

ANGELO BRUNO NUNES OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS  
PROTEÍNAS CRISTALINAS ALFA, BETA E GAMA DO 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  
2019

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

T

O48c  
2019

Oliveira, Angelo Bruno Nunes, 2019-  
Caracterização das modificações pós-traducionais das proteínas  
cristalinas alfa, beta e gama do cristalino de *Felis catus* / Angelo Bruno  
Nunes Oliveira. - Viçosa, MG, 2019.  
xiv, 87 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Claudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 44-53.

1. Cristalinos. 2. Proteômica. 3. Processamento de proteína pós-  
traducional. 4. Gatos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572.6

ANGELO BRUNO NUNES OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DAS  
PROTEÍNAS CRISTALINAS ALFA, BETA E GAMA DO 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: 1 de julho de 2019.



Camilo Elber Vital



Tatiana Schmitz Duarte



Pedro Marcus Pereira Vidigal

(Coorientador)



Cláudio Lísias Mafra de Siqueira  
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha família 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.
- 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 e ao Pedro Vidigal que estiveram comigo nesta jornada do início ao fim. Obrigado pela paciência, amizade e tranquilidade quando eu mais precisava.
- Aos amigos do NUBIOMOL: Nívea, Cláudia e Humberto.
- À equipe do Departamento de Veterinária que me ajudou e apoiou muito neste processo.
- Ao Dr. Bruno Mattei da UFOP pela parceria.
- Aos colegas do LAPEM, pelo apoio.
- Aos meus pais Carlos Magno de Oliveira e Maria Rita Nunes Pereira. Sem eles eu não teria conseguido chegar onde estou hoje.
- À minha amada esposa Maria José de Jesus Silva, pelo apoio, companheirismo e paciência em todos esses anos que estamos juntos.
- Aos meus sogros José Maria da Silva e Maria Joana de Jesus Silva, pois sua parceria é vital.
- Aos meus filhos, que são a razão da minha existência.
- E um agradecimento póstumo a um querido mestre que não está mais entre nós, Marcelo Matos Santoro.

***“Só se vê bem, com o coração. O essencial é invisível para os olhos.”***

***Antoine de Saint-Exupéry***

## **BIOGRAFIA**

Angelo Bruno Nunes Oliveira, filho de Carlos Magno de Oliveira e Maria Rita Nunes Oliveira, nascido em 12 de agosto de 1979, na cidade de Janaúba, Minas Gerais. Casado com Maria José de Jesus Silva desde 25 de julho de 2009. Pai de Victor Nunes Silva, que nasceu em 4 de junho de 2013, e aguardando a chegada da pequena Lis Nunes Silva que nascerá logo.

Iniciou graduação em Biologia na Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), em 1998, onde foi apresentado ao maravilhoso mundo das descobertas acadêmicas, porém no curso errado. Desistiu do curso, e ingressou no curso de química na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em 2000, que por motivos financeiros teve que abandonar, reingressando no mesmo curso em 2003, obtendo o título de Licenciado em Química em janeiro de 2008. Lecionou na rede estadual de ensino em Belo Horizonte, em 2009, e iniciou curso de Doutorado em Bioinformática, pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em 2010, onde aprendeu muito, mas não conseguiu finalizar. Servidor público no cargo de Auxiliar em Administração da UFV, desde 2013, retomou o sonho do desenvolvimento de estudos acadêmicos ao ingressar no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada da UFV, como aluno do curso de Mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
ABREVIACÕES, SÍMBOLOS, UNIDADES E DEFINIÇÕES .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 Introdução .....	1
2 Revisão da Literatura .....	3
2.1 Felis Catus.....	3
2.2 Cristalino.....	4
2.3 Cristalinas .....	5
2.3.1 Superfamília Cristalina alfa .....	5
2.3.2 Superfamília Cristalina beta e gama .....	8
2.4 Opacificação do cristalino (Catarata).....	9
2.5 Modificações Pós-Traducionais nas Cristalinas .....	11
2.6 Identificação das Modificações Pós-Traducionais.....	13
3 Objetivos .....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos .....	15
4 Metodologia .....	16
4.1 Obtenção dos dados de proteômica em larga escala (UHPLC-MS/MS).....	16
4.2 Referenciamento de modificações pós-traducionais registradas em bancos de dados para cada proteína alvo .....	16
4.3 Análise dos espectros de massas com foco em identificação de MPTs.....	16
4.4 Definição de sítios e quantificação de ocorrência de modificações pós-traducionais .....	17

4.5	Análise das frequências das MPTs identificadas.....	19
4.6	Comparação com registro de MPTs de outras espécies.....	19
5	Resultados e Discussão .....	20
5.1	Análise dos resultados.....	20
5.2	Análise dos resultados segundo critério metodológico.....	22
5.2.1	Cristalina alfa A [UNIPROT ID: P68282] .....	22
5.2.2	Cristalina alfa B [UNIPROT ID: M3WT79] .....	23
5.2.3	Cristalina beta A1 [UNIPROT ID: M3WH19].....	24
5.2.4	Cristalina beta A2 [UNIPROT ID: M3W7S8] .....	26
5.2.5	Cristalina beta A4 [UNIPROT ID: M3WDS9].....	27
5.2.6	Cristalina beta B1 [UNIPROT ID: M3WDS8].....	28
5.2.7	Cristalina beta B2 [UNIPROT ID: M3WJG9] .....	29
5.2.8	Cristalina beta B3 [UNIPROT ID: M3WJG8] .....	30
5.2.9	Cristalina gama A [UNIPROT ID: M3W1B5].....	31
5.2.10	Cristalina gama B [UNIPROT ID: M3W1B4] .....	32
5.2.11	Cristalina gama S [UNIPROT ID: M3WND7].....	33
5.2.12	Proteína não-caracterizadas 1 [UNIPROT ID: M3X7P2] .....	34
5.2.13	Proteína não-caracterizadas 2 [UNIPROT ID: M3W1B7].....	35
5.3	Comparação com registro de MPTs de outras espécies.....	36
5.3.1	Cristalinas alfa .....	36
5.3.2	Cristalinas beta e gama .....	39
6	Conclusões gerais.....	41
7	Perspectivas.....	43
8	Referências Bibliográficas .....	44
	Anexo I.....	54
	Anexo II .....	56
	Anexo III.....	58

Anexo IV .....	63
Anexo V .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O cristalino .....	4
Figura 2 - Estrutura tridimensional das cristalinas alfa A e alfa B .....	7
Figura 3 - Estrutura Tridimensional das cristalinas beta B2 e gama B .....	8
Figura 4 – Modelo estrutural das cadeias primárias das cristalina beta B2 e gama B .....	9
Figura 5 - Representação esquemática da relação entre modificações proteicas e a regulação de processos biológicos (SEO; LEE, 2004).....	11
Figura 6 - Estrutura de funcionamento do algoritmo para identificação dos sítios de modificação. ....	18
Figura 7 - Sítios de MPTs identificados na cristalina alfa A de <i>Felis catus</i> .....	23
Figura 8 - Sítios de MPTs identificados na cristalina alfa B de <i>Felis catus</i> .....	24
Figura 9 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A1 de <i>Felis catus</i> .....	25
Figura 10 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A2 de <i>Felis catus</i> .....	26
Figura 11 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A4 de <i>Felis catus</i> .....	27
Figura 12 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B1 de <i>Felis catus</i> .....	28
Figura 13 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B2 de <i>Felis catus</i> .....	29
Figura 14 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B3 de <i>Felis catus</i> .....	30
Figura 15 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama A de <i>Felis catus</i> .....	32
Figura 16 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama B de <i>Felis catus</i> .....	32
Figura 17 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama S de <i>Felis catus</i> .....	33
Figura 18 - Sítios de MPTs identificados na Proteína não-caracterizada de <i>Felis catus</i> , <b>M3X7P2</b> .....	34
Figura 19 - Sítios de MPTs identificados na Proteína não-caracterizada de <i>Felis catus</i> , <b>M3W1B7</b> . ....	35
Figura 20 - Posicionamento estrutural das serinas 19, 45 e 59 em um oligômero de cristalinas alfa B .....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de sítios de MPTs por cristalinas. ....	20
Tabela 2 – Heatmap da frequência relativa de cada Modificação por cristalina .....	21
Tabela 3 - Quantidade de sítios de MPTs por cristalinas com frequência relativa por posição maior que 5% .....	22
Tabela 4 – Frequências relativas das MPTs identificadas nas cristalinas alfa A .....	23
Tabela 5 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas alfa B .....	24
Tabela 6 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A1 .....	25
Tabela 7 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A2 .....	26
Tabela 8 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A4 .....	27
Tabela 9 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B1 .....	28
Tabela 10 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B2 .....	29
Tabela 11 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B3 .....	31
Tabela 12 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama A .....	32
Tabela 13 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama B .....	32
Tabela 14 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama S .....	33
Tabela 15 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas não-caracterizadas <b>M3X7P2</b> .....	35
Tabela 16 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas não-caracterizadas <b>M3W1B7</b> .....	36
Tabela 17 - Modificações pós-traducionais identificadas .....	64
Tabela 18 - MPTs identificadas nas cristalina Alfa A [P68282] .....	66
Tabela 19 - MPTs identificadas nas cristalina Alfa B [M3WT79] .....	69
Tabela 20 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A1 [M3WH19] .....	71
Tabela 21 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A2 [M3W7S8] .....	74
Tabela 22 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A4 [M3WDS9] .....	75
Tabela 23 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B1 [M3WDS8] .....	77
Tabela 24 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B2 [M3WJG9] .....	79
Tabela 25 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B3 [M3WJG8] .....	82
Tabela 26 - MPTs identificadas nas cristalina Gama A [M3W1B5] .....	84
Tabela 27 - MPTs identificadas nas cristalina Gama B [M3W1B4] .....	84

Tabela 28 - MPTs identificadas nas cristalina Gama S [M3W1B5].....	85
Tabela 29 - MPTs identificadas nas cristalina Gama Não-Characterizada [M3X7P2] ....	87
Tabela 30 - MPTs identificadas nas cristalina Gama Não-Characterizada [M3W1B7] ...	87

## ABREVIACOES, SÍMBOLOS, UNIDADES E DEFINIOES

MPT ou PTM	Modificações Pós-Traducionais (Post Translational Modifications)
OMS	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
PEAKS	Powerful Software for Peptide <i>de novo</i> Sequencing by Tandem Mass spectrometry
SHSP ou HSPB	Pequena Proteína de Choque Térmico (Small Heat-Shock Protein)
MS	Espectrmetro de Massas (Mass Spectrometer)
Q	Quadrupolo
IT	Ion Trap
TOF	Time of flight
EDT	Etano-1,2-ditiol (1,2-Ethanedithiol)
EpP	Espectros por posição (número de espectros obtidos onde um determinado resíduo, localizado em uma mesma posição na proteína, apresenta a caraterística definida em contexto)

## RESUMO

OLIVEIRA, Angelo Bruno Nunes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Caracterização das Modificações Pós-Traducionais das Proteínas Cristalinas Alfa, Beta e Gama do Cristalino de *Felis catus***. Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Pedro Vidigal e Edvaldo Barros.

Existe o consenso na literatura veterinária de que a incidência de catarata em gatos é geralmente menor do que em cães e em outros mamíferos. Contudo, os estudos moleculares das proteínas do cristalino de gatos, por serem escassos, não explicam essa diferença de incidência. Neste sentido, iniciamos estudos proteômicos do cristalino de gatos saudáveis a fim de caracterizar as proteínas mais abundantes. No geral, observa-se que as cristalinas alfa, beta e gama são as principais e mais abundantes proteínas encontradas no cristalino da maioria das espécies animais, chegando a cerca de 90% do total de proteínas de cada célula fibrosa, em mamíferos, sendo as responsáveis pela manutenção do correto índice de refração da luz no cristalino. Considerando-se que estas proteínas devem permanecer funcionais durante toda a vida do indivíduo, sem ciclo de troca ou renovação, e expostas ao estresse luminoso por tempo similar, modificações pós-traducionais ocorrerão nas cristalinas afetando sua função. Neste estudo, utilizou-se a abordagem *bottom-up* de análise proteômica para a identificação de modificações pós-traducionais em cristalinos saudáveis de gatos. Foram identificadas 13 cristalinas, com 44 modificações pós-traducionais em um total de 1.117 posições (sítios). Dentre as modificações mais frequentes destacaram-se as acetilações e fosforilações nas cristalinas alfa e as desamidações, que apresentaram algumas diferenças quanto à presença em relação à literatura. A identificação e caracterização das modificações pós-traducionais que ocorrem nas proteínas das famílias Cristalinas em *Felis catus*, contribuem como base para futuros estudos que busquem um melhor entendimento dos aspectos quanto a menor susceptibilidade do cristalino de gatos à catarata.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Angelo Bruno Nunes, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Characterization of Post-Translational Modifications of Alpha, Beta and Gamma Crystallins of *Felis catus***. Advisor: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-advisors: Pedro Vidigal and Edvaldo Barros.

There is a consensus in the veterinary literature that the incidence of cataracts in cats is generally lower than in dogs and other mammals. However, the molecular study of the crystalline proteins of cats is still scarce. In this regard, we have initiated proteomic studies of healthy cats in order to characterize the most abundant proteins. Generally, alpha, beta and gamma crystalline are the main and most abundant proteins found in the lens of most animal species, reaching about 90% of the total proteins of each fibrous cell in mammals, being responsible for maintaining the correct index of light refraction in the lens. Considering that these proteins must remain functional throughout the life of the individual, without cycle of exchange or renewal, and exposed to light stress for a similar time, post-translational modifications will occur in the crystallines affecting their function. In this study, the bottom-up approach of proteomic analysis was used to identify post-translational modifications in cat healthy lens. Thirteen crystallines were identified, with 44 post-translational modifications in a total of 1,117 positions (sites). Among the most frequent modifications, acetylations and phosphorylations in alpha crystallines and deamidations stood out, which presented some differences in relation to the literature. The identification and characterization of the post-translational modifications that occur in the proteins of the crystalline families in *Felis catus*, contribute as a basis for future studies that seek a better understanding of the aspects about the lower cataract susceptibility of cats.

## 1 INTRODUÇÃO

A lente do olho, ou cristalino, tem como parte importante de sua constituição um agrupamento ordenado de células fibrosas cujos principais componentes orgânicos são as proteínas com função estrutural ou de manutenção (ANDLEY, 2007, 2008). A agregação das proteínas estruturais da lente é a causa predominante de vários tipos de catarata (MOREAU; KING, 2012).

Os mecanismos bioquímicos postulados para a formação de catarata incluem: ação de espécies reativas de oxigênio, levando à quebra das membranas plasmáticas da lente; perda da homeostase iônica e acumulação de sódio e cálcio na lente; e modificações pós-traducionais (fosforilação, clivagem e desamidação) das principais proteínas estruturais da lente (Cristalinas<sup>1</sup> alfa, beta e gama), levando à sua insolubilidade (BARROS et al., 1999; BOURGUET et al., 2018; DONALDSON; KISTLER; MATHIAS, 2001; RHODES; SANDERSON, 2009; WILLIAMS, 2006; WILMARTH et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), dentre toda a gama de deficiências visuais, como miopia, hipermetropia, astigmatismo, presbiopia e glaucoma, a catarata é a causa principal de cegueira entre humanos (PASCOLINI; MARIOTTI, 2012). À medida que a população mundial envelhece, a disfunção visual e a cegueira induzidas pela catarata aumentam (RESNIKOFF; KEYS, 2012).

Estudos mostram que em cães, a catarata prevalece como maior causa de cegueira (GELATT; MACKAY, 2005). Adkins e Hendrix fizeram um comparativo de raças afetadas dentro de um universo de 244 cães com catarata. Segundo este estudo, 54 raças foram afetadas, com taxas de probabilidades para catarata significativamente maiores para seis raças puras de cães (incluindo Cocker spaniel, Schnauzer miniatura, Poodle toy, Boston terrier, Poodle em miniatura e Bichon frisé) em comparação com cães de raça mista (ADKINS; HENDRIX, 2005).

Existe o consenso na literatura veterinária de que a incidência de catarata em gatos é geralmente menor do que em cães (GLAZE, 2005; THORESEN et al., 2002) e em outros mamíferos. Apesar de diversos estudos relativos à prevalência de gatos à catarata

---

<sup>1</sup> A partir deste ponto, o termo ‘cristalinas’ será utilizado para se referir às proteínas cristalinas.

estarem sendo conduzidos, o estudo molecular das proteínas do cristalino de gatos ainda é escasso, (BOURGUET et al., 2018; D.L.; M.F., 2006; DE JONG et al., 1975; GUYONNET et al., 2019; THORESEN et al., 2002). Uma busca rápida no UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2018) sobre proteínas do cristalino de *Felis catus* (gato doméstico), realizada em junho de 2018, sob os termos: taxonomy:"*Felis catus* (Cat) (*Felis silvestris catus*) [9685]" "eye lens", retornou 17 proteínas relacionadas ao cristalino de gato, onde apenas uma é revisada e curada: A cristalina alfa A [UNIPROT ID: P68282 (CRYAA\_FELCA) (DE JONG et al., 1975)].

Nosso grupo de pesquisa iniciou o estudo da proteômica do cristalino de gatos saudáveis a fim de caracterizar as proteínas mais abundantes. Os primeiros resultados desse estudo retornam um perfil proteômico de 99 proteínas no cristalino de gatos, dentre as quais 14 são cristalinas: 2 cristalinas alfa (A e B), 6 cristalinas beta (A1, A2, A4, B1, B2 e B3), e 4 cristalinas gama (A, B, N, S) e 2 ainda não caracterizadas, mas com domínios conservados com a família Cristalinas beta e gama (SILVA et al., 2018).

Considerando-se que estas proteínas devem permanecer funcionais durante toda a vida do indivíduo, sem ciclo de troca ou renovação, e expostas ao estresse luminoso por tempo similar, modificações pós-traducionais ocorrerão nas cristalinas afetando sua função positivamente (NAGARAJ et al., 2012) ou negativamente (KAMEI et al., 2001).

Ao analisar os registros de estudos de modificações pós-traducionais das cristalinas de bovinos, caninos, humanos, ratos e outras espécies, evidenciaram-se padrões que indicam conservação de cadeia peptídica, dos principais tipos de modificação e dos sítios de modificações. Contudo, devido ao escasso estudo molecular das proteínas do cristalino de *Felis Catus*, questões como “Este perfil se mantém em *Felis catus*?” ainda não foram respondidas.

Neste trabalho, as principais modificações pós-traducionais encontradas, em cristalinas extraídas de cristalinos saudáveis de gatos, são caracterizadas e seus possíveis efeitos são discutidos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Felis Catus

Representantes da família *Felidae*, que inclui algumas das espécies predadoras mais bem-sucedidas e mais ameaçadas a andar na Terra (NOWELL; JACKSON, 1996; O'BRIEN; JOHNSON, 2005), os gatos domésticos são considerados, há milhares de anos, animais de companhia (DRISCOLL et al., 2007).

Devido à sua importância, existe uma vasta literatura sobre doenças felinas que descrevem similaridades entre as ações de agentes infecciosos em felinos e humanos, ou mesmo a transmissão destes, além de aproximadamente 200 doenças genéticas análogas a doenças humanas. Estudos dessas enfermidades oferecem poderosos modelos naturais de doenças humanas, tais como AIDS – FIV (vírus da Imunodeficiência felina), SARS – FeCoV (coronavírus felino), Leucemia – FeLV (vírus de leucemia felina), Linfoma, *Diabetes mellitus*, Distrofia de córnea e Catarata (PONTIUS et al., 2007).

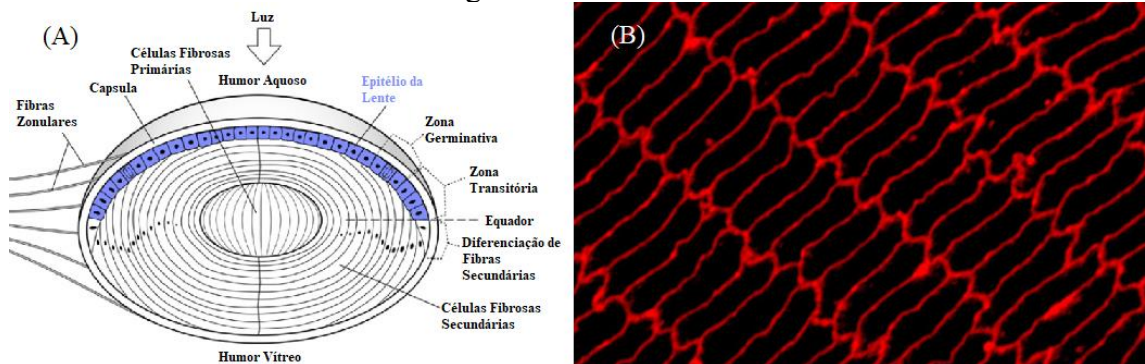
Um exemplo é o relato de caso do atendimento de um gato, de 18 semanas de vida diagnosticado com *diabetes mellitus* e catarata, realizado na Escola Norueguesa de Ciências Veterinárias. O quadro incomum, de diabetes em um gato tão novo, aparentemente foi causado por hipoplasia de ilhotas pancreáticas. Por sua vez, a diabetes pode ter levado à catarata bilateral, quadro considerado raro e com poucos relatos médicos (THORESEN et al., 2002).

A razão sobre a catarata diabética em gatos ser tão pouco frequente ainda é desconhecida. Uma possível explicação pode estar relacionada a atividade da enzima aldose redutase, que catalisa a redução da glicose em sorbitol. O sorbitol acumulado, devido à redução do excesso de glicose, leva a um inchaço osmótico e consequente ruptura das células fibrosas presentes no cristalino. Além do efeito osmótico do sorbitol, há evidências de que o sorbitol também interage diretamente com as proteínas das lentes (BASHER; ROBERTS, 1995), causando modificação de aminoácidos e insolubilidade das proteínas das lentes com a formação de catarata. Estudos demonstraram que há uma diferença entre espécies nos níveis de aldose redutase nas lentes, correspondendo à suscetibilidade à formação de catarata (POLLREISZ; SCHMIDT-ERFURTH, 2010).

## 2.2 Cristalino

Responsável pela refração da luz, focando-a na retina, o cristalino é um tecido avascular e transparente composto majoritariamente por células fibrosas que se originam de células epiteliais dispostas em uma fina camada na porção frontal (região que recebe a luz ambiente), em contato com a membrana capsular que envolve o tecido. Durante o processo de diferenciação, as células epiteliais passam por um alongamento, promovido pela grande formação de proteínas fibrosas e estruturais que manterão o citoplasma translúcido, como as cristalinas da família beta e gama, degradando organelas que podem causar dispersão e oclusão da luz, formando uma nova camada de células fibrosas sobre a antiga camada. Dessa forma, as células no núcleo do cristalino são as células mais maduras, enquanto as da camada mais externa são as mais recentes (ANDLEY, 2007, 2008; KYSELOVA, 2011; SUSANTO et al., 2019; WANG et al., 2019; ZHAO et al., 2019). A Figura 1-A apresenta um esquema geral da distribuição celular do cristalino, visto por uma secção ao longo do eixo óptico, onde se pode observar a localização das células fibrosas e das células epiteliais do cristalino. Na Figura 1-B visualiza-se por imunofluorescência, uma fatia transversal do cristalino, destacando sua formação por camada das células fibrosas (ANDLEY, 2008).

Figura 1: O cristalino



(A) Esquema de um cristalino seccionado (B) Imunofluorescência de uma fatia transversal da lente.

As células do núcleo do cristalino são formadas ainda no estágio embrionário e, uma vez que perdurarão por toda a vida do indivíduo, necessitam de mecanismos de manutenção que possibilitem o cumprimento de suas funções. Não há produção de novas proteínas ou difusão evidente de proteínas entre estas células. A função de refratar e concentrar a luz, focando-a na retina, submete o cristalino a um estresse crônico devido à exposição a radiações do espectro luminoso visível e invisível. Entre as proteínas que

constituem o mecanismo de manutenção do cristalino, destacam-se as cristalinas alfa. Essas proteínas apresentam notória função molecular de chaperonas, sendo classificadas como “pequenas proteínas de choque térmico” (*small heat-shock proteins*, SHSP ou HSPB), sendo encontradas no citoplasma das células fibrosas e epiteliais do cristalino (DASGUPTA; HOHMAN; CARPER, 1992; DE JONG; CASPERS; LEUNISSEN, 1998; DE LEON et al., 2019; HORWITZ, 1992, 2003; MURANOVA; SUDNITSYNA; GUSEV, 2018; WEEKS et al., 2018).

### **2.3 Cristalinas**

As cristalinas alfa, beta e gama são as principais e mais abundantes proteínas encontradas no cristalino da maioria das espécies animais, chegando a cerca de 90% do total de proteínas de cada célula fibrosa deste tecido em mamíferos. São as responsáveis pela manutenção do correto índice de refração da luz no cristalino. Solúveis em água, estas proteínas começam a ser produzidas ainda no estágio embrionário e, como as células fibrosas, elas envelhecerão com o organismo (ANDLEY, 2008; HORWITZ, 2003; LAPKO et al., 2005; LIM et al., 2009; ROSE et al., 2006).

As cristalinas beta e gama compartilham formatos similares em suas estruturas enoveladas, e sequências proteicas conservadas, diferenciando-as das cristalinas alfa. Devido a essas características, as cristalinas foram classificadas em duas superfamílias: Cristalinas alfa e Cristalina beta e gama (LUBSEN; AARTS; SCHOENMAKERS, 1988).

