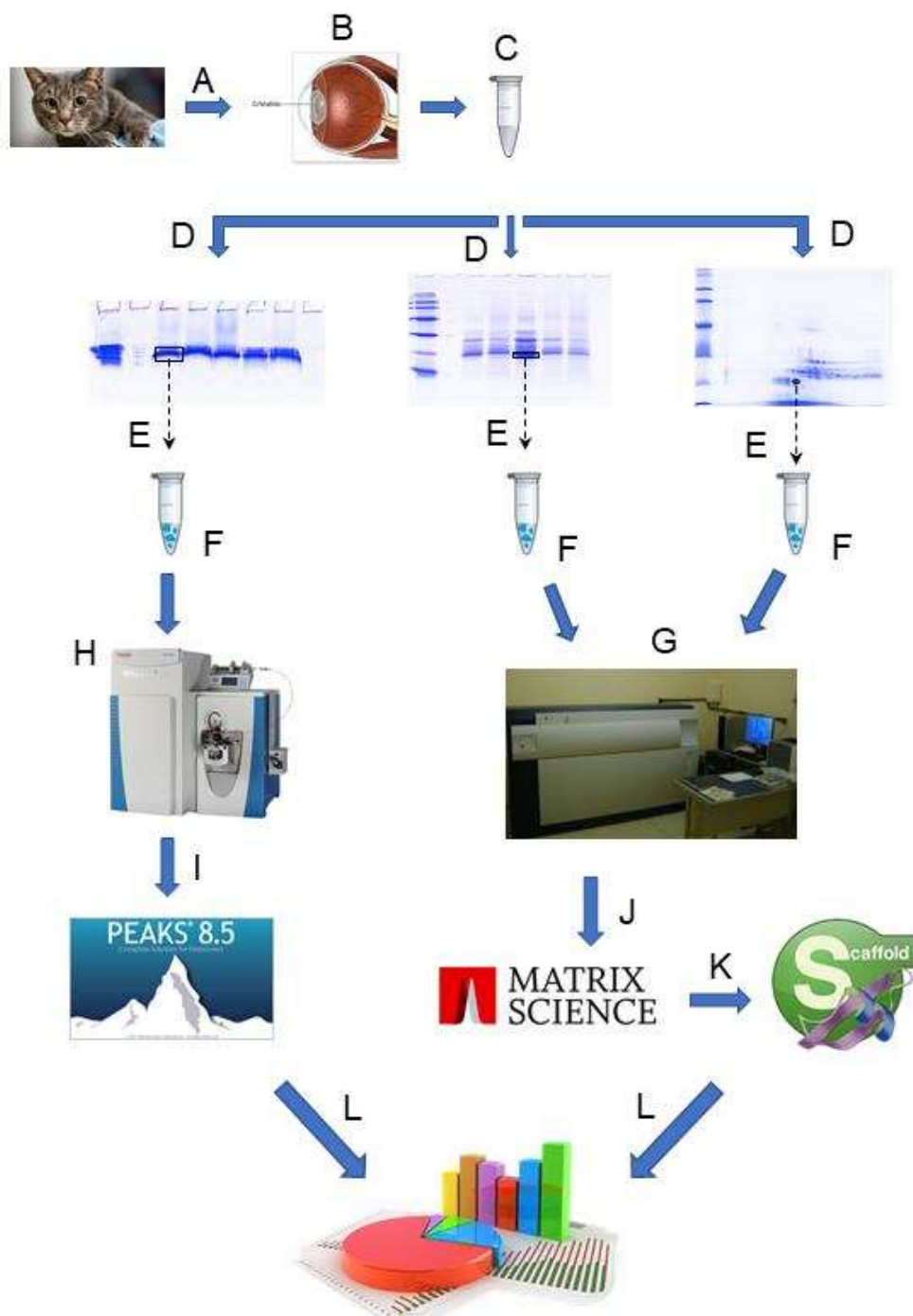


Figura 7: (A) obtenção dos cristalinos; (B) liofilização e armazenamento da amostra; (C) extração das proteínas totais do cristalino; (D) processamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida; (E) excisão dos spots dos géis com as proteínas; (F) redução, alquilação e digestão das proteínas em gel e recuperação dos peptídeos trípticos; análise dos peptídeos por MALDI-TOF/TOF(G) e LC MS/MS Orbitrap (H); identificação das proteínas pelo PEAKS (I) e pelo MASCOT (J); (K) validação dos resultados do MASCOT pelo SCAFFOLD; (L) análise dos resultados.

4.1 - Obtenção dos cristalinos

Submeteu-se à comissão de ética no uso de animais da UFV (CEUA-UFV) o projeto deste estudo com a descrição da metodologia mostrada a seguir. Mediante a aprovação (em anexo), iniciou-se os procedimentos.

A coleta do cristalino foi realizada imediatamente após a confirmação da morte dos animais e da posse do documento que consta autorização do proprietário do animal à coleta de material biológico para estudos científicos. Foram coletadas cinco réplicas biológicas, 2 machos e 3 fêmeas, com idade variando de 1 a 20 anos, da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HVT/UFV) e do Hospital Veterinário da FAVIÇOSA, pela equipe médica responsável pelo atendimento, que foram supervisionados pelo Professor Ricardo Junqueira Del Carlo (HVT/UFV) e pela Professora Alessandra Sayegh Arreguy Silva (HVT/FAVIÇOSA), respectivamente. Os cristalinos retirados foram considerados sadios e sem alterações clínicas.

Os cristalinos foram removidos, de forma asséptica, após uma pequena incisão na córnea, feita com lâmina de bisturi, e abordagem a câmara anterior do olho. Após coleta, os cristalinos foram acondicionados em frascos (coletor universal estéril, 50 mL, J. Prolab) individuais, contendo solução de soro fisiológico 0,9% (Farmax), sendo a seguir refrigerados e adequadamente identificados quanto à ficha do animal, nome, data e qual o olho presente (direito ou esquerdo). As amostras coletadas foram encaminhadas ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL) da UFV para etapas de análise e processamento posterior. A solução foi trocada a cada 24 horas, até a possível liofilização deste material.

Para o processo de liofilização transferiram-se os cristalinos do meio refrigerado para graus limpos, no qual a cápsula do cristalino foi incisada, deixando exposto o núcleo e o córtex do cristalino. Estes foram congelados a -80°C por um período de 12 horas e, em seguida, liofilizados (Liofilizador de modelo L101, LioBras Ltda, Brasil) e macerados. Após a maceração, a massa do pó fino obtido foi aferida e armazenado a -20°C até a próxima etapa.

4.2 - Extração e quantificação de proteínas totais de cristalino

A extração e quantificação de proteínas totais de cristalino foram feitas como descrito por (SU et al., 2011), com algumas adaptações. Resumidamente, a solução de proteínas totais foi obtida com a solubilização deste pó com 500µL de solução extratora (ureia 7M; tiourea 2M; ditioneitol - DTT 40mM; fluoreto de fenilmetilsulfonila - PMSF 1mM e; [3-((3-colamidopropil) dimetilamônio)-2-hidroxi-1-propanosulfonato] – CHAPS 4%). A solução foi sonicada (Lavadora Ultra-sônica, Unique) por 10 minutos, seguindo-se descanso também por 10 minutos (repetindo 5 vezes). O tubo na posição vertical ficou em repouso por 20 minutos seguindo-se o uso do Vórtex (QL-901, Vertex) por 60 segundos (repetindo 3 vezes). O material foi centrifugado (Centrifuge 5424, Eppendorf) por 45 minutos a 20.000 x g. O sobrenadante foi recuperado para um tubo novo e estocado a -80 °C até o uso. Este sobrenadante foi denominado extrato de proteínas totais de cristalino. As concentrações de proteínas totais dos cristalinos foram estimados pelo método de (BRADFORD, 1976) utilizando albumina sérica bovina (BSA) para o preparo da curva padrão.

4.3 - Separação das proteínas totais por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE 1D)

As proteínas totais de cristalino foram separadas por SDS-PAGE 1D de acordo com (LAEMMLI, 1970). O sistema de eletroforese utilizado foi o MiniProtean da BIO-RAD (Fonte PowerPac Universal Power Supply, 500 V - 2,5 A - 500 W da BIO-RAD), com placas de vidro de 10 cm x 8 cm e a espessura do gel de 1,5 mm. Os géis de resolução foram preparados a 12,5% da relação acrilamida/bisacrilamida e o de empilhamento, a 4%. Foi aplicado um padrão molecular (Protein Mixture, GE-healthcare UK Limited) que tem uma variação de massa de 14,4 kDa a 97,0 kDa, sendo previamente solubilizado em tampão de amostra 1X (Tris 0,0625M; SDS 2%; Glicerol 10%; azul de Bromofenol 0,01%; DTT 0,1M em pH 6,8). A constituição do padrão molecular é a seguinte: Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Suécia), constituído por fosforilase b (97 kDa), soroalbumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa).

Na técnica SDS-PAGE 1D foram utilizadas duas estratégias:

A) Corrida completa de 4h (migração das proteínas em todo o gel) para verificação da integridade das mesmas. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas (LPBP);

B) Corrida de menor tempo, chamada “*Short-Run*” que consiste na migração das proteínas por aproximadamente 1 centímetro no gel de separação, alcançando esta marca a corrida é interrompida (LIEBLER; HAM 2009; RESJÖ et al., 2017). Esta etapa foi realizada no NUBIOMOL. A imobilização das proteínas totais no gel de separação foi utilizada visando a redução do número de interferentes e da perda de proteínas, sem a separação efetiva das mesmas. As proteínas parcialmente separadas pelo Short-Run foram conduzidas ao Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) (Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB/UFOP), para identificação em larga escala pelo LC-MS/MS, a qual é referenciada como “*Shotgun proteomics*”.

Nas duas estratégias a corrida foi realizada a 80 V, nos mesmos parâmetros do SDS-PAGE 1D mostrados acima. Finalizada a corrida, as proteínas detectadas foram para a etapa de revelação.

4.4 - Separação das proteínas totais por eletroforese bidimensional (2-DE)

As proteínas foram separadas em duas dimensões, com separações sequenciais por ponto isoelétrico e peso molecular, a fim de encontrar seu perfil proteômico (O’FARRELL, 1975). As amostras foram embebidas em tiras de gel (Immobiline™ DryStrip, com gradiente de pH 3-10, 7 cm e pH 4-7, 7 cm, GE Healthcare) usando 125 µL de solução de reidratação em aparato próprio denominado IPGBox (GE Healthcare), em um período de 20 horas à temperatura ambiente. A solução de reidratação foi constituída de 150 µg de proteínas totais de cristalinos de gato, para ocorrer a absorção da amostra pelo gel. 2,5 µL de IPG Buffer com a faixa de pH competente para cada tira, correspondendo a 2% do volume total, e completou-se o volume final com solução de reidratação DeStreak (DeStreak™ Rehydration solution, GE Healthcare).

A focalização isoeétrica (IEF) das proteínas foi realizada no equipamento Ettan IPGphor III (GE Healthcare, Suécia) à temperatura de 20°C, sendo seus parâmetros programados conforme as etapas seguintes: 1º passo: 300 V por 14h; 2º passo: 1000 V em gradiente, acumulando 300 Vh; 3º passo: 5000 V em gradiente acumulando 4000 Vh; 4º passo: 5000 V em passo único acumulando 8000 Vh; e 5º passo: 200 V em passo único por 10h. Terminada a IEF, as tiras foram acondicionadas em tubo de 15 mL tipo falcon, e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da segunda dimensão da 2-DE.

Para a 2-DE, as tiras foram equilibradas em 6 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 75mM pH 8,8; ureia 6M; glicerol 29,3% (v/v); SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v)). Com o objetivo de reduzir as proteínas, foram adicionados 120 mg de DTT (2%) para cada tira de gel e 6 mL do tampão de equilíbrio deixando sob agitação moderada por 1:30 h. Para alquilação das proteínas, 300 mg de iodoacetamida (5%) foram adicionados em outros 6 mL do referido tampão, também sob agitação moderada por 1:30 h. Em seguida, as tiras foram submetidas ao tampão de corrida 1X (Tris base 25mM; glicina 192mM; SDS 0,1%), por alguns segundos, e transferida para a superfície do gel de resolução de poli(acrilamida), já preparado anteriormente a fim de iniciar a segunda dimensão (LAEMMLI, 1970).

Ao lado da tira, foi inserido o padrão molecular (descrito anteriormente) em pedaço de papel de filtro (usado como referência) previamente seco e ambos foram fixados com solução de agarose (tampão de corrida 1x; agarose 0,5%(m/v); azul de bromofenol 1%). O gel de resolução teve a concentração de 12,5% de poli(acrilamida) (acrilamida 29,2%, N,N'metilbisacrilamida 0,8%), e a corrida ocorreu em uma cuba Mini Protean Tetra Cell (BIO-RAD) a 80V constantes. A corrida foi paralisada quando o azul de bromofenol atingiu o limite inferior do gel. A próxima etapa foi a revelação das proteínas.

4.5 - Revelação das proteínas de cristalino de gato e análise das imagens

As proteínas presentes nos géis foram fixadas por meio da submersão em solução de fixação (ácido acético 10% (v/v), etanol 50% (v/v) e água 40% (v/v))

pelo período de 12 horas. Em seguida, as proteínas foram reveladas por meio de coloração com solução de coloração de azul de Coomassie coloidal G-250 (sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie Blue G-250 0,08% (v/v), e metanol 20% (v/v)) (NEUHOFF; STAMM; EIBL, 1985). Os géis foram mantidos em solução de coloração por aproximadamente 72 h até a completa visualização das proteínas. Em seguida, o corante foi removido e os géis foram lavados com água destilada até a eliminação completa do excedente de corante. Por fim, os géis foram armazenados em solução contendo ácido acético 5% (v/v) até a digitalização.

Os géis foram digitalizados no equipamento ImageScanner III (GE Healthcare, Suécia) em modo de transparência e com a resolução de 300 dpi. Para a estratégia Short-Run, foram geradas imagens no formato (*.png), enquanto, para o SDS-PAGE 2-DE, foram geradas no formato (*.mel).

As imagens do 2-DE foram analisadas no software Image Master 2D Platinum, versão 7.5 (GE Healthcare, Suécia), no qual, os spots correspondentes às proteínas foram detectados automaticamente, conferidos e editados manualmente quando necessário. A análise permitiu aferir o volume relativo de cada spot, baseado em parâmetros de densidade ótica e volume dos referidos spots. A análise também forneceu a estimativa do ponto isoelétrico, baseado no tamanho e na faixa de pH da tira, e das massas moleculares, baseado na referência dos marcadores de massa molecular utilizados.

4.6 - Excisão e preparo dos spots dos géis mais abundantes para a espectrometria de massas

Os spots das proteínas mais abundantes foram manualmente excisados dos géis e as proteínas foram digeridas enzimaticamente, conforme (SHEVCHENKO et al., 2007). Os fragmentos dos géis foram colocados em microtubos de 600 µL contendo 200 µL de acetonitrila 50% (v/v) em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0, e submetidos a lavagens para remoção do corante e do SDS. Em seguida, foi realizada a desidratação dos géis adicionando-se, por duas vezes, 200 µL de acetonitrila 100% em cada tubo, mantendo-os em repouso por

5 minutos. Os fragmentos dos géis foram secos por 15 minutos em sistema de centrifugação a vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha).

As proteínas presentes nos fragmentos dos géis foram reduzidas em 100 μ L de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, a 56°C por 30 minutos. Em seguida, as proteínas foram alquiladas com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0, à temperatura ambiente, por 30 minutos no escuro. Posteriormente, os fragmentos dos géis foram lavados, hidratados e desidratados com bicarbonato de amônio e acetonitrila por duas vezes, respectivamente, e por último, eles foram secos em sistema de centrifugação a vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha).

Na etapa de proteólise, os fragmentos dos géis foram reidratados em banho-de-gelo com uma solução de tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência T-6567 (Sigma Aldrich, EUA), na concentração final de 25 ng/ μ L em solução de ativação (bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8,0, e acetonitrila 10%). Após 45 minutos em gelo, foram adicionados 50 μ L da solução de ativação aos tubos contendo os fragmentos dos géis. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 22 h. Após a proteólise, as amostras foram sonicadas por 10 minutos, agitadas em vórtex por 20 s e a solução foi removida para um microtubo limpo. Na sequência, foram adicionados 30 μ L da solução contendo ácido fórmico 5% (v/v) em acetonitrila 50% (v/v) aos géis restantes. Cada tubo foi submetido à agitação em vórtex por 20 s, mantido em temperatura ambiente por 15 minutos e sonicado por 2 minutos. A solução foi removida e adicionada à solução anteriormente reservada no tubo limpo. Este passo foi repetido mais uma vez, a solução foi recolhida e acrescentada ao tubo limpo. As amostras contendo os peptídeos foram concentradas em sistema de centrifugação a vácuo.

A dessalinização dos peptídeos trípticos ocorreu de duas formas:

A) Os peptídeos trípticos oriundos do Short-Run foram ressuspensos em 200 μ L de ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. Em seguida, os mesmos foram dessalinizados usando cartuchos de extração em fase sólida C18-E Strata®, 55 μ m, 70Å (Phenomenex, USA) e foram secos na centrífuga à vácuo.

B) Os peptídeos trípticos oriundos do 2-DE foram dessalinizados utilizando-se micro colunas de fase reversa C18 modelo ZTC18S096 (Millipore, USA). Em ambas as estratégias, os peptídeos trípticos foram eluídos em solução de acetonitrila 50%, acidificada com ácido trifluoracético 0,1%, conforme as instruções dos fabricantes, e em seguida, aplicados diretamente na placa do MALDI TOF/TOF.

4.7 - Espectrometria de massas

4.7.1 - Análise por LC-MS/MS Orbitrap

Os peptídeos trípticos provenientes da estratégia de Short-Run foram ressuspendidos em 60µL de solução constituída por 98% de água ultrapura, 2% de acetonitrila, acidificada com TFA 0,1%, centrifugados a 20.000 x g por 20 minutos, da qual 50µL foram transferidos para frascos do amostrador. Os peptídeos trípticos foram separados em um sistema nano-UHPLC Ultimate® 3000 (Thermo Scientific, Bremen), no qual foram carregados 2µL da amostra em uma coluna nano-trap C18, modelo Acclaim PepMap100 (diâmetro interno de 100µm x 2cm de comprimento, 5µm de partícula, 100Å de poro, Thermo Scientific), acoplada em uma coluna de separação C18, modelo Acclaim PepMap100 (diâmetro interno de 75µm x 25cm de comprimento, 3µm de partícula, 100Å de poro, Thermo Scientific). Primeiramente, os peptídeos trípticos foram lavados com acetonitrila 2%, acidificada com TFA 0,1%, por 3 minutos em um fluxo de 7µL por minuto. Em seguida, os mesmos foram separados em temperatura constante de 40°C, fluxo de 0,3µL por minuto, usando um gradiente não linear dos solventes A (ácido fórmico – AF 0,1%) e B (Acetonitrila 80%, acidificada com AF 0,1%). O gradiente iniciou com 4% do solvente “B”, pelo período de 3 minutos; variando de 4% a 30% do solvente “B” em 120 minutos; de 30% a 55% do solvente “B” em 30 minutos; de 55% a 99% do solvente “B” em 2 minutos; mantendo 99% do solvente “B” por 10 minutos, com a finalidade de realizar a limpeza da coluna; para o condicionamento da coluna para uma nova corrida, o gradiente foi decrescido de 99% a 4% do solvente “B” por 2 minutos; finalizando a corrida com 4% do solvente “B” pelo período de 16 minutos. A análise cromatográfica teve seu tempo de corrida estimado em 3 horas. Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro de massas modelo Q-Exactive™ (Thermo Scientific, Bremen),

acoplado ao sistema nano-UHPLC por uma fonte de ionização nano-eletrospray. O instrumento foi operado em 2,8 kV, modo positivo, sem listas de inclusão, exclusão ou tag. A resolução para análise dos íons parentais (MS1) foi de 70.000, com acúmulo de íons/cargas (AGC target) de 1×10^6 , tempo máximo de injeção de 120ms, faixa de análise de íons (scan range) na razão massa/carga de 300-2000 m/z. A resolução para análise dos íons fragmentos (MS2) foi de 17.500, com acúmulo de íons/cargas (AGC target) de 5×10^5 , tempo máximo de injeção de 60ms, com fragmentação dos 12 íons mais intensos pelo método Data Dependent Acquisition - DDA (Full MS – ddMS2 TopN 12), janela de isolamento do íon parental de 1,2 m/z, faixa de análise de fragmentos com m/z mínimo de 120 e sem máximo, energia de colisão da HCD (Higher-energy collisional dissociation) de 28/30V, análise dos precursores que apresentaram variação de carga entre 2 e 4, preferência de íons parentais com perfil similar ao de peptídeos, com exclusão dos isótopos na fragmentação e exclusão dinâmica de 40 segundos para cada precursor analisado.

4.7.2 - Análise por MALDI-TOF/TOF

Os peptídeos trípticos provenientes dos spots da estratégia de SDS-PAGE 2DE foram ressuspensos em 5 μ L de solução de acetonitrila 50%, acidificada com TFA 0,1%. A matriz utilizada foi constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), a qual também foi solubilizada em acetonitrila 50%, acidificada com TFA 0,1%, na concentração final de 10mg/mL. Para a calibração do método de análise MS1, foram utilizados peptídeos padrão (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir, 1 μ L da amostra de peptídeos trípticos e 1 μ L da matriz foram aplicados e homogeneizados em cada spot da placa de aço polida apropriada para análise de MALDI, os quais foram secos à temperatura ambiente.

Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics, Alemanha). Para obtenção dos dados de MS1, utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, foi utilizado o método LIFT no modo positivo, sendo selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flexcontrol, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do software flexAnalysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascot generic format (mgf) pelo software BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

4.8 - Identificação das Proteínas

Em ambas as estratégias, as listas de massas geradas foram confrontadas com o banco de dados de proteínas da espécie *Felis catus* (download em 27/11/2017, com 21.533 entradas, depositado no UniProt).

O PEAKS é um software completo para análise de dados em proteômica por espectrometria de massas. A partir das listas de massas com extensão “.raw”, obtidas pelo espectrômetro de massas Q-Exacte, o software PEAKS, versão 8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (Ma et al., 2003), foi utilizado em cada passo da conversão e do confronto das informações adquiridas contra o banco de dados de proteínas acima descrito. Por meio do algoritmo PEAKS DB, ferramenta de pesquisa contra o banco de dados, as proteínas foram identificadas com alta sensibilidade e acurácia. Com base nos resultados obtidos pelo PEAKS DB, o algoritmo PEAKS PTM foi utilizado para identificar proteínas que apresentavam modificações pós-traducionais (PTM) e que não haviam sido identificadas pelo PEAKS DB. Finalmente, com base nos resultados anteriores, o algoritmo PEAKS SPIDER, auxiliado pelo PEAKS de novo sequencing, foi utilizado para encontrar peptídeos homólogos àqueles identificados nos bancos de dados, visando identificar outras proteínas com possíveis sítios de mutações, que não haviam sido identificadas anteriormente. Os três algoritmos PEAKS DB, PTM e SPIDER foram programados em um fluxo de trabalho e seus resultados salvos em um único projeto, do qual foi gerado um relatório de análise mostrando o resultado da pesquisa combinada ao banco de dados.

Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com duas clivagens perdidas e nenhuma clivagem inespecífica; como modificação fixa foi considerada a carbamidometilação da cisteína para os três

softwares: PEAKS DB, PTM e SPIDER. Como modificação variável, para o PEAKS DB foi a oxidação da metionina. Já para o PEAKS PTM e o SPIDER, as modificações variáveis consideradas foram: a oxidação da metionina, oxidação do triptofano, oxidação da tirosina, acetilação de lisina, acetilação N-term, +72 de lisina, carbamidometil de cisteína, carbamilação de lisina, carbamilação N-term, carboxietil de lisina, carboximetil de lisina, deamidação (NQ), glicosilação (ST), metilação de lisina e arginina, H-metilação de histidina, S-metilação de serina, +192 de cisteína, +192 de histidina, fosforilação de serina, treonina e tirosina (STY), +55 de arginina, +28 de serina e histidina (WILMARTH, P. A. et al. 2006). No PEAKS SPIDER também foram consideradas as mutações: Ala->Gln, Gly->Asn, Phe->Tyr, Lys->Arg, Val->Arg, Val->Phe, Ile->Val, Glu->Trp, Glu->Gln, Glu->Asp, Leu->Val, Val->Leu, Ser->Gln, Gly->Ala, Ala->Ser, Gln->Arg, Leu->Arg, Ser->Ala, Asn->Ser, Glu->Pro, Asp->Asn, Met->Leu, Arg->Gly, His->Tyr, Gly->Ser, Asn->Pro, Phe->Trp, Pro->Glu, Pro->Thr, Met->Tyr, Ser->Thr, Asp->Glu, Thr->Pro, Asp->Pro, Glu->Ser, Ala->Asn, Asp->Met, Ile->Phe, Tyr->His, Ala->Val, Ser->Asn, Thr->Ser, Ala->Glu, Thr->Asn, Ala->Gly, Ser->Gly, Gln->Pro, Ala->Thr, Leu->Met, Thr->Glu, Gln->His, Met->Thr, Ala->Pro, Val->His, Thr->Ala, Val->Thr, Leu->Phe, Lys->Ala, Cys->Gly, Gln->Thr; tolerância de erro de 10ppm para o íon parental e de 0,1Da para os fragmento. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentassem, pelo menos, dois peptídeos únicos com FDR (False Discovery Rate) menor que um. A abundância relativa das proteínas foi obtida pela média da aferição das áreas integradas dos picos de três peptídeos mais intensos detectados para cada proteína e analisados pelo PEAKS. As proteínas identificadas foram separadas em dois grupos: cristalinas e outras. Abundância relativa entre as cristalinas foi obtida pela mesma abordagem anterior, considerando a soma das médias das cristalinas como 100%, enquanto, para as outras proteínas, foi procedido da mesma forma.

As listas de massas com extensão “.mgf”, obtidas pelo espectrômetro de massas MALDI TOF/TOF foram confrontadas contra o banco de dados de proteínas por meio do software MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon

parental de 0,2Da e para os fragmentos de 0,5Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo MASCOT como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo software SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (KELLER et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSKII et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

4.9 - Caracterização das proteínas identificadas por ferramentas de bioinformática

A classificação funcional das proteínas identificadas e validadas estatisticamente foi realizada por meio da comparação das suas sequências com as proteínas ortólogas de eucariotos disponíveis no banco de dados KOG (Eukaryotic Orthologous groups) (TATUSOV et al., 2003). Nessa classificação, um ID do KOG foi atribuído a cada proteína que alinhou significativamente (E-value < 1E-4) com aquelas depositadas nesse banco de dados, usando o Reverse Position Specific BLAST (RPS-BLAST) (A.SCHAFFER et al., 1999; MARCHLER-BAUER et al., 2002). A porcentagem das classes foi calculada com base no número de proteínas classificadas em cada função do banco de dados. A porcentagem em abundância foi calculada com base na média das áreas e a soma total destas.

As redes de interação entre as proteínas identificadas e validadas foram reconstruídas utilizando o software STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, versão 10.0, <http://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al.,

2015). Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie *Felis catus* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados por meio das estratégias de textmining, experiments, database e co-expression, dentro de um nível de confiança acima de 0.90. Para as proteínas que não apresentaram interações com outras, foi enriquecida a análise utilizando no máximo 20 interações na primeira e segunda chamada. O gráfico da rede de interações foi gerado no modo confidence view, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação.

Um enriquecimento baseado nas informações provenientes do banco de dados KEGG-Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) foi realizado, usando o próprio STRING. A recuperação dos mapas referentes às vias identificadas no KEGG foi realizada por meio do endereço: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Preparo e separação das proteínas

Foram obtidas 5 réplicas biológicas dos hospitais veterinários. Após o preparo do extrato de proteínas totais do cristalino e a quantificação por Bradford, foi realizada SDS-PAGE 1D, a fim de verificar a integridade das proteínas.

Foram aplicados 30 µL em cada canaleta, uma do padrão molecular, e 5 canaletas com amostra (10C, 14A, 15C, 19A, 20C). Após a corrida e a revelação das bandas por Coomassie Brillante Blue G-250, obteve-se a Figura 8 que ilustra o perfil das proteínas no gel SDS-PAGE 1D em uma corrida de 4 h, e a Figura 9 que ilustra as proteínas em gel SDS-PAGE 1D “Short-Run” de 45 minutos.

Na Figura 8, as proteínas de maior abundância dos cristalinos de gatos encontram-se na faixa entre 20 a 30 kDa, o que indica a predominância de proteínas de baixa massa molecular. Verificou-se que, em comparação com as proteínas de *Felis catus* depositadas no UniProt, sua maioria está em uma faixa de massa aproximada entre 19 a 28 kDa. Outras proteínas de menor abundância também foram observadas neste gel, com massa em torno de 45 kDa.

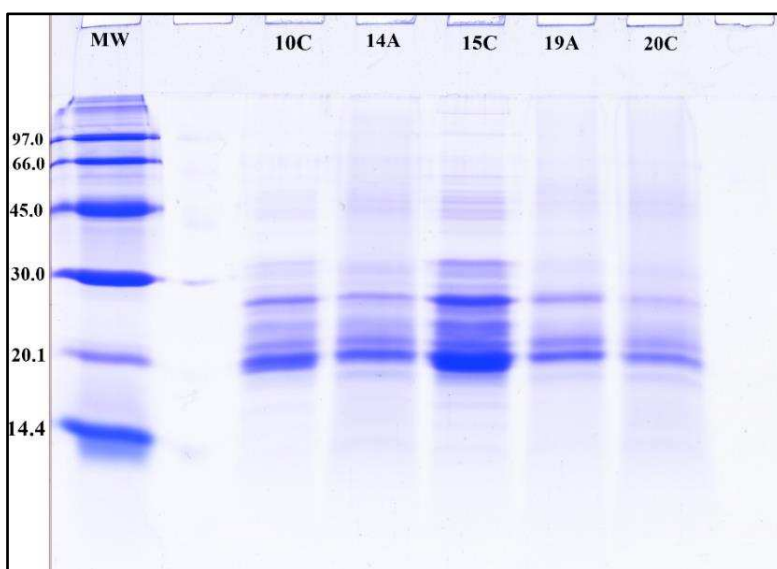


Figura 8: Separação das proteínas das 5 réplicas biológicas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 1D com gel 12,5%, coradas com Coomassie Brillante Blue G-250.

Já na Figura 9, observou apenas uma fração por canaleta que foram excisadas indo direto para digestão enzimática. Estas amostras foram enviadas para o LC MS/MS Orbitrap da LEP/UFOP.

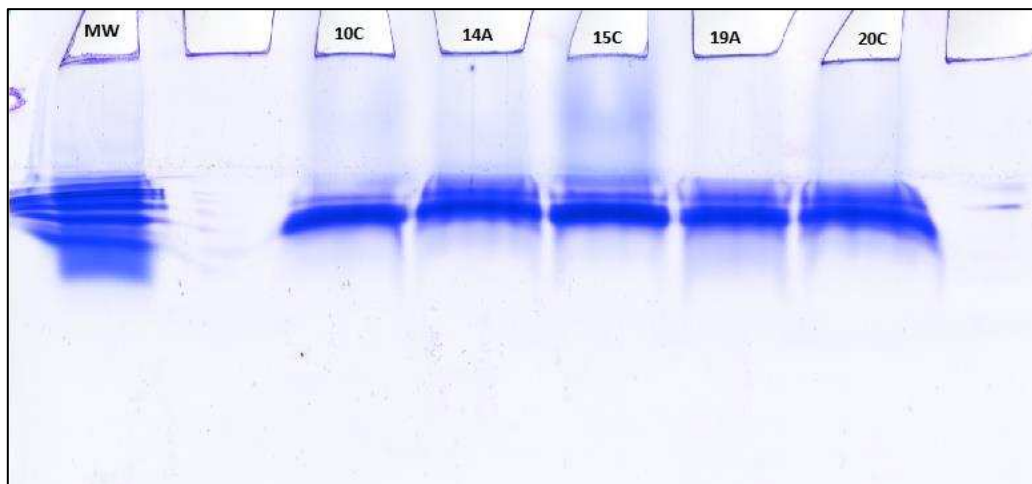


Figura 9: Estratégia short run sem separação das proteínas das 5 amostras biológicas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 1D com gel 12,5%, coradas com Coomassie Brillante Blue G-250.

5.2 - Identificação das proteínas dos cristalinos de gatos pela abordagem LC MS/MS Orbitrap utilizando os algoritmos PEAKS

Do gel da Figura 9, das 5 réplicas biológicas, foram analisadas 3 (15C, 19A e 20 C) réplicas fêmeas com idade variando de 2 a 20 anos, que são aquelas que apresentaram maior correlação para análise quantitativa, realizadas no LC MS/MS Orbitrap. As informações de peptídeos trípticos geradas pelo espectrômetro foram alinhadas contra o algoritmo PEAKS obtendo três listas de proteínas em cada categoria: PEAKS DB (108 proteínas), PEAKS PTM (117 proteínas) e PEAKS SPIDER (132 proteínas). Após esta etapa, estes dados foram processados selecionando as proteínas não redundantes entre os 3 grupos (DB, PTM e SPIDER) e retirando as keratins e tripsins presentes. Como resultado, foram identificadas 99 proteínas que estão na Tabela 1, em anexo. Nela há a identificação de cada proteína da lista gerada pelo algoritmo PEAKS com seu access number, protein name, protein score, coverage, peptide sequence e peptide score.

Dentre as proteínas identificadas, foram encontradas as proteínas não-caracterizadas, “*Uncharacterized protein*”, que foram confrontadas no banco de dados do UniProt e com sua sequência FASTA aplicada ao NCBI, com a

ferramenta BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov), originando a Tabela 2. Este passo foi importante para verificar se a sequência aminoacídica, tem similaridade com proteínas do banco de dados.

No Diagrama de Venn, apresenta-se a distribuição das proteínas identificadas pelo algoritmo PEAKS. Pelo software PEAKS DB (alinhamento das sequências com a base de dados) foram identificadas 90 proteínas, das quais duas destas também foram identificadas pelo software PEAKS SPIDER (identifica mutações). Pelo software PEAKS PTM (identifica modificações pós-traducionais) foi indicada a presença de 93 proteínas, cinco das quais também foram identificadas pelo PEAKS SPIDER. Por este software, identificaram-se 99 proteínas, com quatro destas identificadas apenas pelo PEAKS SPIDER. Dentro das proteínas identificadas pelos três softwares utilizados, 88 proteínas foram comuns a todos (Figura 10).

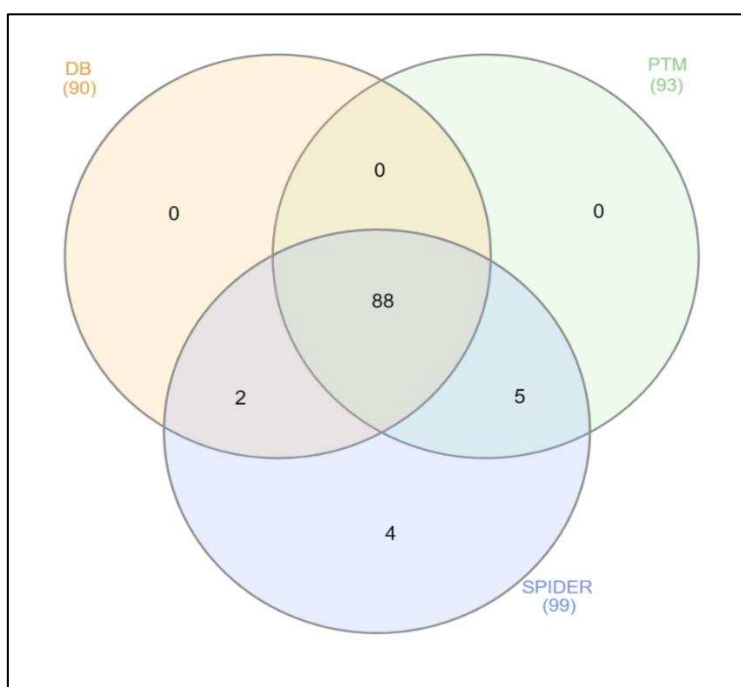


Figura 10: Diagrama de Venn que ilustra a distribuição das proteínas identificadas pelo algoritmo PEAKS DB, PEAKS PTM e PEAKS SPIDER. Fonte: Software InteractiviVenn (HEBERLE et al., 2015).

Dentre todas as proteínas identificadas (Tabela 1), 14 cristalinas apresentam a abundância relativa de 97%, contra apenas 3% de outras proteínas (Figura 11). Em humanos, as alfa, beta e gama cristalinas somam, aproximadamente 90% do total das proteínas nas células fibrosas da lente (SU et al., 2011).

Em gatos, as cristalinas somam mais que 90%, como mostram nossos resultados.

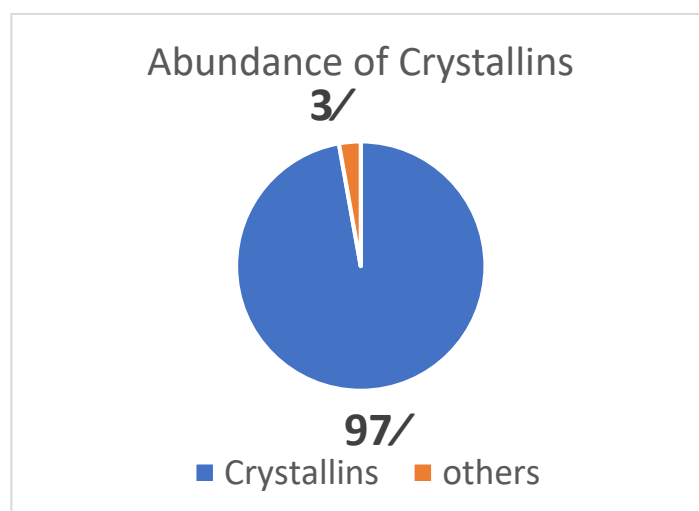


Figura 11: Abundância relativa das proteínas identificadas de *Felis catus*, por análise LC MS/MS Orbitrap. (Abundância relativa das proteínas foi obtida pela média da aferição das áreas integradas dos picos de três peptídeos mais intensos detectados para cada proteína)

Analisando a relação apenas entre as cristalinas, verificou-se que as alfa cristalinas compreendem a 39% do total (Figura 12B), correspondendo a duas proteínas apenas, a 'alfa crystallin A chain' e a 'crystallin alfa B' (Figura 12A). As beta cristalinas equivalem a 52% e as gama cristalinas a 9%, correspondendo a 6 proteínas cada (Figura 12A).

Em humanos as alfa cristalinas são os constituintes de maior porção do citoplasma da lente do olho que pode atingir até 50% do total de proteínas. Esta exibe atividade chaperona na supressão da agregação de várias proteínas e na prevenção da inativação de enzimas devido ao calor e outras condições de estresse (ZHU et al., 2013).