O envelhecimento normal do cristalino, traz uma redução na fração proteica solúvel em água e um aumento na fração proteica insolúvel em água. Essas mudanças ocorrem na lente normal sem comprometer significativamente a transparência da lente. Especialmente na parte central da lente, as velhas proteínas se desdobram e desnaturam ficando propensas a agregação, promovendo um aumento na fração proteica de alto peso molecular. São as cristalinas alfa, as responsáveis, em parte, pela manutenção das estruturas tridimensionais das proteínas do cristalino, mantendo a transparência do tecido (ANDLEY, 2007; HORWITZ, 1992, 2003).

#### **2.3.1 Superfamília Cristalina alfa**

A superfamília Cristalina alfa compõe cerca de 35% do total de proteínas em cristalinos de mamíferos, as quais são expressas a partir de dois genes de cristalinas alfa:

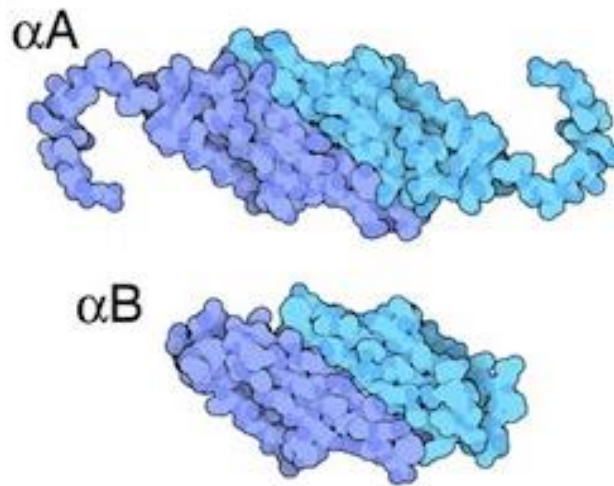
cristalina alfa A (*cryaA*) e cristalina alfa B (*cryaB*), com similaridade próxima a 57% em sua cadeia de resíduos de aminoácidos (HORWITZ, 2003; SRINIVAS; REDDY; REDDY, 2008a).

A cristalina alfa A é encontrada majoritariamente no cristalino, em uma proporção molar próxima a 3:1 da cristalina alfa B, em humanos, variando com a região do cristalino ou com a idade (LAGANOWSKY et al., 2010; SHARMA; SANTHOSHKUMAR, 2009; SRINIVAS; REDDY; REDDY, 2008b). A cristalina alfa B, por sua vez, é expressa de forma ubíqua, sendo encontrada em diversos tecidos no organismo, tais como: cardíacos, pulmonar, muscular, nervoso e epitelial (BHAT; NAGINENI, 1989; DUBIN; WAWROUSEK; PIATIGORSKY, 1989; MURANOVA; SUDNITSYNA; GUSEV, 2018).

Ambas apresentam em sua estrutura um segmento composto por 80 a 100 resíduos de aminoácidos que formam 6 a 7 fitas beta, as quais estão organizadas em duas grandes folhas empacotadas em uma estrutura globular compacta. Denominado de domínio alfa-cristalino ou de domínio Hsp20, este é um segmento presente nas estruturas de todas as SHSPs (HASLBECK; VIERLING, 2015; KRIEHUBER et al., 2010; PESCHEK et al., 2009).

Ao contrário da maioria das chaperonas, as SHSPs não trabalham com um subsistema dependente de ATP, não garantindo uma renaturação completa e eficiente. Por isso, não são classificadas como chaperonas, embora possuam atividade parcial ou similar. Proteínas parcialmente desdobradas se ligam às SHSPs (como a HSP70), sendo transportadas para chaperonas dependentes de ATPs ou degradadas por proteólise em proteossomas e, ou, autofagossomos (MURANOVA; SUDNITSYNA; GUSEV, 2018). As cristalinas alfa ligam-se seletivamente às proteínas desdobradas ou desnaturadas e suprimem a agregação não específica destas, mantendo-as em um estado de enovelamento funcional, observado pela diminuição da fração proteica solúvel em água e o aumento da fração insolúvel (BAKTHISARAN; TANGIRALA; RAO, 2015; DE JONG; CASPERS; LEUNISSEN, 1998; KAMEI et al., 2001; PESCHEK et al., 2009).

Figura 2 - Estrutura tridimensional das cristalinas alfa A e alfa B



A Figura 2 ilustra as estruturas tridimensionais das cristalinas alfa depositadas no ‘PDB’ - *Protein Data Bank* (BERMAN et al., 2000): A cristalina alfa A, de bovinos, registrada sob a PDB ID 3L1E (LAGANOWSKY et al., 2010) e a Cristalina alfa B, de humanos, registrada sob a PDB ID 2WJ7 (BAGNÉRIS et al., 2009).

Evidências apontam que em fase primária, antes de sua atuação, as cristalinas alfa podem ser encontradas polimerizadas em grandes hetero-oligômeros (alfa A e alfa B) ou homo-oligômeros, contendo cerca de 300 kDa a 700 kDa em contraste às células fibrosas de cristalinos com aproximadamente 20 kDa por subunidade (KALLUR; AZIZ; ABRAHAM, 2008; KARMAKAR; DAS, 2012; SRINIVAS et al., 2010; SRINIVAS; REDDY; REDDY, 2008b). Acredita-se que o domínio alfa-cristalino forme dímeros estabilizados via interações entre as fitas beta, cuja porção C terminal estabiliza as interações dímero-dímero, enquanto a porção N-terminal está envolvida na formação de oligômeros maiores (BUCHNER et al., 2013; HOCHBERG et al., 2018; WEEKS et al., 2014).

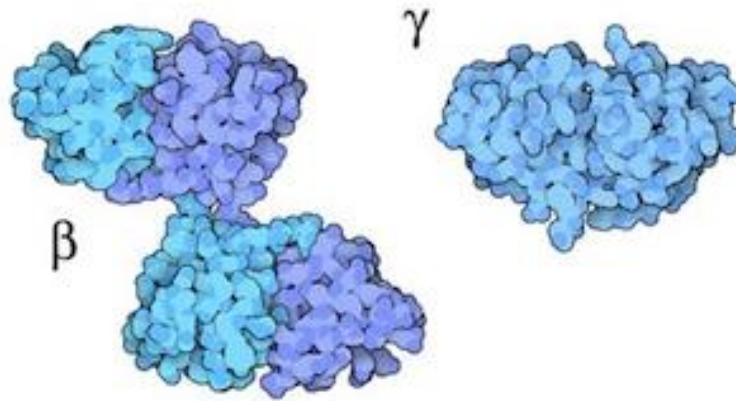
Até o momento, não foi resolvida a estrutura tridimensional de estruturas quaternárias de oligômeros, maiores do que um dímero, para as cristalinas alfa A ou de hetero-oligômeros de cristalinas alfa A e alfa B. Contudo, as considerações citadas, no parágrafo anterior, são consideradas devido aos estudos das estruturas tridimensionais da cristalina alfa B, resolvidas por várias técnicas (BRAUN et al., 2011; DELBECQ; KLEVIT, 2013; JEHLE et al., 2009, 2011; PESCHEK et al., 2009; WEEKS et al., 2014).

### 2.3.2 Superfamília Cristalina beta e gama

Como principais responsáveis pela manutenção do correto índice de refração do cristalino, as cristalinas reduzem a dispersão da luz. Organizam-se de forma a regular as flutuações do índice de refração por interações curtas destas moléculas, semelhantes às de líquidos ou vidros (DELAYE; TARDIEU, 1983).

Enquanto os estudos das cristalinas alfa revelam funções e atuações adicionais, relativas a manutenção das estruturas tridimensionais de outras proteínas, pouco se sabe sobre outras funções das cristalinas da família beta e gama no cristalino (ECROYD; CARVER, 2009; GHAFARI SHARAF et al., 2017).

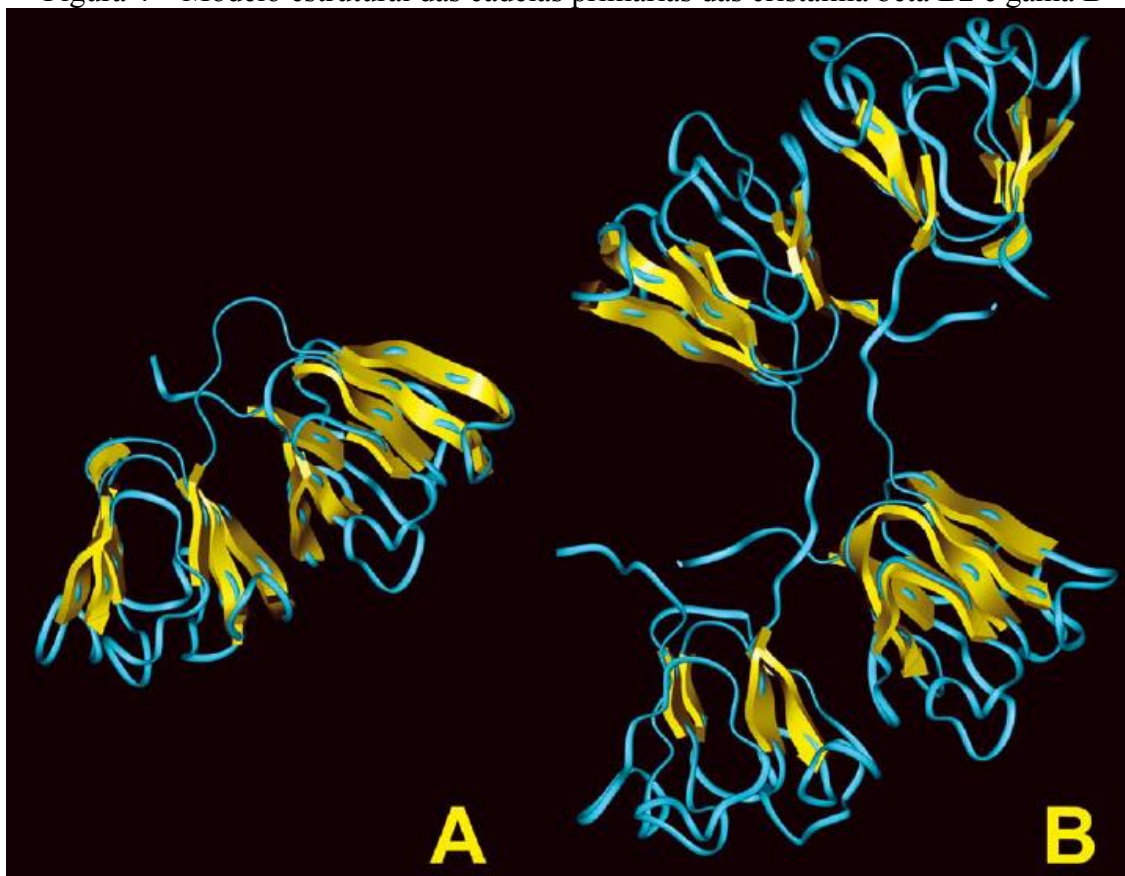
Figura 3 - Estrutura Tridimensional das cristalinas beta B2 e gama B



Cristalinas beta e gama possuem dois domínios ligados por um peptídeo de conexão inter-domínio de 8 a 10 aminoácidos. Cada domínio tem um enovelamento de cadeia polipeptídica similar, chamado de sanduíche beta, formado por duas folhas beta antiparalelas, similar ao motivo "chave grega" (BAX et al., 1990; LAPATTO et al., 1991; SERGEEV et al., 1988; WHITE et al., 1989; WISTOW et al., 1983). Como pode ser visto na representação da estrutura tridimensional (Figura 3) e no modelo estrutural das cadeias primárias (Figura 4), a proteína monomérica cristalina gama B, depositada no 'PDB' sob a identificação (ID) 4GCR (NAJMUDIN et al., 1993) dobra seus domínios em uma forma "fechada", apresentando uma superfície de contato, entre domínios, similar à superfície de contato entre os domínios N-terminal e C-terminal de cada cadeia do homodímero de cristalina beta B2, depositada no 'PDB' sob a ID 1BLB (NALINI et al., 1994). A cadeia individual da cristalina beta B2 apresenta seus domínios de forma "aberta", facilitando a formação homodimérica ou heterodimérica com a cristalina beta A3, apresentando

propriedades físicas semelhantes na face estrutural da superfície de contato (BAX; SLINGSBY, 1989; LAPATTO et al., 1991; SERGEEV; HEJTMANCIK, 1997).

Figura 4 – Modelo estrutural das cadeias primárias das cristalina beta B2 e gama B



(A) Cristalina gamma B: ligação intra-domínio resultando em proteínas monoméricas.

(B) Cristalina beta B2: ligação inter-domínio resultando em proteína dimérica

Estudos de cristalinas beta e gama mutantes e de algumas modificações pós-traducionais, *in vitro*, bem como análises moleculares da ação do tempo nas cristalinas, revelaram alterações conformacionais nesta estrutura, promovendo uma maior agregação destas proteínas e consequente aumento da fração proteica insolúvel e de alta massa molar causando precipitação de agregados de proteína que promovem a oclusão e difusão da luz, quadro clínico definido como catarata (DEN DUNNEN et al., 1985; GHAFARI SHARAF et al., 2017; HEJTMANCIK; WINGFIELD; SERGEEV, 2004; LAPKO et al., 2005; SHARMA; SANTHOSHKUMAR, 2009).

#### 2.4 Opacificação do cristalino (Catarata)

A catarata é a opacidade do cristalino, que impede a refração da luz de forma eficaz, afetando a capacidade do cristalino de focar os raios de luz na retina (ADKINS;

HENDRIX, 2005; ANDLEY, 2008; WILMARTH et al., 2006). Em gatos, o quadro tem relatos ocasionais: associada a múltiplos defeitos oculares, incluindo microftalmia; em decorrência de traumas ou outras doenças, como *diabetes mellitus*; ou como cataratas congênicas e hereditárias (GLAZE, 2005; PEIFFER; GELATT, 1975).

Analisando 2.000 indivíduos em diferentes idades, em um estudo sobre a prevalência de catarata canina, verificou-se que a idade média em que a prevalência de catarata foi de 50% era 9,4 anos, com desvio padrão de  $\pm 3,3$  anos, com todos os cães acima de 13,5 anos afetados por algum grau de opacidade da lente (WILLIAMS; HEATH; WALLIS, 2004). Estudo semelhante com 2.000 gatos normais, 50 gatos com diabetes e cem gatos após crises de desidratação conclui que a idade média em que a prevalência de catarata foi de 50% é de 12,7 anos, com desvio padrão de  $\pm 3,4$  anos, para gatos normais;  $5,6 \pm 1,9$  anos para gatos com diabetes e  $9,9 \pm 2,5$  anos para gatos com histórico de crises de desidratação. Todos os gatos acima de 17,5 anos foram afetados por algum grau de opacidade da lente (D.L.; M.F., 2006).

Estas diferenças de susceptibilidades e prevalências entre as diferentes espécies incentiva estudos que buscam elucidar os mecanismos moleculares que levam a este quadro clínico. A análise das interações entre proteínas mal enoveladas ou incorretamente agregadas tem sido considerada como uma abordagem promissora na busca e desenvolvimento de drogas que inibam, reduzam ou corrijam estas interações proteicas e enovelamentos incorretos (EISELE et al., 2015; HÄRD; LENDEL, 2012; SCIARRETTA; GORDON; MEREDITH, 2006), bem como no tratamento pela diluição e separação destes agregados (ZHAO et al., 2015).

A compreensão de que o cristalino é formado por células que devem continuar ativas por toda a vida do indivíduo, associada ao fato de que, com a idade, a susceptibilidade à catarata é maior, inspirou pesquisas quanto aos diversos fatores que induzissem modificações moleculares que provoquem a catarata. Dentre as diferentes estratégias e métodos destes estudos, destacam-se o nocaute de genes que expressam as cristalinas alfa (BRADY et al., 1997, 2001); mutações nas cristalinas alfa (BOVA et al., 1999; VICART et al., 1998; WANG; SPECTOR, 1994), beta (CHAMBERS; RUSSELL, 1991; KANNABIRAN et al., 1998; LITT et al., 1997) e gama (CARTIER; BREITMAN; TSUI, 1992; DEN DUNNEN et al., 1985; NANDROT et al., 2003; ZHU et al., 2018); e modificações pós-traducionais das cristalinas (HANSON et al., 2000; KAMEI et al.,

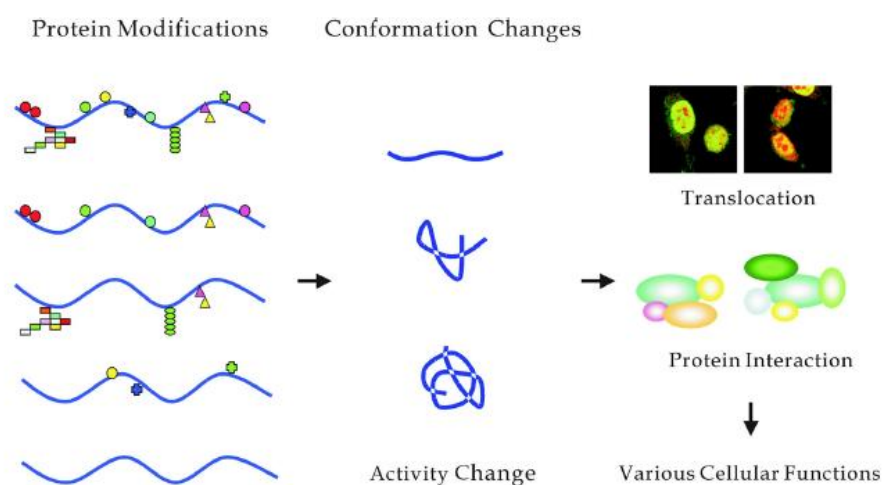
2001; LAPKO et al., 2005; LAPKO; SMITH; SMITH, 2001; LUND; SMITH; SMITH, 1996; MACCOSS et al., 2002; MIESBAUER et al., 1994; PANDE; MOKHOR; PANDE, 2015; SMITH et al., 1996; WILMARTH et al., 2006; ZHU et al., 2018).

## 2.5 Modificações Pós-Traducionais nas Cristalinas

Modificações pós-traducionais (MPTs) são alterações em resíduos de aminoácidos, seja por adição, substituição ou remoção de grupos químicos, que afetam as propriedades da proteína original. Mais de 400 tipos diferentes de MPTs são conhecidas e novas modificações vem sendo descobertas graças a estudos que se baseiam na análise de proteínas através da espectrometria de massas (JENSEN, 2004; LI et al., 2017).

Algumas modificações ocorrem naturalmente durante o processo de enovelamento proteico, como as ligações dissulfeto, ou durante o desenvolvimento do tecido, como a fosforilação do resíduo de serina 122 das cristalinas alfa A que, em humanos, se inicia nos primeiros meses de vida e a partir dos 12 anos de idade alcança um patamar de proporção constante (TAKEMOTO, 1996). A fosforilação caracteriza-se pela adição de um grupo fosfato a um resíduo de aminoácido em uma cadeia peptídica (ou em qualquer outra molécula), podendo ocorrer em resíduos de arginina, cisteína, ácido aspártico, tirosina, histidina, treonina e serina.

Figura 5 - Representação esquemática da relação entre modificações proteicas e a regulação de processos biológicos (SEO; LEE, 2004).



Fosforilações foram encontradas nas cristalinas beta A2, gama B, alfa A e alfa B (CARNINCI et al., 2005; CHURCH et al., 2009; LAPKO; SMITH; SMITH, 2003a;

LUND; SMITH; SMITH, 1996; MACCOSS et al., 2002; MIESBAUER et al., 1994; SACCO et al., 2016; SMITH et al., 1991). Contudo, na cristalina alfa B, a fosforilação dos resíduos de serina nas posições 19 e 45 causa uma mudança estrutural que reduz o tamanho da formação oligomérica, indicando possível regulação de sua atividade chaperona (BAKTHISARAN et al., 2016; KAMEI et al., 2000; MACCOSS et al., 2002; MURANOVA; SUDNITSYNA; GUSEV, 2018).

Outras MPTs podem ocorrer como efeito da idade e exposição à radiação estressante, como a desamidação das cristalinas gama S em seus resíduos de asparagina (posição 76 e 143) e de glutamina (posições 92 e 120), o que promove a formação de agregados desta proteína (PANDE; MOKHOR; PANDE, 2015). A desamidação é a liberação de um grupo amina, na forma de amônia, da cadeia lateral dos resíduos de asparagina ou glutamina seguida da formação de ácido aspártico ou ácido glutâmico. Ela parece acompanhar a agregação das proteínas no cristalino (MIESBAUER et al., 1994; MOREAU; KING, 2012; SHARMA; SANTHOSHKUMAR, 2009).

Encontrada em baixas quantidades na fração proteica solúvel em água, a desamidação prevalece sobre os resíduos de asparagina e glutamina na fração proteica insolúvel em água (SMITH et al., 1995), reduzindo a atividade chaperona das cristalinas alfa A, mais pronunciadamente no resíduo de asparagina da posição 123 (CHAVES et al., 2008) e das cristalinas alfa B, no resíduo de asparagina na posição 146 (GUPTA; SRIVASTAVA, 2004). A desamidação também desestabiliza o dímero nativo de cristalina beta B2 (LAMPI et al., 2006).

Em humanos, a lisina na posição 70 da cristalina alfa A é encontrada acetilada (LAPKO; SMITH; SMITH, 2001; LIN et al., 1998). Esta modificação afeta sua atividade chaperona, aumentando o seu desempenho, em relação à proteína não modificada, segundo análise comparativa feita *in vitro* (NAGARAJ et al., 2012). A acetilação caracteriza-se pela adição de um grupo acetila à cadeia lateral de resíduos de cisteína, lisina e serina ou ainda ao resíduo que estiver na posição N-terminal.

A acetilação também foi identificada nas cristalinas alfa B (DE JONG; NUYTERWINDT; VERSTEEG, 1977; LAPKO; SMITH; SMITH, 2001; OUDERAA et al., 1974), beta B1 (LAMPI et al., 1997; LAPKO et al., 2005), beta B2 (DRIESSEN et al.,

1981; MIESBAUER; SMITH; SMITH, 1993), beta B3 (LAMPI et al., 1997, 2002) e gama S (ZARINA; ABBASI; ZAIDI, 1992).

Entre outras modificações encontradas, nas cristalinas, vale destacar a metilação das cristalinas beta A1 (LAPKO et al., 2005) e da gama B (LAPKO; SMITH; SMITH, 2003b). Esta MPT consiste na substituição de um hidrogênio por um grupo metil e tem maior probabilidade de ocorrer nos resíduos de arginina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, isoleucina, glutamina, asparagina, histidina, lisina, treonina, serina e em qualquer resíduo nas posições N-terminal e, ou, C-terminal (LAPKO et al., 2005; LAPKO; SMITH; SMITH, 2003b).

## 2.6 Identificação das Modificações Pós-Traducionais

Para identificação de proteínas modificadas, uma vez que sua abundância pode ser relativamente baixa, utilizam-se técnicas para aumentar a percepção destas, como purificação de proteínas empregando-se anticorpos e cromatografia de afinidade. Outras estratégias podem auxiliar em suas separações ou identificações, como eletroforese com géis bidimensionais e colorações gel-específicas para determinadas modificações (CANTIN; YATES, 2004; SEO; LEE, 2004; SUN et al., 2006).

Uma vez que a análise de MPTs pode ser feita em escala proteômica, os envolvimento de MPTs em doenças, respostas a estresses e em caminhos regulatórios de processos biológicos podem ser melhor estudados a partir das metodologias *bottom-up* ou *top-down* (JENSEN, 2004). A primeira, também conhecida como *shotgun*, envolve análise por espectrometria de massas de peptídeos obtidos após digestão trípica de soluções proteicas complexas (AHRENS et al., 2010). A *top-down* consiste na análise das proteínas intactas, também por espectrometria de massas (ARMIROTTI; DAMONTE, 2010).

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 (ZHAO et al., 2019).

Atualmente, os principais métodos de ionização utilizados em proteômica são a ionização de eletro spray (ESI-MS) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) (CALDERÓN-CELIS; ENCINAR, 2019; FENN et al., 1989; KARAS; HILLENKAMP, 1988; TANAKA et al., 1988). 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; GAGE; WATSON, 1995). No ESI, a solução aquosa da amostra é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida a alta voltagem e ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas, gerando as formas ionizadas do analito após a evaporação do solvente (NGUYEN; FENN, 2007).

Nos analisadores de massas, a razão massa/carga dos íons é avaliada após passarem por uma câmara de vácuo. Os atuais analisadores são: ‘quadrupolo’ (Q), baseado na estabilidade da  $m/z$ ; ‘*ion trap*’ (IT) baseado na frequência de ressonância; e o ‘*time of flight*’ (TOF), 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; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009). Assim, como os processos de ionização, apresenta-se em um enorme leque de opções, que podem realizar esta operação. O analisador *Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific Inc.) é do tipo IT, no qual os íons oscilam ao longo e ao redor do eletrodo em forma de espiral. A frequência de oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão massa/carga e pode ser determinada com alta precisão (ELIUK; MAKAROV, 2015; GLISH; VACHET, 2003).

A análise por espectrometria de massas de cristalinas não é novidade (SMITH et al., 1991), nem a de suas modificações (MACCOSS et al., 2002). Entretanto, a concepção desta pesquisa surgiu de uma oportunidade e de uma necessidade. A oportunidade foi utilizar um moderno analisador de massas de alta precisão, o *Orbitrap*, para estudar e registrar modificações pós-traducionais nas principais proteínas do cristalino em *Felis catus*, espécie que apresenta diferencial na incidência de catarata, comparado a cães, bovinos e humanos. A necessidade é a de estudar os mecanismos de ocorrência de catarata, onde espera-se que os dados desta pesquisa contribuam para a elucidação destes mecanismos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Identificar e caracterizar as modificações pós-traducionais das cristalinas alfa, beta e gama do cristalino de *Felis catus* usando uma abordagem proteômica 'bottom-up'.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar as principais modificações pós-traducionais das cristalinas alfa, beta e gama do cristalino de *Felis catus*.
- Revisar as modificações com base em registros de modificações em cristalinas com identidade superior a 50% com as proteínas obtidas de cristalinos de *Felis catus*.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Obtenção dos dados de proteômica em larga escala (UHPLC-MS/MS)**

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA-UFV) e autorizado, por meio do processo nº 50/2018 (Anexo I).

Os dados analisados neste projeto são provenientes de análises utilizando espectrometria de massa de cristalinos saudáveis de três gatos, obtidos por meio da rotina do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do Hospital Veterinário da FAVIÇOSA, pela equipe médica responsável pelos atendimentos, em projeto previamente certificado pela CEUA-UFV, por meio do processo nº 75/2017, aprovado em 16/10/2017 (Anexo II) (SILVA et al., 2018).

### **4.2 Referenciamento de modificações pós-traducionais registradas em bancos de dados para cada proteína alvo**

Para a execução deste estudo, criou-se uma lista de referência com as MPTs previamente descritas em várias espécies e registradas em proteínas com identidade superior a 50% em relação às proteínas de *Felis catus* depositadas no banco de dados Swiss-prot do Uniprot (UNIPROT CONSORTIUM, 2018). Não foram listadas as modificações frutos de experimentos *in vitro* ou *in silico* e não observadas *in vivo*.

### **4.3 Análise dos espectros de massas com foco em identificação de MPTs**

A separação das amostras foi definida por par de cristalinos de cada indivíduo. Os dados brutos dos espectros de massa das três amostras (arquivos '.raw'), gerados usando a plataforma *ThermoFisher-MS/MS Q-exactive*, foram analisados no software Peaks, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (MA et al., 2003). Nessa análise foram adotadas as estratégias de sequenciamento *De Novo* e de alinhamento dos espectros de massas obtidos com o banco de dados de *Felis catus* disponível no Uniprot (copiado em 27/11/2017, com 21.533 seqüências de proteínas), usando os seguintes parâmetros: digestão com tripsina, com no máximo duas clivagens perdidas; carbamidometilação da cisteína como MPT fixa; tolerância de erro de massas do precursor de 10 ppm e dos fragmentos de 0.1 Da; 1% de índice de falsas descobertas (FDR) para os peptídeos, como critério de identificação; e, pelo menos, 2 peptídeos únicos identificados para cada proteína.

Para investigar a ocorrência de MPTs nas proteínas, foi realizada uma análise de MPTs usando o algoritmo ‘Peaks PTM’ disponível no software Peaks. Os resultados obtidos da análise concomitante de todas as MPTs foram filtrados e somente os sítios de modificação definidos por, pelo menos, 2 espectros foram selecionados. Cada um dos sítios de modificação encontrados nas cristalinas foi descrito com as possíveis modificações.

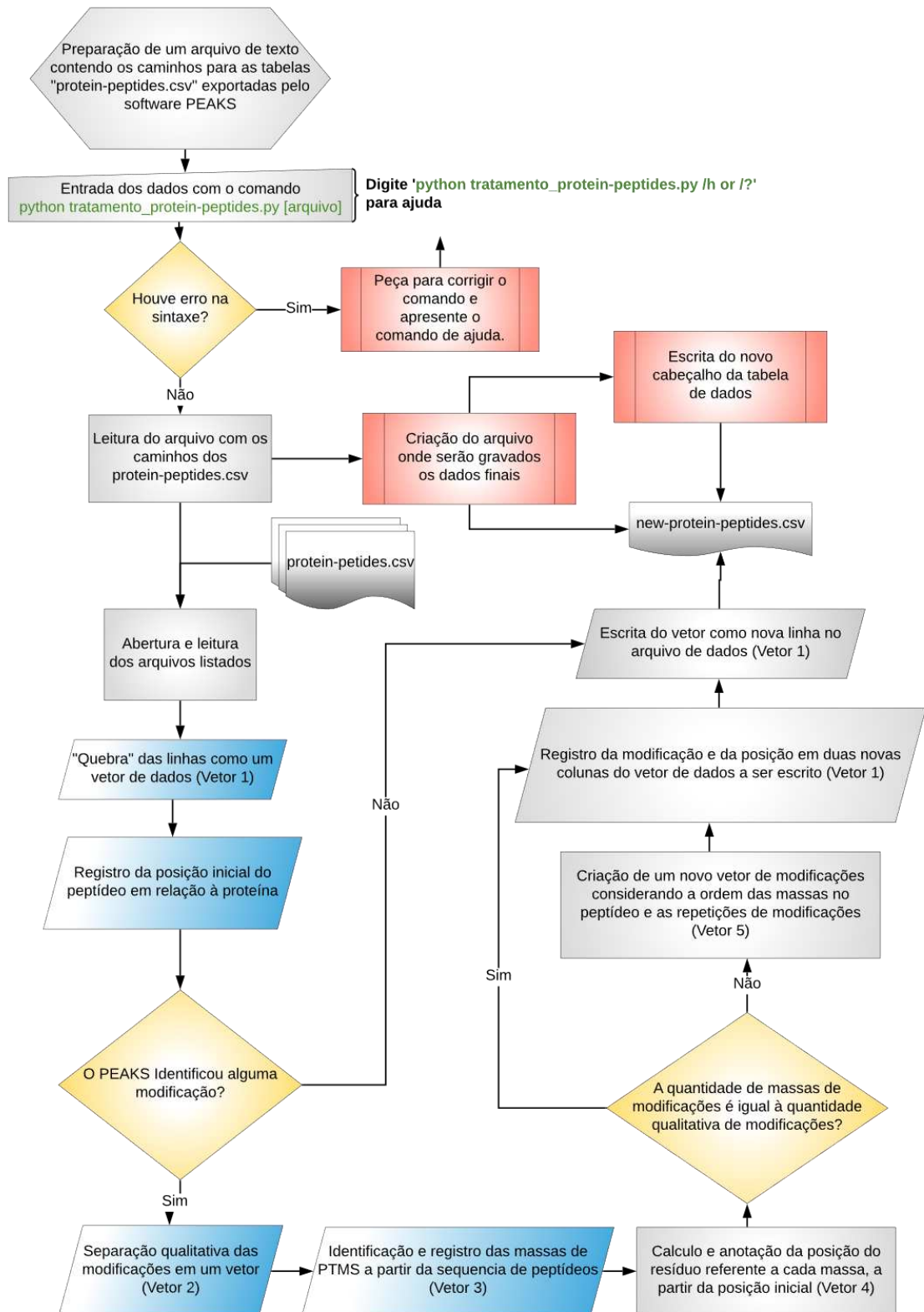
#### **4.4 Definição de sítios e quantificação de ocorrência de modificações pós-traducionais**

Os resultados das análises individuais dos espectros de massas, feita pelo software PEAKS, foram exportados como arquivos de texto com tabulação por vírgulas (formato “.csv”), contendo os peptídeos encontrados no cruzamento do banco de dados de *Felis catus*, os peptídeos encontrados por análise *De Novo* e as modificações pós-traducionais.

Para a identificação dos sítios das MPTs em cada proteína foi desenvolvido um algoritmo (Anexo III), utilizando a linguagem PYTHON (SOEDIONO, 1989), que calcula, de acordo com os dados exportados pelo “PEAKS PTM”, a posição de cada MPT em cada proteína. Definindo, assim, o sítio de ocorrência de cada MPT. A figura 6 ilustra a estrutura de funcionamento do algoritmo.

Na quantificação, o somatório dos espectros que apontaram cada MPT, por posição e por proteína, foi obtido por meio de manipulação do banco de dados resultante do algoritmo.

Figura 6 - Estrutura de funcionamento do algoritmo para identificação dos sítios de modificação.



#### **4.5 Análise das frequências das MPTs identificadas**

Para a análise de padrões de modificações nas cristalinas, foram calculadas as frequências relativas de espectros por proteína, como a porcentagem da quantidade de espectros com as modificações pela quantidade total de espectros por cristalina. Para esta análise de padrões, separam-se os espectros de peptídeos únicos por proteína dos que não são únicos, uma vez que existe conservação nos domínios de cada família.

Para a análise dos dados das modificações pós-traducionais identificadas por proteína, calculou-se a frequência relativa de cada MPT por posição, como a porcentagem de espectros apontando aquela MPT naquela posição, contra o total de espectros obtidos daquela posição apenas para os peptídeos únicos de cada proteína. Garantindo assim que as frequências das modificações encontradas nas respectivas posições são somente para aquela proteína.

#### **4.6 Comparação com registro de MPTs de outras espécies**

Para a execução deste estudo, cada uma das MPTs, previamente referenciadas, foi confrontada com os resultados da análise, com a finalidade de encontrar evidências de sua presença nas proteínas analisadas.

Dentre as modificações encontradas, foram destacadas as modificações que apresentaram mais de 5% de frequência relativa por posição, para os peptídeos únicos identificados, para uma discussão mais próxima e comparativa com a maior parte das referências levantadas na etapa descrita no item 4.2, onde a tecnologia utilizada na época de cada estudo identificava as mais abundantes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cristalinas identificadas por meio deste estudo foram: cristalina alfa A ( $\alpha A$ ), cristalina alfa B ( $\alpha B$ ), cristalina beta A1 ( $\beta A1$ ), cristalina beta A2 ( $\beta A2$ ), cristalina beta A4 ( $\beta A4$ ), cristalina beta B1 ( $\beta B1$ ), cristalina beta B2 ( $\beta B2$ ), cristalina beta B3 ( $\beta B3$ ), cristalina gama A ( $\gamma A$ ), cristalina gama B ( $\gamma B$ ), cristalina gama S ( $\gamma S$ ) e duas proteínas não-caracterizadas ( $U\gamma 1$  e  $U\gamma 2$ ) que alcançaram mais de 90% de identidade e de cobertura, quando analisadas via BLAST (ALTSCHUL et al., 1990, 1997; CAMACHO et al., 2009), com a cristalina gama F.

Associadas a estas cristalinas foram identificadas 55 modificações pós-traducionais pela análise do espectro de massas, em 1.650 posições (sítios). No Anexo IV, estão apresentadas as modificações pós-traducionais, a variação de massas (aproximada) causadas por estas e as cristalinas onde foram encontradas.

### 5.1 Análise dos resultados

Como o processamento das proteínas realizado para a aquisição dos dados é responsável pela carbamidometilação das cisteínas e possíveis oxidações, estas modificações foram desconsideradas neste estudo. Também foi desconsiderado o fator de impacto de outras modificações em cisteínas, uma vez que elas possivelmente sofreram carbamidometilação durante o processamento (GUNDRY et al., 2009). Aplicando esse filtro, o número de sítios totais foi reduzido para 1.117. Em seguida, unificou-se as frequências das modificações que possuem o mesmo produto químico, mas que o software separa por posição ou resíduo, reduzindo para 44 modificações pós-traducionais, apresentadas com as quantidades de sítios por proteína na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição de sítios de MPTs por cristalinas.

Modificações Pós-Traducionais	$\alpha A$	$\alpha B$	$\beta A1$	$\beta A2$	$\beta A4$	$\beta B1$	$\beta B2$	$\beta B3$	$\gamma A$	$\gamma B$	$\gamma S$	$U\gamma 1$	$U\gamma 2$	Total
2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol N-metil carbamato	1											1		2
Ácido 2-amino-3-oxobutanóico			2	1		1			1	1	3	1	1	11
4-hidroxinonenal (HNE)	2		1					1			1			5
Acetilação	9	2	7	2	2	1	3	3				1		30
Amidação		1					1							2
Amidação de lisinas ou aminas N-terminais com metil-acetimidação	4	1	4		1	1	5	1		1	2			20
Aminoetilcisteína			1											1
Perda de Amônia (N)	1	1	1					2	2	2	1	1	1	12
Carbamilação	12	15	12	1	2	6	19	4		4	6	7	3	91
Carboxilação	2		1	1		2	6	2		1	1	2	1	19
Carboximetil	1		1					1	2	2		1	1	9
Desamidação	6	3	16	6	10	13	19	13	8	11	11	13	7	136
Desamidação seguida de metilação			1		1		2							4
Desamidação seguida de esterificação com etanol								1						1
Desidratação	8	1	5		3	1	8	2	2	3	3	2	1	39
Destiometil		1	2			1	3	1	1	2		1	1	13
Dihidroxil	13	10	11	1	7	6	12	7	2	4	6	7	4	90
Aduto com dihidroxil-metilglioxal										1		1	1	3



Sulfona	0,3%	0,6%	0,3%					0,6%	0,8%		1,5%	0,9%	0,8%	0,3%
Oxidação do triptofano para hidroxikinurenina														
Oxidação do triptofano para kinurenina		0,1%	0,5%			0,7%	0,4%	0,6%	0,2%				0,5%	
Oxidação do triptofano para oxolactona			0,1%						0,4%					
Oxidação da tirosina a 2-aminotirosina			0,1%											

## 5.2 Análise dos resultados segundo critério metodológico

Os resultados referentes às análises individuais por proteínas, de acordo com os dados de saída do PEAKS, e os alinhamentos das modificações identificadas com a sequência anotada no banco de dados de *Felis catus*, disponíveis no UNIPROT, estão apresentados nos subtópicos seguintes, sob o critério: frequência relativa por posição superior a 5% e modificações pós-traducionais identificadas apenas em peptídeos únicos. As tabelas completas contemplando todas as posições de modificações pós-traducionais e suas frequências relativas, para cada um dos peptídeos únicos identificados para cada cristalina, estão no anexo V. A Tabela 3 apresenta a distribuição das quantidades de sítios, por proteína, onde as MPTs foram identificadas obedecendo a este critério.

Tabela 3 - Quantidade de sítios de MPTs por cristalinas com frequência relativa por posição maior que 5%

Modificações Pós traducionais	aA	aB	$\beta$ A1	$\beta$ A2	$\beta$ A4	$\beta$ B1	$\beta$ B2	$\beta$ B3	$\gamma$ A	$\gamma$ B	$\gamma$ S	U $\gamma$ 1	U $\gamma$ 2	Total
2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol N-metil carbamato												1		1
Ácido 2-amino-3-oxobutanóico			1	1							1			3
Acetilação	1	1	2	1			1							6
Amidação de lisinas ou amins N-terminais com metilacetimidação					1						1			2
Perda de Amônia (N)								2						2
Carbamilação	2	8	7	1	1	6	6	2	1	4	3			41
Carboxilação				1										1
Desamidação	3	2	10	6	5	8	8	7	1	1	9	3		63
Desidratação	2													2
Destiometil							1							1
Dihidroxi			2	1	1	2	4	1			3	1		15
EDT						1								1
Etilação												1		1
Formilação	6	8	6	6	4	9	7	7	2	4	7	5		71
Hidroxilação				1		2	1	1						5
Oxidação da lisina para semi-aldeído aminoalípico		1												1
Metil éster	1	1	2	3		2	1	5	2	1	1			19
Metilação					1	1	1							3
Fosforilação	1	3					1							5
Propionamida									1					1
Piro-glu a partir de ac. glutâmico	1	1	1		1	1								5
Piro-glu a partir de glutamina	2	1						1		1	1	1		7
Substituição de próton com ion amônio	2		2	1										5
Aduto com Sódio	1	1		1				1			1			5
Sulfona									1					1
Oxidação do triptofano para kinurenina							1							1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>27</b>	<b>33</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>27</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>268</b>

### 5.2.1 Cristalina alfa A [UNIPROT ID: P68282]

A proteína foi identificada com uma leitura total de 5.092 espectros dos quais: 1.792 espectros, da amostra 1, foram obtidos da leitura de 50 peptídeos, em que 49 são peptídeos únicos e cobertura de 100% da Cristalina alfa A anotada no UNIPROT sob a identificação P68282; 1937 espectros, da amostra 2, de 48 peptídeos (todos únicos) em

cobertura de 97% com a sequência anotada; e 1.363 espectros resultantes da leitura de 37 peptídeos (todos únicos), da amostra 3, cobrindo de 97% da sequência anotada.

Das 25 modificações pós-traducionais encontradas em 146 sítios, para esta proteína, na tabela 4 estão listadas 11 modificações, segundo o critério definido, e distribuídas por posição onde foram identificadas na sequência de resíduos, na figura 7.

Figura 7 - Sítios de MPTs identificados na cristalina alfa A de *Felis catus*

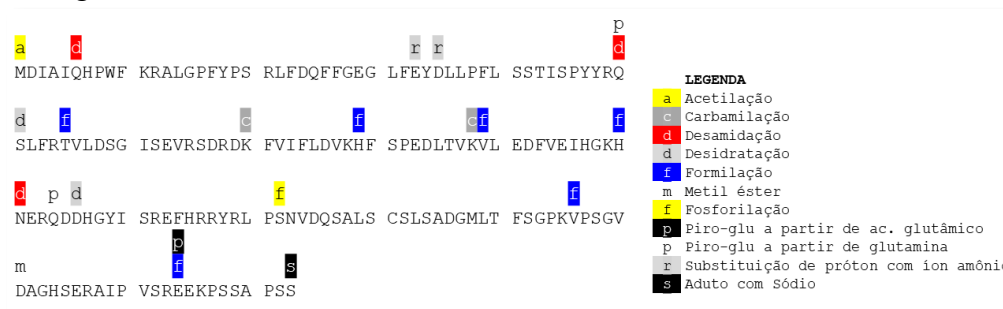


Tabela 4 – Frequências relativas das MPTs identificadas nas cristalinas alfa A

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	574	615	93,33%
Deamidation (NQ)	101	121	392	30,87%
Phosphorylation (STY)	122	99	464	21,34%
Formylation	100	58	392	14,80%
Dehydration	51	7	48	14,58%
Methyl ester	156	53	370	14,32%
Deamidation (NQ)	50	6	48	12,50%
Pyro-glu from Q	104	58	489	11,86%
Replacement of proton with ammonium ion	33	3	28	10,71%
Replacement of proton with ammonium ion	35	3	28	10,71%
Carbamylation	70	67	626	10,70%
Pyro-glu from Q	50	5	48	10,42%
Formylation	146	36	370	9,73%
Formylation	79	53	562	9,43%
Pyro-glu from E	164	6	69	8,70%
Formylation	55	30	467	6,42%
Dehydration	106	31	489	6,34%
Deamidation (NQ)	6	39	628	6,21%
Formylation	89	38	638	5,96%
Formylation	164	4	69	5,80%
Sodium adduct	173	4	69	5,80%
Carbamylation	88	29	562	5,16%

### 5.2.2 Cristalina alfa B [UNIPROT ID: M3WT79]

Identificamos essa cristalina com uma leitura de 1.820 espectros sendo: 576 espectros, da amostra 1, de 35 peptídeos, dos quais 34 são peptídeos únicos, e cobertura de 98% da cristalina alfa B anotada no UNIPROT sob a identificação M3WT79; 722 espectros, da amostra 2, de 38 peptídeos (todos únicos) com 98 % de cobertura sobre a

proteína do UNIPROT; e 522 espectros, da amostra 3, de 35 peptídeos (todos únicos) cobrindo 94 % da sequência depositada no banco de dados.

A análise resultou em 22 modificações pós-traducionais identificadas em 90 sítios. Estão listadas, na Tabela 5, 10 modificações pós-traducionais identificadas em 27 sítios, segundo o critério, e sua distribuição está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Sítios de MPTs identificados na cristalina alfa B de Felis catus

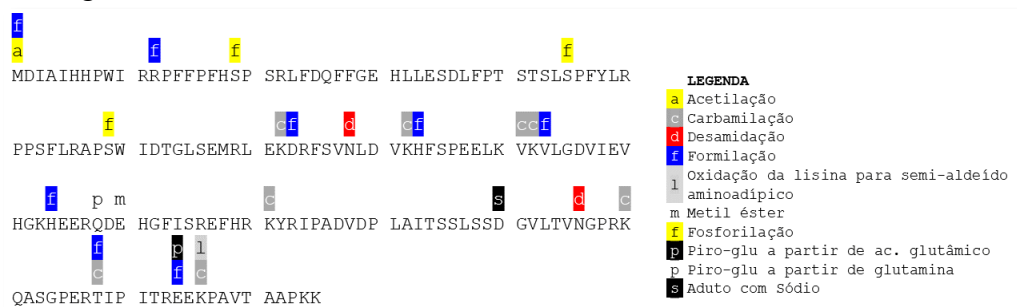


Tabela 5 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas alfa B

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	207	221	93,67%
Deamidation (NQ)	146	76	165	46,06%
Phosphorylation (STY)	19	44	236	18,64%
Phosphorylation (STY)	59	44	280	15,71%
Carbamylation	121	3	21	14,29%
Phosphorylation (STY)	45	6	43	13,95%
Pyro-glu from E	164	16	118	13,56%
Formylation	83	28	217	12,90%
Pyro-glu from Q	108	26	208	12,50%
Formylation	104	22	209	10,53%
Carbamylation	91	12	115	10,43%
Formylation	93	20	219	9,13%
Carbamylation	158	4	49	8,16%
Formylation	158	4	49	8,16%
Formylation	164	9	118	7,63%
Carbamylation	166	9	118	7,63%
Carbamylation	150	2	27	7,41%
Carbamylation	92	8	115	6,96%
Carbamylation	72	5	77	6,49%
Lysine oxidation to aminoadipic semialdehyde	166	7	118	5,93%
Formylation	73	5	85	5,88%
Deamidation (NQ)	78	8	139	5,76%
Formylation (Protein N-term)	12	13	236	5,51%
Sodium adduct	140	9	165	5,45%
Formylation (Protein N-term)	1	12	221	5,43%
Methyl ester	110	11	208	5,29%
Carbamylation	82	7	139	5,04%

### 5.2.3 Cristalina beta A1 [UNIPROT ID: M3WH19]

Essa cristalina foi identificada a partir da leitura de 2.349 espectros, resultado da soma de espectros das três amostras em que cada uma cobriu 99% da sequência de

resíduos anotada para a cristalina beta A1, sob a identificação M3WH19 no UNIPROT: 909 espectros, da amostra 1, de 42 peptídeos, dos quais 41 são peptídeos únicos; 637 espectros, da amostra 2, de 38 peptídeos, em que 37 são únicos; e 803 espectros, da amostra 3, de 42 peptídeos lidos, em que 41 são peptídeos únicos.

Identificaram-se 29 modificações pós-traducionais, em 136 sítios, para esta proteína. A Tabela 6 apresenta as modificações encontradas, de acordo com o critério, e a Figura 9, mostra a distribuição destas 9 modificações pelas 33 posições identificadas.

Figura 9 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A1 de Felis catus

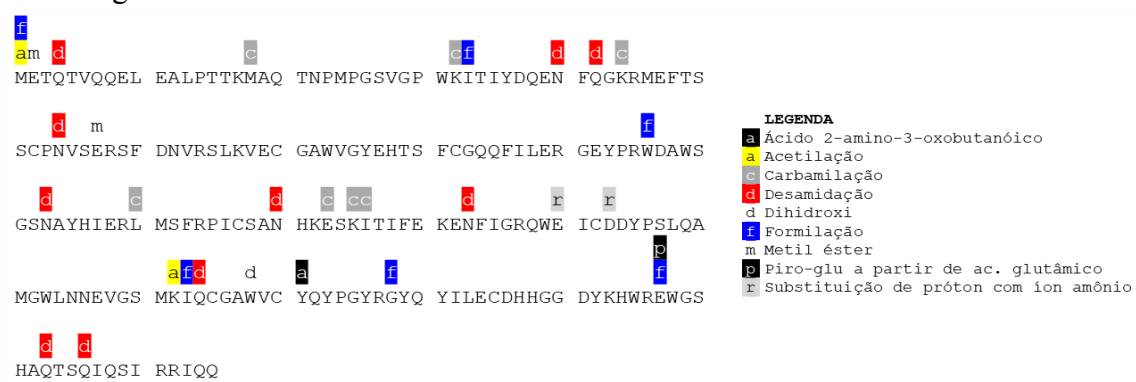


Tabela 6 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A1

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	17	22	77,27%
Deamidation (NQ)	120	80	161	49,69%
Deamidation (NQ)	133	44	215	20,47%
Deamidation (NQ)	40	39	205	19,02%
Deamidation (NQ)	103	58	374	15,51%
Carbamylation	110	20	161	12,42%
Formylation	178	23	222	10,36%
Dihydroxy	198	27	283	9,54%
Deamidation (NQ)	42	19	205	9,27%
Formylation (Protein N-term)	1	2	22	9,09%
Methyl ester	2	2	22	9,09%
Deamidation (NQ)	4	2	22	9,09%
Replacement of proton with ammonium ion	140	3	33	9,09%
Carbamylation	123	8	89	8,99%
Carbamylation	125	8	89	8,99%
Deamidation (NQ)	54	22	263	8,37%
Carbamylation	44	17	205	8,29%
Formylation	197	23	283	8,13%
Methyl ester	57	20	263	7,60%
Dihydroxy	168	10	138	7,25%
Carbamylation	18	3	42	7,14%
Carbamylation	32	3	42	7,14%
Formylation	96	26	374	6,95%
Deamidation (NQ)	206	19	283	6,71%
Replacement of proton with ammonium ion	143	2	33	6,06%
Acetylation (K)	162	2	33	6,06%
Pyro-glu from E	197	17	283	6,01%
Deamidation (NQ)	203	17	283	6,01%

Formylation	163	8	138	5,80%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	171	8	138	5,80%
Carbamylation	126	13	228	5,70%
Formylation	33	11	205	5,37%
Deamidation (NQ)	164	7	138	5,07%

### 5.2.4 Cristalina beta A2 [UNIPROT ID: M3W7S8]

A identificação dessa cristalina foi feita pela leitura de 268 espectros, dos quais: 189 espectros provenientes da leitura de 25 peptídeos, em que 24 são peptídeos únicos, da amostra 1, cobrindo 97 % da sequência de resíduos da proteína registrada no UNIPROT com a ID M3W7S8; 59 espectros, da amostra 2, da leitura de 17 peptídeos, dos quais 16 são únicos, que cobrem 88% da sequência de resíduos referida; e 20 espectros, da amostra 3, de 10 peptídeos, em que 9 são peptídeos únicos, cobrindo 61% da sequência de resíduos da proteína registrada no UNIPROT.