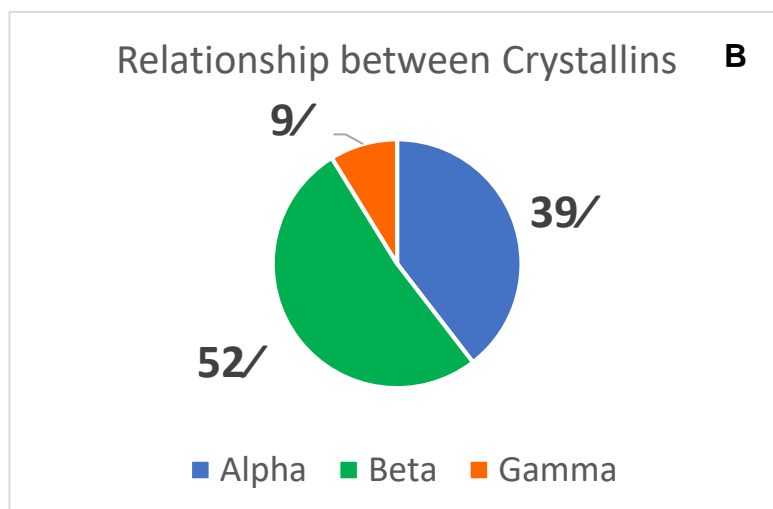
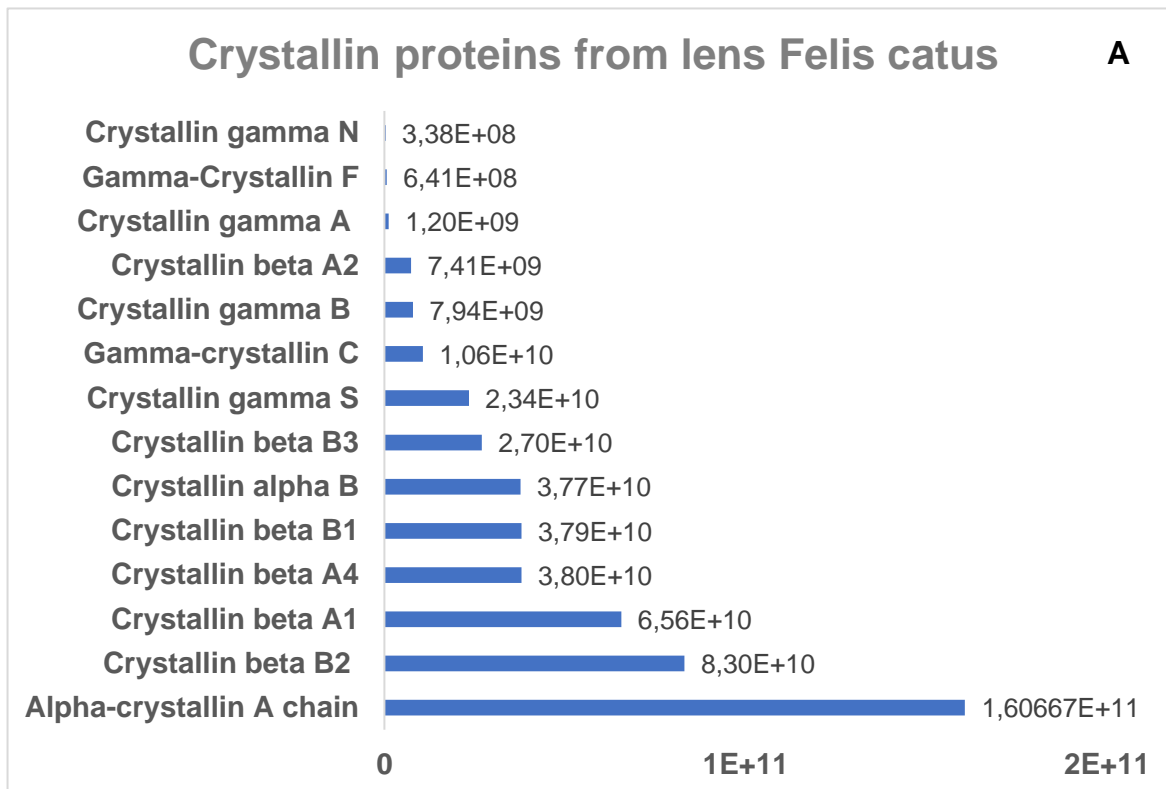


Figura 12: (A) Abundância relativa das cristalinas identificadas em cristalino de *Felis catus*. Representação da soma das médias das áreas de picos integrados para cada proteína, entre as três amostras biológicas e (B) Proporção entre as alfa, beta e gama cristalinas encontradas.

5.3 - Análise da classificação funcional das proteínas dos cristalinos de gatos identificados pelo LC MS/MS Orbitrap com o software KOG

As proteínas identificadas no cristalino de gato foram agrupadas e classificadas funcionalmente confrontando a sequência das mesmas contra um conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no banco de dados KOG - Eukaryotic Orthologous Groups (Figuras 13 e 14).

As classes, com as porcentagens aproximadas das proteínas identificadas (Figuras 13A), foram: Armazenamento de informação e processamento (em vermelho) com 5%; Sinalização e processo celular (em verde) com 31%; Metabolismo (em azul) com 36%; Pobremente caracterizadas (em amarelo) com 9%; No Hit (em preto) com 19%. Nesta porcentagem as 99 proteínas foram consideradas como 100%. Na Figura 13B, tem-se a porcentagem das proteínas identificadas em abundância relativa. Os valores destas porcentagens foram: Armazenamento de informação e processamento (em vermelho) com 5 proteínas 0,06%; Sinalização e processo celular (em verde) com 31 proteínas 39,10%; Metabolismo (em azul) com 35 proteínas 0,70%; Pobremente caracterizadas (em amarelo) com 9 proteínas 0,16%; No Hit (em preto) com 19 proteínas 59,98%. As proteínas pobremente caracterizadas são aquelas que foram alinhadas com as proteínas do banco de dados de função desconhecida e de predição geral funcional. As proteínas classificadas como No Hit, são aquelas que não alinharam com nenhuma outra do banco de dados do KOG, sendo a de maior abundância porque estão a maioria das crystallins.

Cada classe do KOG foi subdividida em funções. As funções com maior número de proteínas (Figuras 14) foram: Metabolismo e transporte de carboidratos com 22 proteínas; Modificações pós-traducionais, proteínas turnover e chaperonas com 16 proteínas; Conversão e produção de energia com 6 proteínas; Somente predição geral funcional com 6 proteínas. A classe No Hit, mesmo não sendo uma função, apresentou 19 proteínas. Estes grupos serão discutidos com maiores detalhes em itens a seguir.

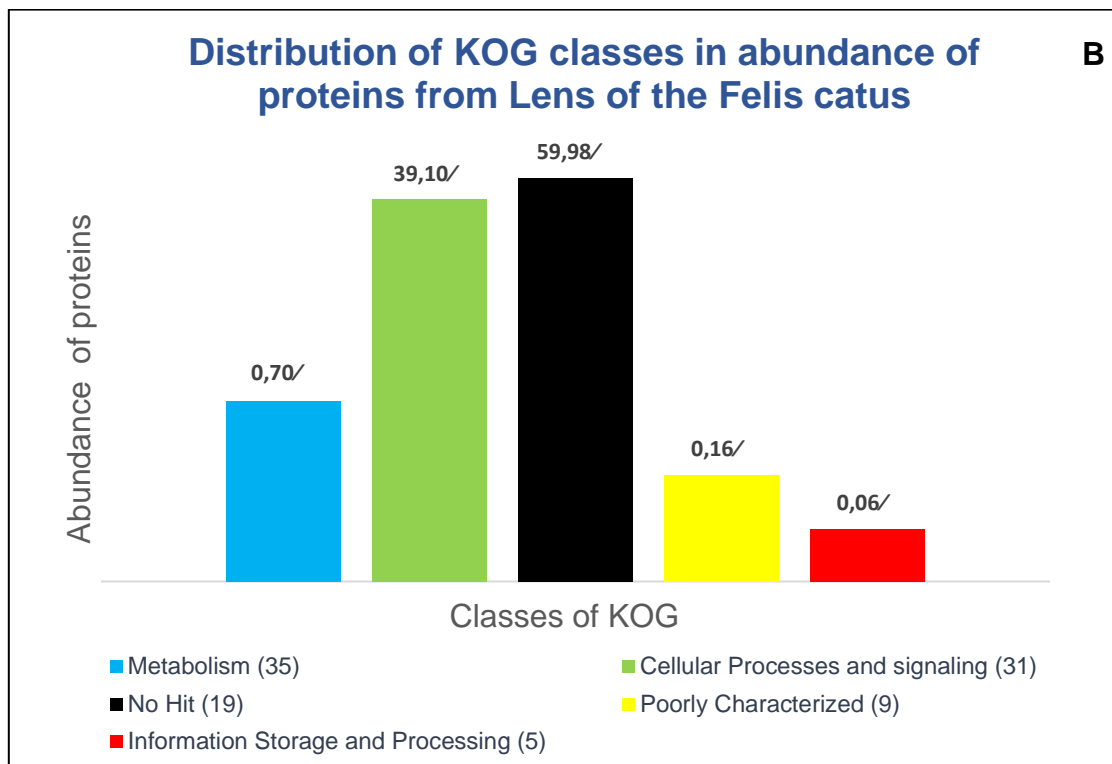
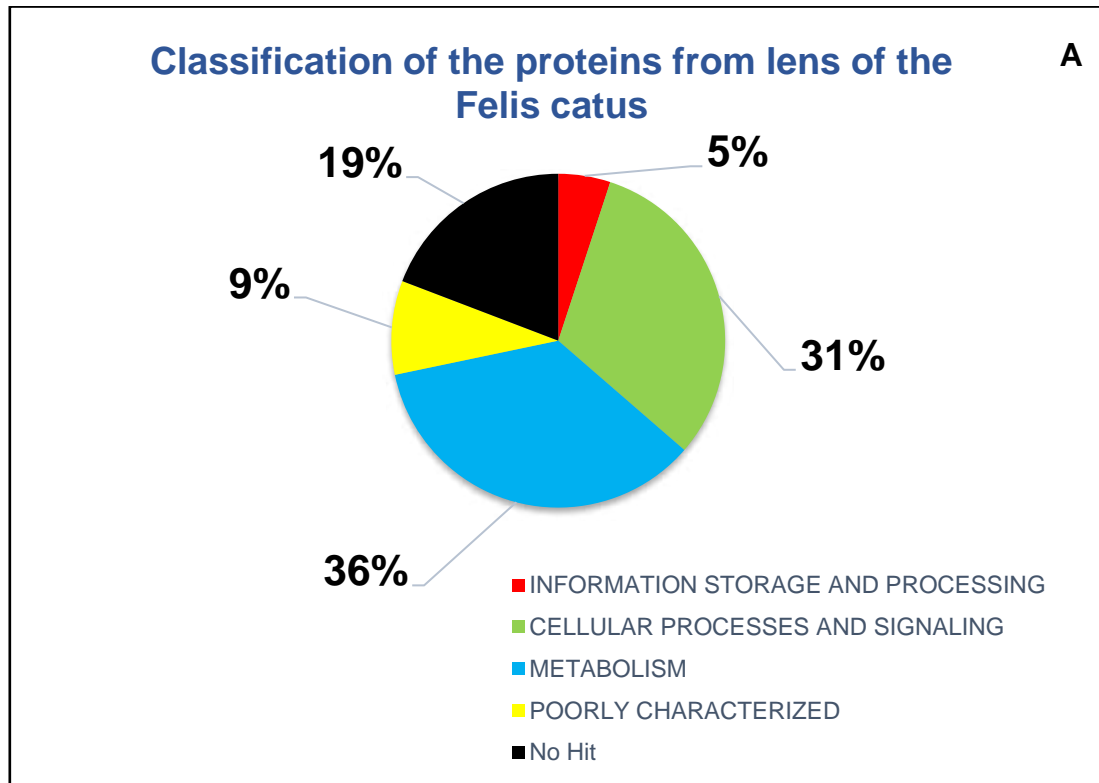


Figura 13: Distribuição das proteínas em classes pelo KOG: Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho), Sinalização e Processo Celular (verde), Metabolismo (azul), Pobrememente Caracterizados (amarelo) e NO HIT (preto). (A) Porcentagem em classes das proteínas identificadas do cristalino de gato pelo KOG e (B) Porcentagem da abundância relativa das proteínas presentes em cada classe do KOG e entre parênteses com o número de proteínas presentes.

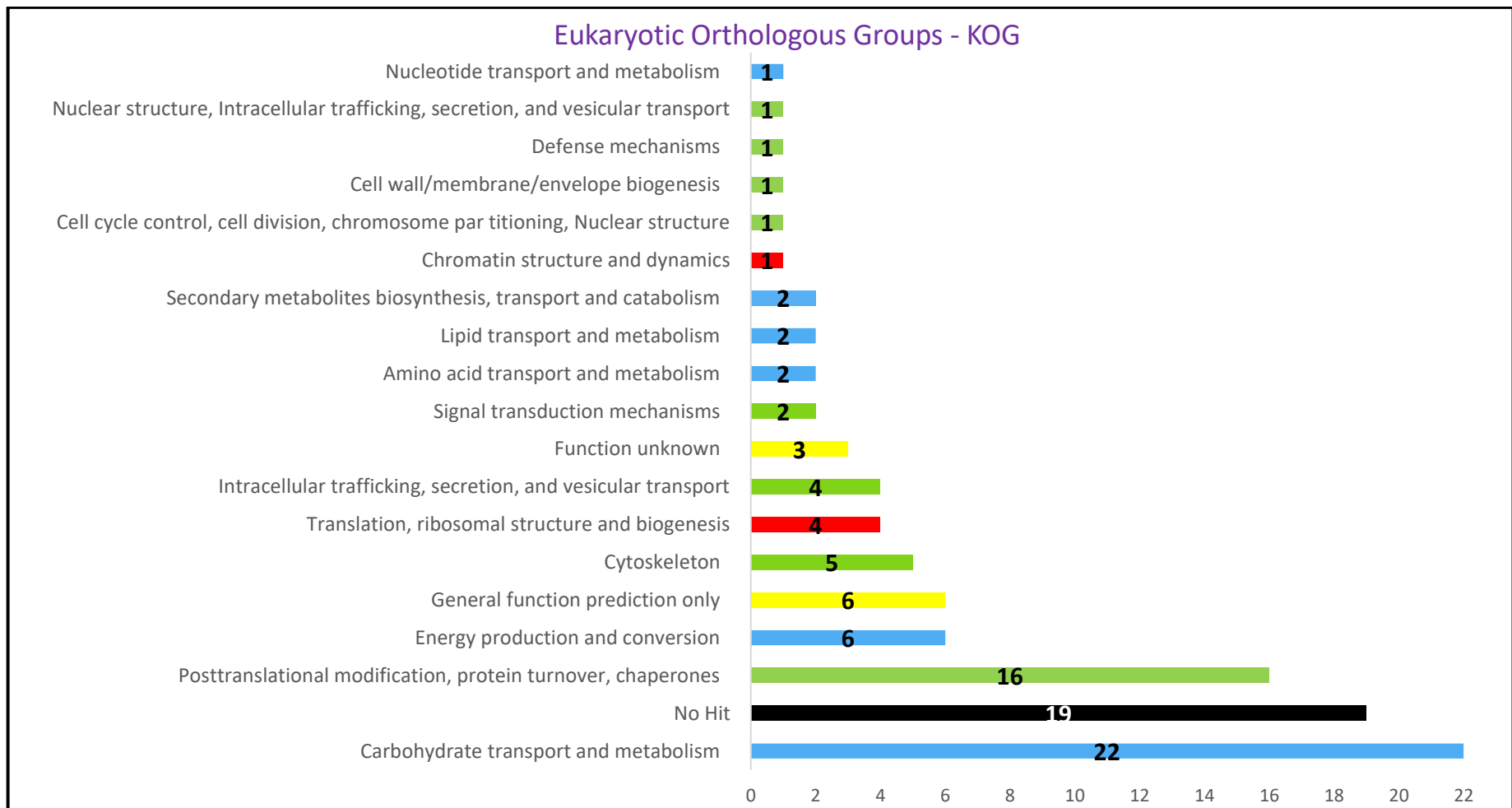


Figura 14: Classificação funcional das proteínas identificadas no cristalino de *Felis catus* pelo KOG (Funções x Número de Proteínas em cada função). Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho): Dinâmica e estrutura da cromatina; Tradução, estrutura ribossomal e biogênese. Sinalização e Processo Celular (verde): Estrutura nuclear, tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular; Mecanismos de defesa; Parede celular/Membrana/biogênese do envelope; Controle do ciclo celular, divisão celular, partição do cromossomo, estrutura nuclear; Mecanismo de transdução de sinal; Tráfico intracelular, secreção e transporte vesicular. Metabolismo (azul): Metabolismo e transporte de nucleotídeo; Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo; Metabolismo e transporte de lipídeos; Metabolismo e transporte de aminoácidos; Conversão e produção de energia; Metabolismo e transporte de carboidratos. Pobremente Caracterizados (amarelo): Somente predição geral funcional; Função desconhecida; e NO HIT (preto).

5.3.1 - Metabolismo e transporte de carboidratos

A glicose recebida nas células fibrosas é metabolizada em água, gás carbônico e ácido láctico, pois estas células já degradaram a maior parte de suas organelas (HAINS; TRUSCOTT, 2008). Uma vez que a fermentação láctica tem rendimento energético baixo, uma grande quantidade de reações deve acontecer ao mesmo tempo para suprir a necessidade energética das células fibrosas, em teoria. O que pode ser justificativa da maior variedade de proteínas encontradas neste grupo.

Excetuando-se as cristalinas, estas proteínas representam 12% do restante de proteínas identificadas (Figura 15).

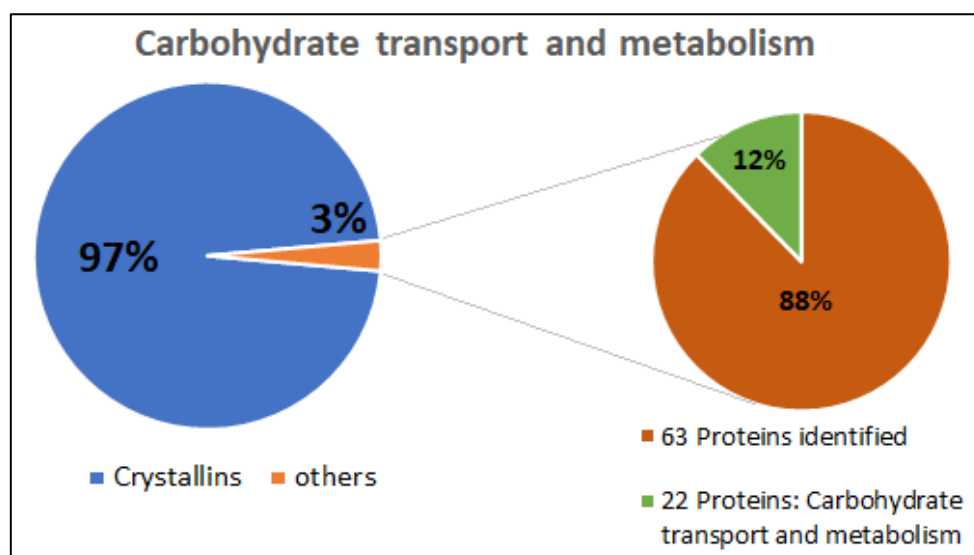


Figura 15: Abundância das proteínas classificadas pelo KOG como Metabolismo e transporte de carboidratos.

O alinhamento das sequências (em formato FASTA, obtidas pela busca no UniProt dos ID's identificados pelo PEAKS) com a base de dados do STRING retornou a rede apresentada na Figura 16. Das quais, 14 (vermelhas) estão envolvidas na via da glicólise.

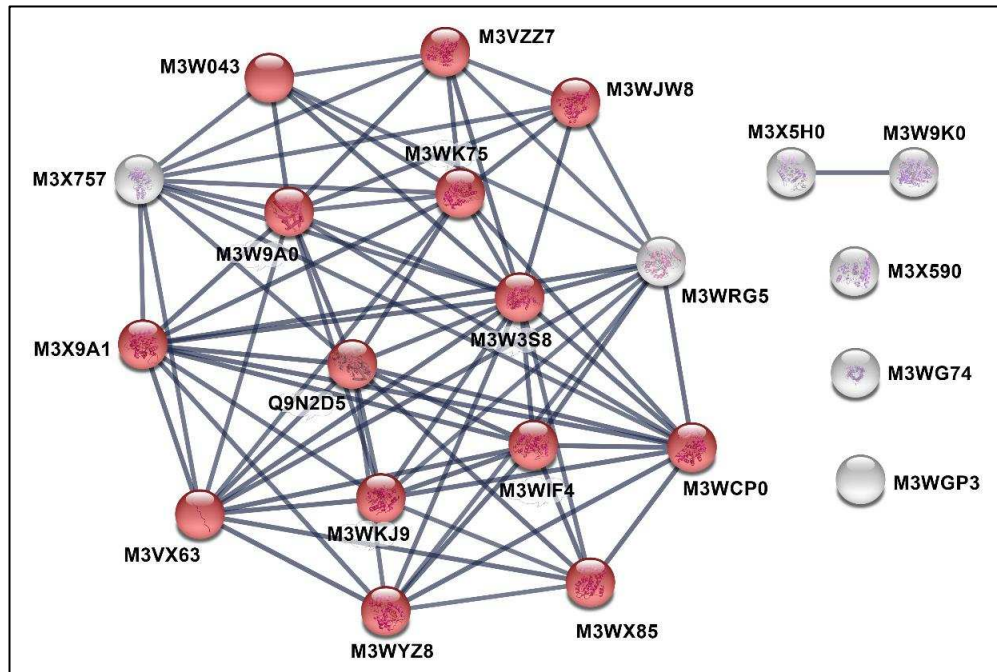


Figura 16: Imagem gerada no banco de dados STRING (<https://string-db.org/>) com 21 proteínas classificadas pelo KOG como metabolismo e transporte de carboidratos, onde as que estão em vermelho participam da via glicolítica.

Identificaram-se 22 proteínas, classificadas pelo KOG em 15 famílias, como envolvidas no transporte e metabolismo de carboidratos. Sendo estas famílias: a Phosphoglycerate mutase (catalisa a conversão do 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato), a Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (catalisa a primeira reação de pagamento da glicólise produzindo NADH, que é a conversão do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3 – bifosfoglicerato), a Phosphoglycerate kinase (catalisa a reação do 1,3-bifosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, produzindo ATP), a Fructose-biphosphate aldolase (catalisa a reação frutose-1,6-bifosfato a gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxicetona fosfato), a Triosephosphate isomerase (catalisa a reação da diidroxacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato), a Pyruvate kinase (converte fosfoenolpiruvato em piruvato, etapa determinante da glicólise), a Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase (catalisa a reação de conversão da frutose-6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato), a Enolase (catalisa a reação de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato). O Glycogen phosphorylase que é a enzima chave na regulação do glicogênio da célula; A alfa-amylase: converte glicogênio em glicose. A enzima transketolase (presente na via das pentoses fosfato para a transferência de dois carbonos de uma cetose para uma aldose) evidencia a utilização de uma via alternativa (etapa não oxidativa) para a geração

de intermediários da via glicolítica a partir da reciclagem das pentoses fosfato; e a Aquaporin que é uma família de proteínas de membrana abundante na lente e que tem um papel essencial na estrutura e na organização das células fibrosas. Estes canais são permeáveis à água e a pequenas moléculas como o glicerol (ROSE et al., 2006).

Pelo banco de dados String (fornece interações proteína-proteína) é possível visualizar informações do PDB, Kegg, UniProt e do Archive! Ensembl. Uma das informações oferecidas pelo Kegg é o mapa metabólico em que a proteína participa. No mapa metabólico obtido, destaca-se a via glicolítica e a gliconeogênese (Figura 17). Nos retângulos em vermelho estão os E.C. (Enzyme Commission Numbers) das enzimas em discussão com a suas posições específicas em cada reação, corroborando as informações já citadas neste texto.

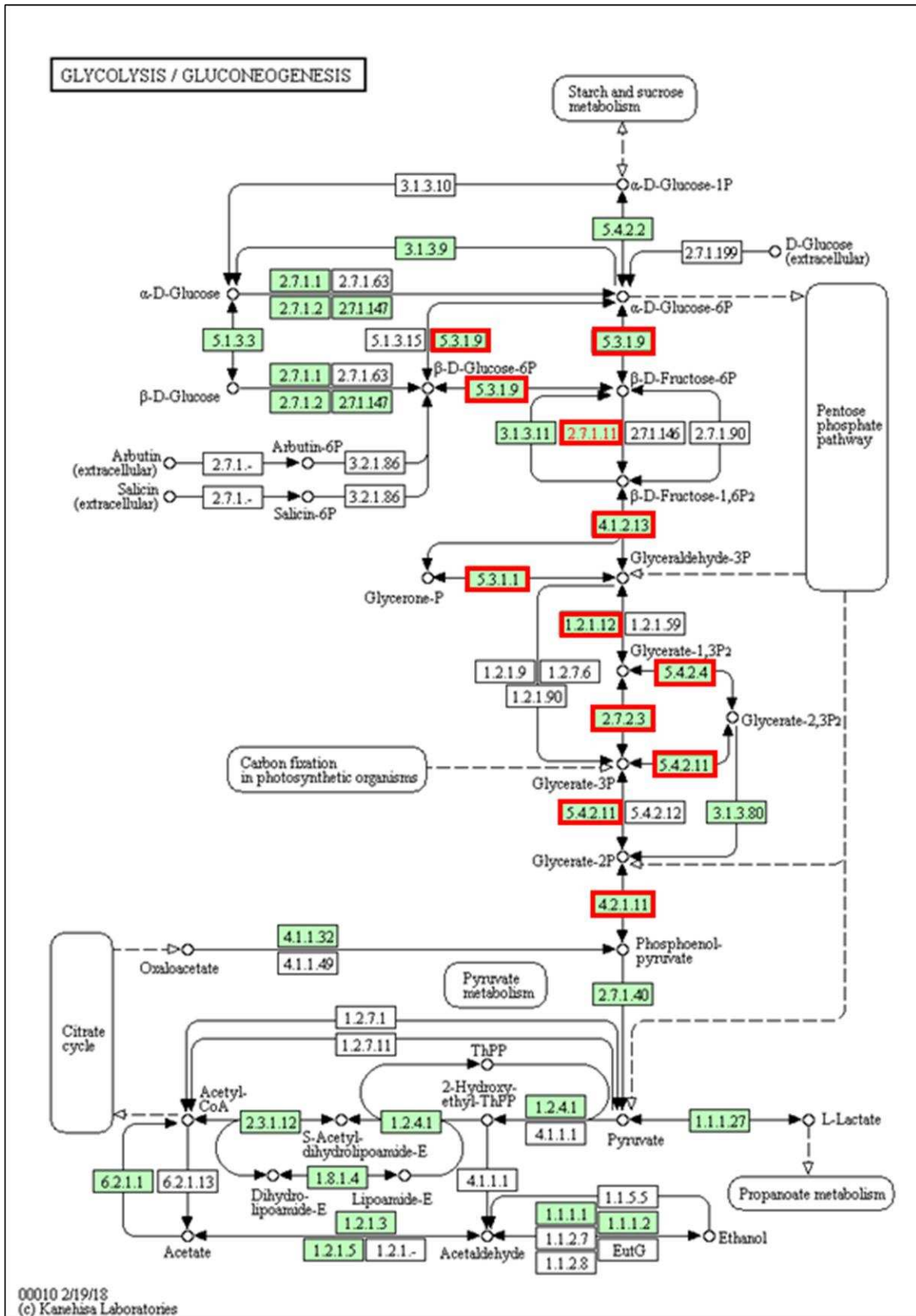


Figura 17: Representação da via metabólica de glicólise/gliconeogênese recuperada do KEGG. Em destaque estão os códigos E.C. das proteínas constituintes desta via que foram identificadas neste estudo. 2.7.1.11 – M3WJW8, M3VZZ7 e M3W043; 4.1.2.13 – M3W9A0, M3WK75; 5.3.1.1 – M3X9A1; 1.2.1.12 – A0A0A0MPZ5; 5.3.1.9 – M3W3S8; 4.2.1.11 – M3VX63 e M3WCPO; 5.4.2.11 – M3WKJ9 e M3WYZ8; 2.7.2.3 – M3WIF4; 5.4.2.4/5.4.2.11 – M3WX85.

O metabolismo da glicose gera ATP necessário para o transporte ativo de íons e aminoácidos, para a manutenção da hidratação do cristalino, de sua transparência e para síntese de proteínas.

5.3.2 - Modificação pós-traducional, proteína turnover e chaperonas

As chaperonas moleculares são as proteínas que auxiliam no processo de enovelamento protéico estando diretamente ligada à estrutura tridimensional das proteínas, suprimindo sua agregação. Elas podem estabilizar as conformações da proteína, ajudar no enovelamento correto, direcionamento de proteínas enoveladas incorretamente para serem degradadas e proteger contra a desnaturação pelo calor, pela oxidação e outros estresses.

De acordo com o UniProt as proteínas classificadas aqui com esta função são: Alfa-crystallin A chain, crystallin alfa B, Heat shock protein 27 kDa beta-1, Heat shock cognate 71 kDa protein, Heat shock protein 90 alfa family class A member 1, Chaperonin containing TCP1 subunit 8, T-complex protein 1 subunit delta, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A. As cinco primeiras proteínas pertencem à família das sHsp (small heat-shock protein) (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). Uma característica estrutural comum das sHsp é que apresentam uma cavidade interna que agem como armadilhas moleculares protegendo a célula das consequências da agregação irreversível de proteínas (PESCHEK et al., 2009). Esta função é muito importante para a lente, porque havendo agregação, há perda da transparência da lente e deficiência visual. Algumas doenças também podem conduzir à agregação das proteínas, diminuindo a atividade chaperona. Já a Chaperonin containing TCP1 subunit 8 e a T-complex protein 1 subunit delta são da família das TCP-1 chaperonin e além da função chaperona elas ajudam no enovelamento de proteínas pela hidrólise de ATP (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). A Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A é também chamada de PPIase A. As PPIases aceleram o enovelamento de proteínas. A PPIase A catalisa a isomerização cis-trans de proline imidic ligada em oligopeptídeos (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

O termo turnover proteico está relacionado com a quantificação de alterações ocorridas em um nutriente durante os processos de síntese e degradação

em um certo período no organismo. O turnover proteico também pode ser visto como um fenômeno em que a síntese e degradação acontecem em simultâneo, havendo a renovação da proteína corporal.

A habilidade das células de reconhecer, reparar ou degradar tais proteínas danificadas representariam uma adaptação evolucionária por um longo tempo de sobrevivência do organismo. Como as células da lente permanecem por toda a vida do indivíduo, existe um mecanismo que favorece a reparação e não a degradação. A Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase está ligada à reparação das proteínas danificadas em resíduos específicos mais do que à síntese e a degradação (DEVRY; CLARKE, 1999), apresentando uma atividade catalítica na reação que repara estes resíduos (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

A Glutathione S-transferase P está ligado à proteção contra danos oxidativos e desintoxicação de drogas e poluentes atmosféricos. A presença de metabólitos tóxicos no olho ou próximo dele (através da nutrição, drogas ou poluição ambiental) podem ser absorvidos e induzir mudanças na estrutura das proteínas presentes, como agregação ou modificação das proteínas. Portanto, um eficiente mecanismo de desintoxicação e de oxidação-redução tem importância especial impedindo a formação de doenças (AWASTHI et al., 1980; JURONEN et al., 2000).

A família da 14-3-3 protein apresentam diversas funções como regulação de proteínas cinases, participa no controle do ciclo celular e na regulação de morte celular (MASTERS; FU, 2001).

Foram encontradas duas proteínas chamadas Peroxiredoxin 1 e 2. Sua atividade thioredoxin peroxidase catalisa a reação da tioredoxin com peróxido de hidrogênio resultando em tioredoxin dissulfeto e água. Também mantem o ambiente celular em equilíbrio redox (homeostase redox), regulação do processo de apoptose e remoção dos radicais superóxidos (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Um estudo com olhos bovinos revelou que as Peroxiredoxins (Prxs) foram encontradas em células epiteliais e fibrosas da lente, nestes tecidos podem contribuir para o mecanismo de defesa celular antioxidante que catalisa a redução de peróxidos sem cofatores, tais como metais ou grupos prostéticos. O peróxido de hidrogênio e os radicais livres gerados podem danificar as frações reativas de macromoléculas biologicamente importantes, como proteínas, lipídios e DNA. As mitocôndrias possuem vários sistemas de defesa contra a oxidação, incluindo enzimas como glutathione peroxidase (Gpx), tioredoxina-2 (Trx2) e tioredoxina reductase (TR3). A mitocôndria também é defendida por antioxidantes como glutathione (GSH), vitamina E e ascorbato (RHEE et al., 2001; SINGH; SHICHI, 2001; FUJII; IKEDA, 2002; HOFMANN et al., 2002; THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Também nesta classe 2 proteínas apareceram como Rab GDP dissociation inhibitor. Elas regulam a reação de troca GDP/GTP. Tem atividade ativadora de GTPases também envolvidas no transporte de proteínas (no poro ou transportador) e relacionada com pequenas GTPases em tradução de sinal - (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

5.3.3 - Conversão e produção de energia

A Malic enzyme age como um cofator que prefere íons Mg^{+2} e Mn^{+2} . Está envolvida no processo metabólico do malato e do piruvato. Catalisando a reação envolvida na descarboxilação do oxaloacetato gerando NADH ou NADPH. Esta enzima também está envolvida na formação de tetrâmeros de proteínas (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

L-lactate dehydrogenase é outra enzima com atividade catalítica gerando NADH em processos metabólicos de carboidratos, do ácido carboxílico e a fermentação do piruvato a lactato (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 catalisa a reação: benzaldehyde + NAD^+ + H_2O = benzoate + NADH + H^+ com atividade oxidoreductase (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] catalisa uma reação do processo catabólico do glicerol-3-fosfato produzindo NADH. Está envolvido na gliconeogênese, no vai-e-vem do glicerofosfato, na regulação positiva do processo glicolítico, em processos de resposta celular cAMP e algum processo que resulta na mudança de estado ou atividade da célula (movimento, secreção, produção de energia, etc) (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Vesicle amine transport 1 tem atividade oxidoreductase e é um ligante de íons Zinco. Regulação de fusão mitocondrial (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Quinone oxidoreductase isoform X2 tem atividade oxidoreductase e é um ligante de íons Zinco (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

5.3.4 - Função geral

As proteínas encontradas nesta classe, são aquelas que tem inúmeras funções em diversos tecidos. Por exemplo, a Carbonic anhydrase 2 e 3 que estão envolvidas em reações químicas com a transferência de uma unidade de carbono em vários estados de oxidação (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). Essas enzimas também estão correlacionadas com a regulação da pressão interna da lente em Glaucoma (GLOSTER; PERKINS, 1955).

A Aldo-keto reductase family 1 member B tem atividade oxidoreductase (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017). A aldose reductase catalisa a redução da glicose para sorbitol. Este sorbitol interage diretamente com proteínas da lente, causando modificações nos aminoácidos e consequente insolubilidade das proteínas da lente (BASHER; ROBERTS, 1995).

A família da PEBP (Fosfatidiletanolamina-binding protein) é um grupo altamente conservado de proteínas que foram identificadas em numerosos tecidos em uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, nematóides, plantas, drosófilas e mamíferos. As várias funções descritas para os membros desta família incluem ligação de lipídios, desenvolvimento neuronal (VALLÉE et al., 2003), inibição de protease de serina (HENGST et al., 2001), o

controle da mudança morfológica entre crescimento de brotações e estruturas florais (BANFIELD; BRADY, 2000) e regulação de vias de sinalização.

Outra proteína é a Moesin que também tem inúmeras funções como interagir com actina, com moléculas de adesão celular, com a cadeia dupla de RNA, receptores de sinalização (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Já a última proteína chamada de Parkinsonism associated deglycase está relacionada com 20 funções no UniProt. Algumas delas são envolvidas na atividade da peroxiredoxin (desintoxicação de toxinas), homeostase da glicose, interação com cinase, interação com chaperonas, reparação de DNA e vias de sinalização.

5.3.5 - Proteínas sem alinhamento funcional

São as proteínas identificadas que o KOG não encontrou alinhamento funcional (No Hit). Estas proteínas são, em sua maioria, as Beta e Gama Cristalinas. O restante são proteínas de membrana e estruturais da lente. Como o KOG gera informações gerais e não dá informações específicas do organismo, é coerente que as sequências destas proteínas não tenham alinhado com nenhuma sequência proteica depositada no KOG.

Como mostrado anteriormente na Figura 11, as cristalinas (alfa, beta e gama) são as proteínas mais abundantes nas lentes estudadas e duas delas (beta e gama) estão neste grupo. Estão presentes 6 gama-cristalinas (gamma-crystallin C, crystallin gamma S, crystallin gamma N, crystallin gamma B, crystallin gamma A, gamma-crystallin F) que, segundo o UniProt, estão envolvidas na constituição estrutural da lente do olho. As gama-cristalinas, em humanos, estão presentes em maior concentração na região nuclear (THOMSON; AUGUSTEYN, 1985). Dado que a região nuclear é embalada compactamente, as gama cristalinas ajudam na transparência e no índice de refração não uniforme da lente (alto índice na região nuclear e menor na região cortical da lente) (UHLHORN et al., 2008).

Há 6 beta-cristalinas (crystallin beta B1; crystallin beta B3, crystallin beta B2, crystallin beta A1, crystallin beta A4, crystallin beta A2) que também estão

relacionadas com a constituição estrutural da lente do olho. Elas desempenham um papel crítico na manutenção da sua transparência (SRIVASTAVA et al., 1996; VAN MONTFORT et al., 2003).

Albumina sérica é a principal proteína transportadora do corpo humano e de outros animais. Transporta hormônios, lipídeos, íons metálicos, aminoácidos e outros, desempenhando um papel importante na proteção dos órgãos e tecidos. Não é sintetizada pelas células da retina e nem da lente, mas é capturada por estas células (PANOVA et al., 2017). Esta proteína é o principal componente proteico do humor aquoso e do humor vítreo que circundam a lente. Albumina sérica facilita o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a lente, que são utilizadas para a biossíntese de lipídeos da lente (SABAH et al., 2005).

Duas proteínas da família das Galectins foram listadas nesta classificação funcional. Galectins foram encontradas em 1998 por Ogden em lentes de ratos saudáveis com 29, 33 e 50 dias de nascimento, e foram designadas como GRI-FIN (Galectin-related interfiber protein); que são restritas, em sua expressão, à lente, e localizadas na interface entre as células fibrosas adjacentes (OGDEN et al., 1998).

Posteriormente (BARTON; HSU; PETRASH, 2009) apresentaram GRI-FINs ligadas às alfa-cristalinas em estudo de lentes de ratos transgênicos e lentes de bezerros. Devido a isto, a galectin GRIFIN pode ser relacionada a funções como: contribuir com alto índice de refração, mecanismo de empacotamento, e conseqüentemente à transparência da lente.

As duas proteínas chamadas Beaded filament structural protein 1 e 2 (BFSP1 e BFSP2) são encontradas no citoplasma, mais precisamente no citoesqueleto. Elas são constituintes estruturais da lente e estão envolvidas com a maturação celular, no desenvolvimento de células fibrosas. Apenas a BFSP2 está envolvida na organização de filamentos intermediários do citoesqueleto (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

FITZGERALD e CASSELMAN (1991) apresentaram micrografias eletrônicas de Beaded Filaments de lentes de diferentes espécies (rato, vaca, humano,

galinha, salamandra, lula e peixe). Estas estruturas são formadas por um filamento base (composto pelas BFSPS, entre outras proteínas) com grânulos, que às vezes aparecem de forma regular, e podem variar de acordo com a idade e a espécie.

A Protein S100 tem a característica chave de interagir seletivamente e não covalentemente com íons cálcio, íons metálicos (como vanádio, manganês, ferro, cobre, cobalto, níquel, molibdênio e prata), com proteína ou proteínas idênticas e com receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products) (ARUMUGAM et al., 2004; THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

As proteínas S100 estão envolvidas na regulação de uma variedade de atividades intracelulares como a proliferação celular, diferenciação e forma (ARUMUGAM et al., 2004; SELINFREUND et al., 1991), tráfico de membrana, homeostase do Ca^{+2} (DEMPSEY; WALSH; SHAW, 2003), transcrição, fosforilação de proteínas (VAN DEN BOS et al., 1996), dinâmica do citoesqueleto (BELOT et al., 2002), metabolismo e atividade enzimática, pode interagir com um número grande de proteínas alvo (DONATO, 2007; FULLE et al., 2000).