Nesta análise, foram identificadas 12 modificações pós-traducionais, divididas em 25 sítios. A Tabela 7 apresenta a listagem de 11 modificações distribuídas nos 23 sítios, e sua distribuição está ilustrada na Figura 10, de acordo com o critério.

Figura 10 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A2 de Felis catus



Tabela 7 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A2

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	2	13	21	61,90%
Deamidation (NQ)	52	11	19	57,89%
Formylation	170	4	20	20,00%
Deamidation (NQ)	176	10	54	18,52%
Formylation	176	10	54	18,52%
Methyl ester	166	4	29	13,79%
Formylation	29	4	34	11,76%
Carbamylation	138	3	26	11,54%
Replacement of proton with ammonium ion	59	2	19	10,53%
Sodium adduct	159	3	29	10,34%
Deamidation (NQ)	162	3	29	10,34%
Methyl ester	32	3	34	8,82%
Formylation	108	2	26	7,69%
Deamidation (NQ)	115	2	26	7,69%
Methyl ester	120	2	26	7,69%
Deamidation (NQ)	183	4	54	7,41%

Formylation	145	2	29	6,90%
Carboxylation (DKW)	150	2	29	6,90%
Dihydroxy	150	2	29	6,90%
Formylation	160	2	29	6,90%
Hydroxylation	161	2	29	6,90%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	31	2	34	5,88%
Deamidation (NQ)	35	2	34	5,88%

### 5.2.5 Cristalina beta A4 [UNIPROT ID: M3WDS9]

O total de 1.327 espectros lidos identificaram os peptídeos das três amostras, em que a cobertura foi de 89% por amostra. Todos os peptídeos foram identificados como únicos. Da amostra 1, foram identificados 27 peptídeos a partir de 615 espectro. A amostra 2 respondeu com 22 peptídeos identificados pela leitura de 319 espectros. Por fim, a amostra 3 apresentou 21 peptídeos resultantes da análise de 393 espectros.

A análise revelou 20 MPTs em 73 sítios. Na Tabela 8, foram listadas 7 modificações e distribuídas em 14 sítios, na Figura 11, segundo o critério definido.

Figura 11 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta A4 de Felis catus

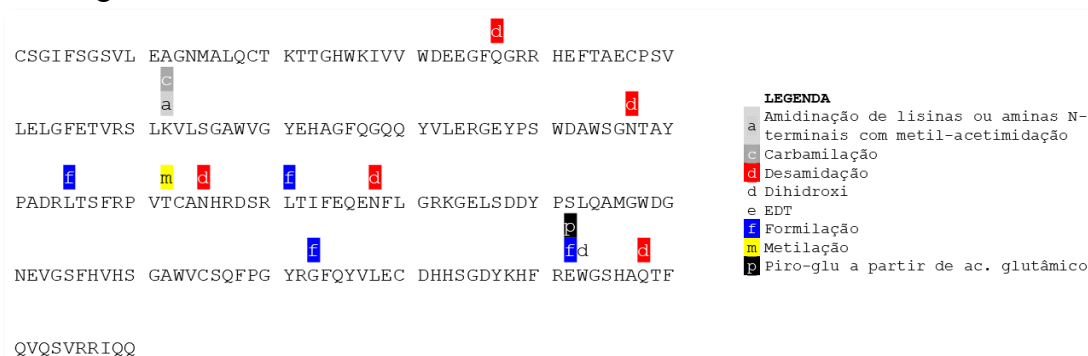


Tabela 8 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta A4

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Carbamylation	62	4	8	50,00%
Deamidation (NQ)	115	48	122	39,34%
Deamidation (NQ)	97	31	113	27,43%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	62	2	8	25,00%
Deamidation (NQ)	128	36	173	20,81%
Formylation	192	17	131	12,98%
Formylation	105	12	122	9,84%
Formylation	173	11	122	9,02%
Deamidation (NQ)	37	14	182	7,69%
Pyro-glu from E	192	10	131	7,63%
Dihydroxy	193	10	131	7,63%
Formylation	121	12	173	6,94%
Methylation	112	8	122	6,56%
Deamidation (NQ)	198	7	131	5,34%

## 5.2.6 Cristalina beta B1 [UNIPROT ID: M3WDS8]

Essa cristalina foi identificada com uma leitura de 1.265 espectros, em que: 503 espectros que identificam 39 peptídeos, sendo 38 peptídeos únicos, para a amostra 1, em uma cobertura de 75% da cristalina beta B1 registrada no UNIPROT com a id M3WDS8; 351 espectros, da amostra 2, correspondentes a 33 peptídeos, sendo 32 peptídeos únicos, cobrindo 76% da sequência de resíduos da proteína no UNIPROT; e 411 espectros de 37 peptídeos, em que 36 são únicos, para a amostra 3, cobrindo 70% da sequência registrada.

Das 21 modificações encontradas, em 87 sítios, estão listadas 9 modificações, na Tabela 9, que atendem ao critério definido, e suas distribuições estão ilustradas nos 32 sítios, na Figura 12.

Figura 12 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B1 de Felis catus

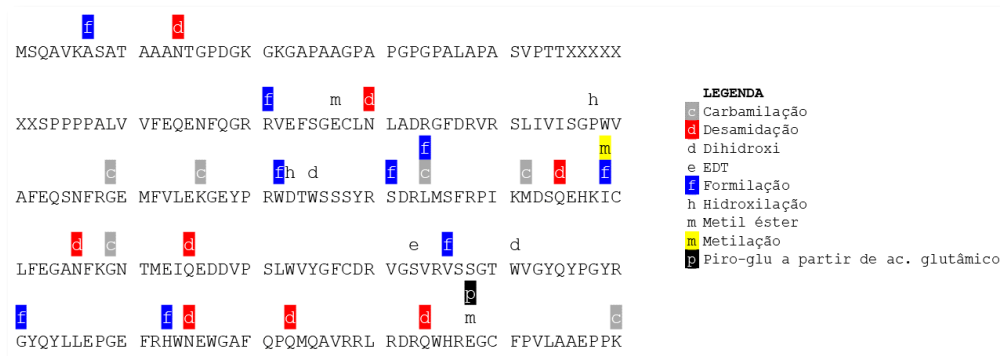


Tabela 9 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B1

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
EDT	183	2	2	100,00%
Deamidation (NQ)	14	19	31	61,29%
Deamidation (NQ)	234	6	18	33,33%
Formylation	131	2	9	22,22%
Dihydroxy	191	19	103	18,45%
Carbamylation	134	11	64	17,19%
Formylation	186	15	103	14,56%
Formylation (Protein N-term)	7	4	31	12,90%
Carbamylation	142	4	32	12,50%
Pyro-glu from E	238	6	49	12,24%
Deamidation (NQ)	165	8	67	11,94%
Deamidation (NQ)	215	23	204	11,27%
Methyl ester	77	18	161	11,18%
Formylation	122	8	74	10,81%
Deamidation (NQ)	156	10	93	10,75%
Carbamylation	250	5	49	10,20%
Formylation	213	20	204	9,80%
Dihydroxy	125	7	74	9,46%
Carbamylation	109	13	138	9,42%
Formylation	134	6	64	9,38%
Formylation	71	11	122	9,02%
Carbamylation	116	11	138	7,97%
Formylation	149	7	93	7,53%

<i>Deamidation (NQ)</i>	80	11	161	6,83%
<i>Deamidation (NQ)</i>	145	2	32	6,25%
<i>Methyl ester</i>	238	3	49	6,12%
<i>Hydroxylation</i>	98	7	115	6,09%
<i>Carbamylation</i>	159	4	67	5,97%
<i>Formylation</i>	201	10	173	5,78%
<i>Hydroxylation</i>	123	4	74	5,41%
<i>Deamidation (NQ)</i>	223	11	204	5,39%
<i>Methylation</i>	149	5	93	5,38%

### 5.2.7 Cristalina beta B2 [UNIPROT ID: M3WJG9]

A proteína foi identificada com uma leitura total de 2.164 espectros dos quais: 688 espectros, da amostra 1, foram obtidos da leitura de 44 peptídeos, em que 43 são peptídeos únicos e cobertura de 98% da Cristalina beta B2 anotada no UNIPROT sob a identificação M3WJG9; 852 espectros, da amostra 2, de 49 peptídeos, sendo 48 peptídeos únicos, em cobertura de 100% com a sequência anotada; e 624 espectros resultantes da leitura de 46 peptídeos, em que 45 são peptídeos únicos, da amostra 3, cobrindo de 100% da sequência anotada no UNIPROT.

Identificou-se 24 modificações pós-traducionais em 149 sítios, para essa cristalina. Seguindo o critério de frequência relativa por posição superior a 5% em peptídeos únicos, estão listados 11 MPTs, na Tabela 10, distribuídas em 32 sítios, como demonstrado na Figura 13.

Figura 13 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B2 de *Felis catus*

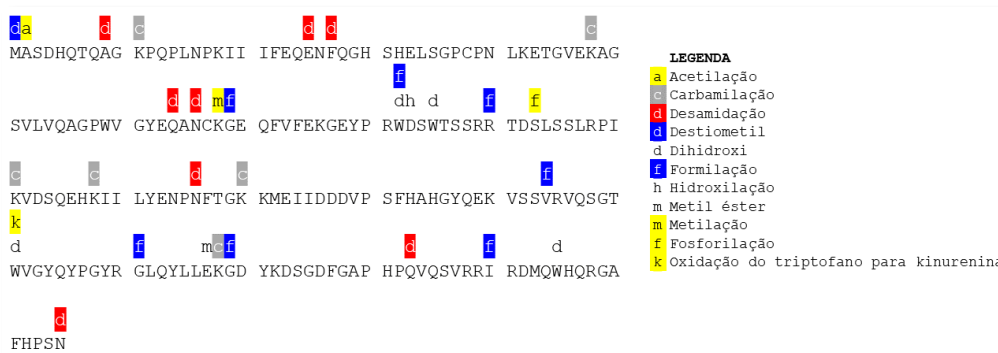


Tabela 10 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B2

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
<i>Dethiomethyl</i>	1	2	2	100,00%
<i>Acetylation (Protein N-term)</i>	2	119	126	94,44%
<i>Deamidation (NQ)</i>	205	5	13	38,46%
<i>Deamidation (NQ)</i>	66	18	108	16,67%
<i>Formylation</i>	161	20	133	15,04%
<i>Dihydroxy</i>	85	15	113	13,27%
<i>Deamidation (NQ)</i>	116	30	234	12,82%
<i>Deamidation (NQ)</i>	8	16	126	12,70%
<i>Deamidation (NQ)</i>	24	11	100	11,00%

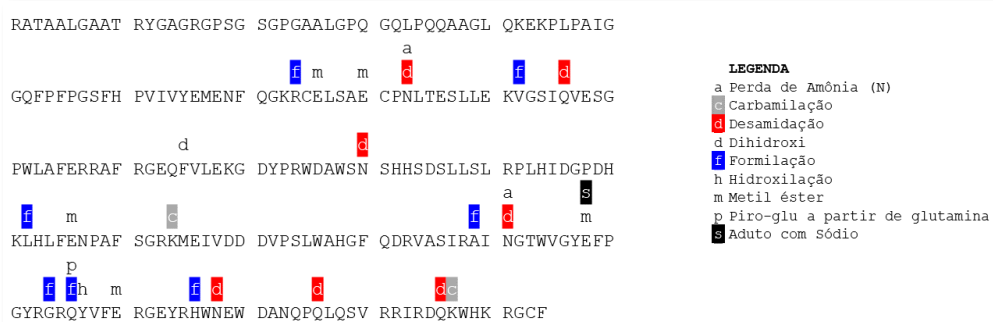
<i>Deamidation (NQ)</i>	26	11	100	11,00%
<i>Carbamylation</i>	11	13	126	10,32%
<i>Formylation</i>	146	18	175	10,29%
<i>Formylation</i>	190	13	149	8,72%
<i>Carbamylation</i>	48	2	23	8,70%
<i>Dihydroxy</i>	151	15	175	8,57%
<i>Carbamylation</i>	168	11	133	8,27%
<i>Formylation</i>	69	10	124	8,06%
<i>Formylation</i>	90	15	199	7,54%
<i>Carbamylation</i>	121	15	230	6,52%
<i>Deamidation (NQ)</i>	64	7	108	6,48%
<i>Carbamylation</i>	108	14	218	6,42%
<i>Tryptophan oxidation to kynurenin</i>	151	11	175	6,29%
<i>Dihydroxy</i>	82	7	113	6,19%
<i>Formylation</i>	82	7	113	6,19%
<i>Hydroxylation</i>	83	7	113	6,19%
<i>Deamidation (NQ)</i>	183	18	301	5,98%
<i>Phosphorylation (STY)</i>	93	19	325	5,85%
<i>Formylation</i>	169	14	247	5,67%
<i>Dihydroxy</i>	195	12	213	5,63%
<i>Methylation</i>	68	6	108	5,56%
<i>Carbamylation</i>	101	18	325	5,54%
<i>Methyl ester</i>	167	7	133	5,26%

## 5.2.8 Cristalina beta B3 [UNIPROT ID: M3WJG8]

Essa cristalina foi identificada a partir da leitura de 1.118 espectros, em que: 616 espectros, da amostra 1, de 30 peptídeos, dos quais 29 são peptídeos únicos, cobrindo 66% da sequência de resíduos anotada para a cristalina beta B3, sob a identificação M3WJG8 no UNIPROT; 203 espectros, da amostra 2, de 22 peptídeos, em que 21 são únicos, com cobertura de 65% da sequência de resíduo registrada; e 299 espectros, da amostra 3, de 25 peptídeos lidos, em que 24 são peptídeos únicos, e que cobrem 67% da sequência da referida proteína.

Foram identificadas 23 modificações para esta proteína, em 85 sítios. Estão listadas, na Tabela 11, 9 modificações que atendem ao critério definido, em 27 posições, como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Sítios de MPTs identificados na cristalina beta B3 de *Felis catus*



**Tabela 11 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas beta B3**

<i>Modificação Pós-Traducional</i>	<i>Posição</i>	<i>EpP com aMPT</i>	<i>Espec. por posição</i>	<i>Freq. Relativa</i>
<i>Deamidation (NQ)</i>	191	89	123	72,36%
<i>Deamidation (NQ)</i>	236	3	7	42,86%
<i>Carbamylation</i>	237	2	7	28,57%
<i>Formylation</i>	204	2	8	25,00%
<i>Deamidation (NQ)</i>	130	7	34	20,59%
<i>Pyro-glu from Q</i>	206	8	46	17,39%
<i>Formylation</i>	216	34	203	16,75%
<i>Deamidation (NQ)</i>	218	27	203	13,30%
<i>Carbamylation</i>	164	22	168	13,10%
<i>Methyl ester</i>	198	13	123	10,57%
<i>Methyl ester</i>	76	10	96	10,42%
<i>Deamidation (NQ)</i>	226	20	203	9,85%
<i>Sodium adduct</i>	198	12	123	9,76%
<i>Formylation</i>	152	7	75	9,33%
<i>Formylation</i>	206	4	46	8,70%
<i>Methyl ester</i>	156	6	75	8,00%
<i>Methyl ester</i>	80	7	96	7,29%
<i>Deamidation (NQ)</i>	83	7	96	7,29%
<i>Hydroxylation</i>	207	3	46	6,52%
<i>Methyl ester</i>	210	3	46	6,52%
<i>Ammonia-loss (N)</i>	191	8	123	6,50%
<i>Formylation</i>	74	2	31	6,45%
<i>Ammonia-loss (N)</i>	83	6	96	6,25%
<i>Formylation</i>	92	10	162	6,17%
<i>Formylation</i>	189	7	123	5,69%
<i>Dihydroxy</i>	115	7	125	5,60%
<i>Deamidation (NQ)</i>	96	9	162	5,56%

### 5.2.9 Cristalina gama A [UNIPROT ID: M3W1B5]

A identificação dessa cristalina foi feita pela leitura de 682 espectros, dos quais: 374 espectros identificaram 39 peptídeos, em que 17 são peptídeos únicos, na amostra 1, cobrindo 97 % da sequência de resíduos da proteína registrada no UNIPROT com a ID M3W1B5; 102 espectros, da amostra 2, da leitura de 16 peptídeos, dos quais 7 são únicos, que cobrem 90% da sequência de resíduos referida; e 206 espectros, da amostra 3, de 29 peptídeos, em que 12 são peptídeos únicos, cobrindo 95% da sequência de resíduos da proteína registrada no UNIPROT.

A análise de modificações pós-traducionais nos espectros dos peptídeos, relacionados a esta proteína, resultou em 18 modificações distribuídas em 42 sítios. Ao atender o critério definido, foram listadas apenas 5 modificações, na Tabela 12, e distribuídas em 7 posições, como pode ser visto na Figura 15.

Figura 15 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama A de Felis catus

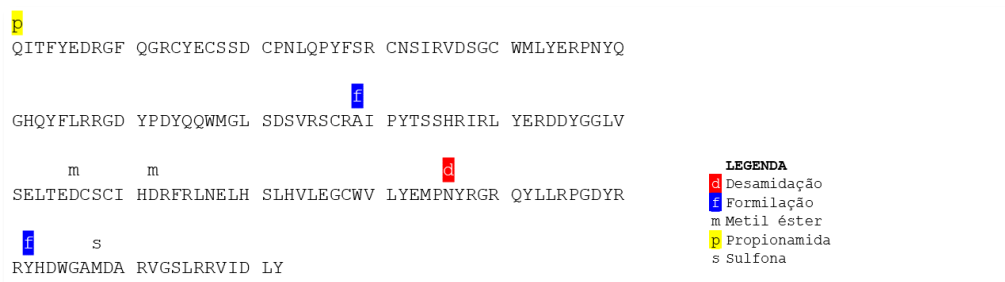


Tabela 12 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama A

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Pyro-glu from Q	169	33	125	26,40%
Carbamylation	189	27	128	21,09%
Formylation	118	3	19	15,79%
Deamidation (NQ)	187	17	128	13,28%
Methyl ester	134	11	121	9,09%
Formylation	169	11	125	8,80%
Formylation	180	9	128	7,03%
Formylation	142	4	68	5,88%

### 5.2.10 Cristalina gama B [UNIPROT ID: M3W1B4]

A identificação dessa cristalina é resultado da de 1.060 espectros, em que: 555 espectros que identificam 43 peptídeos, sendo 19 peptídeos únicos, para a amostra 1, em uma cobertura de 77% da cristalina gama B registrada no UNIPROT com a id M3W1B4; 168 espectros, da amostra 2, correspondentes a 22 peptídeos, sendo 11 peptídeos únicos, cobrindo 76% da sequência de resíduos da proteína no UNIPROT; e 337 espectros de 27 peptídeos, em que 14 são únicos, para a amostra 3, cobrindo 77% da sequência registrada.

A proteína foi identificada com 22 modificações pós-traducionais relacionadas e distribuídas em 66 sítios. Estão listadas as 5 modificações, na Tabela 13, e distribuídas nos 8 sítios em que foram encontrados, na Figura 16, de acordo com o critério definido.

Figura 16 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama B de Felis catus

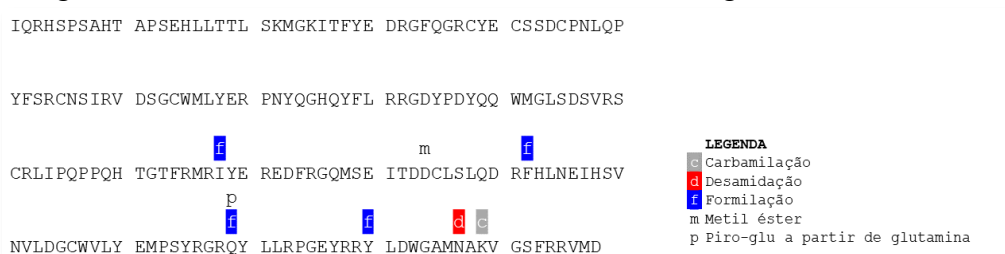


Tabela 13 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama B

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Pyro-glu from Q	169	33	125	26,40%
Carbamylation	189	27	128	21,09%

Formylation	118	3	19	15,79%
Deamidation (NQ)	187	17	128	13,28%
Methyl ester	134	11	121	9,09%
Formylation	169	11	125	8,80%
Formylation	180	9	128	7,03%
Formylation	142	4	68	5,88%

### 5.2.11 Cristalina gama S [UNIPROT ID: M3WND7]

A leitura de 1.265 espectros resultou na identificação dessa cristalina, sendo: 149 espectros que identificam 21 peptídeos, sendo 20 peptídeos únicos, para a amostra 1, em uma cobertura de 85% da cristalina gama S registrada no UNIPROT com a id M3WND7; 469 espectros, da amostra 2, correspondentes a 31 peptídeos, sendo 30 peptídeos únicos, cobrindo 88% da sequência de resíduos da proteína no UNIPROT; e 341 espectros de 30 peptídeos, em que 29 são peptídeos únicos, para a amostra 3, cobrindo 88% da sequência registrada.

Identificou-se 20 modificações pós-traducionais para essa cristalina, distribuídas em 71 sítios. Estão apresentadas as 9 modificações, que atendem ao critério, na Tabela 14, e suas distribuições nos 28 sítios da sequência de resíduos, na Figura 17.

Figura 17 - Sítios de MPTs identificados na cristalina gama S de Felis catus

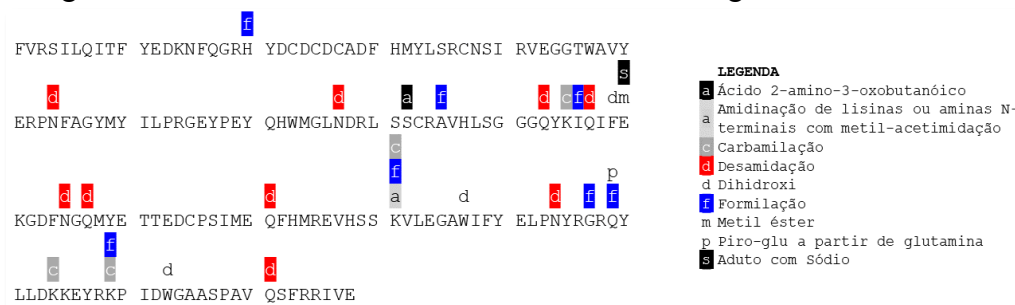


Tabela 14 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas gama S

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Carbamylation	131	10	25	40,00%
Deamidation (NQ)	105	27	69	39,13%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	82	4	11	36,36%
Deamidation (NQ)	77	55	182	30,22%
Deamidation (NQ)	107	18	69	26,09%
Deamidation (NQ)	121	15	69	21,74%
Carbamylation	95	13	83	15,66%
Pyro-glu from Q	149	13	84	15,48%
Methyl ester	100	5	37	13,51%
Deamidation (NQ)	54	13	107	12,15%
Formylation (Protein N-term)	20	8	71	11,27%
Deamidation (NQ)	93	9	83	10,84%
Carbamylation	159	15	142	10,56%
Formylation	147	2	23	8,70%
Formylation	159	12	142	8,45%

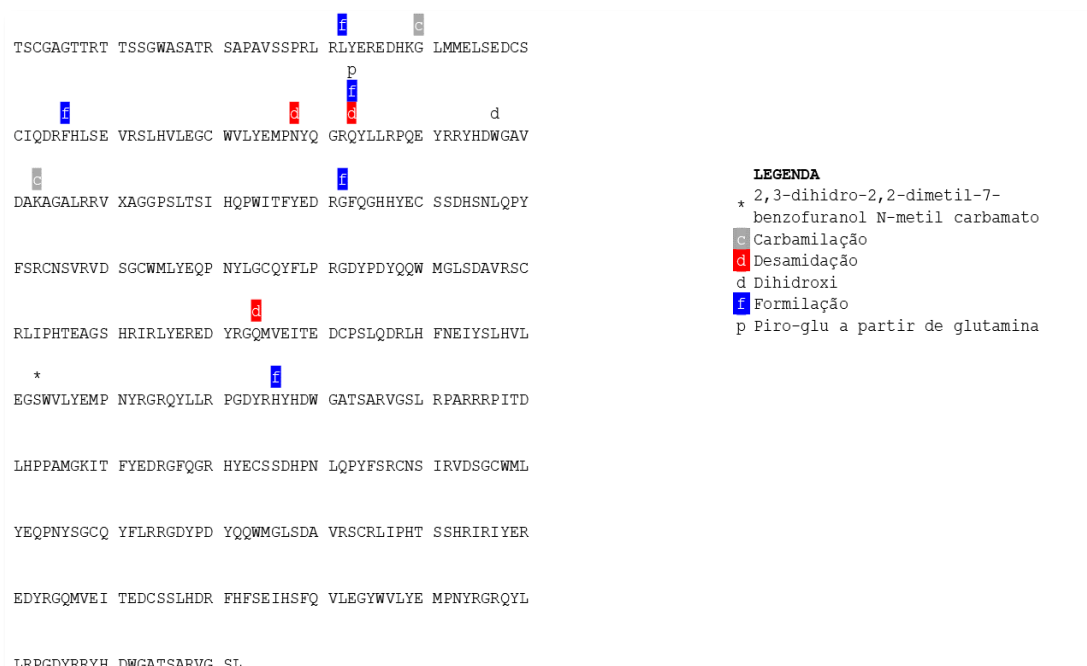
<i>Carbamylation</i>	154	7	84	8,33%
<i>Formylation</i>	96	3	37	8,11%
<i>Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate</i>	131	2	25	8,00%
<i>Formylation</i>	131	2	25	8,00%
<i>Deamidation (NQ)</i>	144	15	191	7,85%
<i>Formylation</i>	149	6	84	7,14%
<i>Deamidation (NQ)</i>	171	9	142	6,34%
<i>Formylation</i>	85	5	83	6,02%
<i>Dihydroxy</i>	163	8	142	5,63%
<i>Deamidation (NQ)</i>	97	2	37	5,41%
<i>Dihydroxy</i>	99	2	37	5,41%
<i>Sodium adduct</i>	100	2	37	5,41%
<i>Dihydroxy</i>	137	10	191	5,24%

### 5.2.12 Proteína não-caracterizadas 1 [UNIPROT ID: M3X7P2]

A proteína não-caracterizada M3X7P2, foi identificada com uma leitura de 1.542 espectros, dos quais: 811 espectros, da amostra 1, são leituras de 56 peptídeos, em que 26 são únicos, cobrindo 78% da sequência registrada no UNIPROT; 258 espectros, da amostra 2, de 38 peptídeos, sendo 18 peptídeos únicos, que cobrem 62 % da sequência registrada; e 473 espectros, da amostra 3, de 43 peptídeos, em que 22 são peptídeos únicos, cobrindo 62% da sequência anotada no UNIPROT.