FINNEGAN et al., 2010 conduziram um estudo sobre a degeneração da retina de pintinhos e encontraram a proteína Secernin 1, que mostrou maior diferença significativa na expressão durante este período de degeneração. Esta proteína tem atividade dipeptidase e pode desempenhar um papel importante na exocitose em mastócitos permeabilizados.

5.4 - Identificação das proteínas dos Cristalinos de gatos pela abordagem MALDI-TOF/TOF utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD

5.4.1 - Separação das proteínas

As Figuras 18 e 19 são géis de referência de cada análise em pH 3-10 e pH 4-7, respectivamente. Nelas estão a numeração de cada spot identificado pela estratégia MALDI TOF/TOF, MASCOT/SCAFFOLD. Os spots que apresentaram maior coloração estão concentrados na região de massa entre 20 e 30 kDa e na faixa de pH 4-8, aproximadamente, com a detecção de alguns spots na faixa de massa de 45 kDa, na mesma faixa de pH (Figura 18).

Em alguns pontos os spots ficaram aglomerados e com baixa resolução, como por exemplo, em torno dos spots 39 e 9 (Figura 18). A fim de melhorar essa resolução, as proteínas foram separadas por tiras com a faixa de pH 4-7 (Figura 19). Comparando as imagens aumentadas de uma mesma região em cada gel, o ganho de resolução nos géis com faixa de pH de 4 a 7 foi evidenciado (Figuras 20a e 20b). Este fato também foi observado quando as imagens tridimensionais dos spots, geradas pelo software ImageMaster, das mesmas regiões, foram comparadas (Figuras 20c e 20d).

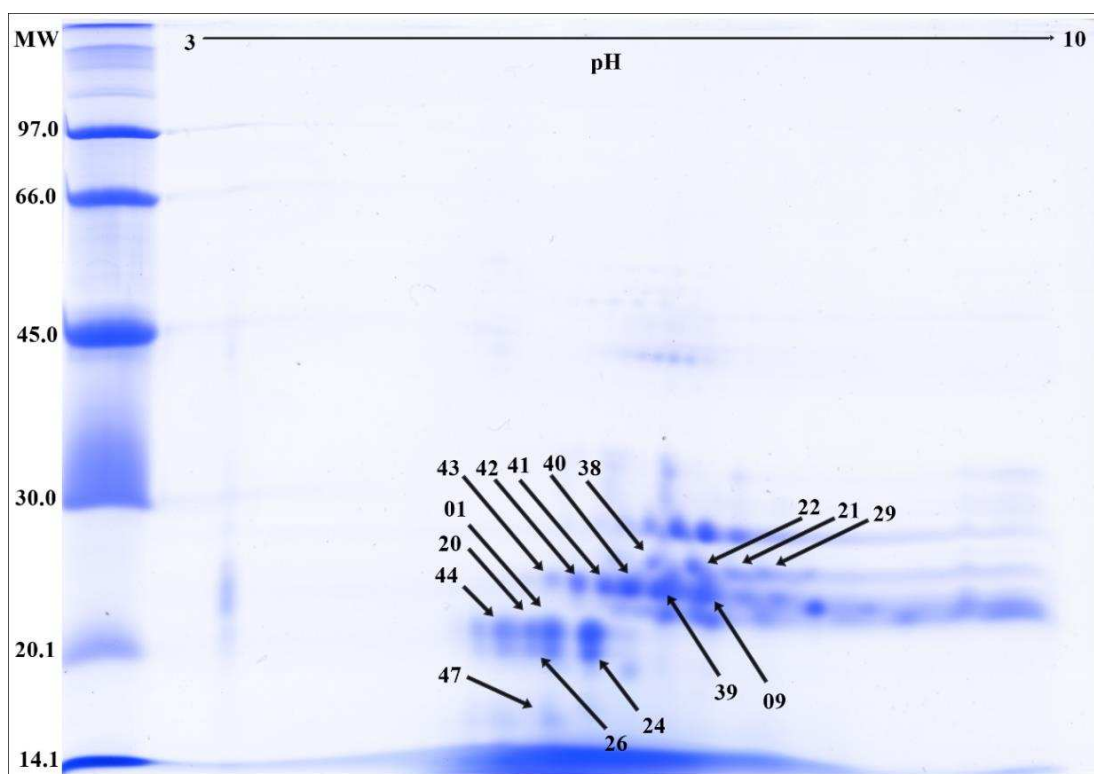


Figura 18: Separação das proteínas de cristalinos de gatos em SDS-PAGE 2D em tira de pH 3-10, com gel 12,5%, coradas com azul de Coomassie Brillante G-250.

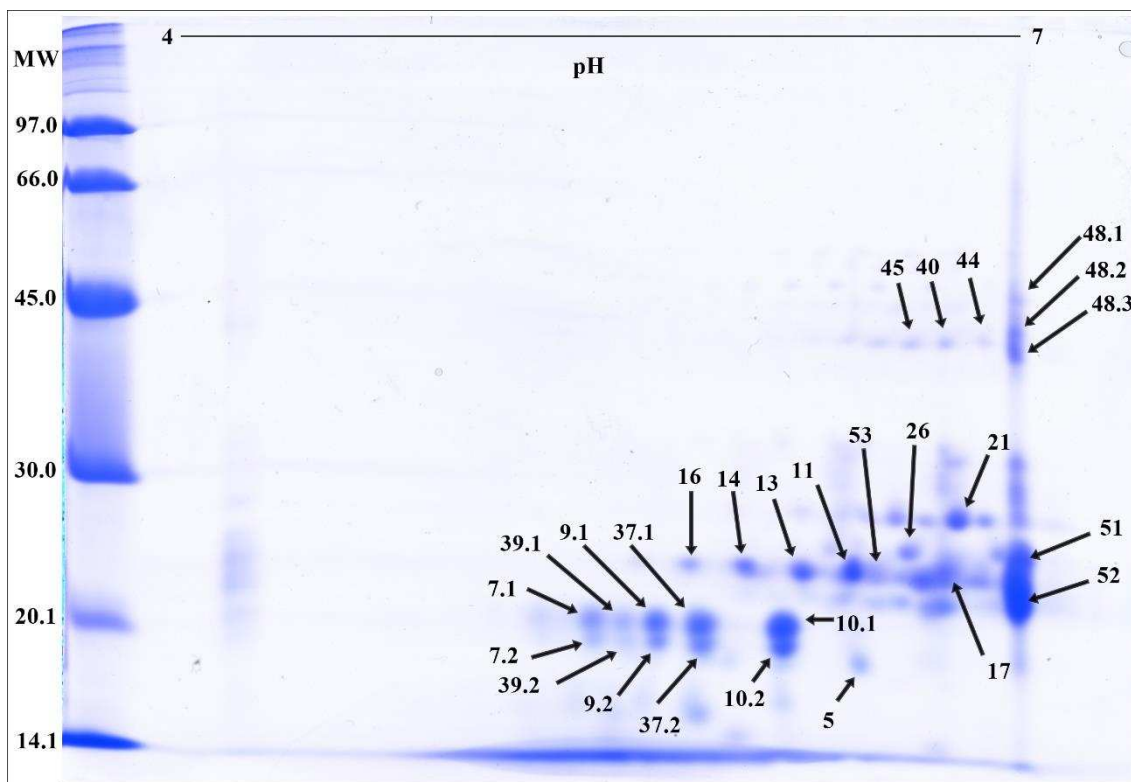


Figura 19: Separação das proteínas de cristalininos de gatos em SDS-PAGE 2D em tira de pH 4-7, com gel 12,5%, coradas com azul de Coomassie Brillante G-250.

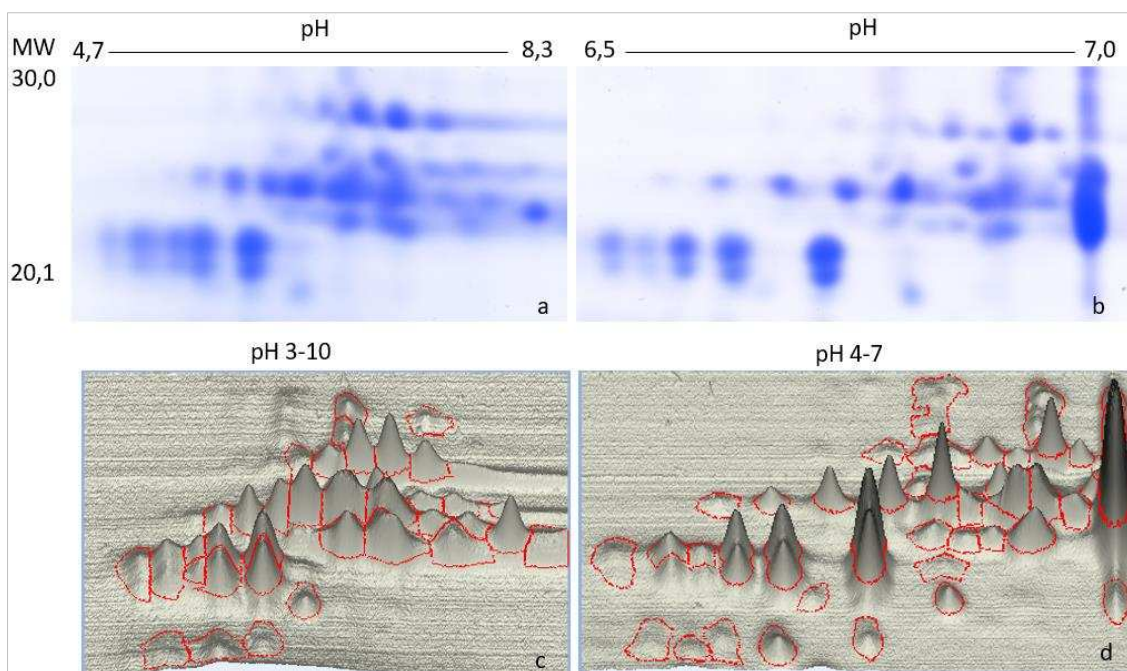


Figura 20: Comparação da imagem do gel com a imagem tridimensional dos spots, evidenciando a resolução entre as diferentes faixas de pH. (a) Destaque do gel de pH 3-10 na região de 20,1 kDa a 30,0 kDa e entre o pH de 4,7 a 8,3 aproximadamente. (b) Destaque do gel de pH 4-7 na região de 20,1 kDa a 30,0 kDa e entre o pH de 6,5 a 7,0 aproximadamente. (c) Imagem em 3D gerada pelo software ImageMaster referente a área de destaque do gel de pH 3-10. (d) Imagem em 3D gerada pelo software ImageMaster referente a área de destaque do gel de pH 4-7.

Pela estratégia de separação das proteínas por eletroforese bidimensional foram detectados 38 spots no gel de referência com faixa de pH 3-10 (Figura 18) e 53 spots no gel com faixa de pH 4-7 (Figura 19) pelo software ImageMaster. Em seguida, pela aquisição de espectros de massa por MALDI TOF/TOF e identificação por MASCOT/SCAFFOLD, foram identificadas seis proteínas diferentes, em 16 spots do gel de referência com faixa de pH 3-10 (Tabela 3), e dez proteínas diferentes, em 20 spots do gel com faixa de pH 4-7 (Tabela 4). A estratégia utilizada permitiu a identificação de poucas proteínas diferentes, sendo 100% das mesmas caracterizadas como cristalinas (Figura 21). No entanto, uma das grandes vantagens da eletroforese bidimensional consiste em evidenciar as isoformas de proteínas, como pode-se observar nos spots 7, 9, 10, 37 e 39 (Figura 19), os quais foram identificados como Alfa-crystallin A chain – ID: P68282 (Tabela 4).

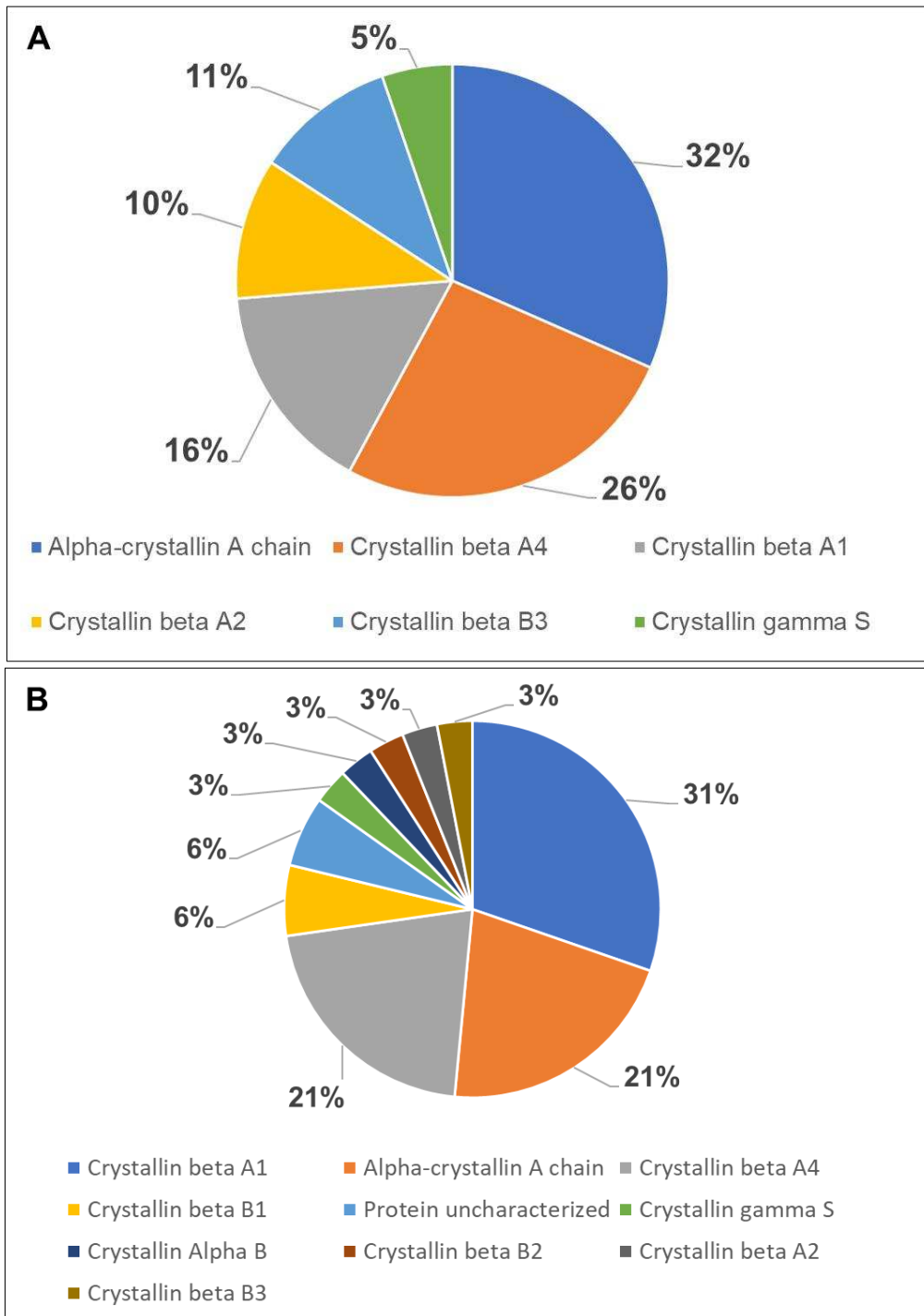


Figura 21: Proteínas do cristalino de gatos identificadas por MALDI TOF/TOF: (A) Spots oriundos do gel de pH 3-10; (B) Spots oriundos do gel de pH 4-7.

6 - CONCLUSÃO

Este estudo permitiu pela a identificação e caracterização de proteínas presentes nos cristalinos de gatos por meio de abordagens proteômicas. Foram identificadas 99 proteínas, das quais 14 foram representadas pelas cristalinas. O grupo das beta cristalinas foi mais representativo (52% das cristalinas), no entanto, a proteína alpha crystallin A chain apresentou maior abundância relativa em comparação com todas as demais proteínas individuais, além de ter sido identificada em diversos spots que apresentaram diferença no ponto isoelétricos e na massa, indicando que se tratam de possíveis isoformas. A função predominante das cristalinas foi compor e manter estruturalmente as fibras do cristalino do gato.

Dentre as 88 proteínas identificadas como diferentes das cristalinas, 22 apresentam funções relativas a metabolismo e transporte de carboidratos e 16 tem como funções relatadas :modificações pós-traducionais, proteína turnover e chaperonas. Essas constatações podem estar relacionadas com a demanda energética e o aparato de modificações pós-traducionais das proteínas do cristalino de gatos.

Em suma, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento das abundâncias das proteínas encontradas no cristalino de gato, fornecendo uma base para estudos futuros, visando entender melhor os aspectos sobre a menor susceptibilidade do cristalino de gatos à catarata.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.SCHAFFER, A. et al. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. **Bioinformatics**, v. 15, n. 12, p. 1000–1011, 1999.

ADKINS, E. A.; HENDRIX, D. V. H. Outcomes of dogs presented for cataract evaluation: A retrospective study. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 41, n. 4, p. 235–240, 2005.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 1990.

ANDLEY, U. P. The lens epithelium: Focus on the expression and function of the α -crystallin chaperones. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 3, p. 317–323, 2008.

ARUMUGAM, T. et al. S100P Stimulates Cell Proliferation and Survival via Receptor for Activated Glycation End Products (RAGE). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5059–5065, 2004.

ASADA, Y. et al. Dimeric crystal structure of rabbit L-gulonate 3-dehydrogenase/lambda-crystallin: insights into the catalytic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 401, n. 5, p. 906-920, 2010.

AWASTHI, Y. C.; SANETO, R. P.; SRIVASTAVA, S. K. Purification and properties of bovine lens glutathione S-transferase. **Experimental Eye Research**, v. 30, n. 1, p. 29–39, 1 jan. 1980.

BAGNÉRIS, C. et al. Crystal Structures of α -Crystallin Domain Dimers of α B-Crystallin and Hsp20. **Journal of Molecular Biology**, v. 392, n. 5, p. 1242–1252, 2009.

BANFIELD, M. J.; BRADY, R. L. The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. **Journal of Molecular Biology**, v. 297, n. 5, p. 1159–1170, 2000.

BARTON, K. A.; HSU, C. DA; PETRASH, J. M. Interactions between small heat shock protein α -crystallin and galectin-related interfiber protein (GRIFIN) in the ocular lens. **Biochemistry**, v. 48, n. 18, p. 3956–3966, 2009.

BASHER, A. W.; ROBERTS, S. M. Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataracts in dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 25, n. 3, p. 661–676, 1995.

BATEMAN, O. A. et al. Crystal structure of η -crystallin: Adaptation of a class 1 aldehyde dehydrogenase for a new role in the eye lens. **Biochemistry**, v. 42, n. 15, p. 4349–4356, 2003.

BELOT, N. et al. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. **Biochimica**

et **Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1600, n. 1–2, p. 74–83, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

CHOWDHURY, U. R. et al. Proteome analysis of human aqueous humor. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 10, p. 4921–4931, 2010.

DE JONG, W. W., OUDERAA, F. J., VERSTEEG, M. , GROENEWOUD, G. , AMELSVOORT, J. M. AND BLOEMENDAL, H. Primary Structures of the α -Crystallin A Chains of Seven Mammalian Species. **European Journal of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 237–242, 20 jun. 1975.

DEMPSEY, A. C.; WALSH, M. P.; SHAW, G. S. Unmasking the annexin I interaction from the structure of apo-S100A11. **Structure**, v. 11, n. 7, p. 887–897, 2003.

DEVRY, C. G.; CLARKE, S. Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) O- methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins. **Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 5, p. 275–288, 1999.

DONATO, R. RAGE: A Single Receptor for Several Ligands and Different Cellular Responses: The Case of Certain S100 Proteins. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 711–724, 2007.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, 1989.

FINNEGAN, S. et al. Proteomic profiling of the retinal dysplasia and degeneration chick retina. **Molecular vision**, v. 16, n. August 2009, p. 7–17, 2010.

FITZGERALD, P. G.; CASSELMAN, J. Immunologic conservation of the fiber cell beaded filament. **Current Eye Research**, v. 10, n. 5, p. 471–478, 1991.

FUJII, J.; IKEDA, Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. **Redox Report**, 2002.

FULLE, S. et al. Calcium and Fos involvement in brain-derived Ca²⁺-binding protein (S100) -dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells. 2000.

GLAZE, M. B. **Congenital and hereditary ocular abnormalities in cats** **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, 2005.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. **The basics of mass spectrometry in the twenty-first century** **Nature Reviews Drug Discovery**, 2003.

GLOSTER, J.; PERKINS, E. S. Carbonic anhydrase in the lens and in the ciliary body and iris of albino rabbits. **The Journal of Physiology**, v. 130, n. 3, p. 665–673, 29 dez. 1955.

HAINS, P. G.; TRUSCOTT, R. J. W. Proteome analysis of human foetal, aged and advanced nuclear cataract lenses. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 2, n. 12, p. 1611–1619, 2008.

HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, 2015.

HENGST, U. et al. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 535–540, 2001.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, 2002.

JURONEN, E. et al. Polymorphic glutathione S-transferase M1 is a risk factor of primary open-angle glaucoma among Estonians. **Experimental Eye Research**, v. 71, n. 5, p. 447–452, 2000.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, 1988.

KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383–5392, 2002.

KYSELOVA, Z. Mass spectrometry-based proteomics approaches applied in cataract research. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 6, p. 1173–1184, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAGANOWSKY, A. et al. Crystal structures of truncated alfaA and alfaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 19, n. 5, p. 1031–1043, 2010.

LIEBLER, D. C.; HAM, A. J. L. Spin filter-based sample preparation for shotgun proteomics. **Nature Methods**, v. 6, n. 11, p. 785, 2009.

LIM, J. C. et al. Confocal microscopy reveals zones of membrane remodeling in the outer cortex of the human lens. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 9, p. 4304–4310, 2009.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: A database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 281–283, 2002.

MASTERS, S. C.; FU, H. 14-3-3 Proteins Mediate an Essential Anti-apoptotic Signal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45193–45200, 2001.

MOREAU, K. L.; KING, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 273–282, 2012.

NAJMUDIN, S. et al. Structure of the bovine eye lens protein gammaB(gamall)-crystallin at 1.47 Å. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 49, n. Pt 2, p. 223–233, 1993.

NALINI, V. et al. Close packing of an oligomeric eye lens β -crystallin induces loss of symmetry and ordering of sequence extensions. **Journal of Molecular Biology**, v. 236, n. 4, p. 1250–1258, 1994.

NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, 2003.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **ELECTROPHORESIS**, 1985.

NGUYEN, S.; FENN, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1111–1117, 2007.

O'FARRELL, P. H. High Resolution of Proteins * Electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007–4021, 1975.

OGDEN, A. T. et al. GRIFIN, a novel lens-specific protein related to the galectin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 28889–28896, 1998.

PANOVA, I. G. et al. Albumin in the Vitreous Body, Retina and Lens of Human Fetal Eye. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 162, n. 5, p. 629–631, 2017.

PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 5, p. 614–618, 2012.

PESCHEK, J. et al. The eye lens chaperone γ -crystallin forms defined globular assemblies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 32, p. 13272–13277, 2009.

RESJÖ, S. et al. Proteomic Analysis of *Phytophthora infestans* Reveals the Importance of Cell Wall Proteins in Pathogenicity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 11, p. 1958–1971, 2017.

RESNIKOFF, S.; KEYS, T. Future trends in global blindness. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 60, n. 5, p. 387, 2012.

RHEE, S. G. et al. **Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases**. IUBMB Life. **Anais...**2001

ROSE, K. M. L. et al. The C terminus of lens aquaporin 0 interacts with the

cytoskeletal proteins filensin and CP49. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 4, p. 1562–1570, 2006.

SABAH, J. et al. Role of albumin as a fatty acid carrier for biosynthesis of lens lipids. **Experimental Eye Research**, v. 80, n. 1, p. 31–36, 2005.

SAMPALEANU, L. M. et al. Structural studies of duck $\delta 1$ and $\delta 2$ crystallin suggest conformational changes occur during catalysis. **Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2732–2742, 2001.

SELINFREUND, R. H. et al. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 3554–3558, 1991.

SHARMA, K. K.; SANTHOSHKUMAR, P. Lens aging: Effects of crystallins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1095–1108, 2009.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

SINGH, A. K.; SHICHI, H. Peroxiredoxin in bovine ocular tissues: immunohistochemical localization and in situ hybridization. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 17, n. 3, p. 279–286, 2001.

SRIVASTAVA, O. P.; SRIVASTAVA, K.; SILNEY, C. Levels of crystallin fragments and identification of their origin in water soluble high molecular weight (HMW) proteins of human lenses. **Current Eye Research**, v. 15, n. 5, p. 511–520, 1996.

SU, S. et al. Proteomic analysis of human age-related nuclear cataracts and normal lens nuclei. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 7, p. 4182–4191, 2011.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D447–D452, 2015.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 1988.

TATUSOV, R. L. et al. The COG database: An updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, v. 4, p. 1–14, 2003.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D158–D169, 4 jan. 2017.

THOMSON, J. A.; AUGUSTEYN, R. C. Ontogeny of human lens crystallins. **Experimental Eye Research**, 1985.

THORESEN, S. I. et al. Diabetes mellitus and bilateral cataracts in a kitten. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2002.

UHLHORN, S. R. et al. Refractive index measurement of the isolated crystalline lens using optical coherence tomography. **Vision Research**, v. 48, n. 27, p. 2732–2738, 2008.

VALLÉE, B. S. et al. Peptides corresponding to the N- and C-terminal parts of PEBP are well-structured in solution: New insights into their possible interaction with partners in vivo. **Journal of Peptide Research**, v. 61, n. 2, p. 47–57, 2003.

VAN DEN BOS, C. et al. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1996.

VAN MONTFORT, R. L. et al. Crystal structure of truncated human betaB1-crystallin. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, n. 11, p. 2606–12, 2003.

VEENSTRA, T. D.; YATES, J. R. **Proteomics for Biological Discovery**. [s.l.: s.n.].

WANG, Z. et al. Proteomics and phosphoproteomics analysis of human lens fiber cell membranes. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 2, p. 1135–1143, 2013.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 1090–1094, 1995.

WILKINS, M. R. et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio/Technology**, v. 14, n. 1, p. 61–65, 1996.

WILMARTH, P. A. et al. Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility?. **Journal of Proteome Research** v. 5, n 10, p. 2554–2566, 2006.

YATES, III J.R., RUSE, C.I., NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, 11:49-79, 2009.

ZALUZEC, E. J.; GAGE, D. A.; WATSON, J. T. **Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: Applications in Peptide and Protein Characterization** **Protein Expression and Purification**, 1995.

ZHOU, H. Y. et al. Quantitative proteomics analysis by iTRAQ in human nuclear cataracts of different ages and normal lens nuclei. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 9, n. 7–8, p. 776–786, 2015.

ZHU, J. et al. Differential proteomics analysis of proteins from human diabetic and age-related cataractous lenses. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 11, p. 984–989, 2013.

Anexos

8 - Anexo I - Tabelas

Tabela 1: Proteínas identificadas em Cristalinos de Gatos, pelas abordagens LC MS/MS Orbitrap utilizando o algoritmo PEAKS (DB, PTM E SPIDER).

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
1	P68282	Alpha-crystallin A chain	574.51	94%	MDIAIQHPWFK	70.95
					RALGPFYPSR	107.42
					LFDQFFGEGLFHEYDLLPFLSSTISPYR	158.57
					TVLDSGISEVR	93.01
					SDRDKFVIFLDVK	105.45
					HFSPEDLTVKVLEDFVEIHGK	157.29
					HNERQDDHGYISR	144.16
					YRLPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK	200.00
					VPSGVDAGHSER	152.91
					AIPVSREEKPSSAPSS	81.29
2	M3WJG9	Crystallin beta B2	651.66	91%	IIIFEQENFQGHSHELSGPCPNLKETGVEK	154.37
					AGSVLVQAGPWVGYEQANCKGEQVFVEKGEYPR	200.00
					WDSWTSSR	77.04
					RTDSLSSLRPIKVDSQEHK	137.28
					IILYENPNFTGK	113.66
					KMEIIDDVPSFHAHGYQEK	163.13
					VQSGTWVGYQYPGYR	140.20
					GLQYLLEKGDYK	122.95
					DSGDFGAPHPQVQSVRR	108.57
					IRDMQWHQR	95.58
GAFHPSN	59.80					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
3	M3WH19	Crystallin beta A1	597.91	88%	MAQTNPMPGSGVGPWK	128.79
					ITIYDQENFQGKR	111.69
					MEFTSSCPNVSERSFDNVR	128.20
					SLKVECGAWVGYEHTSFCGQQFILER	200.00
					WDAWSGSNAYHIER	146.13
					LMSFRPICSANHK	109.09
					ESKITIFEKENFIGR	79.74
					QWEICDDYPSLQAMGWLNNEVGSMK	138.90
					IQCGAWVCYQYPGYR	145.93
					GYQYILECDHHGGDYKHWR	171.56
					EWGSHAQTSQIQSIRR	115.69
					DIAIHPWIR	73.38
4	M3WT79	Crystallin alpha B	591.16	93%	RPFPPFHSPSR	116.36
					LFDQFFGEHLLESDFPTSTSLSPFYLRPPSFLR	168.86
					APSWIDTGLSEMR	132.27
					LEKDRFSVNLDVK	50.29
					HFSPEELKVK	110.82
					VLGDVIEVHGKHEERQDEHGFISR	144.49
					KYRIPADVDPPLAITSSLSSDGVLTVNGPR	138.09
					TIPITREEKPAVTAAPK	63.78

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					LRLYER	46.01
					EDHKGLMMELSEDCSCIQDR	135.10
					FHLSEVR	87.91
					SLHVLEGCWVLYEMPNYQGR	200.00
					QYLLRPQEYRR	69.43
					YHDWGAVDAKAGALR	104.68
					GFQGHHYECSSDHSNLQPYFSR	200.00
					VDSGCWMLYEQPNYLGCQYFLPR	127.05
					GDYPDYQQWMGLSDAVR	138.85
					LYEREDYRGQMVEITEDCPSLQDR	98.61
5	M3X7P2	Uncharacterized protein	675.66	76%	LHFNEIYSLHVLEGSWVLYEMPNYR	163.92
					GRQYLLRPGDYR	96.52
					HYHDWGATSAR	122.93
					ITFYEDRGFQGR	99.46
					HYECSSDHPNLQPYFSR	200.00
					VDSGCWMLYEQPNYSGCQYFLR	140.73
					RGDYPDYQQWMGLSDAVR	154.76
					LIPHTSSHR	101.88
					EDYRGQMVEITEDCSSLHDR	157.98
					FHFSEIHSFQVLEGYWVLYEMPNYRC	117.81
					QYLLRPGDYRR	81.10
					YHDWGATSAR	110.00

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
6	M3WDS9	Crystallin beta A4	554.52	87%	TTGHWK	58.35
					IVVWDEEGFQGR	121.09
					RHEFTAECPSVLELGFETVR	166.24
					VLSGAWVGYEHAGFQGQQYVLER	165.14
					GEYPSWDAWSGNTAYPADR	145.92
					LTSFRPVTCANHRDSR	42.56
					LTIFEQENFLGR	121.81
					KGELSDDYPSLQAMGWDGNEVGSFHVHSGAWVCSQFPGYR	200.00
					GFQYVLECDHHS GDYKHFR	160.84
					EWGSHAQTFQVQSVRR	119.48
					ASATAAANTGPDGK GK	96.04
					RVEFSGECLNLADR	118.91
					GFDRVR	33.76
					SLIVISGPWVAFEQSNFR	147.35
GEMFVLEKGEYPR	123.16					
WDTWSSSYR	88.65					
7	M3X1X3	Crystallin beta B1	554.20	74%	SDRLMSFRPIK	85.20
					MDSQEHKICLFEGANFK	116.26
					GNTMEIQEDDVPSLWVYGFCDR	154.35
					VSSGTWVG YQYPGYR	121.85
					GYQYLLEPGEFR	127.05
					HWNEWGAFQPQM QAVR	200.00
					DRQWHR	49.01
					EGCFPV LAAEPPK	115.18

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
8	M3W1B4	Crystallin gamma B	542.27	74%	ITFYEDRGFQGR	99.46
					CYECSSDCPNLQPYFSR	138.58
					VDSGCWMLYERPNYQGHQYFLR	200.00
					RGDYPDYQQWMGLSDSVR	138.64
					IYEREDFRGQMSEITDDCLSLQDR	75.69
					FHLNEIHSVNVLDGCWVLYEMPSYR	200.00
					GRQYLLRPGEYR	107.45
					YLDWGAMNAKVGSR	103.68
					RCELSAECPNLTESLLEK	128.62
					VGSIQVESGPWLAFER	129.68
9	M3WJG8	Crystallin beta B3	511.98	63%	AFRGEQFVLEKGDYPR	109.51
					WDAWSNSHHSDSLLSLRPLHIDGPDHK	145.23
					LHLFENPAFSGR	130.49
					KMEIVDDDVPSLWAHGFQDR	162.12
					AINGTWVGYEFPGR	126.56
					GRQYVFER	82.00
					GEYRHWNEWANQPQLQSVR	145.22
					HYDCDCDCADFHMYLSR	129.40
					VEGGTWAVYERPWFAGYMYLPR	160.26
					GEYPEYQHWMLNDR	125.77
10	M3WND7	Crystallin gamma S	440.14	82%	AVHLSGGGQYK	124.40
					IQIFEK	39.18
					GDFNGQMYETTEDCPSIMEQFHMRR	98.92
					EVHSSKVLEGAWIFYELPNYR	97.33
					GRQYLLDKK	64.76
					EYRKPIDWGAASPAVQSVR	127.04

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
11	M3W1B5	Crystallin gamma A	546.09	81%	CYECSSDCPNLQPYFSR	138.58
					VDSGCWMLYERPNYQGHQYFLR	200.00
					RGDYPDYQQWMGLSDSVR	138.64
					AIPYTSSHR	94.25
					LYERDDYGGLVSELTEDCSCIHDRFR	160.17
					LNELHSLHVLEGCWVLYEMPNYR	173.33
					GRQYLLRPGDYR	96.52
					RYHDWGAMDAR	83.78
					AGFAGDDAPR	91.61
					AVFPSIVGRPR	85.91
12	M3WRZ7	Actin gamma 1	441.61	60%	HQGVMVGMGQK	75.35
					DSYVGDEAQSK	107.31
					IWHHTFYNELR	100.96
					DLTDYLMK	64.93
					GYSFTTTAER	104.12
					LCYVALDFEQEMATAAASSSSLEK	122.50
					SYELPDGQVITIGNER	139.13
					CDVDIRK	47.56
					DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	109.62
					EITALAPSTMK	97.13
IIAPPER	65.52					
QEYDESGPSIVHR	114.15					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					RVVVDMPGTSSSLPLQR	109.27
					TNAMGGLVR	76.89
					VYVGMVPSGYTGGLGTR	107.78
					RALGISSVFLQGLR	107.83
					SSGLATAPAPGLER	106.68
					NLGAVEDLGGCLVEYMAK	137.42
					VHALENVSQELEAQLR	129.06
					VHLESKATR	69.00
					SESWGALR	72.13
					ASWASSCQQVGEAVLENAR	130.56
13	M3W3J3	Beaded filament structural protein 2	518.51	82%	LMLQTENIQAGADDFKERYENEQPFR	128.69
					KAAEEEINSLYK	106.73
					VIDEANLTKMDLESQIESLKEELGFLSR	138.26
					GYEEDVKVLYK	88.31
					QLAGSELEQMGVPIGTGLDDILETIR	125.74
					IHWERDVEK	43.46
					AEAGALLQAK	82.27
					LELHNTSCQVQSLQAETESLR	150.25
					GLENTLHDAKHWHDIELQNLGAVVSR	120.23
					LEAELR	43.93
					EHLIAHK	75.98
					DVASYHALLDREESC	76.78

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					IFINNEWHNSVSGK	117.77
					KFPVFNPAATEEK	72.11
					LCEVEEGDKEDIDK	61.45
					QAFQIGSPWR	106.37
					LADLIERDR	63.90
					LLLATMESMNGGK	116.06
					LFSNAYQMDLGGCITTLR	100.57
					YCAGWADKIQGR	105.48
					TIPIDGNFFTYTK	99.97
14	M3WAV4	Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1	423.16	53%	VAFTGSTEVGK	83.08
					VTLELGK	58.21
					LFVEESYDEFVR	108.50
					YVLGNPLTPGVSQGPQIDKEQYEK	100.08
					ILDLIESGKK	69.50
					LECGGGPWGNK	92.03
					GYFIQPTVFSNVTDEMR	131.93
					IAKEEIFGPVQQIMK	109.95
					SLDEVK	48.13
					RANNTLYGLSAGIFTK	99.79
					ELGEYGLHEYTEVK	96.84

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					LQIEAQFLQDDISAAKDR	120.42
					NLLEIQTYVTILQQIVQTPQASAITSGMREEK	131.42
					EAAVLQSQLEEGREVVSLQAQR	170.32
					AELQAQTAALEQAIKDAHECYDDEIQLYNEQIESLRK	101.39
					EIEETER	55.57
					QLVVAQQTLKNELEK	109.17
					IIENEGNR	87.65
					LSSAFIETPVTLFTPSHGTFLLSSR	106.62
15	M3WS10	Beaded filament structural protein 1	486.70	55%	LGGKDLTR	47.64
					AVQDITAAKPR	83.70
					KKEIIAK	34.86
					DKADESLEDIPLKGPEDTK	100.62
					LVQVVPKEEGESKLELGAK	72.21
					SPKEPEPPADLYTK	102.43
					YVLVSGDASYVDPGFCSFSIPAK	92.09
					GGVVISIEDDSVHR	113.25
					VEVMESIEK	61.50
					LLSDCANIAER	103.65
					VENGAWVAFEYPDFQGQQFILEK	133.67
					WSAWSGSGGHHSDQLLSFRPVLCANHSDSR	159.22
					VTLFEGDNFQGCK	125.43
16	M3W7S8	Crystallin beta A2	442.61	76%	FELTDDYPSLPSMGWASK	141.26
					VSSGAWVAYQYPGYR	119.56
					GYQYVLER	110.39
					DRHSGEFR	57.59
					NYSEFGTQAHTGLLQSIRR	109.84

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
17	M3W564	Fatty acid binding protein 5	377.09	75%	GFDEYMKEVGVGMALR	101.79
					KVGAMAKPDCIISSDGK	90.06
					TTQFSCNLGEKFEETTADGR	133.72
					TQTVCTFTNGALVQHQEWDGKESTITR	80.43
					KLEDGKLVVECVMMNNVTCTR	124.70
					VGVNGFGR	37.29
					WGDAGAEYVVESTGVFTTMEK	102.06
18	A0A0A0MPZ5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	410.79	55%	VIISAPSADAPMFVMGVNHEK	98.53
					IVSNASCTTNCLAPLAK	125.01
					VIHDHFGIVEGLMTTVHAITATQK	170.07
					LWRDGR	41.58
					GAAQNIIPASTGAAK	93.22
					LTGMAFR	56.47
					VPTPNVSVVDLTCR	134.49
					YDDIKK	48.39
					QASEGPLK	60.24
					LISWYDNEFGYSNR	122.27
VVDLMVHMASKE	74.16					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					EIFDSR	47.54
					GNPTVEVDLYTSK	108.85
					AAVPSGASTGIYEALELRDNDKTR	127.21
					AVEHINK	53.70
					TIAPALISK	78.03
					LSVVEQEK	53.10
					FGANAILGVSLAVCK	102.75
					LAMQEFMILPVGAANFR	87.11
					IGAEVYHNLK	90.30
19	M3WCP0	Enolase 1	412.44	61%	DATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK	83.49
					VVIGMDVAASEFFR	106.31
					SGKYDLDFKSPDDPSR	87.96
					YITPDELANLYK	99.70
					DYPVVSIEDPFDQDDWEAWQK	87.71
					FTASAGIQVVGDDLTVTNPK	119.43
					SCNCLLLK	55.67
					VNQIGSVTESLQACK	123.91
					YNQILR	81.43
					IEEELGSK	60.16
					SFRNPLAK	36.40