Identificou-se 23 modificações, distribuídas em 95 sítios, nos peptídeos que compõe essa proteína. Seguindo o critério definido, foram listadas, na Tabela 15, as 6 MPTs distribuídas nos 14 sítios, como pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Sítios de MPTs identificados na Proteína não-caracterizada de *Felis catus*, M3X7P2.



**Tabela 15 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas não-caracterizadas M3X7P2**

<i>Modificação Pós-Traducional</i>	<i>Posição</i>	<i>EpP com aMPT</i>	<i>Espec. por posição</i>	<i>Freq. Relativa</i>
<i>Pyro-glu from Q</i>	83	22	89	24,72%
<i>Formylation</i>	32	3	15	20,00%
<i>Deamidation (NQ)</i>	78	28	155	18,06%
<i>Formylation</i>	56	7	43	16,28%
<i>Formylation</i>	276	9	59	15,25%
<i>Formylation</i>	132	3	22	13,64%
<i>Deamidation (NQ)</i>	224	7	61	11,48%
<i>Formylation</i>	83	8	89	8,99%
<i>Carbamylation</i>	40	9	109	8,26%
<i>Dihydroxy</i>	97	9	132	6,82%
<i>Carbamylation</i>	103	9	132	6,82%
<i>Deamidation (NQ)</i>	83	6	89	6,74%
<i>Carbamylation</i>	219	2	31	6,45%
<i>2 3-dihydro-2 2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate</i>	253	2	36	5,56%

### 5.2.13 Proteína não-caracterizadas 2 [UNIPROT ID: M3W1B7]

A proteína não-caracterizada M3W1B7, foi identificada com uma leitura de 842 espectros, dos quais: 423 espectros, da amostra 1, são leituras de 32 peptídeos, em que apenas 2 são únicos, cobrindo 88% da sequência registrada no UNIPROT; 155 espectros, da amostra 2, de 22 peptídeos, sendo 2 peptídeos únicos, que cobrem 72 % da sequência registrada; e 264 espectros, da amostra 3, de 23 peptídeos, em que 2 são peptídeos únicos, cobrindo 73% da sequência anotada no UNIPROT.

Foram identificadas 19 modificações, em 52 sítios, nos peptídeos relacionados a esta proteína. Contudo essa proteína, assim como as cristalinas gama A, gama B e a proteína não-caracterizada M3X7P2, apresentam uma alta quantidade de peptídeos não únicos (iguais entre algumas destas proteínas), impossibilitando a análise das MPTs presentes nestes peptídeos, por proteína isoladamente. Optou-se por, na análise individual, tratar somente dos peptídeos únicos. Foi listada na Tabela 16, a única modificação pós traducional que atende ao critério definido. Sua posição pode ser vista na Figura 19.

**Figura 19 - Sítios de MPTs identificados na Proteína não-caracterizada de Felis catus, M3W1B7.**

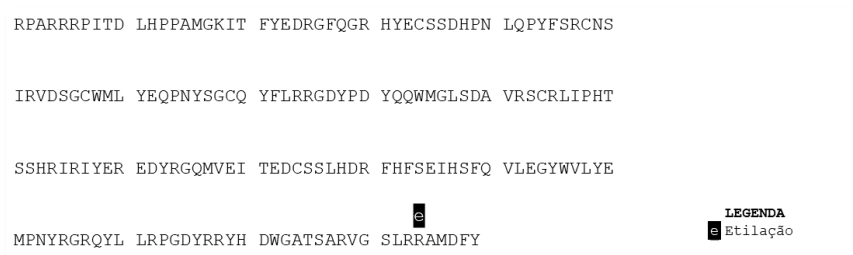


Tabela 16 - Principais MPTs identificadas nas cristalinas não-caracterizadas **M3W1B7**

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Ethylation	184	3	13	23,08%

### 5.3 Comparação com registro de MPTs de outras espécies

Em 2006, Wilmarth e seus colegas conduziram um estudo da análise comparativa de MPTs, *in vivo*, em cristalinos de humanos em diferentes idades. Utilizaram várias técnicas e um espectrômetro de massas do tipo *ion-trap*, para potencializar a identificação de modificações pós-traducionais. Conseguiram identificar modificações com frequência relativa superior a 5%, ou seja, as mais abundantes. Contabilizaram 11 MPTs em 155 sítios de modificações em cristalinas de humanos (WILMARTH et al., 2006).

Este estudo permitiu a identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em proteínas das famílias Cristalinas (alfa, beta e gama) presentes nos cristalinos de gatos por meio de análise dos espectros de massa. Identificamos 13 cristalinas, com 44 modificações pós-traducionais em um total de 1.117 posições (sítios). Considerando o critério adotado de análise de modificações com frequência relativa por posição acima de 5% apenas para os peptídeos únicos, identificamos em cristalinos de *Felis catus* 26 modificações distribuídas em 268 sítios das 13 cristalinas (24 modificações em 266 sítios, se desconsiderar 2 modificações únicas das proteínas não-caracterizadas).

A partir dos dados observados no UNIPROT e do levantamento bibliográfico, a comparação das modificações mais importantes e cujo estudo levou à discussão funcional destas modificações nas posições relatadas.

#### 5.3.1 Cristalinas alfa

Ao analisar o *heatmap* apresentado na Tabela 3, pode-se observar que as maiores frequências relativas da acetilação e da fosforilação e menores frequências relativas à desamidação, discriminam as proteínas da família Cristalinas alfa das proteínas da família Cristalinas beta e gama.

A acetilação das metioninas na posição 1 (posição N-terminal da proteína) apresentam as maiores frequências relativas, sem surpresas uma vez que a acetilação de alfa-amina N-terminais de proteínas é uma modificação difundida nos eucariotos (ARNESEN, 2011; LINSTER; WIRTZ, 2018) e é largamente encontrada em cristalinas alfa A de outras espécies como humanos (*Homo sapiens*) (DE JONG; TERWINDT;

BLOEMENDAL, 1975), bovinos (*Bos taurus*) (SMITH et al., 1991), hiras (*Procapra capensis*), elefantes africanos (*Loxodonta africana*), rinocerontes (*Ceratotherium simum*) e baleias (*Balaenoptera acutorostrata*) (DE JONG; NUY-TERWINDT; VERSTEEG, 1977), porcos (*Sus domesticus*), cavalos (*Equus caballus*), cães (*Canis lupus familiaris*), ratos (*Mus musculus*), macacos rhesus (*Macaca mulata*), coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e em gatos (*Felis catus*) (DE JONG et al., 1975) e em cristalinas alfa B em bovinos (*Bos taurus*) e humanos (*Homo sapiens*) (FUJII et al., 1994; KRAMPS; DE MAN; DE JONG, 1977; OUDERAA et al., 1974).

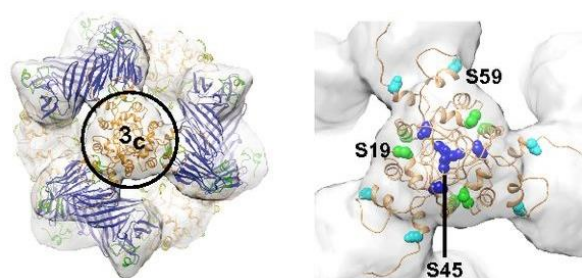
A função desta modificação parece estar atrelada à formação estrutural, contudo ainda não está certo se por estabilização da estrutura tridimensional, se por afetar na estrutura oligomérica, posicionamento celular, entre outras (STROUS; VAN WESTREENEN; BLOEMENDAL, 1973; VAN DAMME; ARNESEN; GEVAERT, 2011; WATSON; LEE, 2019).

Na cristalina alfa B identificou-se acetilação na lisina da posição 166 com frequência relativa abaixo e 5%, mas não detectou-se acetilação na lisina da posição 92, em comparação com a identificação de acetilação de lisinas nestas posições em humanos (LAPKO; SMITH; SMITH, 2001; NAGARAJ et al., 2012).

Não foi detectada a acetilação da lisina na posição 70, na cristalina alfa A. Esta acetilação está associada ao aumento de performance da função chaperona (NAGARAJ et al., 2012), e foi reportada em aproximadamente 5% das cristalinas alfa A de lentes saudáveis, em humanos (LIN et al., 1998), e em torno de 20% em cristalinos com catarata (LAPKO; SMITH; SMITH, 2001). A ausência desta modificação nesta posição pode ser uma das diferenças mais relevantes no entendimento da baixa prevalência de catarata em gatos, necessitando de maiores estudos para validação desta hipótese.

A fosforilação da serina na posição 122 da cristalina alfa A, também em humanos, parece ser regulada pelo desenvolvimento. Aparece durante os primeiros 12 anos de vida humana. A quantidade relativa da forma fosforilada contra a proteína não-fosforilada não se altera ao longo da vida do indivíduo (HANSON et al., 2000; LUND; SMITH; SMITH, 1996; MIESBAUER et al., 1994; TAKEMOTO, 1996; WILMARTH et al., 2006). Essa modificação também foi relatada em bovinos, na mesma posição (SMITH et al., 1991).

Figura 20 - Posicionamento estrutural das serinas 19, 45 e 59 em um oligômero de cristalinas alfa B



(BUCHNER et al., 2013)

Em relação à fosforilação da cristalina alfa B, as serinas das posições 19, 45 e 59 são os sítios onde a modificação é mais importante em outros tecidos e organismos (BIAN et al., 2014; CHIESA et al., 1987; ITO et al., 2001; KATO et al., 2001; MIESBAUER et al., 1994; SMITH et al., 1992; VOORTER et al., 1989). Como a cristalina alfa B não está presente somente no cristalino, esses sítios de fosforilação têm diferentes ações e funções. Estudos *in vitro*, envolvendo mutação e mimetização, demonstram que a fosforilação das serinas nas posições 19 e/ou 45 reduzem o tamanho da formação oligomérica, impactando negativamente na atividade chaperona. Contudo, a fosforilação da serina na posição 59 inativa o efeito inibitório da fosforilação em apenas uma posição, 19 ou 45, mas não inativa o efeito se ambas as serinas (19 e 45) estiverem fosforiladas. Em conclusão, descrevem o efeito regulador da atividade chaperona da cristalina alfa B, promovido pela fosforilação das serinas nas posições 19, 45 e 59 (BUCHNER et al., 2013; CIANO et al., 2016; MURANOVA; SUDNITSYNA; GUSEV, 2018). A Figura 20 evidencia a localização das três serinas na estrutura tridimensional.

A desamidação da asparagina na posição 101 na cristalina alfa A em humanos, tende a ocorrer principalmente no primeiro 1/3 de vida, seguida por um aumento gradativamente menor até alcançar 50% de desamidação durante a vida do indivíduo. A desamidação também ocorre nas glutaminas das posições 6 e 50 desta mesma espécie. (CHAVES et al., 2008; LIN et al., 1998; LUND; SMITH; SMITH, 1996; MIESBAUER et al., 1994; TAKEMOTO, 2003). Na cristalina alfa B, a desamidação da asparagina na posição 146, também reduz a atividade chaperona desta cristalina. Porém o efeito dessa modificação na estrutura, leva a formação de oligômeros maiores (de 700 a 750 kDa) se comparada a proteína nativa (580 kDa) (GUPTA; SRIVASTAVA, 2004).

### 5.3.2 Cristalinas beta e gama

Novamente, na cristalina beta A1, a acetilação da metionina na posição 1 (posição N-terminal da proteína) apresenta a maior frequência relativa e é relatada em metioninas na mesma posição, da cristalina beta A3/A1 em humanos [P05813 (CRBA1\_HUMAN) (LAMPI et al., 1997; LAPKO et al., 2005)], que apresentou identidade superior a 90%, com esta proteína.

A acetilação na posição N-terminal também é evidenciada nas cristalinas beta A2 e beta B2, contudo ocorre na alanina e na serina (posição 2) das respectivas proteínas, evidenciando uma possível clivagem. As proteínas que obedecem aos nossos parâmetros de busca, não retornaram nenhuma modificação revisada, na base do UNIPROT, para compor a referência da beta A2. Porém, a partir da sequência de resíduos da beta B2 e da sua identidade com a cristalina beta B2 de cães [Q2LEC2 (CRBB2\_CANLF)], encontrou-se a cristalina beta B2 de bovinos [P02522 (CRBB2\_BOVIN) (DRIESSEN et al., 1981)] e de humanos [P43320 (CRBB2\_HUMAN) (CHAMBERS; RUSSELL, 1993; MIESBAUER; SMITH; SMITH, 1993)] onde essa acetilação, em mesma posição, é relatada.

A desamidação dos resíduos de asparagina e glutamina, junto com as ligações dissulfeto entre cisteínas, metilação de cisteínas e clivagem, são as modificações mais abundantes relatadas para as cristalinas (GUPTA; SRIVASTAVA, 2004; HANSON et al., 2000; MIESBAUER et al., 1994; MOREAU; KING, 2012; PANDE; MOKHOR; PANDE, 2015; SHARMA; SANTHOSHKUMAR, 2009; TAKEMOTO, 2003; WILMARTH et al., 2006; YANSHOLE et al., 2013).

Como a desamidação prevalece na fração proteica insolúvel em água (SMITH et al., 1995), a desamidação tão acentuada das cristalinas beta e gama, representada na Tabela 3, indica a agregação de uma fração destas proteínas (de solúveis para insolúveis em água). Contudo, os cristalinos de origem eram translúcidos e saudáveis (não possuíam opacificação). Acredita-se que esta porção insolúvel contenha oligômeros de cristalinas alfa com cristalinas beta e gama, prevenindo a agregação e precipitação das cristalinas beta e gama.

Os estudos mais extensos dos efeitos da desamidação provavelmente foram conduzidos nas cristalinas beta (LAMPI et al., 2014). Estudos de mimetização de

desamidões na cristalina beta A3, demonstram possíveis perturbações na estrutura terciária causadas por desamidões das asparaginas nas posições 54, 120, 133 e 155 e na glutamina da posição 42 (TAKATA et al., 2008). Não identificou-se desamidação na posição 155, mas foi identificada desamidação com frequência relativa superior a 5% em todas as outras posições relatadas.

Em cristalinas beta B2, as desamidões das glutaminas nas posições 70 e 162, levam a uma desestabilização do dímero nativo (LAMPI et al., 2006). A cristalina beta B2 de *Felis catus*, anotada no UNIPROT [M3WJG9], assim como a de humanos [P43320], não apresenta glutaminas, nas posições 70 e 162, mas sim nas posições 71 e 163, e em ambas, não encontrou-se desamidões.

A cristalina gama S anotada para *Felis catus* [M3WND7] também não apresentou alinhamento com os resíduos de asparagina (posição 76 e 143) e de glutamina (posições 92 e 120), referenciados em estudos sobre desamidação (PANDE; MOKHOR; PANDE, 2015). Contudo encontrou-se 9 sítios com esta modificação.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Neste estudo, foram identificadas e caracterizadas 13 cristalinas, com 44 modificações pós-traducionais em um total de 1.117 posições (sítios), onde as mais importantes foram definidas por um critério de análise de modificações com frequência relativa por posição acima de 5% apenas para os peptídeos únicos.

A análise das frequências relativas de espectros de MPTs por cristalina apresentaram diferenças entre as superfamílias Cristalinas alfa, onde a quantificação de acetilação e de fosforilação foram destacadas, e a superfamília Cristalinas beta e gama, que tiveram destaque nas quantificação de desamidação. Tais observações evidenciam um padrão nas frequências destas modificações, demonstrando uma relação de conservação físico-química entre as famílias.

A revisão da literatura de modificações pós-traducionais, com identidade superior a 50% com as proteínas obtidas em cristalinos de outras espécies, forneceu pontos de discussão acerca das diferenças entre as MPTs encontradas ou não identificadas

As diferenças em relação a identificação de algumas acetilações (como a lisina da posição 70, da cristalina alfa A) e quantificação de fosforilações (serinas 19, 45 e 59 da cristalina alfa B), nas cristalinas alfa, podem ser a razão de uma menor prevalência a catarata do cristalino de gatos, comparado ao o cristalino de outros mamíferos,. Ou talvez, essas modificações sejam parte de mecanismos moleculares não-ativos em gatos, visto que a frequência de acetilação na lisina da posição 70, em humanos, é maior em cristalinos que apresentam catarata (20%) que em cristalinos saudáveis (5%).

A quantificação elevada de desamidação nas cristalinas beta e gama, indica a agregação de uma fração destas proteínas. Porém o estudo foi realizado com cristalinos translúcidos e sadios, o que leva à interpretação de já haver oligômeros destas proteínas com cristalinas alfa, prevenindo a precipitação destes agregados. Logo, algumas das modificações identificadas podem ser provenientes da ação das cristalinas alfa, em sua função chaperona.

Em suma, a abordagem trouxe um gama de modificações pós-traducionais identificadas nas proteínas das famílias Cristalinas em *Felis catus*, contribuindo como base para futuros estudos que busquem um melhor entendimento dos aspectos sobre a

menor susceptibilidade do cristalino de gatos à catarata e dos mecanismos moleculares que envolvem a doença.

## 7 PERSPECTIVAS

A abordagem *bottom-up* utilizada aliada ao uso de tecnologias modernas de análise por espectrometria de massa, rendeu boas observações e identificações, porém sugerimos a utilização de uma abordagem do tipo ‘*top down*’ para melhorar a identificação das modificações nas cristalinas gama.

As modificações “Formilação” e “Carbamiliação” precisarão de uma melhor análise com outras técnicas para validar os resultados referentes a elas, uma vez que suas presenças são notáveis, mas os quantitativos podem ter sido afetadas pelo uso de ácido fórmico e ureia no preparo da amostra (LAPKO; SMITH; SMITH, 2001; QIN; SMITH; SMITH, 1992; ZHENG; DOUCETTE, 2016). A carbamiliação já vem sendo estudada como modificação nas cristalinas, porém a formilação é apresentada pela primeira vez. Outra metodologia, também, deve ser aplicada no estudo para as modificações oxidação, e para as modificações que a cisteína sofre.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- AHRENS, C. H. et al. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 1990.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 1997.
- ANDLEY, U. P. Crystallins in the eye: Function and pathology. **Progress in Retinal and Eye Research**, 2007.
- ANDLEY, U. P. The lens epithelium: Focus on the expression and function of the  $\alpha$ -crystallin chaperones. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2008.
- ARMIROTTI, A.; DAMONTE, G. Achievements and perspectives of top-down proteomics. **Proteomics**, 2010.
- ARNESEN, T. Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. **PLoS Biology**, 2011.
- BAGNÉRIS, C. et al. Crystal Structures of  $\alpha$ -Crystallin Domain Dimers of  $\alpha$ B-Crystallin and Hsp20. **Journal of Molecular Biology**, 2009.
- BAKTHISARAN, R. et al. Phosphorylation of  $\alpha$ B-crystallin: Role in stress, aging and patho-physiological conditions. **Biochimica et biophysica acta**, 2016.
- BAKTHISARAN, R.; TANGIRALA, R.; RAO, C. M. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2015.
- BARROS, P. S. M. et al. Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 2, p. 83–86, 1999.
- BASHER, A. W.; ROBERTS, S. M. Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataracts in dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, 1995.
- BAX, B. et al. X-ray analysis of  $\beta$ B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 776–780, out. 1990.
- BAX, B.; SLINGSBY, C. Crystallization of a new form of the eye lens protein  $\beta$ B2-crystallin. **Journal of Molecular Biology**, v. 208, n. 4, p. 715–717, 20 ago. 1989.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)). **Nucleic Acids Research**, 2000.
- BHAT, S. P.; NAGINENI, C. N.  $\alpha$ B subunit of lens-specific protein  $\alpha$ -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1989.
- BIAN, Y. et al. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. **Journal of Proteomics**, 2014.

- BOURGUET, A. et al. Cataracts in a population of Bengal cats in France. **Veterinary Ophthalmology**, v. 21, n. 1, p. 10–18, 2018.
- BOVA, M. P. et al. Mutation R120G in alphaB-crystallin, which is linked to a desmin-related myopathy, results in an irregular structure and defective chaperone-like function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 6137–42, 25 maio 1999.
- BRADY, J. P. et al. Targeted disruption of the mouse  $\alpha$ A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein  $\alpha$ B-crystallin. **PNAS**, 1997.
- BRADY, J. P. et al.  $\alpha$ B-Crystallin in Lens Development and Muscle Integrity: A Gene Knockout Approach. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2001.
- BRAUN, N. et al. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone alphaB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2011.
- BUCHNER, J. et al. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of B-crystallin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2013.
- CALDERÓN-CELIS, F.; ENCINAR, J. R. A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: Update and future perspective. **Journal of Proteomics**, 2019.
- CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC bioinformatics**, 2009.
- CANTIN, G. T.; YATES, J. R. Strategies for shotgun identification of post-translational modifications by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A. Anais...**2004
- CARNINCI, P. et al. Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science**, 2005.
- CARTIER, M.; BREITMAN, M. L.; TSUI, L.-C. A frameshift mutation in the  $\gamma$ E-crystallin gene of the Elo mouse. **Nature Genetics**, v. 2, n. 1, p. 42–45, set. 1992.
- CHAMBERS, C.; RUSSELL, P. Deletion mutation in an eye lens  $\beta$ -crystallin: An animal model for inherited cataracts. **Journal of Biological Chemistry**, 1991.
- CHAMBERS, C.; RUSSELL, P. Sequence of the human lens  $\beta$ B2-crystallin-encoding cDNA. **Gene**, 1993.
- CHAVES, J. M. et al. Structural and Functional Roles of Deamidation and/or Truncation of N- or C-Termini in Human  $\alpha$ A-Crystallin. **Biochemistry**, v. 47, n. 38, p. 10069–10083, 23 set. 2008.
- CHIESA, R. et al. The phosphorylation sites of the B2 chain of bovine  $\alpha$ -crystallin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 144, n. 3, p. 1340–1347, 1987.
- CHURCH, D. M. et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. **PLoS Biology**, 2009.
- CIANO, M. et al. Differential phosphorylation-based regulation of  $\alpha$ B-crystallin chaperone activity for multipass transmembrane proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016.
- D.L., W.; M.F., H. Prevalence of feline cataract: Results of a cross-sectional study of 2000 normal animals, 50 cats with diabetes and one hundred cats following dehydrational

crises. **Veterinary Ophthalmology**, 2006.

DASGUPTA, S.; HOHMAN, T. C.; CARPER, D. Hypertonic stress induces  $\alpha$ B-crystallin expression. **Experimental Eye Research**, v. 54, n. 3, p. 461–470, mar. 1992.

DE JONG, W. W. et al. Primary Structures of the alpha-Crystallin A Chains of Seven Mammalian Species. **European Journal of Biochemistry**, v. 53, n. 1, p. 237–242, abr. 1975.

DE JONG, W. W.; CASPERS, G. J.; LEUNISSEN, J. A. M. Genealogy of the  $\alpha$ -crystallin - small heat-shock protein superfamily. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1998.

DE JONG, W. W.; NUY-TERWINDT, E. C.; VERSTEEG, M. Primary structures of  $\alpha$ -crystallin a chains of elephant, whale, hyrax and rhinoceros. **BBA - Protein Structure**, 1977.

DE JONG, W. W.; TERWINDT, E. C.; BLOEMENDAL, H. The amino acid sequence of the A chain of human  $\alpha$ -crystallin. **FEBS Letters**, v. 58, n. 1–2, p. 310–313, 1975.

DE LEON, E. R. et al. Chaperone-like activity of the N-terminal region of a human small heat shock protein and chaperone-functionalized nanoparticles. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 2019.

DELAYE, M.; TARDIEU, A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. **Nature**, v. 302, n. 5907, p. 415–417, mar. 1983.

DELBECQ, S. P.; KLEVIT, R. E. One size does not fit all: The oligomeric states of  $\alpha$ B crystallin. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1073–1080, 17 abr. 2013.

DEN DUNNEN, J. T. et al. Two human  $\gamma$ -crystallin genes are linked and riddled with Alu-repeats. **Gene**, 1985.

DONALDSON, P.; KISTLER, J.; MATHIAS, R. T. Molecular solutions to mammalian lens transparency. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, 2001.

DRIESSEN, H. P. C. et al. Primary Structure of the Bovine  $\beta$ -Crystallin Bp Chain: Internal Duplication and Homology with  $\gamma$ -Crystallin. **European Journal of Biochemistry**, v. 121, n. 1, p. 83–91, 1981.