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
20	M3XCT4	Betaine--homocysteine S-methyl-transferase	436.47	63%	LNAGEVVIGDGGFVFALEKR	97.64
					AGPWTPEAAVEHPEAVR	115.70
					AGSNVMQTFTFYASEDKLENR	159.23
					GNYVAEK	35.64
					VNEAACDIAR	70.34
					QVADEGDALVAGGVSQTPSYLSCK	118.20
					VFQQQLEVFLK	81.04
					AGASIVGVNCHFDPTISLQTVK	112.47
					AHLMSQPLAYHTPDCNK	99.65
					QGFIDLPEFPFGLLEPR	135.84
					YIGGCCGFEPYHIR	106.27
					AIAEELAPER	97.15
					GFLPPASEK	100.18
					HGSWGSGLDMHTKPWIR	41.07
					IASGRPYNPSMSKPDWGVTK	83.37
					GTAELMQQK	83.33
					EATSEQQLR	90.95
21	M3WS40	Carbonic anhydrase 3	380.96	47%	VDNQSPIELHTK	111.70
					DIRHDPSELLPWSASYDPGSK	129.07
					VVFDPTYDR	104.37
					YNTFGEALKQPDGIAVVGIFLK	102.78
					EKGEFQLFLDALDKVK	102.30
					GKEAPFTNFDPSCLFPACR	123.90
					SLFSSAENEPPVPLVGNWRPPQPIK	133.46

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
22	S4R157	Pyruvate kinase	355.47	43%	LDIDSPITAR	78.62
					NTGIICTIGPASR	90.17
					AATESFASDPIR	93.88
					YRPVAVALDTKGPEIR	77.02
					GSGTAEVELKK	79.62
					ITLDNAYMEK	71.85
					VVEVGSK	59.09
					VYVDDGLISLLVK	82.69
					KGVNLPGAAVDLPAVSEKDIQDLK	55.13
					FGVEQDVDMVFASFIR	100.89
					IENHEGVR	68.27
					RFDEILEASDGIMVAR	120.56
					GDLGIEIPA EK	87.38
					AGKPVICATQMLES MIK	93.12
					CLAAALIVLTESGR	91.34
GIFPVVCKDPVQEAWAEDVDLR	106.72					
VNLAMNVGK	55.09					
23	M3WRG5	Pyruvate kinase	335.43	33%	LDIDSPITAR	78.62
					AATESFASDPIR	93.88
					GSGTAEVELKK	79.62
					ITLDNAYMEK	71.85
					VVEVGSK	59.09
					VYVDDGLISLLVK	82.69
					GVNLPGAAVDLPAVSEKDIQDLK	82.35

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
23	M3WRG5	Pyruvate kinase	335.43	33%	FGVEQDVMVFASFIR	100.89
					RFDEILEASDGIMVAR	120.56
					GDLGIEIPAEEK	87.38
					AGKPVICATQMLESNIK	93.12
					EAEAAIYHLQLFEELRR	112.50
					VNLAMNVGK	55.09
					FQFFQR	42.33
					LQIASDENYKDPTNLQGK	85.41
					VNEVNQFAAK	90.46
					LIQEQHPPEETIK	41.85
24	M3W4T6	Spectrin alpha, non-erythrocytic 1	396.33	12%	TKQDEVNAAWQR	79.88
					LFGAAEVQR	57.84
					FNRDVDETISWIK	67.78
					DLASVQALLR	77.92
					DLALEDKVK	64.27
					ALINADELANDVAGAEALLDR	107.17
					SADESGQALLTAGHYASDEVK	137.10
					KHEDFEK	33.32
					ITALDEFATK	50.23
					AQLADSFHLQQFFR	92.54
					HQAFEAEELSANQSR	108.50
					SQLLGSAAHEVQR	72.36
					IAALQSFADQLIAAGHYAK	126.27
					LGESQTLQQFSK	83.75
DVDEIEAWISEK	83.35					
GVIDTGNSLIER	59.56					
LSDDNTIGKEEIQQR	78.76					
DLSSVQTLTK	80.31					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					TYSLGSALRPSTSR	89.78
					SLYASSPGGPYATR	106.71
					LLQDSVDFSLADAINTEFK	102.57
					TNEKVELQELNDR	109.49
					FANYIDK	67.03
					FLEQQNK	49.45
					ILLAELEQLKGQGK	93.85
					DNLAEDIMR	46.75
					LQEMLQREEAESTLQSFR	88.58
25	M3WJ26	Vimentin	380.34	56%	KVESLQEEIAFLK	108.67
					QQYESVAAK	70.31
					NLQEAEEWYK	72.99
					FADLSEANR	92.75
					QVQSLTCEVDALK	98.17
					LQDEIQNMKEEMAR	32.66
					EYQDLLNVK	75.32
					MALDIEIATYR	91.84
					LLEGEESR	54.50
					IALPLPNFSSLNLR	121.24
					ETNLDSLPLVDTHSKR	94.27
					DGQVINETSQHDDLE	39.43

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
26	M3WYZ8	Phosphoglycerate mutase	308.84	60%	HGESTWVQENR	80.26
					FCGWFDAELSEK	87.65
					MEFDICYTSVLKR	96.55
					TLWTILDGTDQMWLPVVR	91.62
					HYGGLTGLNK	89.38
					SFDIPPPMDEKHPYSSISK	58.37
					RYAGLKPGEPTCESLKDTIAR	90.45
					ALPFWNEEIAPQIK	89.62
					VLIAAHGNSLR	85.98
					FLGDEETVR	74.36
					AMEAVAAQ GK	74.34
27	M3VX82	Uncharacterized protein	325.53	44%	MLLADQGGQSWKEEVVNKETWLQGPKL	114.40
					ASCLYGQLPK	75.97
					FQDGDLTLYQSNAILR	113.34
					TLGLYGKDQR	79.89
					EAALVDVVNDGVEDLR SK	114.04
					YITLIYTNYEAGKK	117.26
28	M3X2S4	Lengsin, lens protein with glutamine synthetase domain	310.05	18%	NHLQFVR	88.26
					FEATDLHGVS R	98.21
					SIPAHFFQEK	78.06
					GYLELIPNPKDDEV DHIR	103.84
					VICDTFTVTGEPLLTSP R	128.70
					HSAALSCLMAPAVSCR	74.48
					QALGETFIR	89.02
KYELENEETDAER	73.10					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
					ILVDYSK	57.65
					INFTEDR	67.37
					SNTPILVDGKDVMPEVNR	65.86
					VWFVSNIDGTHIAK	67.63
					TLATLNPESSLFIIASK	89.86
29	M3W3S8	Glucose-6-phosphate isomerase	305.09	30%	TFTTQETITNAETAK	111.46
					EWFLLSAK	63.07
					HFVALSTNTTK	111.59
					VKEFGIDPQNMFEFWDWVGGR	75.77
					MIPCDFLIPVQTQHPIRK	70.44
					ILMANFLAQTEALMK	106.04
					LTPFILGALIAMYEHK	87.29
					MGIYVGAK	57.10
					LAAAYNLVQR	94.31
					REWGSLLLEELVAAGK	87.73
					IMEVIDAITTTAQSHQR	98.06
					VTVLGHVQR	63.92
30	M3W043	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	280.67	22	GGTPSAFDR	65.50
					LPLMECVQVTK	86.95
					FDEAIQLR	68.69
					SGISQGHTVYVVHDGFEGFLAK	86.46
					GQVQEVSWHDVAGWLGR	86.42
					TNVLGHLQQGGAPTPFDR	75.03
					EQWWLNLR	67.35
					SMADYVSGELEHVTR	51.25

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
31	M3X959	Galectin	247.18	40%	FSSATMVGNTFQGGR	133.29
					VLQFAHR	57.05
					HRPLAGITR	73.59
					VQVLSDHR	70.67
					LAQVELAR	65.75
					RDLSWWDGGH	79.12
32	M3WII0	Crystallin gamma N	266.16	39%	ITFYEGK	68.85
					KLEVYGDCCDNFQDR	124.98
					VESGAWVCYDHPDFR	105.57
					VYGDGAWVLYEEPNYHGR	115.84
					MYLVER	33.92
					NYSDWEAHSSR	104.84
33	M3W7J1	Echinoderm microtubule associated protein like 2	305.50	23%	GRPVPMIIPTELAPTYSLDAR	77.16
					LKLDWVYGYR	50.29
					IWDSVSLSTLHVLGLGVFDR	105.51
					AVCCVGFSK	50.06
					SHIYFWSLEGGSLSK	90.72
					ITQAVLGAHDGGVFGLCALR	94.89
					LQEVEVPEDFGPVR	102.22
					TVAEGRGDTLYVGTTR	56.80
					AQFVTCGQDK	86.48
					LVHLWSAESR	82.03
					RPLWSR	51.97
					SAGFHPSGSVLAVGTVTGR	109.03
QITSVDAVR	60.26					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
34	M3WET7	Annexin	279.37	35%	GIGTDEETLISILTER	88.72
					QLIVQAYQAAYGK	81.28
					GVGTSSEHALIEILTTR	122.16
					EISQAYYTVYKK	73.02
					SLGDDISSETSGDFRK	64.36
					SMPAFLAER	63.26
					SEIDLLDIR	77.54
					HYGYSLYSAIK	89.40
					SDTSGNYEITLLK	77.26
					MLLYTEVTR	80.37
35	M3WHB4	Rab GDP dissociation inhibitor	312.05	21%	VTEGSFVYK	65.63
					KFDLGQDVIDFTGHALALYR	148.91
					LYSESLAR	67.76
					SPYLYPLYGLGELPQGFAR	115.98
					FVSISDLLVPK	63.73
					DLGTESQIFISR	88.78

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
36	M3WDK0	Spectrin beta chain	294.63	8%	LLEVELSGER	57.08
					SIITYVVTTYHYFSK	95.84
					VLDNAIETEK	77.45
					FANSLVGVQQQLQAFNTYR	96.90
					GNLEVLLFTIQSK	83.36
					VLLLSQDYGK	89.37
					HLLGVEDLLQK	55.50
					EQWANLEQLSAIR	87.15
					YKEVAELTR	64.85
					VAVVNQIAR	58.84
					DLDDFQSWLSR	85.94
					EVDDLEQWIAER	92.82
					NDSFTTCIELGK	71.74
					EIGQSVDEVEK	70.48
					TALPAQSAATLPAR	90.85
					37	M3W3J4
QSPIDIDTK	79.31					
AAIHDPGLK	73.07					
SLFPSYEQAVSR	94.72					
GGPLTGTYR	97.30					
YAAELHLVHWNTK	115.76					
AVQQPDGLAVLGIFLK	91.45					
VLDALDSIK	58.86					
SADFANFDPR	77.00					

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
38	M3WIF4	Phosphoglycerate kinase	328.77	34%	SLLGKDVFLK	53.77
					DCVGPEVEK	43.69
					ACADPAAGSVILLENLR	149.63
					AEPAKIEAFR	64.92
					LGDVYVNDAFGTAHR	92.65
					ELNYFAK	49.36
					ALESPERPFLAILGGAK	107.16
					ITLPVDFVTAEKFDENAK	86.04
					YAEAVAR	55.43
					QIWWNGPVGVFWEAFAQGTK	101.25
					ALMDEVVK	61.22
					FQLLEGPEAMGR	82.18
					MLLYTEVTR	80.37
39	M3WF17	Rab GDP dissociation inhibitor	308.50	20%	VVEGSFVYK	41.44
					KFDLGQDVIDFTGHALALYR	148.91
					LYSESLAR	67.76
					SPYLYPLYGLGELPQGFAR	115.98
					QLICDPSYIPDR	71.29
40	M3WHU0	Aldo-keto reductase family 1 member B	223.28	23%	MPIVGLGTWK	90.00
					IAIDLGYR	88.77
					REDLFIVSK	56.28
					TLSDLKLDYLDLYLIHWPTGFKPGK	94.43
					AIGVSNFNHLQVEK	87.40
					TTAQVLIR	72.52

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
41	M3WJW8	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	199.57	9%	VGIFTGAR	50.16
					SEWSDLLSDLQK	79.87
					ITAEATK	60.40
					IIEIVDAITTTAQSHQR	87.24
					VTVLGHVQR	63.92
					GGTPSAFDR	65.50
					DLQANVEHLVHK	77.97
					ELSDIALR	55.84
42	M3W9A0	Fructose-bisphosphate aldolase	229.64	24%	GILAADESVGSMK	103.49
					LSQIGVENTEENRR	70.13
					GVVPLAGTDGETTTQGLDGLSER	90.76
					TPSALAILENANVLAR	104.56
					ALQASALNAWR	78.96
					LDNLIAILDINR	94.36
43	M3X757	Transketolase	200.02	11%	AFDQIR	39.35
					AVELAANTK	71.87
					VLDPFTIKPLDR	88.37
					NLILSSAR	38.90
					LAVGEVPR	46.68
					MFGIDRDAIAQAVR	64.22
44	M3WE05	Coactosin like F-actin binding protein 1	213.79	28%	FALITWIGENVSGLQR	124.31
					EVVQNFAK	80.30
					EFVISDRK	63.57
					ELEEDFIK	61.27

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
45	M3VY98	Glutathione synthetase	192.41	14%	ALAEGVLLR	65.28
					EGIAQTVFLGLNR	88.96
					HVLSVLSK	47.12
					AIENELLAQNIHVIR	90.33
					KVQQELSR	50.61
					ASYILMEK	42.45
					HVGHLLR	46.14
46	M3WEZ7	Uncharacterized protein	181.67	28%	NLLSVAYK	58.55
					LICCDILDVLDKHLIPAANTGESK	80.37
					YLAEFATGNDRK	71.83
					EAAENSLVAYK	78.49
					DSTLIMQLLR	62.28
47	M3X9A1	Triosephosphate isomerase	256.29	31%	NLGELITTLNAAK	87.39
					IAVAAQNCYK	108.00
					DCGATWVVVLGHSER	81.78
					RHVFGESEDELIGQK	88.09
					VVFEQTK	63.67
					VVLAYEPVWAIGTGK	103.40
					SNVSDAVAQSTR	103.07
48	M3XAX6	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	190.01	25%	SVTEQGAELSNEER	95.04
					NLLSVAYK	58.55
					FLIPNASQAESK	85.13
					GIVDQSQQAYQEAFFEISKK	75.35
					DSTLIMQLLR	62.28

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
49	M3VX63	Uncharacterized protein	245.27	14%	GNPTVEVDLHTAK	119.00
					AAVPSGASTGIYEALRL	113.81
					AVEHINK	53.70
					VNQIGSVTESIQACK	123.91
					IEEALGNK	52.49
50	M3WKJ9	Phosphoglycerate mutase	203.22	26%	HYGGLTGLNK	89.38
					YADLTEDQLPSCESLKDTIAR	98.67
					ALPFWNEEIVPQIK	63.05
					VLIAAHGNSLR	85.98
					AMEAVAAQGK	74.34
51	M3XBK1	Peroxiredoxin 1	156.17	23%	IGH PAPNFK	50.11
					ADEGISFR	63.48
					GLFIIDEK	58.28
					QITVNDLPVGR	79.71
					LVQAFQFTDK	60.36
52	M3WK75	Fructose-bisphosphate aldolase	223.82	9%	GILAADESTGSIK	100.88
					TDDGRPPFPQVIK	39.76
					IGEHTPSALAIMENANVLAR	121.74
					ALQASALK	50.62
					ALANSLACQGK	93.08
53	Q66RN5	Elongation factor 1-alfa 1	197.34	12%	THINIVVIGHVDSGK	95.06
					STTTGHLYK	80.30
					EHALLAYTLGVK	100.71
					QLIVGVNK	33.88
					IGGIGTVPVGR	62.21

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
54	M3VVF9	Serpin family B member 6	182.56	24%	SSGGGDVHQGFQSLLEINR	49.33
					SYDFLSSFK	85.00
					ITQLLSPGSVDPVTNLILVNAIFYK	53.63
					GNWDSQFNK	63.04
					TVEKEITYEK	64.37
					KDLYLSR	44.71
					TNSILFCGR	70.00
55	M3W818	Annexin	192.05	18%	GVDEVTIVNILTNR	82.81
					QDIAFAYQR	70.86
					SALSGHLETVILGLLK	67.85
					TPAQYDASELK	83.84
					TNQELQEINR	91.23
56	M3VW17	Uncharacterized protein	227.45	15%	NQVAMNPTNTVFDAGR	45.04
					DAGTIAGLNVLNR	72.96
					IINEPTAAAIAYGLDKK	101.10
					STAGDTHLGGEDFDNR	89.44
					ARFEELNADLFR	86.70
					SQIHDIVLVGGSTR	82.09
					LSKEDIER	53.28
57	M3VZZ7	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	182.76	6%	MGIYVGAK	57.10
					IIEVVDAIMTTAQSHQR	116.44
					VTILGHVQR	57.88
					GGTPSAFDR	65.50

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
58	M3WYR7	Parkinsonism associated deglycase	217.06	46%	VTVAGLAGKDPVQCSR	81.77
					DVLICPDASLEDAKK	95.93
					EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSESAVK	116.79
					EILKEQEK	51.54
					DGLILTSR	58.94
59	M3XG55	Uncharacterized protein	195.12	15%	VFEFGGPEVLK	80.89
					QGAAIGIPYFTAYR	99.16
					GPIEINPR	79.53
					VAQAHENIIHSSGATGK	98.22
60	P49064	Serum albumin	181.68	6%	LYYEIAR	72.44
					LGEYGFQNALLVR	102.14
					KVPQVSTPTLVEVSR	106.46
61	M3W3Z1	Ankyrin 2	166.46	1%	GAAVDFTAR	45.89
					AREEQTPLHIASR	82.16
					DFPQYFAVVSRR	90.71
					FWLIDCR	60.18
62	M3WBH7	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	130.27	8%	ANAIGVSLIK	66.99
					LGLMEMIAFAK	75.02
					VAEAFVR	65.25
63	M3WEW2	WD repeat domain 1	182.64	8%	YAPSGFYIASGDVSGK	108.16
					YEYQPFAGK	68.23
					IKDIAWTEDSKR	52.58
					LYSILGTTLKDEGK	77.19

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
64	M3WYS3	Protein-L-isoaspartate O-methyl-transferase	185.79	16%	ALDVGSGSGILTACFAR VIGIDHIKELVDDSINNVR	112.44 94.67
65	M3WAC5	Eukaryotic translation elongation factor 1 gama	159.72	7%	ALIAAQYSGAQVR TFLVGER EYFSWEGAFQHV GK	105.31 61.61 67.73
66	P63052	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	118.95	14%	TLSDYNIQK ESTLHLVLR	72.36 76.43
67	Q8HXS3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	96.88	16%	SIYGEKFD DENFILK EGMNIVEAMER	50.44 53.29
68	M3XGA0	Malic enzyme	272.02	15%	VRGPEYDDFLDEFMEAVSSK AIFASGSPFDPVTL PDGR HITDEIFLTTAEVIAQQVSDKHLEEGR TATVYPEPQNK	103.24 72.06 143.09 82.72
69	M3VUU2	Peroxi redoxin 2	179.79	24%	KEGGLGPLNIPLLADVTR SLEDYGV LKEDEGIAYR QITVNDLPVGR	90.58 107.92 79.71
70	M3WN67	L-lactate dehydrogenase	139.95	9%	LVIITAGAR VIGSGCNLDSAR VTLTPEEEAR	60.49 72.72 83.42
71	M3X3B0	Secernin 1	184.66	8%	YWAAEQITEGVK IDAQHPELR AVIESDQEQGR	99.17 92.63 104.19
72	M3WFI7	Dicarbonyl and L-xylulose reductase	174.31	17%	ALHAAGVQVVALSR AVIQVSQIVAR GAPGAIVNIS SQASQR	96.43 74.44 101.27