DRISCOLL, C. A. et al. The near eastern origin of cat domestication. **Science**, 2007.

DUBIN, R. A.; WAWROUSEK, E. F.; PIATIGORSKY, J. Expression of the murine alpha B-crystallin gene is not restricted to the lens. **Molecular and cellular biology**, 1989.

ECROYD, H.; CARVER, J. A. Crystallin proteins and amyloid fibrils. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 1, p. 62–81, 22 jan. 2009.

EISELE, Y. S. et al. Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 759–780, 4 nov. 2015.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of *Orbitrap* Mass Spectrometry Instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry**, 2015.

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

- FUJII, N. et al. Simultaneous racemization and isomerization at specific aspartic acid residues in  $\alpha$ B-crystallin from the aged human lens. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, 1994.
- GELATT, K. N.; MACKAY, E. O. Prevalence of primary breed-related cataracts in the dog in North America. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 2, p. 101–111, 2005.
- GHAFFARI SHARAF, M. et al. Peptides for targeting  $\beta$ B2-crystallin fibrils. **Experimental Eye Research**, v. 165, p. 109–117, 1 dez. 2017.
- 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.
- GUNDRY, R. L. et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2009.
- GUPTA, R.; SRIVASTAVA, O. P. Effect of Deamidation of Asparagine 146 on Functional and Structural Properties of Human Lens  $\alpha$ B-Crystallin. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2004.
- GUYONNET, A. et al. Epidemiology and clinical presentation of feline cataracts in france: A retrospective study of 268 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 22, n. 2, p. 116–124, mar. 2019.
- HANSON, S. R. A. et al. The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. **Experimental Eye Research**, 2000.
- HÄRD, T.; LENDEL, C. Inhibition of Amyloid Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 421, n. 4–5, p. 441–465, 24 ago. 2012.
- HASLBECK, M.; VIERLING, E. A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 7, p. 1537–1548, 10 abr. 2015.
- HEJTMANCIK, J. F.; WINGFIELD, P. T.; SERGEEV, Y. V.  $\beta$ -crystallin association. **Experimental Eye Research**, v. 79, n. 3, p. 377–383, 1 set. 2004.
- HOCHBERG, G. K. A. et al. Structural principles that enable oligomeric small heat-shock protein paralogs to evolve distinct functions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 359, n. 6378, p. 930–935, 23 fev. 2018.
- HORWITZ, J.  $\alpha$ -Crystallin can function as a molecular chaperone. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 1992.
- HORWITZ, J. Alpha-crystallin. **Experimental Eye Research**, 2003.
- ITO, H. et al. Phosphorylation-induced Change of the Oligomerization State of  $\alpha$ B-crystallin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 5346–5352, 16 fev. 2001.
- JEHLE, S. et al.  $\alpha$ B-Crystallin: A Hybrid Solid-State/Solution-State NMR Investigation Reveals Structural Aspects of the Heterogeneous Oligomer. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1481–1497, 6 fev. 2009.
- JEHLE, S. et al. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 16, p. 6409–14, 19 abr. 2011.

JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2004.

KALLUR, L. S.; AZIZ, A.; ABRAHAM, E. C. C-Terminal truncation affects subunit exchange of human  $\alpha$ A-crystallin with  $\alpha$ B-crystallin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 308, n. 1–2, p. 85–91, 2 jan. 2008.

KAMEI, A. et al. Post-translational modification of alphaB-crystallin of normal human lens. **Biol Pharm Bull**, 2000.

KAMEI, A. et al. Does post-translational modification influence chaperone-like activity of alpha-crystallin? I. Study on phosphorylation. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 1, p. 96–9, 2001.

KANNABIRAN, C. et al. Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the  $\beta$ A3/A1-crystallin gene. **Molecular vision**, 1998.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. **Analytical Chemistry**, 1988.

KARMAKAR, S.; DAS, K. P. Identification of histidine residues involved in Zn<sup>2+</sup> binding to  $\alpha$ - and  $\alpha$ B-crystallin by chemical modification and MALDI TOF mass spectrometry. **Protein Journal**, v. 31, n. 7, p. 623–640, 14 out. 2012.

KATO, K. et al. Ser-59 is the major phosphorylation site in  $\alpha$ B-crystallin accumulated in the brains of patients with Alexander's disease. **Journal of Neurochemistry**, 2001.

KRAMPS, J. A.; DE MAN, B. M.; DE JONG, W. W. The primary structure of the B2 chain of human  $\alpha$ -crystallin. **FEBS Letters**, 1977.

KRIEHLER, T. et al. Independent evolution of the core domain and its flanking sequences in small heat shock proteins. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 10, p. 3633–3642, 25 out. 2010.

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

LAGANOWSKY, A. et al. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB 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.

LAMPI, K. J. et al. Sequence analysis of  $\beta$ A3,  $\beta$ B3, and  $\beta$ A4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens. **Journal of Biological Chemistry**, 1997.

LAMPI, K. J. et al. Lens proteomics: Analysis of rat crystallin sequences and two-dimensional electrophoresis map. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2002.

LAMPI, K. J. et al. Deamidation in human lens  $\beta$ B2-crystallin destabilizes the dimer. **Biochemistry**, 2006.

LAMPI, K. J. et al. Lens  $\beta$ -crystallins: THE role of deamidation and related modifications in aging and cataract. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2014.

LAPATTO, R. et al. High resolution structure of an oligomeric eye lens  $\beta$ -crystallin: Loops, arches, linkers and interfaces in  $\beta$ B2 dimer compared to a monomeric  $\gamma$ -crystallin.

- Journal of Molecular Biology**, v. 222, n. 4, p. 1067–1083, 20 dez. 1991.
- LAPKO, V. N. et al. Modifications of human  $\beta$ A1/ $\beta$ A3-crystallins include S-methylation, glutathiolation, and truncation. **Protein Sci.**, v. 14, n. 1, p. 45–54, 2005.
- LAPKO, V. N.; SMITH, D. L.; SMITH, J. B. In vivo carbamylation and acetylation of water-soluble human lens alphaB-crystallin lysine 92. **Protein Sci**, v. 10, n. 6, p. 1130–1136, 2001.
- LAPKO, V. N.; SMITH, D. L.; SMITH, J. B. Expression of  $\beta$ A2-crystallin in human lenses. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 383–385, 2003a.
- LAPKO, V. N.; SMITH, D. L.; SMITH, J. B. Methylation and carbamylation of human  $\gamma$ -crystallins. **Protein Science**, 2003b.
- LI, Q. et al. Global Post-Translational Modification Discovery. **Journal of Proteome Research**, 2017.
- 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**, 2009.
- LIN, P. P. et al. In vivo acetylation identified at lysine 70 of human lens  $\alpha$ A- crystallin. **Protein Science**, v. 7, n. 6, p. 1451–1457, 1998.
- LINSTER, E.; WIRTZ, M. N-terminal acetylation: An essential protein modification emerges as an important regulator of stress responses. **Journal of Experimental Botany**, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/69/19/4555/5045385>>
- LITT, M. et al. Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human  $\beta$ -crystallin gene CRYBB2. **Human Molecular Genetics**, 1997.
- LUBSEN, N. H.; AARTS, H. J. M.; SCHOENMAKERS, J. G. G. The evolution of lenticular proteins: The  $\beta$ - and  $\gamma$ -crystallin super gene family. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** Pergamon, , 1 jan. 1988. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0079610788900107>>. Acesso em: 28 mar. 2019
- LUND, A. L.; SMITH, J. B.; SMITH, D. L. Modifications of the water-insoluble human lens alpha-crystallins. **Experimental eye research**, v. 63, n. 6, p. 661–72, 1996.
- MA, B. et al. PEAKS: Powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 2003.
- MACCOSS, M. J. et al. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002.
- MIESBAUER, L. R. et al. Post-translational modifications of water-soluble human lens crystallins from young adults. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 17, p. 12494–12502, 1994.
- MIESBAUER, L. R.; SMITH, J. B.; SMITH, D. L. Amino acid sequence of human lens  $\beta$ B2-crystallin. **Protein Science**, v. 2, n. 2, p. 290–291, 31 dez. 1993.
- 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, maio 2012.
- MURANOVA, L. K.; SUDNITSYNA, M. V.; GUSEV, N. B.  $\alpha$ B-Crystallin Phosphorylation: Advances and Problems. **Biochemistry (Moscow)**, 2018.

- NAGARAJ, R. H. et al. Acetylation of  $\alpha$ A-crystallin in the human lens: Effects on structure and chaperone function. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 2, p. 120–129, 2012.
- NAJMUDIN, S. et al. Structure of the bovine eye lens protein  $\gamma$ B( $\gamma$ II)-crystallin at 1.47 Å. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 49, n. 2, p. 223–233, mar. 1993.
- NALINI, V. et al. Close packing of an oligomeric eye lens  $\beta$ -crystallin induces loss of symmetry and ordering of sequence extensions. **Journal of Molecular Biology**, v. 236, n. 4, p. 1250–1258, 1994.
- NANDROT, E. et al. Gamma-D crystallin gene (CRYGD) mutation causes autosomal dominant congenital cerulean cataracts. **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 4, p. 262–7, 1 abr. 2003.
- NGUYEN, S.; FENN, J. B. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2007.
- NOWELL, K.; JACKSON, P. Status Survey and Conservation Action Plan Wild Cats. **IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland, Switzerland**, 1996.
- O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. BIG CAT GENOMICS. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 2005.
- OUDERAA, F. J. V. A. N. D. E. R. et al. The Amino-Acids Sequence of the  $\alpha$ B2 Chain of Bovine  $\alpha$ -Crystallin. **Peptides**, v. 168, p. 157–168, 1974.
- PANDE, A.; MOKHOR, N.; PANDE, J. Deamidation of Human  $\gamma$ S-Crystallin Increases Attractive Protein Interactions: Implications for Cataract. **Biochemistry**, v. 54, n. 31, p. 4890–4899, 11 ago. 2015.
- PASCOLINI, D.; MARIOTTI, S. P. Global estimates of visual impairment: 2010. **British Journal of Ophthalmology**, v. 96, n. 5, p. 614–618, 2012.
- PEIFFER, R. L.; GELATT, K. N. Congenital cataracts in a Persian kitten (a case report). **Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC**, 1975.
- PESCHEK, J. et al. The eye lens chaperone -crystallin forms defined globular assemblies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 32, p. 13272–13277, 2009.
- POLLREISZ, A.; SCHMIDT-ERFURTH, U. Diabetic Cataract—Pathogenesis, Epidemiology and Treatment. **Journal of Ophthalmology**, 2010.
- PONTIUS, J. U. et al. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. **Genome Research**, 2007.
- QIN, W.; SMITH, J. B.; SMITH, D. L. Rates of carbamylation of specific lysyl residues in bovine  $\alpha$ -crystallins. **Journal of Biological Chemistry**, 1992.
- RESNIKOFF, S.; KEYS, T. Future trends in global blindness. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 60, n. 5, p. 387, 2012.
- RHODES, J. D.; SANDERSON, J. The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. **Experimental Eye Research**, 2009.
- 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**, 2006.
- SACCO, F. et al. Glucose-regulated and drug-perturbed phosphoproteome reveals

molecular mechanisms controlling insulin secretion. **Nature Communications**, v. 7, n. May, 2016.

SCIARRETTA, K. L.; GORDON, D. J.; MEREDITH, S. C. Peptide-Based Inhibitors of Amyloid Assembly. **Methods in Enzymology**, v. 413, p. 273–312, 1 jan. 2006.

SEO, J.; LEE, K. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 35–44, 2004.

SERGEEV, Y. V. et al. Surface interactions of  $\gamma$ -crystallins in the crystal medium in relation to their association in the eye lens. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 4, n. 2, p. 137–147, 1 jan. 1988.

SERGEEV, Y. V.; HEJTMANCIK, J. F. A method for determining domain binding sites in proteins with swapped domains: implications for  $\beta$ A3- and  $\beta$ B2-crystallins. **Techniques in Protein Chemistry**, v. 8, p. 817–826, 1 jan. 1997.

SHARMA, K. K.; SANTHOSHKUMAR, P. Lens aging: Effects of crystallins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 2009.

SILVA, M. J. DE J. et al. **ANÁLISE PROTEÔMICA DE CRISTALINO DE *Felis catus***. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2018.

SMITH, J. B. et al. Elucidation of the primary structures of proteins by mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 118–124, 1991.

SMITH, J. B. et al. Identification of the posttranslational modifications of bovine lens  $\alpha$ B-crystallins by mass spectrometry. **Protein Science**, 1992.

SMITH, J. B. et al. Glutathione adducts, not carbamylated lysines, are the major modification of lens  $\alpha$ -crystallins from renal failure patients. **Journal of Protein Chemistry**, 1995.

SMITH, J. B. et al. Identification of the glycation site of lens  $\gamma$ B-crystallin by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, 1996.

SOEDIONO, B. **Python**. [s.l.: s.n.].

SRINIVAS, P. et al. Importance of eye lens  $\alpha$ -crystallin heteropolymer with 3:1  $\alpha$ A to  $\alpha$ B ratio: stability, aggregation, and modifications. **IUBMB life**, v. 62, n. 9, p. 693–702, set. 2010.

SRINIVAS, P. N. B. S.; REDDY, P. Y.; REDDY, G. B. Significance of  $\alpha$ -crystallin heteropolymer with a 3:1  $\alpha$ A/  $\alpha$ B ratio: Chaperone-like activity, structure and hydrophobicity. **Biochemical Journal**, 2008a.

SRINIVAS, P. N. B. S.; REDDY, P. Y.; REDDY, G. B. Significance of  $\alpha$ -crystallin heteropolymer with a 3:1  $\alpha$ A/ $\alpha$ B ratio: chaperone-like activity, structure and hydrophobicity. **Biochemical Journal**, v. 414, n. 3, p. 453–460, 15 set. 2008b.

STROUS, G. J. A. M.; VAN WESTREENEN, H.; BLOEMENDAL, H. Synthesis of Lens Protein in vitro N-Terminal Acetylation of  $\alpha$ -Crystallin. **European Journal of Biochemistry**, 1973.

SUN, J. K. et al. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. **Journal of Experimental Botany**, 2006.

SUSANTO, A. et al. Spred negatively regulates lens growth by modulating epithelial cell proliferation and fiber differentiation. **Experimental Eye Research**, 2019.

- TAKATA, T. et al. Deamidation destabilizes and triggers aggregation of a lens protein,  $\beta$ A3-crystallin. **Protein Science**, 2008.
- TAKEMOTO, L. J. Differential phosphorylation of Alpha-A crystallin in human lens of different age. **Experimental Eye Research**, v. 62, n. 5, p. 499–503, 1996.
- TAKEMOTO, L. J. Quantitation of asparagine-101 deamidation from alpha-A crystallin during aging of the human lens. **Current Eye Research**, 2003.
- 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.
- THORESEN, S. I. et al. Diabetes mellitus and bilateral cataracts in a kitten. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, n. 2, p. 115–122, 2002.
- UNIPROT CONSORTIUM, T. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, 2018.
- VAN DAMME, P.; ARNESEN, T.; GEVAERT, K. **Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics**. FEBS Journal. **Anais...**2011
- VICART, P. et al. A missense mutation in the  $\alpha$ B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. **Nature Genetics**, v. 20, n. 1, p. 92–95, set. 1998.
- VOORTER, C. E. M. et al. The in vivo phosphorylation sites of bovine  $\alpha$ B-crystallin. **FEBS Letters**, v. 259, n. 1, p. 51–52, 1989.
- WANG, F. et al. Lens differentiation is controlled by the balance between PDGF and FGF signaling. **PLOS Biology**, 2019.
- WANG, K.; SPECTOR, A. The chaperone activity of bovine alpha crystallin. Interaction with other lens crystallins in native and denatured states. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13601–8, 6 maio 1994.
- WATSON, M. D.; LEE, J. C. Impact of N-Terminal Acetylation on  $\alpha$ -Synuclein Amyloid Formation. **Biophysical Journal**, 2019.
- WEEKS, S. D. et al. Molecular structure and dynamics of the dimeric human small heat shock protein HSPB6. **Journal of Structural Biology**, v. 185, n. 3, p. 342–354, mar. 2014.
- WEEKS, S. D. et al. Characterization of human small heat shock protein HSPB1  $\alpha$ -crystallin domain localized mutants associated with hereditary motor neuron diseases. **Scientific Reports**, 2018.
- WHITE, H. E. et al. Packing interactions in the eye-lens: Structural analysis, internal symmetry and lattice interactions of bovine  $\gamma$ IVa-crystallin. **Journal of Molecular Biology**, v. 207, n. 1, p. 217–235, 5 maio 1989.
- WILLIAMS, D. L. Oxidation, antioxidants and cataract formation: A literature review. **Veterinary Ophthalmology**, 2006.
- WILLIAMS, D. L.; HEATH, M. F.; WALLIS, C. Prevalence of canine cataract: Preliminary results of a cross-sectional study. **Veterinary Ophthalmology**, 2004.
- WILMARTH, P. A. et al. Age-related changes in human crystalline 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.

- WISTOW, G. et al. X-ray analysis of the eye lens protein  $\gamma$ -II crystallin at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 170, n. 1, p. 175–202, 15 out. 1983.
- YANSHOLE, L. V et al. Cataract-specific posttranslational modifications and changes in the composition of urea-soluble protein fraction from the rat lens. **Molecular vision**, 2013.
- YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual review of biomedical engineering**, 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.
- ZARINA, S.; ABBASI, A.; ZAIDI, Z. H. Primary structure of beta s-crystallin from human lens. **The Biochemical journal**, v. 287 ( Pt 2, p. 375–381, 1992.
- ZHAO, L. et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **Nature**, v. 523, n. 7562, p. 607–611, 22 jul. 2015.
- ZHAO, Y. et al. Proteome-transcriptome analysis and proteome remodeling in mouse lens epithelium and fibers. **Experimental Eye Research**, 2019.
- ZHENG, S.; DOUCETTE, A. A. Preventing N - and O -formylation of proteins when incubated in concentrated formic acid. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 7, p. 1059–1068, abr. 2016.
- ZHU, S. et al. The cataract-causing mutation G75V promotes  $\gamma$ S-crystallin aggregation by modifying and destabilizing the native structure. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 807–814, 2018.





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
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 50/2018, com o Projeto de Pesquisa intitulado, “**Caracterização das modificações pós-traducionais e variações das proteínas cristalinas alfa, beta e gama 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 10 de julho de 2018.

### CERTIFICATE

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that the 50/2018 Process, with the Research Project titled, “**Characterization of post-translational modifications and variations of the crystalline alpha, beta and gamma crystalline proteins 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 July 10, 2018.

  
Prof.<sup>a</sup> Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – 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*

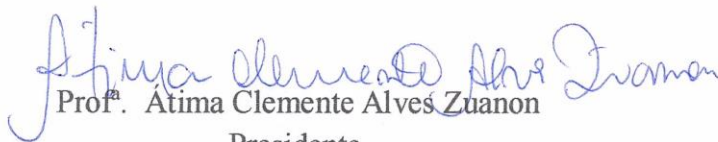
---

### 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. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV



## Algoritmo: Tratamento dos 'protein-peptides.csv' do PEAKS

```
#!/usr/bin/env python3
#-*-coding:utf8-*-

'''
Título: Tratamento dos 'protein-peptides.csv' do PEAKS
Função: Rearranjar a listagem de PTMs de várias amostras a
partir dos protein-peptides.csv exportado do PEAKS
Autor: Angelo B N Oliveira
Contato: angelobno@outlook.com
'''

# 1 - Le as expressões, como nomes de arquivos
import sys

# se houver erro na sintaxe
if len(sys.argv) == 1 or len(sys.argv) > 2:
    print ("Sintaxe 'python tratamento_protein-peptides.py [arquivo]\n")
    print ("Digite 'python tratamento_protein-peptides.py /h or /?' para ajuda \n")
    sys.exit()

arq = sys.argv[1]

# help
if arq == "/h" or arq == "/?":
    print("Sintaxe 'python tratamento_protein-peptides.py [arquivo]\n")
    print("A sintaxe [arquivo] deve conter o nome do arquivo \n\
que lista a localização dos arquivos 'protein-peptides.csv'\n")
    sys.exit()

# 2 - Abrindo o arquivo para leitura das localizações
file1 = open (arq)
# leitura das localizações dos arquivos '.csv'
files = file1.readlines()

# 3 - criando o arquivo output
file2 = open ("new-protein-peptides.csv","w+")
# Criaremos aqui um novo cabeçalho para adicionar as informações das PTMs
# como as PTMs individuais e suas posições
cabecalho = "Protein Group,Protein ID,Protein Accession,Peptide,\
Unique,-10lgP,Mass,Length,ppm,m/z,z,RT,Area Sample 1,Fraction,Scan,\
Source File,#Spec,#Spec Sample 1,Start,End,PTMS,PTM,Position(s)"
# Escrevendo o novo cabeçalho
file2.write(cabecalho)
file2.write("\n")

# 4 - Abrindo os arquivos '.csv' com base na localização
for subfile in files:
    file = subfile.split("\n")

    file3 = open (str(file[0]))
    lines = file3.readlines()
    # Apagando o antigo cabeçalho
    del lines[0]

    # lendo as linhas do arquivo '.csv'
    for line in lines:
        # eliminando a quebra de linha
        dados = line.split("\n")
```

```

# quebrando as linhas em vetores de dados
arrow = dados[0].split(',')

# registra a posição de início do peptídeo
start = int(arrow[18]) - 1
positions = []

# 5 - Separando as PTMs em um vetor de PTMs
if arrow[20] != "":
    PTMS = arrow[20].split('; ')

# abundância qualitativa de PTMs no peptídeo
nPTM = len(PTMS)
# print (PTMS)

# 6 - Relacionado as PTMs com sua posição

# registrando a sequência de peptídeos com as massas
# de cada PTM
peptide = arrow[3]

# quebrando a sequência de peptídeos em um vetor de
# subsequências finalizadas em uma PTM com
# a massa anotada desta PTM
sub_pep = peptide.split(',')
# descartando a última subsequência, que não possui PTM
sub_pep.pop()
# criando um vetor para anotação das massas das PTMs
mass_vec = []
# criando vetor para os resíduos relacionados as PTMs
end_seq = []
# O PEAKS lista qualitativamente as PTMS encontradas \
# no peptídeo. Temos que relacionar as PTMS com as \
# massas encontradas no segmento e anotar suas \
# posições. Criamos um vetor de massas únicas para \
# funcionar de índice
mass_arrow = []
# PTM_arrow = []

# separando onde a massa da PTM é anotada,
for sequencia in sub_pep:
    # separando a subsequência da massa da PTM
    fake_seq = sequencia.split("(")
    # anotando a massa da PTM no vetor de massas
    mass = fake_seq.pop()
    mass_vec.append(mass)
    # limpando o cabeçalho da primeira sequência
    # (se houver)
    seq = fake_seq[0].split(".")
    sub_seq = seq.pop()
    # anotando a posição da PTM
    pos_position = len(sub_seq)
    position = start + pos_position
    positions.append(position)
    start = position
    # anotando o resíduo relacionado a PTM
    if pos_position > 0:
        last_position = pos_position - 1
        last = sub_seq[last_position]

```

```

end_seq.append(last)

# Apagando o registro do ASCORE (inexistente)
del arrow[21]

npos = len(positions)

# anotando as PTMs em linhas separadas

# Quando a qu
# antidade de PTMs diverge da quantidade \
# de massas
if nPTM != npos:
    # em caso de apenas uma PTM em varias posicoes
    if nPTM == 1:
        for posicao in positions:
            PTM_pos = [str(PTMS[0]), str(posicao)]
            newline = ';'.join(arrow)+"+';'.join(PTM_pos)
            file2.write(newline)
            file2.write("\n")
            # print(PTM_pos)
    # em caso de duas ou mais PTMs listadas, divergindo \
    # do numero de posicoes
    else:

        n = 0
        # criaremos um vetor de massas alinhado com o \
        # de PTMS para criar um dicionario (ou indice)
        for mass_unity in mass_vec:
            # Verificamos que carbamidometilacao ocorre \
            # de duas maneiras em um mesmo peptideo, entao \
            # estas PTMS tem tratamento diferenciado
            if "Carbamidomethylation (DHKE X@N-term)" in PTMS \
            and "Carbamidomethylation" in PTMS:
                if mass_unity == "+57.02" and end_seq[n] != "C":
                    mass_unity = mass_unity+"*"

            # se a massa lida ja foi anotada:
            if mass_unity in mass_arrow:
                i = mass_arrow.index(mass_unity)
                PTM_pos = [str(PTMS[i]), str(positions[n])]
                newline = ';'.join(arrow)+"+';'.join(PTM_pos)
                file2.write(newline)
                file2.write("\n")
                n = n + 1
            # caso a massa lida ainda nao tenha sido anotada
            # anota-se no vetor de massas
            else:
                mass_arrow.append(mass_unity)
                i = mass_arrow.index(mass_unity)
                PTM_pos = [str(PTMS[i]), str(positions[n])]
                newline = ';'.join(arrow)+"+';'.join(PTM_pos)
                file2.write(newline)
                file2.write("\n")
                n = n + 1

# Quando a quantidade de PTM e igual a de massas
else:

```

```

# anotando as PTMs em linhas separadas
n = 0
for PTM in PTMS:
    PTM_pos = [PTM, str(positions[n])]
    newline = ', '.join(arrow)+"", '+', '.join(PTM_pos)
    n = n + 1
    file2.write(newline)
    file2.write("\n")
else:
    newline = ', '.join(arrow)
    file2.write(newline)
    file2.write("\n")

# print (positions)

file2.close()

# O ideal e levar o arquivo gerado (mixed-protein-peptides) \
# para um editor de planilhas e classificar de forma que \
# atenda a sua análise.
# lembre-se que é um csv separado por virgulas.

# fdp

```



Tabela 17 - Modificações pós-traducionais identificadas

<b>Modificações pós traducionais</b>	<b>Massa</b>	<b>Proteínas</b>
2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol N-metil carbamato	+58,03	$\alpha$ A, U $\gamma$ 1
Ácido 2-amino-3-oxobutanóico	-2,02	$\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ B1, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
4-hidroxi-nonenal (HNE)	+156,12	$\alpha$ A, $\beta$ A1, $\beta$ B3, $\gamma$ S
Acetilação (K)	+42,01	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B2
Acetilação (N-terminal)	+42,01	$\alpha$ A, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, U $\gamma$ 1
Acetilação (N-terminal da Proteína)	+42,01	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ B2
Acetilação (TSCYH)	+42,01	$\alpha$ A
Amidação	-0,98	$\alpha$ B, $\beta$ B2
Amidação de lisinas ou aminas N-terminais com metil-acetimidação	+41,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ B, $\gamma$ S
Aminoetilcisteína	+59,02	$\beta$ A1
Perda de Amônia (N)	-17,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Carbamidometilação	+57,02	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Carbamidometilação (DHKE X@N-terminal <sup>2</sup> )	+57,02	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Carbamilação	+43,01	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Carboxilação (DKW)	+43,99	$\alpha$ A, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Carboxilação (E)	+43,99	$\alpha$ A, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3
Carboximetil	+58,01	$\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B
Carboximetil (KW X@N-terminal)	+58,01	$\alpha$ A, $\beta$ A1, $\gamma$ A, $\gamma$ B, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Desamidação (NQ)	+0,98	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Desamidação seguida de metilação	+15,00	$\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B2
Desamidação seguida de esterificação com etanol	+29,04	$\beta$ B3
Desidratação	-18,01	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Destimetil	-48,00	$\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Dihidroxi	+31,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Aduto com dihidroxi-metilglioxal	+72,02	$\gamma$ B, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
EDT	+75,98	$\beta$ B1
Etilação	+28,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Fluorinação	+17,99	$\beta$ B3
Formilação	+27,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Formilação (N-terminal da Proteína)	+27,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ B1, $\gamma$ A, $\gamma$ S
Glioxal-derivado hidroimidazolona	+39,99	$\beta$ A4, $\beta$ B2, $\gamma$ A, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Hexosamina	+161,07	$\beta$ A4
Hidroxilação	+15,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Oxidação da lisina para semi-aldeído aminoalípico	-1,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B,
Derivativo de menadiona hidroquinona	+172,05	$\beta$ B2
Metil éster	+14,02	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Metilação	+14,02	$\alpha$ A, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\gamma$ A, $\gamma$ B, U $\gamma$ 1
Oxidação (HW)	+15,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Oxidação (M)	+15,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Fenil isotiocianato	+163,05	$\beta$ A4
Fosforilação (STY)	+79,97	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ B2, $\gamma$ S
Oxidação da Prolina para ácido piroglutâmico	+13,98	$\alpha$ A, $\beta$ B2
Propionamida	+71,04	$\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B
Propionamida (K X@N-terminal)	+71,04	$\beta$ A4, $\beta$ B2, $\gamma$ A
Piro-glu a partir de ac. glutâmico	-18,01	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1
Piro-glu a partir de glutamina	-17,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Quinona	+29,97	$\beta$ A1
Substituição de 2 prótons por cálcio	+37,95	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Substituição de próton com íon amônio	+17,03	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ B1, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Aduto com Sódio	+21,98	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A2, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1, U $\gamma$ 2
Sulfona	+31,99	$\alpha$ A, $\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\gamma$ A, $\gamma$ B, $\gamma$ S, U $\gamma$ 1
Oxidação do triptofano para hidroxikinurenina	+19,09	$\beta$ B3
Oxidação do triptofano para kinurenina	+3,99	$\alpha$ B, $\beta$ A1, $\beta$ A4, $\beta$ B1, $\beta$ B2, $\beta$ B3, $\gamma$ S
Oxidação do triptofano para oxolactona	+13,98	$\beta$ A1
Oxidação da tirosina a 2-aminotirosina	+15,01	$\beta$ A1

<sup>2</sup> O PEAKS define “X@N-terminal” como qualquer resíduo na posição N-terminal de peptídeo.

**ANEXO V**

Resultados com as frequências totais e relativas de espectros por posição e modificações pós-traducionais.

Tabela 18 - MPTs identificadas nas cristalina Alfa A [P68282]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	574	615	93,33%
Formylation (Protein N-term)	1	18	615	2,93%
Sulphone	1	11	615	1,79%
Carbamylation	1	7	615	1,14%
Carboxylation (DKW)	2	10	628	1,59%
Carbamylation	2	2	628	0,32%
Methyl ester	2	2	628	0,32%
Deamidation (NQ)	6	39	628	6,21%
Dihydroxy	8	4	628	0,64%
Hydroxylation	8	3	628	0,48%
Dihydroxy	9	9	628	1,43%
Carbamylation	11	18	628	2,87%
Formylation	11	6	628	0,96%
Sodium adduct	11	3	628	0,48%
Methyl ester	11	2	628	0,32%
Formylation (Protein N-term)	12	2	175	1,14%
Formylation (Protein N-term)	13	11	438	2,51%
Dihydroxy	16	11	438	2,51%
Hydroxylation	16	2	438	0,46%
Dihydroxy	17	2	438	0,46%
Hydroxylation	18	16	438	3,65%
Acetylation (TSCYH)	20	2	438	0,46%
Replacement of proton with ammonium ion	33	3	28	10,71%
Replacement of proton with ammonium ion	35	3	28	10,71%
Deamidation (NQ)	50	6	48	12,50%
Pyro-glu from Q	50	5	48	10,42%
Formylation	50	2	48	4,17%
Dehydration	51	7	48	14,58%
Formylation	55	30	467	6,42%
Carboxymethyl (KW X@N-term)	55	2	467	0,43%
Sodium adduct	58	8	467	1,71%
Hydroxylation	58	2	467	0,43%
Dehydration	59	9	467	1,93%
Phosphorylation (STY)	59	7	467	1,50%
Acetylation (TSCYH)	62	2	467	0,43%
Methyl ester	63	15	467	3,21%
Ethylation	63	11	467	2,36%
Methyl ester	65	2	467	0,43%
Formylation	66	24	545	4,40%
Carbamylation	66	19	545	3,49%
Acetylation (N-term)	66	2	545	0,37%
Formylation	69	2	626	0,32%
Carbamylation	70	67	626	10,70%
Formylation	70	4	626	0,64%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	70	3	626	0,48%
Formylation	71	7	987	0,71%
Carbamylation	71	5	987	0,51%
Sodium adduct	76	6	987	0,61%
Carbamylation	78	11	987	1,11%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	78	6	987	0,61%

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation	78	3	987	0,30%
Formylation	79	53	562	9,43%
Acetylation (N-term)	79	8	562	1,42%
4-hydroxynonenal (HNE)	79	2	562	0,36%
Dihydroxy	80	5	562	0,89%
Phosphorylation (STY)	81	2	562	0,36%
Methyl ester	83	16	562	2,85%
Ethylation	83	5	562	0,89%
Replacement of 2 protons by calcium	83	3	562	0,53%
Carboxylation (E)	83	2	562	0,36%
Sodium adduct	83	2	562	0,36%
Methyl ester	84	4	562	0,71%
Sodium adduct	84	4	562	0,71%
Replacement of 2 protons by calcium	84	3	562	0,53%
Carbamylation	88	29	562	5,16%
Formylation	88	6	562	1,07%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	88	5	562	0,89%
Lysine oxidation to aminoadipic semialdehyde	88	3	562	0,53%
4-hydroxynonenal (HNE)	88	2	562	0,36%
Acetylation (K)	88	2	562	0,36%
Dihydroxy	88	2	562	0,36%
Formylation	89	38	638	5,96%
Carbamylation	89	22	638	3,45%
Acetylation (N-term)	89	3	638	0,47%
Methyl ester	91	17	638	2,66%
Ethylation	91	6	638	0,94%
Hydroxylation	92	18	638	2,82%
Dehydration	92	5	638	0,78%
Methyl ester	92	3	638	0,47%
Dihydroxy	93	12	638	1,88%
Methyl ester	95	20	638	3,13%
Ethylation	95	11	638	1,72%
Replacement of 2 protons by calcium	95	8	638	1,25%
Sodium adduct	95	7	638	1,10%
Formylation	99	11	638	1,72%
Dihydroxy	99	9	638	1,41%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	99	7	638	1,10%
Carbamylation	99	5	638	0,78%
Acetylation (K)	99	4	638	0,63%
Formylation	100	58	392	14,80%
Deamidation (NQ)	101	121	392	30,87%
Ammonia-loss (N)	101	14	392	3,57%
Pyro-glu from Q	104	58	489	11,86%
Deamidation (NQ)	104	21	489	4,29%
Formylation	104	15	489	3,07%
Dehydration	105	11	489	2,25%
Sodium adduct	105	4	489	0,82%
Hydroxylation	105	2	489	0,41%
Dehydration	106	31	489	6,34%
Methyl ester	106	4	489	0,82%
Sodium adduct	106	3	489	0,61%
Hydroxylation	106	2	489	0,41%
Hydroxylation	109	14	489	2,86%
Dihydroxy	109	10	489	2,04%
Sodium adduct	112	2	489	0,41%
Formylation	118	3	310	0,97%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
Phosphorylation (STY)	118	2	310	0,65%
Formylation	120	2	464	0,43%
Phosphorylation (STY)	122	99	464	21,34%
Deamidation (NQ)	123	3	464	0,65%
Methyl ester	125	3	464	0,65%
Deamidation (NQ)	126	5	464	1,08%
Phosphorylation (STY)	127	2	464	0,43%
Methylation	132	3	464	0,65%
2 3-dihydro-2 2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate	134	5	464	1,08%
Replacement of proton with ammonium ion	136	8	464	1,72%
Methyl ester	136	5	464	1,08%
Replacement of 2 protons by calcium	136	3	464	0,65%
Sulphone	138	3	464	0,65%
Dihydroxy	141	2	464	0,43%
Formylation	146	36	370	9,73%
Dihydroxy	147	4	370	1,08%
Proline oxidation to pyroglutamic acid	147	3	370	0,81%
Phosphorylation (STY)	148	6	370	1,62%
Dehydration	148	3	370	0,81%
Replacement of 2 protons by calcium	151	5	370	1,35%
Dehydration	151	2	370	0,54%
Sodium adduct	151	2	370	0,54%
Phosphorylation (STY)	155	8	370	2,16%
Dehydration	155	5	370	1,35%
Acetylation (TSCYH)	155	3	370	0,81%
Methyl ester	156	53	370	14,32%
Ethylation	156	10	370	2,70%
Dihydroxy	157	10	370	2,70%
Methyl ester	157	4	370	1,08%
Formylation	158	5	127	3,94%
Dihydroxy	160	2	127	1,57%
Pyro-glu from E	164	6	69	8,70%
Formylation	164	4	69	5,80%
Methyl ester	164	3	69	4,35%
Carbamylation	164	2	69	2,90%
Methyl ester	165	3	69	4,35%
Carbamylation	166	3	69	4,35%
Ethylation	166	2	69	2,90%
Phosphorylation (STY)	172	3	69	4,35%
Sodium adduct	173	4	69	5,80%

Tabela 19 - MPTs identificadas nas cristalina Alfa B [M3WT79]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	207	221	93,67%
Formylation (Protein N-term)	1	12	221	5,43%
Sulphone	1	6	221	2,71%
Carbamylation	1	2	221	0,90%
Sodium adduct	2	2	226	0,88%
Dihydroxy	8	3	226	1,33%
Hydroxylation	8	3	226	1,33%
Dihydroxy	9	5	226	2,21%
Hydroxylation	11	3	226	1,33%
Formylation (Protein N-term)	12	13	236	5,51%
Dihydroxy	15	4	236	1,69%
Dihydroxy	16	3	236	1,27%
Hydroxylation	16	2	236	0,85%
Phosphorylation (STY)	19	44	236	18,64%
Phosphorylation (STY)	41	2	43	4,65%
Phosphorylation (STY)	45	6	43	13,95%
Formylation	57	5	280	1,79%
Dihydroxy	58	2	280	0,71%
Phosphorylation (STY)	59	44	280	15,71%
Dihydroxy	60	13	280	4,64%
Tryptophan oxidation to kynurenin	60	2	280	0,71%
Sodium adduct	62	10	280	3,57%
Replacement of 2 protons by calcium	62	3	280	1,07%
Methyl ester	67	6	280	2,14%
Sulphone	68	5	280	1,79%
Dethiomethyl	68	3	280	1,07%
Methyl ester	69	2	280	0,71%
Carbamylation	72	5	77	6,49%
Formylation	73	5	85	5,88%
Formylation	75	5	139	3,60%
Carbamylation	75	4	139	2,88%
Phosphorylation (STY)	76	3	139	2,16%
Deamidation (NQ)	78	8	139	5,76%
Sodium adduct	80	3	139	2,16%
Carbamylation	82	7	139	5,04%
Formylation	83	28	217	12,90%
Dihydroxy	86	2	217	0,92%
Hydroxylation	86	2	217	0,92%
Methyl ester	87	9	217	4,15%
Sodium adduct	87	3	217	1,38%
Ethylation	87	2	217	0,92%
Methyl ester	88	7	217	3,23%
Sodium adduct	88	4	217	1,84%
Ethylation	88	3	217	1,38%
Carbamylation	90	8	217	3,69%
Dihydroxy	90	3	217	1,38%
Amidation	90	2	217	0,92%
Carbamylation	91	12	115	10,43%
Carbamylation	92	8	115	6,96%
Formylation	93	20	219	9,13%
Carbamylation	93	5	219	2,28%
Hydroxylation	96	5	219	2,28%
Methyl ester	99	6	219	2,74%
Ethylation	99	3	219	1,37%
Sodium adduct	99	3	219	1,37%
Formylation	103	3	219	1,37%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
<b>Carbamylation</b>	103	2	219	0,91%
<b>Dihydroxy</b>	103	2	219	0,91%
<b>Formylation</b>	104	22	209	10,53%
<b>Methyl ester</b>	106	5	209	2,39%
<b>Ethylation</b>	106	2	209	0,96%
<b>Pyro-glu from Q</b>	108	26	208	12,50%
<b>Formylation</b>	108	9	208	4,33%
<b>Deamidation (NQ)</b>	108	7	208	3,37%
<b>Methyl ester</b>	110	11	208	5,29%
<b>Ethylation</b>	110	2	208	0,96%
<b>Dihydroxy</b>	113	2	208	0,96%
<b>Carbamylation</b>	121	3	21	14,29%
<b>Formylation</b>	124	4	165	2,42%
<b>Replacement of proton with ammonium ion</b>	129	2	165	1,21%
<b>Sodium adduct</b>	140	9	165	5,45%
<b>Replacement of proton with ammonium ion</b>	140	5	165	3,03%
<b>Dehydration</b>	140	4	165	2,42%
<b>Replacement of 2 protons by calcium</b>	140	3	165	1,82%
<b>Deamidation (NQ)</b>	146	76	165	46,06%
<b>Ammonia-loss (N)</b>	146	8	165	4,85%
<b>Carbamylation</b>	150	2	27	7,41%
<b>Carbamylation</b>	158	4	49	8,16%
<b>Formylation</b>	158	4	49	8,16%
<b>Pyro-glu from E</b>	164	16	118	13,56%
<b>Formylation</b>	164	9	118	7,63%
<b>Carbamylation</b>	164	4	118	3,39%
<b>Methyl ester</b>	164	3	118	2,54%
<b>Methyl ester</b>	165	5	118	4,24%
<b>Carbamylation</b>	166	9	118	7,63%
<b>Lysine oxidation to amino adipic semialdehyde</b>	166	7	118	5,93%
<b>Formylation</b>	166	5	118	4,24%
<b>Acetylation (K)</b>	166	2	118	1,69%
<b>Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate</b>	166	2	118	1,69%
<b>Carbamylation</b>	174	4	118	3,39%

Tabela 20 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A1 [M3WH19]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	1	17	22	77,27%
Formylation (Protein N-term)	1	2	22	9,09%
Methyl ester	2	2	22	9,09%
Deamidation (NQ)	4	2	22	9,09%
Carbamylation	18	3	42	7,14%
Carbamylation	32	3	42	7,14%
Formylation	33	11	205	5,37%
Hydroxylation	36	8	205	3,90%
Dihydroxy	36	7	205	3,41%
Dehydration	37	5	205	2,44%
Hydroxylation	37	3	205	1,46%
Deamidation (NQ)	38	4	205	1,95%
Methyl ester	39	7	205	3,41%
Ethylation	39	5	205	2,44%
Replacement of 2 protons by calcium	39	3	205	1,46%
Deamidation (NQ)	40	39	205	19,02%
Deamidation (NQ)	42	19	205	9,27%
Carbamylation	44	17	205	8,29%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	44	5	205	2,44%
Acetylation (K)	44	3	205	1,46%
Formylation	44	3	205	1,46%
Carbamylation	45	6	230	2,61%
Formylation	45	4	230	1,74%
Acetylation (N-term)	45	2	230	0,87%
Formylation	46	11	263	4,18%
Carbamylation	46	9	263	3,42%
Sulphone	46	7	263	2,66%
Dethiomethyl	46	5	263	1,90%
Methyl ester	47	5	263	1,90%
Ethylation	47	2	263	0,76%
Dihydroxy	48	2	263	0,76%
Methylation	51	5	263	1,90%
Dihydroxy	53	3	263	1,14%
Hydroxylation	53	2	263	0,76%
Deamidation (NQ)	54	22	263	8,37%
Hydroxylation	54	2	263	0,76%
Methyl ester	57	20	263	7,60%
Replacement of 2 protons by calcium	57	2	263	0,76%
Sodium adduct	57	2	263	0,76%
Dehydration	61	5	215	2,33%
Deamidation (NQ)	62	2	215	0,93%
Aminoethylcysteine	65	2	165	1,21%
Carbamylation	67	2	165	1,21%
Methyl ester	69	2	333	0,60%
Dihydroxy	73	2	333	0,60%
Tyrosine oxidation to 2-aminotyrosine	76	2	333	0,60%
Methyl ester	77	4	333	1,20%
Replacement of 2 protons by calcium	77	3	333	0,90%
Deamidation (NQ)	84	3	333	0,90%
Formylation	96	26	374	6,95%
Acetylation (N-term)	96	11	374	2,94%
Dihydroxy	96	6	374	1,60%
Hydroxylation	97	13	374	3,48%
Dehydration	97	9	374	2,41%
Methyl ester	97	5	374	1,34%

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Sodium adduct	97	4	374	1,07%
Dihydroxy	99	18	374	4,81%
Tryptophan oxidation to kynurenin	99	3	374	0,80%
Deamidation (NQ)	103	58	374	15,51%
Hydroxylation	103	2	374	0,53%
Hydroxylation	105	3	374	0,80%
Methyl ester	108	5	374	1,34%
Ethylation	108	2	374	0,53%
Sodium adduct	108	2	374	0,53%
Carbamylation	110	20	161	12,42%
Formylation	110	7	161	4,35%
Dethiomethyl	111	2	161	1,24%
Deamidation (NQ)	120	80	161	49,69%
Carbamylation	123	8	89	8,99%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	123	2	89	2,25%
Carbamylation	125	8	89	8,99%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	125	2	89	2,25%
Formylation	125	2	89	2,25%
Carbamylation	126	13	228	5,70%
Formylation	126	11	228	4,82%
Dihydroxy	129	5	228	2,19%
Replacement of 2 protons by calcium	130	4	228	1,75%
Ethylation	130	3	228	1,32%
Methyl ester	130	2	228	0,88%
Sodium adduct	130	2	228	0,88%
Formylation	131	7	228	3,07%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	131	6	228	2,63%
Carbamylation	131	3	228	1,32%
Acetylation (K)	131	2	228	0,88%
Carboxymethyl (KW X@N-term)	131	2	228	0,88%
Hydroxylation	131	2	228	0,88%
Formylation	132	4	215	1,86%
Pyro-glu from E	132	4	215	1,86%
Deamidation (NQ)	133	44	215	20,47%
Hydroxylation	133	4	215	1,86%
Ammonia-loss (N)	133	2	215	0,93%
Dihydroxy	134	2	215	0,93%
Replacement of proton with ammonium ion	140	3	33	9,09%
Replacement of proton with ammonium ion	143	2	33	6,06%
Acetylation (K)	162	2	33	6,06%
Formylation	163	8	138	5,80%
Methylation	163	6	138	4,35%
Deamidation (NQ)	164	7	138	5,07%
Dihydroxy	168	10	138	7,25%
Tryptophan oxidation to kynurenin	168	3	138	2,17%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	171	8	138	5,80%
Hydroxylation	171	2	138	1,45%
Phosphorylation (STY)	171	2	138	1,45%
Deamidation (NQ)	172	6	138	4,35%
Sodium adduct	177	4	138	2,90%
Formylation	178	23	222	10,36%
Carbamylation	178	10	222	4,50%
Hydroxylation	179	4	222	1,80%
Deamidation (NQ)	180	3	222	1,35%
Dihydroxy	181	10	222	4,50%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
Hydroxylation	181	9	222	4,05%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	181	2	222	0,90%
Methyl ester	184	7	222	3,15%
Ethylation	184	2	222	0,90%
Replacement of 2 protons by calcium	184	2	222	0,90%
Methyl ester	186	10	222	4,50%
Dehydration	186	3	222	1,35%
Hydroxylation	186	3	222	1,35%
Formylation	194	3	111	2,70%
Formylation	197	23	283	8,13%
Pyro-glu from E	197	17	283	6,01%
Acetylation (N-term)	197	7	283	2,47%
Sodium adduct	197	6	283	2,12%
Methyl ester	197	2	283	0,71%
Dihydroxy	198	27	283	9,54%
Tryptophan oxidation to kynurenin	198	6	283	2,12%
Quinone	198	3	283	1,06%
Tryptophan oxidation to oxolactone	198	3	283	1,06%
Carboxylation (DKW)	198	2	283	0,71%
Dehydration	200	11	283	3,89%
4-hydroxynonenal (HNE)	201	3	283	1,06%
Deamidation (NQ)	203	17	283	6,01%
Deamidation (NQ)	206	19	283	6,71%
Deamidation followed by a methylation	206	3	283	1,06%
Deamidation (NQ)	208	5	283	1,77%
Sodium adduct	211	2	283	0,71%

Tabela 21 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A2 [M3W7S8]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Acetylation (Protein N-term)	2	13	21	61,90%
Formylation	29	4	34	11,76%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	31	2	34	5,88%
Methyl ester	32	3	34	8,82%
Deamidation (NQ)	35	2	34	5,88%
Deamidation (NQ)	52	11	19	57,89%
Replacement of proton with ammonium ion	59	2	19	10,53%
Formylation	108	2	26	7,69%
Deamidation (NQ)	115	2	26	7,69%
Methyl ester	120	2	26	7,69%
Carbamylation	138	3	26	11,54%
Formylation	145	2	29	6,90%
Carboxylation (DKW)	150	2	29	6,90%
Dihydroxy	150	2	29	6,90%
Sodium adduct	159	3	29	10,34%
Formylation	160	2	29	6,90%
Hydroxylation	161	2	29	6,90%
Deamidation (NQ)	162	3	29	10,34%
Methyl ester	166	4	29	13,79%
Formylation	170	4	20	20,00%
Deamidation (NQ)	176	10	54	18,52%
Formylation	176	10	54	18,52%
Replacement of 2 protons by calcium	179	2	54	3,70%
Deamidation (NQ)	183	4	54	7,41%

Tabela 22 - MPTs identificadas nas cristalina Beta A4 [M3WDS9]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation	28	7	182	3,85%
Dihydroxy	31	4	182	2,20%
Tryptophan oxidation to kynurenin	31	3	182	1,65%
Sodium adduct	32	2	182	1,10%
Replacement of 2 protons by calcium	34	2	182	1,10%
Deamidation (NQ)	37	14	182	7,69%
Formylation	40	8	177	4,52%
Glyoxal-derived hydroimidazolone	40	2	177	1,13%
Formylation	41	7	193	3,63%
Acetylation (N-term)	41	2	193	1,04%
Phenethyl isothiocyanate	41	2	193	1,04%
Methyl ester	42	5	193	2,59%
Methyl ester	46	7	193	3,63%
Dihydroxy	48	2	193	1,04%
Replacement of 2 protons by calcium	52	3	193	1,55%
Ethylation	52	2	193	1,04%
Methyl ester	52	2	193	1,04%
Methyl ester	56	4	193	2,07%
Carbamylation	62	4	8	50,00%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	62	2	8	25,00%
Formylation	63	2	259	0,77%
Tryptophan oxidation to kynurenin	68	4	259	1,54%
Dihydroxy	68	3	259	1,16%
Sodium adduct	72	4	259	1,54%
Replacement of 2 protons by calcium	72	2	259	0,77%
Deamidation (NQ)	77	3	259	1,16%
Formylation	86	4	113	3,54%
Methyl ester	87	3	113	2,65%
Hydroxylation	88	2	113	1,77%
Replacement of 2 protons by calcium	92	5	113	4,42%
Hydroxylation	92	2	113	1,77%
Tryptophan oxidation to kynurenin	94	2	113	1,77%
Deamidation (NQ)	97	31	113	27,43%
Dehydration	103	2	113	1,77%
Formylation	105	12	122	9,84%
Dihydroxy	108	2	122	1,64%
Hydroxylation	109	4	122	3,28%
Dihydroxy	110	3	122	2,46%
Methylation	112	8	122	6,56%
Deamidation (NQ)	115	48	122	39,34%
Deamidation followed by a methylation	115	2	122	1,64%
Hydroxylation	115	2	122	1,64%
Methyl ester	117	2	122	1,64%
Formylation	121	12	173	6,94%
Propionamide (K X@N-term)	121	2	173	1,16%
Sodium adduct	125	4	173	2,31%
Methyl ester	125	3	173	1,73%
Deamidation (NQ)	126	7	173	4,05%
Methyl ester	127	7	173	4,05%
Replacement of 2 protons by calcium	127	4	173	2,31%
Ethylation	127	3	173	1,73%
Deamidation (NQ)	128	36	173	20,81%
Hexosamine	128	2	173	1,16%
Hydroxylation	128	2	173	1,16%
Acetylation (K)	133	2	48	4,17%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
<b>Formylation</b>	173	11	122	9,02%
<b>Carbamylation</b>	173	3	122	2,46%
<b>Deamidation (NQ)</b>	175	2	122	1,64%
<b>Dihydroxy</b>	176	4	122	3,28%
<b>Hydroxylation</b>	176	4	122	3,28%
<b>Methyl ester</b>	179	4	122	3,28%
<b>Ethylation</b>	179	2	122	1,64%
<b>Methyl ester</b>	181	5	122	4,10%
<b>Dehydration</b>	181	3	122	2,46%
<b>Hydroxylation</b>	181	2	122	1,64%
<b>Formylation</b>	189	2	56	3,57%
<b>Formylation</b>	192	17	131	12,98%
<b>Pyro-glu from E</b>	192	10	131	7,63%
<b>Dihydroxy</b>	193	10	131	7,63%
<b>Dehydration</b>	195	5	131	3,82%
<b>Deamidation (NQ)</b>	198	7	131	5,34%
<b>Deamidation (NQ)</b>	201	3	131	2,29%
<b>Deamidation (NQ)</b>	203	5	131	3,82%

Tabela 23 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B1 [M3WDS8]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation (Protein N-term)	7	4	31	12,90%
Deamidation (NQ)	14	19	31	61,29%
Formylation	71	11	122	9,02%
Ethylation	72	2	161	1,24%
Formylation	72	2	161	1,24%
Methyl ester	73	7	161	4,35%
Ethylation	73	3	161	1,86%
Dihydroxy	74	5	161	3,11%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	75	3	161	1,86%
Methyl ester	77	18	161	11,18%
Sodium adduct	77	3	161	1,86%
Ethylation	77	2	161	1,24%
Deamidation (NQ)	80	11	161	6,83%
Formylation	91	2	115	1,74%
Hydroxylation	98	7	115	6,09%
Dihydroxy	98	5	115	4,35%
Carboxylation (DKW)	99	2	115	1,74%
Methyl ester	103	5	115	4,35%
Replacement of 2 protons by calcium	103	5	115	4,35%
Sodium adduct	103	5	115	4,35%
Ethylation	103	2	115	1,74%
Deamidation (NQ)	104	4	115	3,48%
Deamidation (NQ)	106	3	115	2,61%
Methyl ester	108	2	115	1,74%
Carbamylation	109	13	138	9,42%
Formylation	109	4	138	2,90%
Carboxylation (E)	110	2	138	1,45%
Methyl ester	110	2	138	1,45%
Dethiomethyl	111	6	138	4,35%
Sulphone	111	6	138	4,35%
Methyl ester	115	3	138	2,17%
Carbamylation	116	11	138	7,97%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	116	4	138	2,90%
Formylation	122	8	74	10,81%
Acetylation (N-term)	122	2	74	2,70%
Hydroxylation	123	4	74	5,41%
Dehydration	123	3	74	4,05%
Sodium adduct	123	2	74	2,70%
Dihydroxy	125	7	74	9,46%
Tryptophan oxidation to kynurenin	125	2	74	2,70%
Formylation	131	2	9	22,22%
Carbamylation	134	11	64	17,19%
Formylation	134	6	64	9,38%
Sulphone	135	2	64	3,13%
Formylation	141	3	64	4,69%
Carbamylation	142	4	32	12,50%
Deamidation (NQ)	145	2	32	6,25%
Formylation	149	7	93	7,53%
Methylation	149	5	93	5,38%
Dihydroxy	152	3	93	3,23%
Sodium adduct	153	3	93	3,23%
Deamidation (NQ)	156	10	93	10,75%
Carbamylation	159	4	67	5,97%
Deamidation (NQ)	165	8	67	11,94%
Methyl ester	167	3	67	4,48%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
<b>Replacement of proton with ammonium ion</b>	168	3	67	4,48%
<b>EDT</b>	183	2	2	100,00%
<b>Formylation</b>	186	15	103	14,56%
<b>Dihydroxy</b>	191	19	103	18,45%
<b>Tryptophan oxidation to kynurenin</b>	191	3	103	2,91%
<b>Hydroxylation</b>	194	4	103	3,88%
<b>Deamidation (NQ)</b>	195	3	103	2,91%
<b>Formylation</b>	201	10	173	5,78%
<b>Hydroxylation</b>	202	8	173	4,62%
<b>Deamidation (NQ)</b>	203	7	173	4,05%
<b>Methyl ester</b>	207	6	173	3,47%
<b>Replacement of 2 protons by calcium</b>	207	6	173	3,47%
<b>Sodium adduct</b>	207	6	173	3,47%
<b>Ethylation</b>	207	3	173	1,73%
<b>Ethylation</b>	210	6	173	3,47%
<b>Methyl ester</b>	210	5	173	2,89%
<b>Formylation</b>	213	20	204	9,80%
<b>Deamidation (NQ)</b>	215	23	204	11,27%
<b>Hydroxylation</b>	215	2	204	0,98%
<b>Methyl ester</b>	216	2	204	0,98%
<b>Replacement of 2 protons by calcium</b>	216	2	204	0,98%
<b>Sodium adduct</b>	216	2	204	0,98%
<b>Dihydroxy</b>	217	9	204	4,41%
<b>Deamidation (NQ)</b>	221	9	204	4,41%
<b>Deamidation (NQ)</b>	223	11	204	5,39%
<b>Deamidation (NQ)</b>	234	6	18	33,33%
<b>Pyro-glu from E</b>	238	6	49	12,24%
<b>Methyl ester</b>	238	3	49	6,12%
<b>Replacement of 2 protons by calcium</b>	238	2	49	4,08%
<b>Methyl ester</b>	247	2	49	4,08%
<b>Sodium adduct</b>	247	2	49	4,08%
<b>Carbamylation</b>	250	5	49	10,20%

Tabela 24 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B2 [M3WJG9]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Dethiomethyl	1	2	2	100,00%
Acetylation (Protein N-term)	2	119	126	94,44%
Carbamylation	2	2	126	1,59%
Dehydration	3	6	126	4,76%
Phosphorylation (STY)	3	2	126	1,59%
Sodium adduct	4	3	126	2,38%
Deamidation (NQ)	6	5	126	3,97%
Deamidation (NQ)	8	16	126	12,70%
Carbamylation	11	13	126	10,32%
Formylation	11	6	126	4,76%
Carboxylation (DKW)	11	2	126	1,59%
Dihydroxy	11	2	126	1,59%
Dihydroxy	12	2	126	1,59%
Deamidation (NQ)	13	4	126	3,17%
Formylation	18	2	126	1,59%
Deamidation (NQ)	24	11	100	11,00%
Methyl ester	25	2	100	2,00%
Deamidation (NQ)	26	11	100	11,00%
Methyl ester	33	2	100	2,00%
Methyl ester	42	4	100	4,00%
Carbamylation	42	2	100	2,00%
Carbamylation	48	2	23	8,70%
Formylation	49	2	108	1,85%
Deamidation (NQ)	55	3	108	2,78%
Sodium adduct	63	5	108	4,63%
Methyl ester	63	3	108	2,78%
Deamidation (NQ)	64	7	108	6,48%
Deamidation (NQ)	66	18	108	16,67%
Methylation	68	6	108	5,56%
Methyl ester	68	5	108	4,63%
Formylation	69	10	124	8,06%
Ethylation	69	5	124	4,03%
Carbamylation	69	2	124	1,61%
Methyl ester	70	4	124	3,23%
Dihydroxy	72	2	124	1,61%
Methyl ester	75	3	124	2,42%
Sodium adduct	75	3	124	2,42%
Carbamylation	76	6	124	4,84%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	76	3	124	2,42%
Formylation	76	2	124	1,61%
Hydroxylation	79	2	76	2,63%
Hydroxylation	80	2	76	2,63%
Dihydroxy	82	7	113	6,19%
Formylation	82	7	113	6,19%
Carboxylation (DKW)	82	2	113	1,77%
Hydroxylation	83	7	113	6,19%
Dehydration	83	3	113	2,65%
Carboxylation (DKW)	83	2	113	1,77%
Sodium adduct	83	2	113	1,77%
Dihydroxy	85	15	113	13,27%
Tryptophan oxidation to kynurenin	85	3	113	2,65%
Formylation	90	15	199	7,54%
Glyoxal-derived hydroimidazolone	90	2	199	1,01%
Carbamylation	91	12	325	3,69%
Formylation	91	11	325	3,38%

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Dehydration	91	2	325	0,62%
Dehydration	92	5	325	1,54%
Phosphorylation (STY)	93	19	325	5,85%
Dehydration	93	6	325	1,85%
Proline oxidation to pyroglutamic acid	99	6	325	1,85%
Dihydroxy	99	4	325	1,23%
Carbamylation	101	18	325	5,54%
Formylation	101	13	325	4,00%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	101	2	325	0,62%
Dihydroxy	101	2	325	0,62%
Deamidation (NQ)	105	9	218	4,13%
Methyl ester	106	3	218	1,38%
Replacement of 2 protons by calcium	106	2	218	0,92%
Carbamylation	108	14	218	6,42%
Formylation	109	11	234	4,70%
Carbamylation	109	3	234	1,28%
Hydroxylation	112	8	234	3,42%
Methyl ester	113	9	234	3,85%
Ethylation	113	5	234	2,14%
Sodium adduct	113	4	234	1,71%
Deamidation (NQ)	114	3	234	1,28%
Deamidation (NQ)	116	30	234	12,82%
Formylation	120	8	234	3,42%
Carbamylation	120	6	234	2,56%
Carbamylation	121	15	230	6,52%
Carboxylation (DKW)	121	8	230	3,48%
Formylation	121	6	230	2,61%
Acetylation (K)	121	4	230	1,74%
Amidation	121	4	230	1,74%
Acetylation (N-term)	121	3	230	1,30%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	121	2	230	0,87%
Propionamide (K X@N-term)	121	2	230	0,87%
Carbamylation	122	9	290	3,10%
Sulphone	122	9	290	3,10%
Formylation	122	8	290	2,76%
Dethiomethyl	122	6	290	2,07%
Ethylation	122	3	290	1,03%
Methyl ester	123	7	290	2,41%
Carboxylation (E)	123	2	290	0,69%
Replacement of 2 protons by calcium	128	3	290	1,03%
Deamidation (NQ)	138	5	290	1,72%
Carbamylation	140	8	290	2,76%
Formylation	146	18	175	10,29%
Deamidation (NQ)	147	4	175	2,29%
Deamidation followed by a methylation	147	2	175	1,14%
Dihydroxy	151	15	175	8,57%
Tryptophan oxidation to kynurenin	151	11	175	6,29%
Hydroxylation	154	2	175	1,14%
Deamidation followed by a methylation	155	2	175	1,14%
Hydroxylation	156	2	175	1,14%
Hydroxylation	157	3	175	1,71%
Hydroxylation	159	3	175	1,71%
Sodium adduct	160	4	175	2,29%
Formylation	161	20	133	15,04%
Carbamylation	161	3	133	2,26%
Deamidation (NQ)	163	6	133	4,51%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
Hydroxylation	164	6	133	4,51%
Dihydroxy	164	5	133	3,76%
Methyl ester	167	7	133	5,26%
Sodium adduct	167	5	133	3,76%
Ethylation	167	3	133	2,26%
Carbamylation	168	11	133	8,27%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	168	2	133	1,50%
Formylation	168	2	133	1,50%
Menadione hydroquinone derivative	168	2	133	1,50%
Formylation	169	14	247	5,67%
Dehydration	170	3	247	1,21%
Hydroxylation	171	6	247	2,43%
Formylation	172	11	247	4,45%
Carbamylation	172	5	247	2,02%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	172	2	247	0,81%
Formylation	173	5	301	1,66%
Dehydration	173	2	301	0,66%
Dehydration	174	2	301	0,66%
Hydroxylation	176	6	301	1,99%
Sodium adduct	176	6	301	1,99%
Replacement of 2 protons by calcium	176	5	301	1,66%
Dihydroxy	177	3	301	1,00%
Dihydroxy	180	2	301	0,66%
Hydroxylation	180	2	301	0,66%
Deamidation (NQ)	183	18	301	5,98%
Deamidation (NQ)	185	4	301	1,33%
Formylation	190	13	149	8,72%
Carbamylation	190	6	149	4,03%
Carbamylation	192	4	213	1,88%
Formylation	192	4	213	1,88%
Carboxylation (DKW)	192	3	213	1,41%
Methyl ester	192	3	213	1,41%
Sulphone	193	8	213	3,76%
Dethiomethyl	193	2	213	0,94%
Deamidation (NQ)	194	7	213	3,29%
Dihydroxy	195	12	213	5,63%
Deamidation (NQ)	197	5	213	2,35%
Deamidation (NQ)	205	5	13	38,46%

Tabela 25 - MPTs identificadas nas cristalina Beta B3 [M3WJG8]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation	74	2	31	6,45%
Carboxymethyl	75	3	96	3,13%
Formylation	75	3	96	3,13%
Propionamide	75	3	96	3,13%
Methyl ester	76	10	96	10,42%
Dehydration	78	2	96	2,08%
Methyl ester	80	7	96	7,29%
Deamidation (NQ)	83	7	96	7,29%
Ammonia-loss (N)	83	6	96	6,25%
Sodium adduct	86	2	96	2,08%
Formylation	92	10	162	6,17%
Deamidation (NQ)	96	9	162	5,56%
Replacement of 2 protons by calcium	98	7	162	4,32%
Sodium adduct	98	7	162	4,32%
Ethylation	98	5	162	3,09%
Methyl ester	98	4	162	2,47%
Dihydroxy	101	2	162	1,23%
Hydroxylation	101	2	162	1,23%
Dihydroxy	102	4	162	2,47%
Tryptophan oxidation to kynurenin	102	4	162	2,47%
Formylation	109	4	81	4,94%
Formylation	112	4	125	3,20%
Deamidation (NQ)	114	6	125	4,80%
Dihydroxy	115	7	125	5,60%
Ethylation	118	3	125	2,40%
Methyl ester	118	2	125	1,60%
Carbamylation	119	6	125	4,80%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	119	3	125	2,40%
Hydroxylation	122	2	41	4,88%
Deamidation (NQ)	130	7	34	20,59%
Formylation	152	7	75	9,33%
Dihydroxy	155	2	75	2,67%
Methyl ester	156	6	75	8,00%
Ethylation	156	2	75	2,67%
Sodium adduct	156	2	75	2,67%
Deamidation (NQ)	157	2	75	2,67%
Carbamylation	164	22	168	13,10%
Formylation	164	6	168	3,57%
Acetylation (N-term)	164	4	168	2,38%
Carboxylation (DKW)	164	3	168	1,79%
Formylation	165	8	242	3,31%
Carbamylation	165	4	242	1,65%
Dethiomethyl	165	2	242	0,83%
Methyl ester	166	8	242	3,31%
Carboxylation (E)	166	2	242	0,83%
Replacement of 2 protons by calcium	169	3	242	1,24%
Methyl ester	169	2	242	0,83%
Dehydration	170	3	242	1,24%
Methyl ester	170	3	242	1,24%
Methyl ester	171	2	242	0,83%
Sodium adduct	171	2	242	0,83%
Deamidation (NQ)	181	6	242	2,48%
Formylation	189	7	123	5,69%
Deamidation (NQ)	191	89	123	72,36%
Ammonia-loss (N)	191	8	123	6,50%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
<b>Dihydroxy</b>	194	4	123	3,25%
<b>Fluorination</b>	194	2	123	1,63%
<b>Methyl ester</b>	198	13	123	10,57%
<b>Sodium adduct</b>	198	12	123	9,76%
<b>Methyl ester</b>	203	2	123	1,63%
<b>Formylation</b>	204	2	8	25,00%
<b>Pyro-glu from Q</b>	206	8	46	17,39%
<b>Formylation</b>	206	4	46	8,70%
<b>Hydroxylation</b>	207	3	46	6,52%
<b>Dihydroxy</b>	207	2	46	4,35%
<b>Methyl ester</b>	210	3	46	6,52%
<b>Formylation</b>	216	34	203	16,75%
<b>4-hydroxynonenal (HNE)</b>	216	4	203	1,97%
<b>Acetylation (N-term)</b>	216	2	203	0,99%
<b>Deamidation (NQ)</b>	218	27	203	13,30%
<b>Methyl ester</b>	219	5	203	2,46%
<b>Dihydroxy</b>	220	10	203	4,93%
<b>Tryptophan oxidation to hydroxykynurenin</b>	220	2	203	0,99%
<b>Hydroxylation</b>	221	7	203	3,45%
<b>Sodium adduct</b>	221	7	203	3,45%
<b>Replacement of 2 protons by calcium</b>	221	4	203	1,97%
<b>Methyl ester</b>	221	2	203	0,99%
<b>Deamidation (NQ)</b>	223	8	203	3,94%
<b>Deamidation followed by esterification with ethanol</b>	223	2	203	0,99%
<b>Deamidation (NQ)</b>	224	8	203	3,94%
<b>Deamidation (NQ)</b>	226	20	203	9,85%
<b>Deamidation (NQ)</b>	228	3	203	1,48%
<b>Deamidation (NQ)</b>	236	3	7	42,86%
<b>Carbamylation</b>	237	2	7	28,57%

Tabela 26 - MPTs identificadas nas cristalina Gama A [M3W1B5]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Propionamide (K X@N-term)	1	3	6	50,00%
Formylation	79	2	22	9,09%
Methyl ester	106	2	28	7,14%
Methyl ester	112	2	28	7,14%
Deamidation (NQ)	136	3	33	9,09%
Formylation	152	4	33	12,12%
Sulphone	158	3	33	9,09%

Tabela 27 - MPTs identificadas nas cristalina Gama B [M3W1B4]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation	118	3	19	15,79%
Formylation	122	3	82	3,66%
Carbamylation	122	2	82	2,44%
Methyl ester	123	2	82	2,44%
Formylation	126	5	121	4,13%
Carbamylation	126	4	121	3,31%
Deamidation (NQ)	127	6	121	4,96%
Methyl ester	133	2	121	1,65%
Methyl ester	134	11	121	9,09%
Formylation	142	4	68	5,88%
Deamidation (NQ)	145	3	68	4,41%
Pyro-glu from Q	169	33	125	26,40%
Formylation	169	11	125	8,80%
Deamidation (NQ)	169	6	125	4,80%
Hydroxylation	170	4	125	3,20%
Dihydroxy	173	2	125	1,60%
Methyl ester	176	5	125	4,00%
Hydroxylation	177	2	125	1,60%
Formylation	180	9	128	7,03%
Carbamylation	180	4	128	3,13%
Dihydroxy	183	6	128	4,69%
Carboxylation (DKW)	183	2	128	1,56%
Dethiomethyl	186	4	128	3,13%
Sulphone	186	3	128	2,34%
Deamidation (NQ)	187	17	128	13,28%
Carbamylation	189	27	128	21,09%
Sodium adduct	189	3	128	2,34%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	189	2	128	1,56%

Tabela 28 - MPTs identificadas nas cristalina Gama S [M3W1B5]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation (Protein N-term)	20	8	71	11,27%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	21	3	71	4,23%
Methyl ester	24	2	71	2,82%
Dehydration	29	2	71	2,82%
Dihydroxy	30	2	71	2,82%
Sodium adduct	51	3	107	2,80%
Deamidation (NQ)	54	13	107	12,15%
Sulphone	59	3	107	2,80%
Formylation	65	9	182	4,95%
Ethylation	65	2	182	1,10%
Methyl ester	66	6	182	3,30%
Hydroxylation	67	4	182	2,20%
Methyl ester	69	5	182	2,75%
Sodium adduct	69	2	182	1,10%
Dihydroxy	70	2	182	1,10%
Deamidation (NQ)	71	7	182	3,85%
Dihydroxy	73	5	182	2,75%
Carboxylation (DKW)	73	2	182	1,10%
Sulphone	74	5	182	2,75%
Deamidation (NQ)	77	55	182	30,22%
Dehydration	78	3	182	1,65%
2-amino-3-oxo-butanoic_acid	82	4	11	36,36%
Formylation	85	5	83	6,02%
Phosphorylation (STY)	89	4	83	4,82%
Deamidation (NQ)	93	9	83	10,84%
Hydroxylation	94	4	83	4,82%
Carbamylation	95	13	83	15,66%
Formylation	95	4	83	4,82%
Sodium adduct	95	3	83	3,61%
Formylation	96	3	37	8,11%
Deamidation (NQ)	97	2	37	5,41%
Dihydroxy	99	2	37	5,41%
Methyl ester	100	5	37	13,51%
Sodium adduct	100	2	37	5,41%
Deamidation (NQ)	105	27	69	39,13%
Deamidation (NQ)	107	18	69	26,09%
Deamidation (NQ)	121	15	69	21,74%
Carbamylation	131	10	25	40,00%
Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate	131	2	25	8,00%
Formylation	131	2	25	8,00%
Formylation	132	3	191	1,57%
Sodium adduct	134	4	191	2,09%
Dihydroxy	137	10	191	5,24%
Tryptophan oxidation to kynurenin	137	3	191	1,57%
Hydroxylation	140	2	191	1,05%
Methyl ester	141	5	191	2,62%
Replacement of 2 protons by calcium	141	4	191	2,09%
Ethylation	141	3	191	1,57%
Replacement of proton with ammonium ion	141	3	191	1,57%
Sodium adduct	141	3	191	1,57%
Deamidation (NQ)	144	15	191	7,85%
Hydroxylation	145	2	191	1,05%
Formylation	147	2	23	8,70%
Pyro-glu from Q	149	13	84	15,48%
Formylation	149	6	84	7,14%

<b>Modificação Pós-Traducional</b>	<b>Posição</b>	<b>EpP com aMPT</b>	<b>Espec. por posição</b>	<b>Freq. Relativa</b>
<b>Deamidation (NQ)</b>	149	3	84	3,57%
<b>Carbamylation</b>	149	2	84	2,38%
<b>Hydroxylation</b>	150	3	84	3,57%
<b>Carbamylation</b>	154	7	84	8,33%
<b>Carbamylation</b>	155	3	75	4,00%
<b>Carbamylation</b>	159	15	142	10,56%
<b>Formylation</b>	159	12	142	8,45%
<b>Amidination of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate</b>	159	4	142	2,82%
<b>4-hydroxynonenal (HNE)</b>	159	3	142	2,11%
<b>Dehydration</b>	162	2	142	1,41%
<b>Dihydroxy</b>	163	8	142	5,63%
<b>Tryptophan oxidation to kynurenin</b>	163	2	142	1,41%
<b>Phosphorylation (STY)</b>	167	4	142	2,82%
<b>2-amino-3-oxo-butanoic_acid</b>	167	2	142	1,41%
<b>Deamidation (NQ)</b>	171	9	142	6,34%

Tabela 29 - MPTs identificadas nas cristalina Gama Não-Characterizada [M3X7P2]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Formylation	32	3	15	20,00%
Carbamylation	40	9	109	8,26%
Acetylation (N-term)	40	3	109	2,75%
Methylation	50	2	109	1,83%
Formylation	56	7	43	16,28%
Dihydroxy	56	2	43	4,65%
Formylation	63	5	155	3,23%
Methyl ester	68	7	155	4,52%
Replacement of 2 protons by calcium	68	2	155	1,29%
Sodium adduct	68	2	155	1,29%
Carboxylation (DKW)	71	3	155	1,94%
Dihydroxy	74	3	155	1,94%
Hydroxylation	74	2	155	1,29%
Methyl ester	75	3	155	1,94%
Replacement of proton with ammonium ion	75	2	155	1,29%
Sulphone	76	4	155	2,58%
Deamidation (NQ)	78	28	155	18,06%
Deamidation (NQ)	80	7	155	4,52%
Pyro-glu from Q	83	22	89	24,72%
Formylation	83	8	89	8,99%
Deamidation (NQ)	83	6	89	6,74%
Hydroxylation	84	3	89	3,37%
Dehydration	84	2	89	2,25%
Ethylation	90	2	89	2,25%
Methyl ester	90	2	89	2,25%
Hydroxylation	91	2	89	2,25%
Formylation	93	2	72	2,78%
Formylation	94	6	132	4,55%
Dihydroxy	97	9	132	6,82%
Sodium adduct	101	2	132	1,52%
Carbamylation	103	9	132	6,82%
Formylation	132	3	22	13,64%
Carbamylation	219	2	31	6,45%
Carbamylation	223	3	61	4,92%
Formylation	223	2	61	3,28%
Deamidation (NQ)	224	7	61	11,48%
Methyl ester	230	2	61	3,28%
2 3-dihydro-2 2-dimethyl-7-benzofuranol N-methyl carbamate	253	2	36	5,56%
Formylation	276	9	59	15,25%

Tabela 30 - MPTs identificadas nas cristalina Gama Não-Characterizada [M3W1B7]

Modificação Pós-Traducional	Posição	EpP com aMPT	Espec. por posição	Freq. Relativa
Ethylation	184	3	13	23,08%