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
73	M3VXY4	Junction plakoglobin	178.04	6%	SAIVHLINYQDDAELATR	92.09
					LVQNCLWTLR	66.63
					TLVTQNSGVEALIHAILR	102.18
74	M3VZX9	N-myc downstream regulated 1	133.73	8%	SIIGMTGAGAYILTR	85.29
					TASGSSVTSLEGAR	91.08
75	M3W6F2	Nucleoside diphosphate kinase	120.80	17%	GLVGEIIKR	42.63
					VMLGETNPADSKPGTIR	99.49
76	M3X9Z0	Fatty acid binding protein 3	108.37	22%	SIGVGFATR	59.22
					ELVDGKLILTLTHGSVVCTR	58.52
77	M3VY77	Uncharacterized protein	137.74	15%	YTGAEVDELGK	96.76
					CDEPILSNR	41.89
					LYEQLSGK	54.03
78	M3VVG3	Heat shock protein 90 alfa family class A member 1	133.43	4%	YIDQEELNK	70.00
					FYEQFSK	48.65
					DQVANSAFVER	82.21
79	M3WK78	Mitogen-activated protein kinase	88.10	10%	FRHENVIGIR	40.82
					ICDFGLAR	55.52
					IADPEHDHTGFLTEYVATR	36.52
80	M3WNF9	Chaperonin containing TCP1 subunit 8	124.61	7%	AIADTGANVIVTGGK	79.73
					LVPGGGATEIELAK	32.57
					LATNAAVTVLR	68.04
81	M3WWP2	Heat shock protein 27 kDa beta-1	119.58	9%	LFDQAFGLPR	86.20
					QDEHGYSIR	66.77

(Continued)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
82	M3WJI8	Moesin	103.18	3%	LFFLQVK APDFVIFYAPR	36.24 85.06
83	M3WRA1	T-complex protein 1 subunit delta	109.30	5%	VIDPATATSVDLR AYILNLVK	85.21 48.17
84	M3WXV4	GTP-binding nuclear protein Ran	106.39	12%	FNVWDTAGQEK SNYNFEKPFLWLR	73.99 64.80
85	M3WIA9	Vesicle amine transport 1	111.62	8%	LQSRPAVPPAPGPGQVTLR ACGLNFADLMAR	74.08 74.58
86	M3W XK0	Karyopherin subunit beta 1	107.71	3%	VLANPGNSQVAR LAATNALLNSLEFTK	65.65 74.88
87	M3WX85	Phosphoglycerate mutase	98.05	8%	YKVC DVPVDQLPR IAPEVLSGK	57.12 69.49
88	M3WBE2	Uncharacterized protein	101.44	11%	NPSAVFCCVAR SNLSSLDEQEGVK	52.20 75.34
89	M3X5H0	Alpha-amylase	127.07	4%	TSIVHLFEWR ALVFVDNHDNQR	52.47
90	M3WGP3	Lactase like	83.80	4%	FYSDFIDALLK PVFSLQEK	56.78 54.04
91	M3W269	Annexin	75.94	5%	VLTEIIASR ITIFGTR	60.66 30.56
92	M3W9D5	Galectin	94.18	16%	DAGAWGAEQR ISFDQADLTVK	75.17 38.03
93	M3WG74	Major intrinsic protein of lens fiber	161.80	11%	SFAPAILTR GARPSDSNGQPEGTGEPVELK	83.98 119.81

(Conclusion)

Protein number	Access number	Protein name	Protein score	Coverage	Peptide sequence	Peptide Score
94	M3WHD2	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B	54.40	2%	MKQMTLLDMAK	30.24
					WDMSAENAR	34.21
95	M3X590	Inositol-1-monophosphatase	82.83	9%	SLLVTEFGSSR	67.12
					EIQVVPFQRDDED	31.41
96	M3W1B7	Uncharacterized protein	623.42	89%	GKITFYEDRGFQGR	71.95
					HYECSSDHPNLQPYFSRCNSIR	137.32
					VDSGCWMLYEQPNYSGCQYFLR	163.88
					RGDYPDYQQWMGLSDAVR	154.76
					SCRLIPHTSSHR	104.39
					IRIYER	46.01
					EDYRGQMVEITEDCSSLHDR	200.00
					FHFSEIHSFQVLEGYWVLYEMPNYR	117.81
					GRQYLLRPGDYR	96.52
					RYHDWGATSAR	116.80
97	M3W9K0	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	156.20	4%	VGSLRR	29.26
					DYFFALAHTVR	87.10
98	M3WJN3	Eukaryotic translation initiation factor 4A2	137.10	6%	LKQEYFVVAATLQDIIR	87.17
					VIFLENYR	76.42
99	M3WK06	Protein S100	95.64	18%	LQAEAPHIVVGTPGR	93.39
					VLITTDLLAR	74.42
99	M3WK06	Protein S100	95.64	18%	ALDVMVSTFY(sub H)K	51.93
					TDDAAFQR	69.67

Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Tabela 2: Proteínas identificadas como não-caracterizadas no cristalino de gatos, pela abordagem LC-MS/MS, utilizando o algoritmo PEAKS e alinhadas pela ferramenta BLASTp contra o banco de dados de proteínas depositados no NCBI.

UniProt		NCBI		Max. Score	Query cover	Evalue	Ident.
Access Number	Protein Name	Access number	Protein number				
M3X7P2	Uncharacterized protein	ELK04886.1	Gamma-crystallin C	522	97/	0	73/
M3W1B7	Uncharacterized protein	XP_003991136.1	Gamma-Crystallin F	362	92/	1E-126	100/
M3WBE2	Uncharacterized protein	XP_003982954.1	Gamma-glutamylcyclotransferase isoform X1	392	85/	2E-137	100/
M3VY77	Uncharacterized protein	XP_003994758.3	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	384	100/	2E-135	100/
M3XG55	Uncharacterized protein	XP_006934900.1	Quinone oxidoreductase isoform X2	671	100/	0	100/
M3VW17	Uncharacterized protein	KFO35963.1	Heat shock cognate 71 kDa protein	1332	100/	0	100/
M3VX63	Uncharacterized protein	XP_003996194.1	beta-enolase	893	100/	0	100/
M3WEZ7	Uncharacterized protein	EMC77099.1	14-3-3 protein epsilon	483	100/	1E-172	100/
M3VX82	Uncharacterized protein	XP_011285433.1	Glutathione S-transferase P	431	97/	5E-153	99/

Fonte: Dados da pesquisa do autor

Tabela 3: Proteínas identificadas em cristalininos de gatos, pelas abordagens MALDI-TOF/TOF utilizando o algoritmo mascot e scaffold com tiras de pH 3-10.

Spot	Acess number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.
						MW	pI	MW	pI			
1	P68282	Alpha-crystallin A chain	130	100/	13/	19776	5.78	20200	5.78	2	TVLDSGISEVR VPSGVDAGHSER	94/ 95/
9	M3WH19	Crystallin beta A1	158	100/	13/	25558	5.98	22600	7.02	2	ITIYDQENFQGKR EWGSHAQTSQIQSIR	95/ 95/
20	P68282	Alpha-crystallin A chain	109	100/	13/	19776	5.78	20400	5.61	2	TVLDSGISEVR VPSGVDAGHSER	92/ 94/
21	M3WJG8	Crystallin beta B3	44	92/	5/	27636	7.93	24333	7.18	1	LHLFENPAFSGR	92/
22	M3W7S8	Crystallin beta A2	275	100/	31/	22417	6.30	24333	6.88	5	VTLFEGDNFQGcK VSSGAWVAYQYPGYR GYQYVLER DRHSGEFR NYSEFGTQAHTGLLQSIR	95/ 95/ 94/ 90/ 95/
24	P68282	Alpha-crystallin A chain	171	100/	18/	19776	5.78	19500	6.08	3	ALGPFYPSR TVLDSGISEVR VPSGVDAGHSER	92/ 94/ 95/
26	P68282	Alpha-crystallin A chain	106	100/	7/	19776	5.78	20000	5.59	1	VPSGVDAGHSER	95/
29	M3WJG8	Crystallin beta B3	124	100/	11/	27636	7.93	24500	7.48	2	LHLFENPAFSGR HWNEWVANQPQLQSVR	95/ 95/
38	M3W7S8	Crystallin beta A2	180	100/	23/	22417	6.30	25000	6.58	3	VTLFEGDNFQGcK VSSGAWVAYQYPGYR NYSEFGTQAHTGLLQSIR	90/ 95/ 95/

(Continued)

Spot	Access number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.			
						MW	pI	MW	pI						
39	M3WDS9	Crystallin beta A4	102	100/	11/	24180	5.78	23000	6.75	2	IVVWDEEGFQGR	93/			
														LTIFEQENFLGR	95/
	M3WH19	Crystallin beta A1	180	100/	13/	25558	5.98			2	ITIIDQENFQGKR	95/			
											IQCGAWVCYQYPGYR	95/			
40	M3WDS9	Crystallin beta A4	372	100/	28/	24180	5.78	23000	6.47	4	IVVWDEEGFQGR	95/			
														GEYPSWDAWSGNTAYPADR	95/
														LTIFEQENFLGR	95/
	M3WH19	Crystallin beta A1	130	99/	6/	25558	5.98			1	EWGSHAQTFQVQSVR	95/			
	M3WND7	Crystallin gamma S	82	99/	9/	21422	6.09			1	WDAWSGSNAYHIER	95/			
41	M3WDS9	Crystallin beta A4	419	100/	35/	24180	5.78	23000	6.25	5	KPIDWGAASPAVQSF	95/			
											IVVWDEEGFQGR	95/			
											GEYPSWDAWSGNTAYPADR	95/			
											LTIFEQENFLGR	95/			
											GFQYVLEcDHHS GDYK	95/			
EWGSHAQTFQVQSVR	95/														
42	M3WDS9	Crystallin beta A4	199	100/	28/	24180	5.78	23000	6.03	4	IVVWDEEGFQGR	95/			
											GEYPSWDAWSGNTAYPADR	95/			
											LTIFEQENFLGR	93/			
											EWGSHAQTFQVQSVR	95/			
43	M3WDS9	Crystallin beta A4	198	100/	20/	24180	5.78	23500	5.86	3	IVVWDEEGFQGR	95/			
											GEYPSWDAWSGNTAYPADR	95/			
											LTIFEQENFLGR	95/			

(Conclusion)

Spot	Acess number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical	Experimental	peptide number	peptides sequence	peptide prob.		
44	P68282	Alpha-crystallin A chain	167	100/	13/	19776	5.78	20400	5.38	2	TVLDSGISEVR VPSGVDAGHSER	94/ 95/
47	P68282	Alpha-crystallin A chain	96	100/	12/	19776	5.78	15000	5.84	2	ALGPFYPSR	90/

Fonte: Dados da pesquisa do autor

Tabela 4: Proteínas identificadas em cristalinos de gatos, pelas abordagens MALDI-TOF/TOF utilizando o algoritmo mascot e scaffold com tiras de pH 4-7.

Spot	Access number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.
						MW	pI	MW	pI			
5	P68282	Alpha-crystallin A chain	340	100/	32/	19776	5.78	18600	6.33	5	ALGPFYPSR	95/
											TVLDSGISEVR	95/
											VLEDFVEIHGK	91/
											HNERQDDHGYISR	93/
											VPSGVDAGHSER	95/
7	P68282	Alpha-crystallin A chain	115	100/	26/	19776	5.78	20200	5.42	4	ALGPFYPSR	93/
											TVLDSGISEVR	93/
											HNERQDDHGYISR	94/
											VPSGVDAGHSER	95/
9	P68282	Alpha-crystallin A chain	374	100/	32/	19776	5.78	20400	5.65	5	ALGPFYPSR	95/
											TVLDSGISEVR	95/
											VLEDFVEIHGK	95/
											HNERQDDHGYISR	93/
10	P68282	Alpha-crystallin A chain	430	100/	32/	19776	5.78	20000	6.09	5	VPSGVDAGHSER	95/
											ALGPFYPSR	95/
											TVLDSGISEVR	95/
											VLEDFVEIHGK	90/
											HNERQDDHGYISR	95/

(Continued)

Spot	Access number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.
						MW	pI	MW	pI			
11	M3WDS9	Crystallin beta A4	479	100/	33/	24180	5.78			4	IVVWDEEGFQGR	95/
											VLSGAWVGYEHAGFQQQY-VLER	93/
	M3WH19	Crystallin beta A1	145	100/	12/	25558	5.98			2	GEYPSWDAWSGNTAYPADR	95/
											EWGSHAQTFQVQSVR	95/
M3WND7	Crystallin gamma S	130	100/	17/	21422	6.09			2	VLEGAWIFYELPNYR	95/	
										KPIDWGAASPAVQSFR	95/	
M13	M3WH19	Crystallin beta A1	120	100/	12/	25558	5.98			2	WDAWSGSNAYHIER	95/
											ITIFEKENFIGR	95/
M13	M3WDS9	Crystallin beta A4	271	100/	19/	24180	5.78	23400	6.16	3	IVVWDEEGFQGR	95/
											LTSFRPVTcANHR	95/
M14	M3WDS9	Crystallin beta A4	351	100/	19/	24180	5.78	23400	5.96	3	EWGSHAQTFQVQSVR	95/
											IVVWDEEGFQGR	95/
M16	M3WDS9	Crystallin beta A4	294	100/	13/	24180	5.78	23600	5.77	2	ITIFEKENFIGR	95/
											EWGSHAQTFQVQSVR	95/
M17	M3WH19	Crystallin beta A1	199	100/	12/	25558	5.98	23200	6.67	2	ITIIDQENFQGKR	95/
											ITIFEKENFIGR	95/
M17	M3WT79	Crystallin Alpha B	51	91/	6/	20054	6.76			1	RPFFPFHSPSR	95/

(Continued)

Spot	Access number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.
						MW	pI	MW	pI			
M21	M3WJG9	Crystallin beta B2	439	100/	34/	23432	6.50	27800	6.71	5	GEQFVFEKGEYPR WDSWTSSR IILYENPNFTGKK VQSGTWVGYQYPGYR GDYKDSGDFGAPHPQVQSVR	95/ 95/ 95/ 95/ 95/
	M3WDS8	Crystallin beta B1	52	97/	5/	28143	6.84			1	GYQYLLEPGEFR	91/
M26	M3W7S8	Crystallin beta A2	106	100/	10/	22417	6.30	25000	6.55	2	LLSDCANIAER GYQYVLER	92/ 95/
	M3WDS9	Crystallin beta A4	51	91/	6/	24180	5.78			1	LTIFEQENFLGR	95/
M37	P68282	Alpha-crystallin A chain	422	100/	32/	19776	5.78	20200	5.81	5	ALGPFYPSR	95/
											TVLDSGISEVR	95/
M39	P68282	Alpha-crystallin A chain	199	100/	18/	19776	5.78	20333	5.53	3	VLEDFVEIHGK	94/
											HNERQDDHGYISR	95/
M48	M3WH19	Crystallin beta A1	207	100/	20/	25558	5.98	47400	6.95	3	VPSGVDAGHSER	95/
											ITIIDQENFQGKR	95/
M48	M3X7P2	Protein uncharacterized	117	100/	4/	56483	6.88			1	WDAWSGSNAYHIER	95/
											IQCGAWVCYQYPGYR	95/
	MEWDS8	Crystallin beta B1	77	99/	4/	28143	6.84			1	HYECSSDHPNLQPYFSR	94/
										1	WDTWSSSYR	94/

											(Conclusion)											
Spot	Access number	Protein name	Score MS/MS	Protein prob.	coverage	theoretical		Experimental		peptide number	peptides sequence	peptide prob.										
						MW	pI	MW	pI													
M51	M3WH19	Crystallin beta A1	405	100/	34/	25558	5.98			5	ITIYDQENFQGKR	95/										
											WDAWSGSNAYHIER	95/										
											ITIFEKENFIGR	95/										
	M3WJG8	Crystallin beta B3	272	100/	11/	27636	7.93			2	IQCGAWVCYQYPGYR	95/										
											GYQYILEcDHHGGDYKHW	95/										
											LHLFENPAFSGR	95/										
M53	M3WH19	Crystallin beta A1	421	100/	32/	25558	5.98	23250	6.43	5	HWNEWDANQPQLQSVR	95/										
											ITIYDQENFQGKR	95/										
											WDAWSGSNAYHIER	95/										
											ITIFEKENFIGR	95/										
											IQCGAWVcYQYPGYR	95/										
M3WDS9	Crystallin beta A4	120	99/	6/	24180	5.78			1	EWGSHAQTSQIQSIR	95/											
M40	M3WH19	Crystallin beta A1	119	99/	6/	25558	5.98	46600	6.70	1	LTIFEQENFLGR	95/										
M44	M3WH19	Crystallin beta A1	46	95/	6/	25558	5.98	46200	6.84	1	ITIYDQENFQGKR	95/										
M45	M3WH19	Crystallin beta A1	134	100/	12/	25558	5.98	45400	6.59	2	P68282	Alpha-crystallin A Chain	57	91/	5/	19776	5.78			1	ALGPFYPSR	94/
											ITIYDQENFQGKR	95/										
											ITIFEKENFIGR	95/										
											M3WDS9	Crystallin beta A4	48	92/	6/	24180	5.78			1	LTIFEQENFLGR	95/
M52	M3WH19	Crystallin beta A1	136	100/	13/	25558	5.98	22000	6.95	2	WDAWSGSNAYHIER	95/										
											IQCGAWVCYQYPGYR	95/										
	M3X7P2	Protein uncharacterized	63	99/	4/	56483	6.88			1	RGDYDPDYQQWMGLSDAVR	94/										

Fonte: Dados da pesquisa do autor.

Tabela 5: Proteínas identificadas como não-caracterizadas no cristalino de gatos, pela abordagem MALDI TOF/TOF, utilizando os algoritmos mascot/scaffold e alinhadas pela ferramenta BLASTp contra o banco de dados de proteínas depositados no NCBI.

UniProt		NCBI		Max. Score	Query cover	Evalue	Ident.
Acess Number	Protein Name	Access number	Protein number				
M3X7P2*	Uncharacterized protein	ELK04886.1	Gamma-crystallin C	522	97/	0	73/

Fonte: Dados da pesquisa do autor

* Este access number aparece na tabela 2 e 5.

9 - Anexo II – Certificação CEUA-UFV



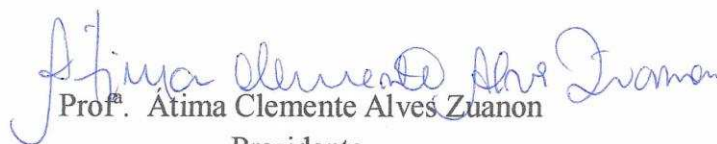
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, certifica que o Processo nº 75/2017, com o Projeto de Pesquisa intitulado, “**Análise proteômica do cristalino de *Felis catus***” coordenado pelo(a) professor(a) Cláudio Lísias Mafra de Siqueira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a legislação vigente, Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com as Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, CONCEA e, apresenta especificidade, caracterizando “*A não utilização de animais vivos*”, portanto sendo aprovado por esta comissão em 16 de outubro de 2017.

CERTIFICATE

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that the 75/2017 Process, with the Research Project titled, “**Proteomic analysis of the lens of *Felis catus***”, coordinated by the Cláudio Lísias Mafra de Siqueira teacher of Department of Biochemistry and Molecular Biology, is of according to current legislation, Law No. 11,794, of october 08, 2008, with the Normative Resolutions issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA and, presents specificity, characterizing "Non-use of live animals", therefore being approved by this commission in October 16, 2017.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV