

Manuel Sebastián Rebollo Couto

**PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE
MYCOPLASMA SYNOVIAE
E
ESTUDOS PROTEÔMICOS DAS ASSOCIAÇÕES
MICORRÍZICAS ARBUSCULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis, 2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Rebollo Couto, Manuel Sebastián
PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE MYCOPLASMA SYNOVIAE E
ESTUDOS PROTEÔMICOS DAS ASSOCIAÇÕES MICORRÍZICAS
ARBUSCULARES [tese] / Manuel Sebastián Rebollo Couto ;
orientador, Hernán Terenzi - Florianópolis, SC, 2012. 210 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas. Programa de PósGraduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Secretoma. 3. Sanidade animal. 4. Agricultura. 5.
Mutualismo. I. Terenzi, Hernán. II.

Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de PósGraduação em Bioquímica. III. Título.

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOUVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado (a) adequado (a) para
obtenção do Título de "...", e aprovad (o)a em sua forma final pelo
Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a xxxx, Dr.^a
Corientadora
Universidade xxxx

Prof. xxxx, Dr.
Universidade xxxxxx

Dedico a Carin Perske.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado com recursos do (a) INBEB-CNPq, CAPES, CAPES-COFECUB, FAPESC, MCTI, FINEP e GENOPROT.

Agradeço ao Dr. Hernán Terenzi pela participação como orientador.

Agradeço à Dra. Eliane Dumas Gaudot pela contribuição como orientadora durante o período de Dezembro de 2008 a Dezembro de 2009 no Institute Nacional de la Recherche Agronomique (INRA) em Dijon, na França.

Meus sinceros agradecimentos a todos os colegas que contribuíram direta ou indiretamente, tornando este trabalho possível.

Gostaria de agradecer especialmente ao Dr. Luciano Huergo, à Dra. Eliane Dumas Gaudot e aos amigos Zhipeng Hao, Franck Robert e Tiago Bortolotto, que muito gentilmente prestaram grande contribuição com o trabalho prático e com a escrita deste trabalho.

“O estudo em geral, a busca da verdade e da
beleza são domínios em que nos é consentido ficar
crianças toda a vida.”

Albert Einstein

RESUMO

A presente tese de doutorado trata de estudos feitos através de uma abordagem proteômica em duas distintas áreas de ciência aplicada, a identificação de proteínas produzidas pela bactéria patogênica de frangos e perus *Mycoplasma synoviae* detectadas no ambiente extracelular e estudos das interações entre Fungos Micorrízicos Arbusculares (MA) e plantas. *M. synoviae* é uma bactéria pertencente à classe Mollicutes, formada por organismos procariontes desprovidos de parede celular, que causa sinovite infecciosa em aves de criação. Esse patógeno encontra-se distribuído por plantéis de aves do mundo inteiro e causa perdas econômicas por diminuir a taxa de crescimento, desvalorizar as carcaças no corte e aumentar os custos de produção. Sua prevenção se dá essencialmente através de cuidados no manejo, higiene nas instalações e uso de antibióticos. Em muitos microorganismos patogênicos, a virulência está associada a proteínas produzidas e secretadas por esses organismos, permitindo que o invasor instale-se no organismo hospedeiro, explore recursos necessários à sua sobrevivência e seja capaz de escapar dos mecanismos de defesa. Neste trabalho, proteínas presentes na fração extracelular de culturas de *M. synoviae* foram identificadas e comparadas com dados da literatura para verificar sua implicação com virulência de outros microorganismos. Com respeito a micorrização de raízes de plantas, foram feitas tentativas de se isolar proteínas membranares de células raízes de plantas micorrizadas e resolver essas proteínas através de eletroforese bidimensional (2DE), para posterior identificação por espectrometria de massa. Em seguida, discute-se avanços científicos no entendimento dos mecanismos bioquímicos desse tipo de interações promovidos por estudos sob uma abordagem proteômica na forma de revisão sobre o assunto. Fungos MA são microorganismos presentes no solo capazes de colonizar as raízes das plantas e penetrar nas células corticais mais internas deste órgão, onde se ramificam para gerar estruturas conhecidas como arbúsculos. Uma vez produzidos os arbúsculos, uma simbiose mutualística se estabelece, na qual a planta provê formas orgânicas de carbono derivadas da fotossíntese para o fungo, enquanto este auxilia a planta a absorver água e nutrientes minerais presentes no solo aumentando a área de absorção e a zona de exploração para um raio que excede amplamente a rizosfera. Relatos indicam que além de melhorar o status nutricional da planta, os fungos MA conferem ao vegetal proteção contra ataque de patógenos e alivia estresse causado por seca, salinidade ou presença de metais pesados no solo. Desse modo, há interesse no

estudo desse tipo de interação para manejo sustentável para se diminuir a utilização de pesticidas e fertilizantes químicos.

Palavras-chave: Aves, Frango, Patógenos, Sinovite, Secretoma, Infecção, Artrite aviária, Aerossaculite, MALDI-TOF, Espectrometria de massa, 2DE, Vegetais, Mutualismo, Fungos, Proteômica, Simbiose, Desenvolvimento sustentável, Agricultura.

ABSTRACT

The present doctoral thesis deals with studies carried out on two distinct areas of applied science having in common the use of a proteomic approach. These are the identification of proteins that are produced by the chicken pathogen *Mycoplasma synoviae* detected in the extracellular environment and studies of the interactions of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). *M. synoviae* is a bacteria that belongs to the class Mollicutes, comprising procariont organisms which lack cell wall, that cause infectious synovitis in poultry. This pathogen is found worldwide in bird flocks and causes economic losses because they retard growth, downgrade carcasses at slaughter and increases production costs. Prevention strategies rely mainly on poultry and housing management, and the usage of antibiotics. Many pathogenic microorganisms have their virulence associated to proteins that are produced and secreted by these organisms, allowing them to install into their hosts, explore host resources, and evade its defense mechanisms. In this work, proteins present in the extra-cellular fraction of *M. synoviae* cultures were identified and compared to literature data as to verify their implication in virulence in other microorganisms. Regarding the mycorrhization of plant roots, attempts to isolate root membrane proteins were made in order to resolve these proteins by two dimensional-electrophoresis (2DE) for later identification by mass spectrometry. Next we discuss scientific advances provided by proteomic studies in a review format on the subject. AM fungi are soil borne microorganisms able to colonize plant roots and penetrate into the inner cortical cells of these organs, where they branch to form structures known as arbuscules. Once the arbuscules are produced, a mutualistic symbiosis takes place, where the plant provides the fungi with organic forms of carbon derived from photosynthesis, while the fungus helps the plant to absorb water and mineral nutrients from the soil by increasing the depletion zone to a radius that by far exceeds the rhizosphere. Reports indicate that in addition to improve the plant nutritional status, AM fungi protects the plants against pathogen attacks and alleviates stress caused by drought, salt, or the presence of heavy metals in the soil. For these reasons, there is interest in the study of this kind of interaction for the development as agricultural inputs usage can be minimized.

Keywords: Birds, Poultry, Pathogens, Synovitis, Secretome, Infection, Disease, Avian arthritis, Airsaculitis, MALDI-TOF, Mass spectrometry,

2DE, Plants, Mutualism, Fungi, Proteomics, Symbiosis, Sustainable development, Agriculture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Foto de microscopia eletrônica de células de *Mycoplasma pneumoniae* (esquerda) (em: <<http://www.health-reply.com/mycoplasma-pneumoniae-infection/>>. Acesso em: 28 setembro 2012) e microscopia de luz de *Mycoplasma synoviae* (direita) (em: <<http://www.mycoplasma-exp.com/9829.htm>>. Acesso em: 28 setembro 2012).2
- Figura 2 – Pata de frango infectado por sinovite infecciosa (esquerda) (em: <<http://www.granjaonline.es/viewtopic.php?t=15298>>. Acesso em: 28 setembro 2012) e modo característico de sentar sobre o tornozelo de frango com artrite provocada por *Mycoplasma synoviae* (direita) (em: <<http://www.kashvet.org/oasis/tag/bird-flu/>>. Acesso em: 28 setembro 2012). ..3
- Figura 3 – Desenho esquemático mostrando as hifas de fungos micorrízicos arbusculares extrarradiculares, entre as células da epiderme e corticais externas das raízes e no interior das células corticais mais internas das raízes, onde formam-se os arbúsculos. Números indicam possíveis sítios de transporte de substâncias. O transporte de fosfato ocorre do solo para a hifa (1), atravessa a membrana do arbúsculo (2) e da membrana periarbuscular (3), enquanto o transporte de carbono possivelmente ocorra no arbúsculo (2) e nas hifas entre as células corticais (4). Modificado a partir de HARRISON e colaboradores (1999b). (HARRISON, 1999b).....14
- Figura 4: Marcadores de peso molecular molecular Precision Plus Protein Unstained Standards – Bio-Rad, com os pesos moleculares indicados em kDa.31
- Figura 5: Gráfico representativo de identificação positiva de proteína de *Mycoplasma synoviae* através do motor de pesquisa Mascot (fosfodiesterase de proteína carreadora de acil). A não ambiguidade da identificação é demonstrada pela diferença de score entre a proteína identificada (89) e as demais proteínas candidatas (detalhes na tabela 1).....34
- Figura 6: acoplamento do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à membrana de nitrocelulose para transferência de proteínas (Bio-Rad, 2010).35
- Figura 7: Membrana de nitrocelulose após a transferência corada com vermelho de Ponceau36
- Figura 8: Proteínas celulares de *M.ihyopneumoniae* 7448 (superior) e J (inferior) extraídas em tampão sem detergente. IEF realizada em gradiente imobilizado de pH de 13cm, pH 3-10. 300 µg de proteínas aplicadas em cada gel. Géis corados com Coomassie Blue.41

Figura 9: Proteínas celulares de <i>M.ihyopneumoniae</i> 7448 extraídas em tampão acrescido de CHAPS/NP-40 (superior) ou ASB-14 (inferior). IEF realizada em gradiente imobilizado de pH de 13cm, pH 3-10. 300 µg de proteínas aplicadas em cada gel. Géis corados com Coomassie Blue.....	42
Figura 10: Comparação de perfis bidimensionais de proteínas celulares de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 extraídas em ausência de detergente (superior) e em presença de CHAPS/NP-40 (inferior). Flechas finas indicam bandas presentes na fração extraída sem detergentes mas enriquecidas na extração subsequente em presença de CHAPS/NP-40. Flechas largas indicam proteínas presentes na fração extraída sem detergente e aparentemente ausentes na extração feitas em presença de CHAPS/NP-40.	43
Figura 11: Gel bidimensional representativo de meio Friis livre de proteínas incubado por 48h a 37°C em presença de <i>M. hyopneumoniae</i> 7448 (superior) e J (inferior). IEF realizada em gradients imobilizados de pH de 7cm de comprimento, pH 3-10. Coloração em Coomassie Blue.....	44
Figura 12: Setores de eletroforese bidimensional de proteínas celulares (a) e extracelulares (b) de <i>M. synoviae</i> . Figuras nos painéis superiores indicam similaridades entre os dois perfis. Painéis inferiores são cópias idênticas dos painéis superiores e observa-se em destaque proteínas presentes na fração extracelular não claramente detectadas na facção celular.	45
Figura 13 – Perfil de eletroforese bidimensional de fração extracelular de meio de cultura Frey livre de proteínas incubado com <i>M. synoviae</i> 52. Flechas numeradas correspondem a identidades de proteínas listadas na tabela 3.	48
Figura 14: Disposição das diferentes frações do microsoma após ultracentrifugação em gradiente de sacarose. I1: Interface entre as regiões contendo sacarose a 15% e a 33%. 33: região onde a concentração de sacarose é de 33%. I2: Interface entre as regiões contendo sacarose a 33% e a 38%. P: precipitado contendo as membranas internas da célula.	57
Figura 15: Perfil eletroforético de proteínas extraídas de raízes de <i>Medicago truncatula</i> ao longo das diversas etapas de fracionamento das membranas celulares. F1 : fração retirada da suspensão celular logo após a trituração das raízes em nitrogênio líquido e suspensão em tampão de trituração, F2 : fração retirada do sobrenadante após precipitação dos restos de paredes por centrifugação a 16.000 x g, M : fração microsomal, obtida por ultracentrifugação do sobrenadante da etapa anterior, I1, I2, 33 e P : frações obtidas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (Figura 15).	58

Figura 16: Frações (1-20) de focalização isoeétrica de proteínas microsomais de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) através do sistema Rotofor Bio-Rad.....	60
Figura 17: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 20µL de cada uma das frações 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16.....	61
Figura 18: géis de focalização isoeétrica (GE Healthcare Immobiline DryStrip pH 3-10, 7cm) de proteínas membranares de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%,IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após precipitação por acetona (A) ou submetidas a tratamento com Triton X-100 (sobrenadante) (B), Triton X-100 (precipitado) (C) ou carbonato (D). Grupos atribuídos a precipitação de proteínas não solúveis indicados por setas.	63
Figura 19: perfis de eletroforese bidimensionais de eletroforese em géis de poliacrilamida acoplados digitalmente aos respectivos géis de focalização isoeétrica (GE Healthcare Immobiline DryStrip pH 3-10, 7cm) de proteínas membranares de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após precipitação por acetona (A) ou submetidas a tratamento com Triton X-100 (sobrenadante) (B), Triton X-100 (precipitado) (C) ou carbonato (D).	64
Figura 20: perfis de eletroforese bidimensionais de eletroforese em géis de poliacrilamida de proteínas membranares de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%, PG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após tratamento com clorofórmio/metanol (5:4). Géis a partir das frações metanol (A), interface (B) e clorofórmio (C).	65
Figura 21: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Aplicação anódica de 80µL de amostra, contendo aproximadamente 50µg de proteínas da fração microsomal de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeétrica.....	67
Figura 22: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Aplicação convencional de 80µL de amostra, contendo aproximadamente 50µg de proteínas da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeétrica.....	68
Figura 23: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Aplicação catódica de 80µg (em 50µL de uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG	

2%) de proteínas da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica.	69
Figura 24: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 20µL de extrato de proteínas microsomais (aproximadamente 5µg de proteínas) de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.	71
Figura 25: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Aplicação de 100µL de amostra, contendo aproximadamente 42µg de proteínas da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica. A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.	72
Figura 26: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 16µL de extrato de proteínas microsomais (aproximadamente 10µg de proteínas) de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de carvão ativado na razão 1:5 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.	74
Figura 27: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Aplicação de 100µL de amostra, contendo aproximadamente 30µg de proteínas da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica. A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.	75
Figura 28: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em presença de carvão ativado e areia de Fontainebleau. Aplicação de 20µL de amostra contendo aproximadamente 14µg de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie (gel quebrado no processo de fixação e coloração).	77
Figura 29: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em presença de carvão ativado e areia de Fontainebleau. Aplicação de 100µL de amostra contendo aproximadamente 70µg de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.	78
Figura 30: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com carvão ativado em presença de areia de Fontainebleau.	

Aplicação de 2 μ L e 20 μ L do sobrenadante obtido na etapa de centrifugação dos detritos celulares (S (2) e S (20), respectivamente) e de 20 μ L da suspensão microsomal (M) contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas. Dois tratamentos digitais foram feitos na imagem para evidenciar as bandas observadas na fração S e na fração M (detalhe). Coloração em azul coloidal de Coomassie.....80

Figura 31: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com carvão ativado em presença de areia de Fontainebleau. Aplicação de 100 μ L de amostra contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.81

Figura 32: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com PVPP. Aplicação de 20 μ L da suspensão microsomal contendo aproximadamente 20 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.83

Figura 33: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com PVPP. Aplicação de 58 μ L de amostra contendo aproximadamente 40 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.84

Figura 34: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspendida em presença de PVPP. S1: alíquotas de 20 μ L de quatro das diluições seriadas (razões de diluição indicadas) do sobrenadante da ultracentrifugação após primeira solubilização da fração microsomal em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. S2: 20, 10 e 5 μ L do sobrenadante obtido após ressuspensão do precipitado da etapa anterior no mesmo tampão e ultracentrifugação. Coloração em azul coloidal de Coomassie.....86

Figura 35: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspendida em presença de PVPP. S3: Frações de 20 μ L obtido em se ressuspendendo o precipitado obtido da centrifugação na etapa anterior em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% e submetendo-se a suspensão a uma breve centrifugação (centrífuga de bancada, 10s) por três vezes sucessivas (A, B e C). P: 20 μ L do precipitado suspenso em 100 μ L do mesmo tampão e 20 μ L de diluições

seriadas dessa mistura (razões de diluição indicadas). Coloração em azul coloidal de Coomassie.....	87
Figura 36: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspensão em presença de PVPP. 37u: sobrenadante obtido por ultracentrifugação da fração aquecida a 37°C após solubilização em Tris 62,5mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. 37: fração aquecida a 37°C submetida a breve centrifugação. 95: fração aquecida a 95°C submetida a breve centrifugação. Volumes aplicados indicados na Figura. À direita, as vias de 20μL das três frações cortadas digitalmente e alinhadas para melhor comparação. Coloração em azul coloidal de Coomassie.....	89
Figura 37: Perfil eletroforético de frações retiradas ao longo do processo de extração de proteínas de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). T: proteínas Totais, S: proteínas solúveis, M: fração microsomal.....	92
Figura 38: Perfil eletroforético da fração microsomal e da fração microsomal livre de matéria não solubilizada, ambas diluídas na razão 1:10 (M/10 e Mu/10, respectivamente) de raízes de <i>Vitis</i> (porta-enxertos SO4). Volumes de amostra aplicados indicados.....	93
Figura 39: Western Blotting mostrando aparente enriquecimento de uma proteína de membrana do complexo de Golgi, o fator de ribosilação de ADP na fração microsomal (M/10 e Mu/10) em comparação com a fração de proteínas totais (T).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os scores de uma identificação representativa pelo motor de pesquisa Mascot. Identificação aceita em negrito.....	35
Tabela 2. Proteínas celulares identificadas em <i>Mycoplasma synoviae</i>	49
Tabela 3. Proteínas presentes na fração extracelular de meio de cultura incubado com <i>M. synoviae</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D: unidimensional
2D: bidimensional
2DE: Eletroforese Bidimensional
Ae: *Aphanomyces euteiches*
CBB: Azul Brilhante de Coomassie coloidal
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DIGE: Eletroforese Diferencial em Gel, do inglês *Differential Gel Electrophoresis*
DNA: Ácido Desoxirribonucléico
DTT: Ditioneitol
EF: Fator de Elongação
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI: Ionização por *Electospray*, do inglês *Electrospray Ionization*
GeLC: Cromatografia Líquida a partir de Gel de eletroforese seguida de ionização *Nanospray*
Gi: *Glomus intraradices*
Gim: *Gigaspora margarita*
Gm: *Glomus mosseae*
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEF: Focalização Isoelétrica, do inglês *Isoelectric Focusing*
IPG: Gradiente Imobilizado de pH, do inglês *Immobilized pH Gradient*
LC: Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
m/z: relação entre massa e carga
MA: Micorrízicos (as) Arbusculares
MALDI: Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*
Mr: Massa Molecular Aparente
MS: Espectrometria de Massa, do inglês *Mass Spectrometry*
MS/MS: Espectrometria de Massa em Tandem
NAD: Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
NCBIInr: Centro “Nacional” de Informação Biotecnológica, do inglês *National Center for Biotechnology Information*
NMWC: Corte Nominal de Massa Molecular, do inglês *Nominal Molecular Weight Cut-off*
ORF: Fase de Leitura Aberta, do inglês *Open Reading Frame*
PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do inglês *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PEG: Polietileno Glicol
pI: Ponto Isoelétrico
PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil, do inglês *phenylmethanesulfonylfluoride*
PVPP: Polivinilpolipirrolidona
Q-TOF: Híbrido Quadrupolo / Tempo de Voo, do inglês *Time of Flight*
RNA: Ácido Ribonucléico
RNAm: Ácido Ribonucléico mensageiro
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa, do inglês *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*
SOD: Superóxido Dismutase
SRB: Sociedade Rural Brasileira
TCA: Ácido Tricloro Acético, do inglês *Trichloroacetic Acid*
TFA: Ácido Trifluoroacético, do inglês *Trifluoroacetic Acid*
TOF: Tempo de Voo, do inglês *Time of Flight*
UI: Unidade Internacional

SUMÁRIO

SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 – <i>Mycoplasma synoviae</i>	1
1.1.1 – Epidemiologia	2
1.1.2 – Interações entre patógeno e hospedeiro	5
1.2 – Pneumonia enzoótica suína	8
1.3 – Estudos proteômicos das associações micorrízicas arbusculares	9
1.2.1 – Desenvolvimento agrícola e uso de fertilizantes e pesticidas	9
1.2.2 – Micorrizas	11
1.2.3 – Formação do arbúsculo	12
1.2.4 – Trocas de nutrientes entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares	13
1.2.5 – Benefícios da interação micorrízica para as plantas	15
1.3 – Proteômica	16
1.4 JUSTIFICATIVA	18
1.5 OBJETIVOS	21
1.5.1 Objetivo Geral	21
1.5.2 Objetivos Específicos	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 – Cultivos de <i>Mycoplasma synoviae</i> e <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	23
2.2 – Extração de proteínas celulares de <i>M. synoviae</i> e <i>M. hyopneumoniae</i>	24
2.3 – Concentração de meios e extração de proteínas extracelulares	24
2.4 – Cultivo das plantas e Extração das Raízes	25
2.5 – Trituração das Raízes	25
2.6 – Suspensão do triturado	25

2.7 – Eliminação da matéria particulada	26
2.8 – Isolamento da fração microsomal	27
2.9 – Fracionamento de membranas por gradiente de sacarose	27
2.10 – Limpeza da Plasmalema	28
2.11 – Liofilização e Diálise	28
2.12 – Precipitação de proteínas vegetais por acetona	29
2.13 – Precipitação de proteínas vegetais com TCA	29
2.14 – Solubilização de proteínas membranares	29
2.15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	31
2.16 – Eletroforese bidimensional	32
2.17 – Digestão in gel, análise por espectrometria de massa e identificação de proteínas	33
2.18 – Western Blotting	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 – Proteínas de <i>Mycoplasma</i>	39
3.1.1 – Proteínas celulares de <i>Mycoplasma synoviae</i>	39
3.1.2 – Proteínas celulares de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	39
3.1.2 – Proteínas extracelulares de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	40
3.1.2 – Proteínas extracelulares de <i>Mycoplasma synoviae</i>	45
3.2.1 – Extração de proteínas membranares de raízes de <i>Medicago truncatula</i>	56
3.2.2 – Focalização isoeétrica em solução (sistema Rotofor Bio- Rad) de proteínas da fração microsomal de raízes de <i>Vitis</i> (porta- enxertos SO4)	58
3.2.3 – Solubilização de proteínas membranares	61
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5 CURSOS, CONGRESSOS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA	98
6 REFERÊNCIAS	100
ANEXO A – Participação no curso tutorial intitulado Bioinformática para análise de espectrometria de massa em Genebra de 26 a 29 de janeiro de 2009.	130

ANEXO B – Curso teórico de espectrometria de massa com duração de 3 horas intitulado “Espectometria de Massa e Abordagem Proteômica”	131
ANEXO C – Envio de Resumo a congresso ICOM 6 - International Conference on Mycorrhiza, de 9 a 14 de agosto de 2009, Belo Horizonte Brasil. Resumo intitulado: “Proteomics of Vitis root cuttings: a step forward to understanding molecular mechanisms involved in mycorrhizal symbiosis of a woody plant species”, de autoria de Guillier, Christelle e Rebollo, Manuel	132
ANEXO D – Participação em congresso SMAP (Cpctrométrie de Masse et Analyse Protéomique) em Dijon de 14 a 17 de setembro de 2009	133
ANEXO E – Participação em semanários de grupo a cada três semanas durante todo o período do estágio no Institute National de la Recherche Agronomique – INRA – Dijon, França.	134
ANEXO F Proteínas Extracelulares de <i>Mycoplasma synoviae</i> Artigo aceito na revista ISRN – Veterinarian Science	135
ANEXO G Estudos proteômicos de associações micorrízicas arbusculares	155

1 INTRODUÇÃO

1.1 –*Mycoplasma synoviae*

Micoplasmas são micro-organismos procariontes pertencentes à classe Mollicutes, as menores e mais simples células auto-replicas que se conhece, desprovidas de parede celular (EDWARD e FREUNDT, 1967) (Figura 1). Apesar de negativos para o teste de coloração de Gram, são filogeneticamente relacionados com eubactérias Gram-positivas (Firmicutes) (TRACHTENBERG, 2005). Apresentam genoma reduzido, resultado de evolução degenerativa. A redução genômica é facilmente observada quando se compara o genoma de micoplasmas ao de outras bactérias como *E. coli*, cujo DNA cromossomal é aproximadamente cinco vezes maior que o DNA cromossomal de *Mycoplasma* (RAZIN, GLASER et al., 1984). Com esse genoma reduzido, essas bactérias não apresentam diversas vias biossintéticas, dependendo de aminoácidos, lipídios, carboidratos, precursores de ácidos nucleicos, além de vitaminas que são retirados dos organismos hospedeiros ou precisam ser fornecidos nos meios de cultura (RAZIN, GLASER et al., 1984).

Devido a essa condição, todos os micoplasmas descritos até o presente dependem de hospedeiros para sobreviver, incluindo humanos, gado, ovelhas, aves, cães, gatos e peixes (TRACHTENBERG, 2005). Entre as espécies de *Mycoplasma* que afetam frangos e perus, *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum* são as mais patogênicas. Em frangos, na maioria dos casos, *M. synoviae* infecta as vias aéreas superiores e mantém-se subclínica, embora possa a infecção possa progredir causando patologia nas vias aéreas superiores ou instalar-se nas articulações e causar sinovite infecciosa, afetando as membranas sinoviais das articulações e bainhas de tendões (BENCINA, DROBNIC-VALIC et al., 2001) (Figura 2). Em circunstâncias que ainda não são conhecidas, a doença pode causar vasculite sistêmica e causar alterações patológicas em uma diversidade de órgãos, como na bolsa esternal, articulações (tornozelo e algumas intervertebrais), fígado, cérebro, coróide dos olhos (JORDAN, 1975; SENTÍES-CUÉ, SHIVAPRASAD et al., 2005), além de poder causar anemia (JORDAN, 1975), imunossupressão ou ainda doenças autoimunes (BERČIĆ, SLAVEC, LAVRIĆ, NARAT, ZORMAN-ROJS et al., 2008).

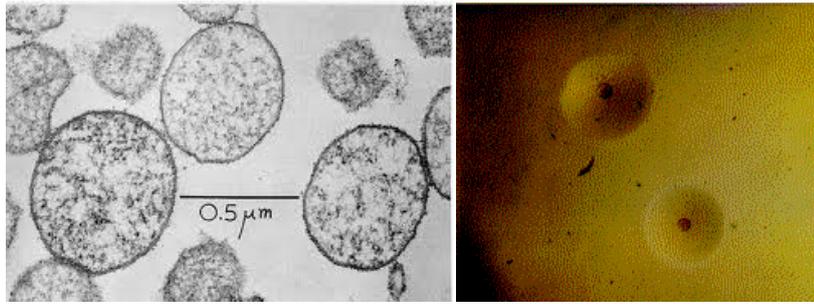


Figura 1 – Foto de microscopia eletrônica de células de *Micoplasma pneumoniae* (esquerda) (em: <<http://www.health-reply.com/mycoplasma-pneumoniae-infection/>>. Acesso em: 28 setembro 2012) e microscopia de luz de *Mycoplasma synoviae* (direita) (em: <<http://www.mycoplasma-exp.com/9829.htm>>. Acesso em: 28 setembro 2012).

1.1.1 – Epidemiologia

Infecções por *M. synoviae* são amplamente distribuídas, ocorrendo em criações comerciais de aves de todo o mundo, inclusive em países industrializados, onde medidas de biossegurança encontram-se bem estabelecidas (BENCINA, NARAT et al., 1999). Informações epidemiológicas a respeito da distribuição e prevalência de *M. synoviae* no Brasil são escassos ou ausentes. Porém, um estudo realizado em uma região costeira da França (Côtes d'Armor) revelou que 68% das criações de frangos dessa região estão contaminados por *M. synoviae* e que nos plantéis contaminados 87% das coletas renderam culturas positivas (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006). Resultados semelhantes foram obtidos na região de Wales, na Austrália, com prevalência de 69% de *M. synoviae* entre as criações de frango (GOLE, CHOUSALKAR et al., 2012). Comparando-se esses estudos, verifica-se que dados de prevalência são muito semelhantes em países de diferente continentes e em diferentes anos. Apesar de esses dados não serem suficientes para permitir uma estimativa de prevalência mundial da doença, indicam nitidamente que a doença é extremamente comum e que medidas de prevenção devem ser tomadas. As perdas econômicas mais importantes estão relacionadas ao retardamento do crescimento e à desvalorização da carcaça no abate, devido às lesões de artrite e aerossaculite (lesões nos sacos aéreos), além de pesados investimentos por parte dos criadores comerciais de aves para manter seus plantéis livres do patógeno (RAMÍREZ, NAYLOR et al., 2006). Esses

investimentos envolvem medidas adequadas de manejo e desinfecção, terapia com antibióticos e vacinações com cepas vacinais atenuadas ou inativadas (BUIM e SOARES, 2011). Há também evidências de que índices de mortalidade aumentem e que a produção diminua em criações onde há presença de *M. synoviae* (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006). Um estudo em criações de aves poedeiras revelou perda da qualidade dos ovos relacionada com a presença de *M. synoviae* na criação (GOLE, CHOUSALKAR et al., 2012), além de evidências de que a presença do patógeno aumentaria a taxa de mortalidade e diminuiria a produtividade de ovos (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006).

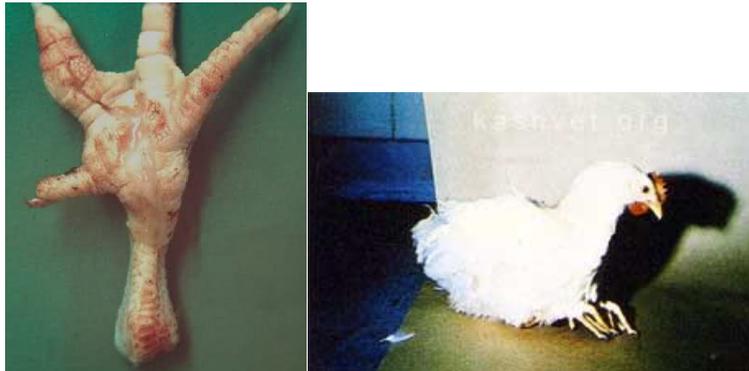


Figura 2 – Pata de frango infectado por sinovite infecciosa (esquerda) (em: <<http://www.granjaonline.es/viewtopic.php?t=15298>>. Acesso em: 28 setembro 2012) e modo característico de sentar sobre o tornozelo de frango com artrite provocada por *Mycoplasma synoviae* (direita) (em: <<http://www.kashvet.org/oasis/tag/bird-flu/>>. Acesso em: 28 setembro 2012).

Como parte de um conjunto de medidas que visam a controlar a doença, estudos epidemiológicos são necessários e estes dependem em procedimentos diagnósticos que idealmente devem ser rápidos, sensíveis e específicos. Foi realizado um estudo epidemiológico de *M. synoviae* empregando esfregaço traqueal e isolamento da bactéria em meio de cultivo (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006). Isolamento do patógeno a partir de coletas por esfregaço traqueal nas aves é um teste

que apresenta alta especificidade, porém, devido às grandes restrições nutricionais de *M. synoviae*, o procedimento é trabalhoso e demorado. Além disso, o teste é pouco sensível, podendo ocorrer falsos negativos devido a contaminação dos meios de cultura por outros microorganismos (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006) ou pela ausência de *M. synoviae* no ambiente extracelular, especialmente após tratamentos com antibióticos, não sendo excluída, porém, a possibilidade de presença do organismo no interior das células do hospedeiro (BUIM, BUZINHANI et al., 2011). Testes sorológicos em aves são comumente utilizados (GOLE, CHOUSALKAR et al., 2012). Estes testes, porém, podem gerar falsos negativos em infecções subclínicas e, por vezes, apresentar especificidade limitada (HAMMOND, RAMÍREZ et al., 2009). Em criações de aves poedeiras há uma alternativa de se realizar testes sorológicos em ovos, com a vantagem de se evitar o estresse da coleta de sangue nos animais (GOLE, CHOUSALKAR et al., 2012), além do fato de que ovos têm maior concentração de anticorpos do que o próprio plasma (RAJ, LATHA et al., 2004). Testes por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) apresentam alta sensibilidade, permitindo a detecção de material genético de *M. synoviae* em uma diversidade de amostras coletadas no ambiente (MAROIS, OUFOUR-GESBERT et al., 2000). Moléculas de RNA são menos estáveis que o DNA em amostras ambientais devido à presença de RNAses produzidas por microorganismos presentes no solo. Por esse motivo, possuem um tempo de vida reduzido nessas condições. Assim, a presença de RNA em amostras coletadas do ambiente indica a presença de células viáveis no ambiente. Partindo desse princípio, um estudo semelhante utilizando PCR via Transcriptase Reversa (RT-PCR, do inglês *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) foi realizado com iniciadores de transcrição (*primers*, em inglês) da subunidade 16S de RNA ribossômico tendo permitido estimar a presença de espécimes viáveis de *M. synoviae* em amostras do ambiente associadas a fazendas de criação de frangos. Iniciadores dirigidos ao gene *vlhA*, que codifica a hemaglutinina de *M. synoviae*, permitiram a amplificação gênica a partir de esfregaços de frangos, indicando esse desenho como um método de diagnóstico sensível e específico (HAMMOND, RAMÍREZ et al., 2009).

M. synoviae pode ser transmitido entre aves verticalmente através dos ovos, ou horizontalmente. Na transmissão horizontal, o contágio pode ocorrer por contato direto entre as aves ou indireto, através de contato com células viáveis do patógeno presentes na água, alimento ou

fezes. A bactéria pode manter-se viável por até dois dias nas penas a temperatura ambiente e há indícios de sua presença em partículas de poeira dentro dos criadouros e nos terrenos ao redor. Isso significa que nas técnicas de manejo, além do uso extensivo de antibióticos relatados em determinadas áreas (GERCHMAN, LYSNYANSKY et al., 2008), é importante que se mantenha um rigoroso controle de sanidade, não apenas no ambiente do criadouro, mas também no controle a vetores carreadores de poeira, tais como roedores, insetos ou mesmo humanos, sejam tratadores, veterinários ou visitantes (MAROIS, GOTTSCHALK et al., 2009).

1.1.2 – Interações entre patógeno e hospedeiro

Frangos experimentalmente infectados por *M. synoviae* via aerossóis ou contato direto, respondem com a produção de anticorpos que reagem positivamente contra uma série de proteínas de *M. synoviae* (AVAKIAN e KLEVEN, 1990; AVAKIAN, LEY et al., 1992). Entretanto, o patógeno encontra meios para evadir o sistema imunológico do hospedeiro, fazendo que a doença no trato respiratório superior persista e se torne crônica (BENCINA, NARAT et al., 1999). Um fator que pode contribuir para essa capacidade da bactéria em persistir no organismo hospedeiro, mesmo após longos tratamentos com antibióticos, é a elevada taxa de mutação desses microorganismos. Essa taxa de mutação decorre da evolução degenerativa do genoma de micoplasmas, que resultou na perda de mecanismos de reparo de DNA, de modo que micoplasmas apresentam uma taxa de mutação consistentemente maior do que a de outras bactérias (BUIM, BUZINHANI et al., 2011).

Outra característica de micoplasmas, assim como de outros patógenos, que possivelmente seja importante para a sua manutenção no organismo hospedeiro, é a presença de antígenos altamente imunogênicos cuja presença na superfície bacteriana é variável, as chamadas proteínas com variação de fase. Essas proteínas podem mudar em expressão, tamanho e exposição na superfície da bactéria, o que causa modificações fenotípicas no patógeno e interfere na sua fisiologia, bem como sua virulência (ROSENGARTEN e WISE, 1990).

Micoplasmas apresentam uma diversidade de proteínas com variação de fase expostas na superfície, muitas delas lipoproteínas, com determinantes antigênicos específicos para cada espécie (BENCINA, NARAT et al., 1999). Na superfície de *M. synoviae* foram descritas proteínas com variação de fase e propriedades hemaglutinantes e de hemadsorção a eritrócitos de frango (NARAT, BENCINA et al., 1998).

Moléculas de adesão são fundamentais na implantação de *M. synoviae*, que depende da adesão às células do hospedeiro para obtenção dos nutrientes necessários ao seu metabolismo. Essa necessidade é ilustrada pelo fato de que, dentro de uma mesma cepa de *M. synoviae*, clones positivos para o fenótipo hemaglutinante causam sinovite com mais frequência do que clones negativos quando inoculados experimentalmente no tornozelo de frangos (NARAT, BENČINA et al., 1998).

O gene *vlhA* de *M. synoviae* é considerado como sendo o único gene expresso de uma família multigênica que codifica uma lipoproteína de membrana, a VlhA (NARAT, BENČINA et al., 1998; KHIARI e MARDASSI, 2012). Esta, sofre clivagem pós-traducional, dando origem a duas proteínas menores, chamadas de MSPA e MSPB, ambos apresentando variações de tamanho e componentes antigênicos entre diferentes isolados de *M. synoviae* (BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, BIDOVEC et al., 2008) e capazes de variação de fase com alta frequência (NOORMOHAMMADI, MARKHAM et al., 1997). MSPB corresponde ao fragmento N-terminal da proteína VlhA, enquanto MSPA, correspondente ao fragmento C-terminal é a única que apresenta atividade hemaglutinante e é, por isso, considerada a hemaglutinina de *M. synoviae* (NOORMOHAMMADI, MARKHAM et al., 1997).

Hemaglutininas lipoproteicas codificadas pelo gene *vlhA* são consideradas como sendo o mecanismo primário de adesão de *M. synoviae* a células do hospedeiro (MAY e BROWN, 2009). A capacidade de adesão de *M. synoviae* a células embrionárias de frango e de formar microcolônias e crescer na superfície destas células é diminuída ou suprimida por tratamento com neuraminidase, o que indica que a adesão é mediada por aglutininas que se ligam a receptores de membrana que contêm resíduos de ácido siálico (ALDRIDGE, 1975). Há evidências que indicam recombinação do gene *vlhA* com pseudogenes da família multigênica, que resulta na grande variabilidade fenotípica entre adesinas expressas em diferentes isolados de *M. synoviae* (MAY e BROWN, 2009).

Existe forte correlação entre a virulência de *M. synoviae* e *M. gallisepticum* e a atividade da enzima sialidase destes organismos (MAY, KLEVEN et al., 2007). Essa enzima é capaz de remover o ácido siálico de diversos tipos de glicoconjugados presentes na superfície celular do hospedeiro. É possível que o processo esteja relacionado com a nutrição de *M. synoviae*, já que a bactéria apresenta os mecanismos enzimáticos para a incorporação dos produtos da sialidase na via glicolítica (MAY, KLEVEN et al., 2007), ao contrário do que se

observa em *Mycoplasma gallisepticum*. Além disso, a atividade parece estar também associada a processos de colonização, degradação de matriz extracelular e indução de apoptose (MAY, KLEVEN et al., 2007). A presença de dois mecanismos no mesmo organismo que competem por determinado substrato, ou seja, a aglutinina e a sialidase, que utilizam resíduos de ácido siálico presentes na superfície das células do hospedeiro para adesão e nutrição, respectivamente, leva a crer que exista um balanço coordenado entre esses mecanismos (MAY, KLEVEN et al., 2007).

Finalmente, recentemente foi observado que *M. synoviae*, a exemplo do que ocorre com outras espécies de micoplasmas, é capaz de invadir células não fagocíticas. Uma vez internalizadas nessas células, o patógeno evade o sistema imunológico do hospedeiro e resiste ao tratamento por antibióticos, além de dificultar o isolamento a partir de coletas por raspagem e com isso o diagnóstico por cultura de células (BUIM, BUZINHANI et al., 2011).

Foi observado que o número de passagens *in vitro* por meio de cultura de colônias de *M. gallisepticum* diminui significativamente a patogenicidade dos isolados (LEVISOHN, DYKSTRA et al., 1986). Isso pode ser explicado em parte pelo fato de micoplasmas apresentarem alta taxa de mutação e de recombinação gênica que resultam na perda de fenótipos importantes para o processo infeccioso em situação de meio de cultura, em que não há pressão seletiva do sistema imunológico do hospedeiro. Após sucessivas passagens por meio de cultura, isolados de *M. gallisepticum* perdem a capacidade de invadir células HeLa-229 (WINNER, ROSENGARTEN et al., 2000) e é possível observar significativa perda da atividade da enzima sialidase após diversas passagens em meio de cultura, tanto em *M. gallisepticum* como em *M. synoviae* (BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, ZORMAN-ROJS et al., 2008).

1.1.3 – *Mycoplasma synoviae* e proteínas secretadas

O sequenciamento do genoma de *M. synoviae* permitiu que o organismo fosse estudado por uma abordagem proteômica e identificação por espectrometria de massa de proteínas associadas a 694 sequências codificantes (VASCONCELOS, FERREIRA et al., 2005). Através de estudos proteômicos diversas proteínas de *M. synoviae* foram identificadas. Dessas, 19 proteínas mostraram-se solúveis, e podem ser atribuídas a proteínas citoplasmáticas. Outras 5 proteínas identificadas foram encontradas apenas na extração de proteínas feitas a partir de precipitados membranares, o que indica que podem estar associadas às

membranas celulares de *M. synoviae* (MENEGATTI, TAVARES et al., 2010).

Por outro lado, diversos estudos descritos na literatura indicam que proteínas secretadas por micro-organismos patogênicos podem desempenhar uma diversidade de ações, tais como proteólise, biossíntese, tradução, alongação e transcrição (MARIAPPAN, VELLASAMY et al., 2010). Acredita-se que essas atividades possam estar diretamente envolvidas na invasão do hospedeiro e adesão a células ou tecidos (GRAB, GIVENS et al., 1998; LAMMERS, NUIJTEN et al., 1999; DALLO, KANNAN et al., 2002; DABO, CONFER et al., 2005; CHAVES, DE SOUZA et al., 2009; OKAHASHI, NAKATA et al., 2010). Não há, no entanto, até o presente, nenhum estudo a respeito de proteínas secretadas por *M. synoviae*. No presente trabalho *M. synoviae* foi cultivada em meio de cultura normal e, em seguida, células foram lavadas e transferidas para meio de cultura desprovido de proteínas, onde foram incubadas por períodos de 48h. As células foram então removidas e proteínas do meio foram concentradas e analisadas, como estratégia de se identificar proteínas possivelmente secretadas por *M. synoviae*.

Na presente tese de doutorado é descrito o isolamento e a identificação de proteínas extracelulares de *M. synoviae*, resultados estes publicados na revista ISRN Veterinarian Science (REBOLLO-COUTO, KLEIN et al., 2012) (Anexo F).

1.2 – Pneumonia enzoótica suína

A pneumonia enzoótica suína é uma doença infecciosa causada principalmente por *Mycoplasma hyopneumoniae* e é responsável por perdas econômicas mundiais devido ao aumento de gastos com vacinação e medicação de suínos infectados. *M. hyopneumoniae* apresenta alta prevalência, infectando criações em praticamente todas as áreas produtoras de suínos do mundo (MAES, VERBEKE et al., 2003; MAES, SEGALLES et al., 2008). Nos casos em que o quadro clínico não envolve complicações por doenças secundárias causadas por patógenos oportunistas, a infecção por *M. hyopneumoniae* decorre de modo subclínico, podendo causar sintomas amenos. O principal sinal clínico observado em animais infectados é o surgimento de tosse não produtiva, que aparece de 10-16 dias após infecção experimental (MAES, SEGALLES et al., 2008). A doença pode afetar a economia da produção suína causando diminuição das taxas de crescimento e assim reduzir a

eficiência da conversão de alimento em massa corporal suína. O controle da doença baseia-se, hoje, principalmente em correções de práticas de manejo, abrigo dos animais, estratégias de prevenção de transmissão durante o aleitamento, vacinação e uso de antibióticos (MAES, VERBEKE et al., 2003; SIBILA, PIETERS et al., 2009).

Embora vacinas bacterianas são disponíveis e amplamente utilizadas, a eficiência dessas estratégias continua controversa. Alguns estudos relatam diminuição de sinais clínicos, de infecções bacterianas secundárias e das lesões pulmonares (THACKER, 2004), além de indicar que a eficiência do custo-benefício favorece as estratégias de vacinação (MAES, VERBEKE et al., 2003). Por outro lado, outros estudos demonstram que a vacinação não previne significativamente a transmissão em condições de campo (MEYNS, MAES et al., 2004; MEYNS, DEWULF et al., 2006; CHAE, 2010; VILLARREAL, MEYNS et al., 2010). Outro desafio é o diagnóstico de *M. hyopneumoniae*, baseado principalmente em sinais clínicos, monitoramento de abate, culturas bacteriológicas, testes sorológicos, métodos de detecção molecular e PCR (SIBILA, PIETERS et al., 2009). Atualmente, o teste mais confiável para o diagnóstico de *M. hyopneumoniae* são culturas bacterianas, mas o teste é difícil por que depende do cultivo de micoplasmas, o que é laborioso e propenso a contaminações por outras bactérias.

Recentemente, foi publicado o sequenciamento total do genoma de duas cepas de *M. hyopneumoniae*, 7448 e J (VASCONCELOS, FERREIRA et al., 2005), além de um estudo proteômico da linhagem 7448 (PINTO, CHEMALE et al., 2007), porém até o presente momento, nenhum artigo foi relatado a respeito do secretoma dessa espécie. Como parte das atividades deste doutorado, foi feita uma tentativa de se analisar por eletroforese bidimensional amostras celulares e extracelulares de proteínas deste microorganismo.

1.3 – Estudos proteômicos das associações micorrízicas arbusculares

1.2.1 – Desenvolvimento agrícola e uso de fertilizantes e pesticidas

Devido a avanços tecnológicos iniciados durante a chamada revolução verde, que ocorreu entre os anos quarenta e setenta do século XX, a agricultura mundial vem observando um rápido crescimento de produtividade, relacionado com expansão das fronteiras agrícolas e intensificação do uso do solo. Grande parte desse aumento de produção

se deve ao desenvolvimento de fertilizantes químicos que aumentam drasticamente a produtividade do solo e ao uso de pesticidas, que controlam pragas. Apesar de aumentar a produtividade, entretanto, o uso dessas substâncias resulta em fortes impactos ambientais e na saúde humana. No Brasil, um estudo recente relata o uso de 180 tipos comerciais diferentes de pesticidas na região de Bento Gonçalves, no estado do Rio Grande do Sul. De acordo com esse estudo, 1,7% dos pesticidas usados pelos agricultores são de uso proibido, 17,8% não são registrados no *Pesticide Information System* e 9,4% não apresentam qualquer tipo de identificação (FARIA, DA ROSA et al., 2009).

De longa data os efeitos dos pesticidas à saúde humana têm sido relatados, sendo que os efeitos causados pelo emprego de pesticidas são mais sensíveis em países em desenvolvimento, pois operadores que manuseiam os pesticidas raramente tem preparo técnico para fazê-lo e há grande negligência às recomendações de dosagem e uso de equipamentos de proteção individual. Em um único hospital em Maringá (Paraná, Brasil) foram registrados 171 casos de intoxicação por organofosforados e 167 casos de intoxicação por pesticidas a base de carbamato ao longo de 10 anos (FERREIRA, MAROCO et al., 2008). Praticamente metade dos casos registrados estava relacionado com tentativa de suicídio. Essa informação é particularmente alarmante se compararmos esses dados a um estudo desenvolvido numa região rural da China em que se verifica um aumento da taxa de suicídios relacionado com o uso de pesticidas (ZHANG, STEWART et al., 2009). A regulamentação do uso de pesticidas *per se* é suficiente para diminuir os índices de suicídio (EDDLESTON e BATEMAN, 2011; PITMAN, KRYSINSKA et al., 2012), o que indica alterações comportamentais relacionadas com a exposição a agrotóxicos verificadas na prática (PARRÓN, REQUENA et al., 2011; LONDON, BESELER et al., 2012).

A absorção dos pesticidas pode acontecer por uma série de diferentes vias, incluindo inalação, ingestão e absorção pela pele. Como são compostos lipofílicos não biodegradáveis tendem a se acumular ao longo das cadeias alimentares e são bioconcentrados em tecidos humanos e animais, tais como os tecidos adiposo e muscular (BOTARO, TORRES et al., 2011; RUDGE, SANDANGER et al., 2012), onde são associados a uma diversidade de efeitos tóxicos. Correlação positiva foi observada entre vendas de pesticida e incidência de câncer de próstata, leucemia, lábio, esôfago e pâncreas, além de evidências de um possível aumento na incidência de câncer de laringe, pulmões, testículos, bexiga, fígado, estômago, cérebro, linfoma

e mieloma nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (CHRISMAN, KOIFMAN et al., 2009).

Devido aos danos gerados ao ambiente, especialmente, os riscos à saúde humana, restrições têm sido impostas ao redor do mundo contra uma série de pesticidas. Isso não tem evitado, entretanto, danos causados à saúde humana por pesticidas, tais como o herbicida Atrazina, amplamente utilizado em todo mundo, inclusive em países industrializados. Entre efeitos relacionados com esse pesticida podem ser citados aumento na taxa de mortalidade e câncer (SATHIAKUMAR, DELZELL et al., 1996; SATHIAKUMAR e DELZELL, 1997; MACLENNAN, DELZELL et al., 2002; MACLENNAN, DELZELL et al., 2003; MILIGI, COSTANTINI et al., 2005).

Em meio a esse contexto, existe uma tendência em se buscar alternativas para os tratamentos químicos e uso de pesticidas no controle de pragas, assim como melhor utilização do solo, visando ao aumento da produtividade de um modo sustentável. Entre essas alternativas encontra-se uma associação que tem trazido grandes benefícios à agricultura, a simbiose entre plantas de interesse agrícola com fungos Micorrízicos Arbusculares (MA).

1.2.2 – Micorrizas

O termo micorriza (do grego, fungo + raiz) é empregado para designar diversos tipos de interações mutualísticas que envolvem fungos presentes no solo e plantas, através de suas raízes. Fungos micorrízicos podem ser classificados em endomicorrizas e ectomicorrizas (MALLOCH, PIROZYNSKI et al., 1980). Em ectomicorrizas as hifas se mantêm extracelulares, induzindo mesmo assim importantes mudanças na morfogênese das raízes, enquanto sua presença faz com que apenas ligeiras modificações ocorram nas células epidérmicas ou corticais. Fungos endomicorrízicos são aqueles cujas hifas penetram nas células da raiz estabelecendo uma simbiose intracelular (SMITH e SMITH, 1990).

Entre os fungos endomicorrízicos, os mais estudados são os fungos micorrízicos arbusculares, micro-organismos presentes no solo que dependem da interação com as plantas para completar seus ciclos vitais sendo, por isso, considerados simbioses biotróficos obrigatórios (DASSI, SAMRA et al., 1999; DUMAS-GAUDOT, VALOT et al., 2004; FERROL, BAGO et al., 2004). Fungos micorrízicos arbusculares colonizam cerca de 80% de todas as plantas terrestres fanerógamas,

incluindo um grande número de cultivares de interesse agrícola (HARRIER e WATSON, 2004).

1.2.3 – Formação do arbúsculo

A instalação da simbiose mutualística micorrízica arbuscular se dá em algumas etapas bem definidas (MUGNIER e MOSSE, 1987). A partir da germinação do esporo surge uma hifa denominada tubo germinativo que se desenvolve crescendo pelo substrato. Se não houver a presença de raízes compatíveis com a simbiose micorrízica arbuscular, o crescimento da hifa é apenas limitado. Sinalizadores exudados pela raiz, em contrapartida, estimulam o desenvolvimento da hifa que se ramifica e cresce em direção à raiz (AKIYAMA, MATSUZAKI et al., 2005). Uma vez que a raiz é alcançada, a hifa continua a se ramificar criando uma rede hifal que a envolve. Em pontos determinados formam-se os apressórios, também conhecidos como hifopódios (GENRE, CHABAUD et al., 2008), que penetram pela epiderme da raiz, atravessam as células epidérmicas e corticais externas, ramificam-se pelos interstícios entre as células, até alcançar as células corticais mais internas. Os hifopódios penetram então nestas células e ramificam-se dentro delas, formando estruturas transientes, com apenas alguns dias de vida, denominadas arbúsculos, uma zona de contato entre a planta e o fungo por onde, acredita-se, a maior parte das trocas de nutrientes entre os simbiontes ocorre (COX e TINKER, 1976) (Figura 3).

As células vegetais, por sua vez, respondem à presença do fungo. No momento que uma célula epidérmica vegetal entra em contato direto com a hifa, o núcleo da célula vegetal desloca-se para a zona imediatamente abaixo do ponto de contato e uma profunda alteração citoplasmática ocorre, envolvendo principalmente elementos de citoesqueleto e retículo endoplasmático. Estes elementos formam um tubo que desloca o núcleo para a extremidade oposta do ponto de contato entre a hifa e a célula vegetal e que finalmente conduz a penetração do hifopódio permitindo que este atravesse a célula. Esse canal que possibilita e conduz a penetração do hifopódio na célula vegetal ficou conhecido como aparelho pré-penetração (GENRE, CHABAUD et al., 2005). As células do parênquima cortical mais externo respondem do mesmo modo ao contato com a hifa, que é conduzida até as células mais internas do parênquima cortical, onde mecanismos semelhantes permitem a entrada da hifa, que termina por ramificar-se no interior destas últimas células vegetais para formar os arbúsculos (GENRE, CHABAUD et al., 2008).

A formação do arbúsculo, entretanto, não rompe a membrana plasmática (HARRISON, 1999a), apenas faz com que esta se deforme e estenda-se, convertendo-se no que se chama a membrana periarbuscular, contígua ao restante da membrana plasmática da célula vegetal (PUMPLIN e HARRISON, 2009).

Há fortes evidências que indicam que a membrana periarbuscular seja o principal sítio de interação entre a planta e o fungo. Estima-se que a superfície de membrana da célula vegetal colonizada aumente 4 a 10x (BAGO, DONAIRE et al., 1997) e que a membrana periarbuscular apresenta características próprias, que diferem do restante da membrana da célula, sugerindo síntese *de novo* de membrana plasmática (BONFANTE e PEROTTO, 1995; GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Após alguns dias da implantação do arbúsculo, este regride e a célula vegetal torna-se novamente capaz de receber a colonização por um novo arbúsculo (COX e TINKER, 1976).

1.2.4 – Trocas de nutrientes entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares

A simbiose MA traz notavelmente benefícios para a planta, na maioria das vezes estando relacionada com um aumento de biomassa e da taxa de fotossíntese, como exemplificado por diversos estudos (FRANKEN e GNADINGER, 1994; CANGAHUALA-INOCENTE, VILLARINO et al., 2009; CAMPOS-SORIANO, GARCÍA-GARRIDO et al., 2010; BOLDT, PÖRS et al., 2011; LATEF e CHAOXING, 2011; WU, ZOU et al., 2011). O efeito é mais sensível nos casos em que as plantas crescem em ambientes pobres em macronutrientes (SCHLIEMANN, AMMER et al., 2008; LEE, MUNEER et al., 2012). Isso ocorre por que fungos micorrízicos arbusculares são capazes de promover crescimento e ramificação da raiz (BERTA, FUSCONI et al., 1993; AZCÓN-AGUILAR e BAREA, 1997), além de criar uma rede hifal extrarradicular que é conectada à raiz da planta e aumenta a zona de exploração para além da rizosfera (SMITH e GIANINAZZI-PEARSON, 1988), aumentando consideravelmente a eficiência da absorção de água e nutrientes minerais do solo. Vários estudos demonstram que a associação micorrízica arbuscular auxilia as plantas a suportar estresse por seca (AL-KARAKI, MCMICHAEL et al., 2004; ABBASPOUR, SAEIDI-SAR et al., 2012; LEE, MUNEER et al., 2012).

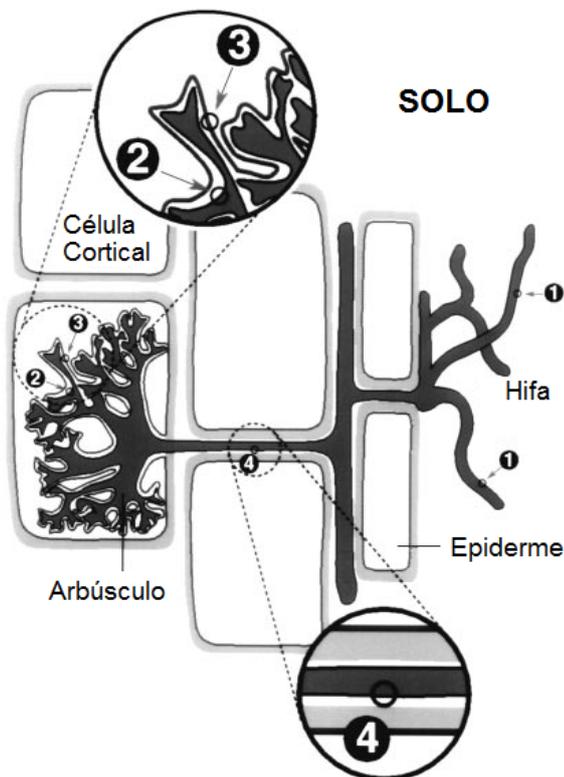


Figura 3 – Desenho esquemático mostrando as hifas de fungos micorrízicos arbusculares extrarradiculares, entre as células da epiderme e corticais externas das raízes e no interior das células corticais mais internas das raízes, onde formam-se os arbúsculos. Números indicam possíveis sítios de transporte de substâncias. O transporte de fosfato ocorre do solo para a hifa (1), atravessa a membrana do arbúsculo (2) e da membrana periarbuscular (3), enquanto o transporte de carbono possivelmente ocorra no arbúsculo (2) e nas hifas entre as células corticais (4). Modificado a partir de HARRISON e colaboradores (1999b).

Em troca, as plantas direcionam uma fração considerável dos produtos de fotossíntese para o fungo, onde as hexoses assimiladas são convertidas em moléculas típicas destes últimos, como a trealose, o glicogênio e a quitina (BAGO, PFEFFER et al., 2002). Uma vez incorporados pelo fungo, carboidratos são convertidos em lipídios de

armazenamento que formam os chamados oleossomos, estruturas lipídicas produzidas exclusivamente no micélio intrarradicular utilizadas para distribuir carbono orgânico em todo o micélio extrarradicular. Formas orgânicas de carbono são transferidas não só da planta para o fungo, mas também do fungo para a planta (CAMERON, JOHNSON et al., 2008). Isso permite um sistema de nutrição cooperativa entre plantas através dos fungos, fenômeno que ficou conhecido como “the woodwide web” (BONFANTE e ANCA, 2009).

1.2.5 – Benefícios da interação micorrízica para as plantas

Pelo fato de que a associação micorrízica arbuscular aumenta consideravelmente a eficiência da absorção de água do solo, há interesse em estudar os benefícios dessa associação em condições em que recursos hídricos são limitados. Nesse contexto, diversos estudos demonstraram um aumento da tolerância das plantas à seca conferida pela colonização de fungos micorrízicos arbusculares (BOOMSMA e VYN, 2008; ABBASPOUR, SAEIDI-SAR et al., 2012). Plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares são também capazes de suportar melhor estresse salino (AL-KARAKI, MCMICHAEL et al., 2004; GIRI, KAPOOR et al., 2007; LANGENFELD-HEYSER, GAO et al., 2007; RUIZ-LOZANO, ALGUACIL et al., 2009).

Há indícios de que as interações micorrízicas arbusculares aumentam a resistência ou ajudam a planta a suportar estresse causado pela ação de patógenos, como fungos ou nemátodes, tendo como consequências a compensação dos danos e aumento da produtividade (INGHAM, 1988; GARMENDIA, GOICOECHEA et al., 2004; BARKER, EDMONDS-TIBBETT et al., 2005; HOL e COOK, 2005; JAITI, MEDDICH et al., 2007). Acredita-se que a bioproteção conferida pelos fungos às plantas sejam consequência de uma série de benefícios, tais como melhora no estado nutricional da planta e compensação dos danos à raiz devido ao aumento da eficiência de absorção de água e nutrientes, competição pelos sítios de infecção entre o parasita e o fungo micorrízico arbuscular, ou pelos fotossintatos produzidos pela planta, modificações anatômicas das raízes ou mesmo interferência na dinâmica da comunidade microbiana do solo (AZCÓN-AGUILAR e BAREA, 1996). A ação protetora de fungos micorrízicos arbusculares também já foi demonstrada no controle de plantas hemiparasitas (LENDZEMO e KUYPER, 2001; LENDZEMO, KUYPER et al., 2005), e de ervas daninhas difíceis de separar de cultivares de interesse (GANGE, LINDSAY et al., 1999).

Esses benefícios vêm atraindo a atenção de cientistas para o uso de fungos micorrízicos arbusculares em preservação ambiental e agricultura sustentável, como alternativa ao uso de pesticidas e fertilizantes químicos (GANGE, LINDSAY et al., 1999; HARRIER e WATSON, 2004; WANG, VESTBERG et al., 2008; LECOMTE, ST-ARNAUD et al., 2011).

Plantas podem também ser utilizadas em estratégias de biorremediação, pela sua capacidade de absorver determinados contaminantes do solo. A associação micorrízica arbuscular comprovadamente aumenta a tolerância a metais pesados, tais como cádmio (ALLOUI, RECORBET et al., 2009; LIU, GONG et al., 2011), chumbo e zinco (SOLÍS-DOMÍNGUEZ, VALENTÍN-VARGAS et al., 2011), arsênico (BONA, MARSANO et al., 2011). Benefícios para a planta em presença de metais pesados são registrados na forma de ganho de biomassa (REPETTO, BESTEL-CORRE et al., 2003; BONA, MARSANO et al., 2011) e diminuição de bioacumulação nos tecidos aéreos (HILDEBRANDT, REGVAR et al., 2007; LIU, GONG et al., 2011; WANG, WANG et al., 2012).

A ação bioprotetora contra patógenos ou poluentes e o auxílio na nutrição, fazem das micorrizas importantes aliados na busca de alternativas em direção a um manejo sustentável do solo agrícola (HARRIER e WATSON, 2004). Geração de conhecimento nessa área se torna cada vez mais relevante na busca de alternativas para agricultura em resposta às mudanças globais (SMITH, FACELLI et al., 2010).

1.3 – Proteômica

O termo proteoma deriva do inglês “proteome”, que por sua vez é um acrônimo a partir de “PROTEins expressed by a genOME”. Utilizado pela primeira vez por Marc Wilkins em 1995 no simpósio “2D Electrophoresis: from protein maps to genomes”, em Siena, Itália, é definido como a análise extensiva das proteínas expressas em um tecido, célula ou compartimento subcelular em determinadas condições (WILKINS, PASQUALI et al., 1996). Atualmente a proteômica é fundamentada em dois procedimentos principais, a separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2DE) e identificação dessas proteínas por espectrometria de massa (GÖRG, WEISS et al., 2004).

A identificação dos genes de um organismo por sequenciamento de DNA permite conhecer o repertório de proteínas que esse organismo é capaz de sintetizar, mas oferece apenas um panorama estático, pois a informação genômica é constante para cada célula. Identificação de transcritos de RNAm (transcriptoma) oferece um quadro mais dinâmico,

pois os genes transcritos são ativados de acordo com a necessidade fisiológica da célula a cada momento. Entretanto, a remoção de introns (*splicing*) que permite criar variações de proteínas e modificações pós-traducionais que regulam o funcionamento das proteínas dificultam o entendimento do funcionamento de um sistema biológico a partir de informações genômicas (YATES, 2004). Essas modificações fazem com que o número de proteínas que pode ser encontrado em um organismo vivo pode ser muito maior do que o número de genes contidos em seu genoma (DOMON e AEBERSOLD, 2006). Assim, o proteoma oferece um quadro direto da condição metabólica de um sistema biológico por mostrar quais proteínas estão efetivamente presentes nesse sistema em dado momento.

O surgimento da metodologia de eletroforese bidimensional de separação de proteínas combinando-se a focalização isoeletrica à separação por massa molecular permitiu que a típica resolução de algumas centenas de proteínas nos géis unidimensionais fosse aumentada para mais de mil proteínas bem separadas em um único gel bidimensional a partir de extratos de células procariontes (O'FARRELL, 1975). Com o advento dos gradientes imobilizados de pH e melhoras das técnicas subsequentes (RABILLOUD, ADESSI et al., 1997; RABILLOUD, LUCHE et al., 2007; GÖRG, DREWS et al., 2009) a técnica ganhou robustez e a resolução foi aumentada, sendo que separações de até 3000 bandas de proteínas já foram registradas em um único gel (MALDONADO, ECHEVARRÍA-ZOMEÑO et al., 2008), além de os perfis serem altamente reprodutíveis, inclusive entre diferentes laboratórios.

Grandes avanços tecnológicos foram observados também em espectrometria de massa nos últimos tempos, permitindo enorme aumento no desempenho do processo de identificação de proteínas. Essencialmente, a espectrometria de massa é capaz de medir a massa de moléculas ionizadas em fase gasosa de acordo com a razão entre a massa e a carga (m/z).

Espectrômetros de massa consistem em três componentes básicos: uma fonte de íons, um analisador de massa e um detector de íons. Moléculas presentes no material analisado precisam ser transferidas da fase líquida ou sólida para a fase gasosa e ionizadas. Ao serem inseridas num campo eletromagnético sofrem aceleração sendo separadas pela razão m/z até atingir o detector (YATES, 2004).

Duas técnicas de ionização suave foram desenvolvidas nos anos 80, a Ionização por *Electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*) e a Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI, do

inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*), enquanto analisadores foram desenvolvidos gerando um número considerável de tipos diferentes de analisadores que podem ser utilizados sozinhos ou combinados entre si, gerando equipamentos de espectrometria de massa em seqüência (conhecida em inglês como Tandem Mass Spectrometry) (DOMON e AEBERSOLD, 2006). Essas combinações permitem uma ampla gama de uso dos espectrômetros de massa, cada uma com vantagens e limitações em termos de resolução, rendimento e cobertura (YATES, RUSE et al., 2009).

1.4 JUSTIFICATIVA

O crescimento da indústria avícola é muitas vezes limitado por doenças infecciosas que afetam as aves. *Mycoplasma synoviae* é um importante patógeno associado a sinovite em frangos e perus (LOCKABY, HOERR et al., 1998; KANG, GAZDZINSKI et al., 2002). A produção de aves no Brasil, especialmente na região sul, é de grande importância para o estado de Santa Catarina, com números expressivos de produtividade: 20% da produção nacional de aves, atendendo 60% do mercado interno e 70% das exportações do país (Em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em: 28 setembro 2012), sendo um setor da economia do estado que cresce a cada ano. A produtividade intensiva implica na criação de animais em grandes concentrações, o que gera estresse para as aves por falta de espaço, podendo refletir em baixa imunológica. O contato próximo também propicia a transmissão horizontal de doenças infectocontagiosas e o fato de que os plantéis são altamente homogêneos geneticamente facilita enormemente o surgimento de pragas que podem contaminar muito rapidamente criações inteiras. Dentro desse contexto, é fundamental conhecer a biologia de patógenos como *M. synoviae*, que reconhecidamente causa impactos econômicos na produção de aves em todo o mundo e cuja transmissão é grandemente favorecida nas condições de criação intensiva de aves.

Infecção pode ocorrer de modo subclínico ou na forma de infecção severa do trato respiratório superior, sendo que em condições ainda desconhecidas, pode tornar-se sistêmica e causar artrite (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006). A doença causa perdas econômicas por retardar o crescimento e desvalorizar as carcaças no corte (DUFOUR-GESBERT, DHEILLY et al., 2006). Estratégias para controlar esse patógeno dependem principalmente de melhores práticas

de manejo, higiene nas instalações físicas de criadouros e uso de antibióticos, enquanto uma vacina eficiente ainda não se encontra disponível (GERCHMAN, LYSNYANSKY et al., 2008).

Do mesmo modo, a pneumonia enzoótica suína, causada pelo patógeno *Mycoplasma synoviae*, afeta criações de porcos do mundo inteiro causando danos à economia por retardar o crescimento e diminuir a taxa de conversão de alimento em peso.

Proteínas secretadas de bactérias patogênicas são fatores-chave na colonização do hospedeiro. A análise dessas proteínas, chamada secretoma, pode assim permitir a identificação de novos fatores de virulência que são fundamentais para a invasão do hospedeiro e sobrevivência no interior do organismo deste (TROST, WEHMHÖNER et al., 2005). Nesse contexto, eletroforese bidimensional 2DE, juntamente com análise de fragmentos de proteínas por espectrometria de massa e identificação das proteínas tornou-se um método poderoso para desvendar fatores de patogenicidade em microorganismos (CORDWELL, NOUWENS et al., 2001; JUNGBLUT, 2001).

A agricultura é, atualmente, um dos pilares da economia brasileira. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que a área a ser colhida em 2012 seja de 49,5 milhões de hectares, 2,8% maior que o obtido em 2011 (MATA, GUEDES et al., 2012), sendo o arroz, o milho e a soja, os principais cultivares. O constante crescimento das áreas cultivadas e a necessidade do aumento da produtividade criam pressões econômicas que exigem o uso cada vez mais intensivo do solo. Como consequência, verifica-se também uma maior necessidade do uso de insumos e defensivos agrícolas. Segundo dados da Sociedade Rural Brasileira (SRB) foi verificado um crescimento de 16,3% entre os anos de 2010 e 2011 na comercialização de defensivos agrícolas (em: <www.srb.org.br>. Acesso em: 28 setembro 2012), o que acarreta em riscos à saúde humana e ambiente. Práticas de desenvolvimento sustentável englobam buscas a alternativas para o uso de fertilizantes químicos e pesticidas. Uma dessas estratégias é o desenvolvimento biotecnológico de agentes biológicos de controle de pragas ou simbioses que auxiliam o processo de nutrição da planta, tais como bactérias rizóbias e fungos micorrízicos, com a perspectiva de se melhorar a produtividade de modo mais sustentável.

Plantas interagem com uma ampla diversidade de microorganismos do solo através de suas raízes. Alguns desses microorganismos atuam como patógenos, causando danos à planta. Outros auxiliam no desenvolvimento vegetal enquanto, por sua vez, são beneficiados por recursos da planta, sendo considerados simbioses

mutualísticos. Entre esses, encontram-se bactérias rizóbias que favorecem as plantas por fixar e fornecer formas assimiláveis de nitrogênio e os fungos micorrízicos, que fornecem à planta nutrientes minerais absorvidos do solo. Esses fungos podem ser funcionalmente divididos em duas categorias, ecto e endomicorrizas. Fungos ectomicorrízicos não invadem células vegetais. Infiltram pelo córtex da raiz e estimulam respostas das células vegetais que tornam possível trocas de nutrientes. Fungos endomicorrízicos, por sua vez, são capazes de penetrar e atravessar células epidérmicas e corticais das raízes através de apressórios e de se instalar nas células corticais mais internas, onde no fim formam estruturas hifais altamente ramificadas chamadas arbúsculos. Acredita-se que os arbúsculos sejam o lugar onde ocorre a maioria das trocas de nutrientes entre fungos endomicorrízicos e as plantas hospedeiras (SMITH e SMITH, 1990). Cerca de 80% das plantas terrestres estabelecem simbioses com fungos micorrízicos arbusculares (MA), formando interações ubíquas presentes em todos os ecossistemas terrestres, incluindo paisagens naturais e agrícolas (HARRIER e WATSON, 2004).

Em ecossistemas terrestres, sejam naturais ou agrícolas, as raízes das plantas estão expostas a uma série de fatores de estresse bióticos e abióticos. Esses fatores podem causar danos à planta e diminuir sobrevivência, crescimento e produtividade. Em associações MA, as plantas muitas vezes ganham benefícios que ajudam a tolerar esses fatores de estresse. Fungos MA promovem crescimento e ramificação da raiz (BERTA, FUSCONI et al., 1993; AZCÓN-AGUILAR e BAREA, 1997), enquanto eles mesmos criam uma rede hifal extrarradicular que é conectada à raiz e que aumenta a zona de exploração de nutrientes para bem além da zona da rizosfera (SMITH e GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Esse aumento da superfície de absorção melhora a eficiência de absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, mas também outros macro e micronutrientes (SMITH e SMITH, 1990; SMITH, RAE et al., 2000), melhorando o status nutricional da planta, particularmente em solos pobres. Em troca, o fungo recebe formas orgânicas de carbono derivadas da fotossíntese da planta hospedeira (BAGO, DONAIRE et al., 1997; PFEFFER, DOUDS et al., 1999; BAGO, PFEFFER et al., 2000; BAGO, PFEFFER et al., 2002).

Fungos MA melhoram a resistência de plantas a ataques de patógenos e os danos às raízes parecem ser compensados pelo aumento da zona de depleção, como mencionado acima (AZCÓN-AGUILAR e BAREA, 1996). Fungos MA conferem à planta também proteção contra agentes de estresse abióticos, tais como seca (BOOMSMA e VYN,

2008; ABBASPOUR, SAEIDI-SAR et al., 2012), salinidade (AL-KARAKI, MCMICHAEL et al., 2004; GIRI, KAPOOR et al., 2007; LANGENFELD-HEYSER, GAO et al., 2007; RUIZ-LOZANO, ALGUACIL et al., 2009) e metais pesados (DAVIES, PURYEAR et al., 2001; CHRISTIE, LI et al., 2004; HILDEBRANDT, REGVAR et al., 2007). Esses benefícios têm atraído a atenção de cientistas para o uso de fungos MA em ações de preservação ambiental e práticas de agricultura sustentável como uma alternativa ao uso de pesticidas e fertilizantes químicos (GANGE, LINDSAY et al., 1999; HARRIER e WATSON, 2004; WANG, VESTBERG et al., 2008; LECOMTE, ST-ARNAUD et al., 2011).

Fungos MA pertencem ao exclusivo filo Glomeromycota (SCHÜBLER, SCHWARZOTT et al., 2001). São biotrofos obrigatórios e até o presente é impossível criar estruturas como arbúsculos em culturas axênicas (DASSI, SAMRA et al., 1999; DUMAS-GAUDOT, VALOT et al., 2004; FERROL, BAGO et al., 2004). Como a associação interfere grandemente com a fisiologia da planta, especialmente nas raízes, espera-se grandes modificações no perfil de expressão de proteínas em função da associação MA. Com isso em mente, diversos estudos sobre as mudanças nos perfis de transcritos e de proteínas relacionados com a associação MA foram realizados.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Desenvolver estudos proteômicos em diferentes tecidos biológicos visando a otimizar protocolos de extração de proteínas e resolução de eletroforese das bactérias *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*, além de células de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4), para possibilitar resolução dessas proteínas por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massa.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Extrair proteínas celulares de *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma hyopneumoniae* e analisar essas proteínas através de eletroforese bidimensional.

- Precipitar as proteínas presentes no meio de cultura inicialmente livre de proteínas e incubado por diferentes períodos de tempo com *M. hyopneumoniae* ou por 48h com *M. synoviae* a 37°C.
- Comparar os perfis de eletroforese bidimensional das proteínas celulares e extracelulares das bactérias estudadas.
- Identificar, por espectrometria de massa, as proteínas celulares e extracelulares de *M. synoviae*.
- Extrair proteínas membranares de células de raízes de *Medicago truncatula*.
- Aplicar o procedimento utilizado para raízes de *M. truncatula* em raízes de *Vitis*, porta-enxertos SO4
- Resolver as proteínas por focalização isoelétrica *ex gel* e *in gel*.
- Testar diferentes tampões e detergentes para solubilizar as proteínas membranares de *Vitis*, porta-enxertos SO4.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Cultivos de *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. synoviae cepa 53 isolada de uma granja avícola foi cultivada no Laboratório de Genética e Sanidade Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Suínos e Aves (Concórdia, Santa Catarina, Brasil), como descrito por Frey e colaboradores (1968). As células foram cultivadas em caldo Frey (FREY, HANSON et al., 1968) suplementado com soro suíno 12%, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) 0,1 g/L, hidrocloreto de L-cisteína monohidratado 0,1 g/L, penicilina G 106 UI e acetato de tálio 0,25 g/L a 37°C até a cultura alcançar o meio da fase *log* de crescimento, indicado por mudança de cor e turbidez. Células foram precipitadas por centrifugação e lavadas três vezes com caldo Frey modificado sem proteínas (glicose 3 g/L, NAD 0,1 g/L, hidrocloreto de L-cisteína monohidratado 0,1 g/L, penicilina G 106 UI e acetato de tálio 0,25 g/L) para reduzir o nível de proteínas contaminantes presentes no meio de crescimento. Células foram em seguida cultivadas nesse meio sem proteínas por 48h e em seguida centrifugadas. Precipitados celulares foram armazenados a -80°C e sobrenadantes a -20°C. Para monitorar a presença de proteínas contaminantes, iguais volumes de meio livre de proteínas não expostos a células de *M. synoviae* foram concentrados e analisados por 2DE como descrito a seguir.

Precipitados celulares e meios de cultura de *M. hyopneumoniae* (cepas 7448 e J[ATCC25934]) foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA Suínos e Aves, Laboratório de Sanidade Animal (Concórdia, Santa Catarina, Brasil). Células foram cultivadas em meio Friis (FRIIS, 1975; FRIIS, AHRENS et al., 1991) a 37°C por 24h até a cultura atingir a metade da fase *log* de crescimento, indicado por mudança de cor e turbidez. Células de *M. hyopneumoniae* foram precipitadas por centrifugação e lavadas três vezes em meio Friis sem proteínas para reduzir o nível de proteínas contaminantes presentes no meio de cultura. Para análises das frações celulares, células foram diretamente armazenadas a -80°C para análises de secretoma, células tratadas como descritas acima foram incubadas no mesmo meio Friis sem proteínas por 24 ou 48h e centrifugadas.

2.2 – Extração de proteínas celulares de *M. synoviae* e *M. hyopneumoniae*

Extrações de proteínas celulares foram realizadas como descrito anteriormente descrito (WESTERMEIER, REINER e NAVEN, TOM, 2002; PINTO, CHEMALE et al., 2007) com algumas modificações. Células foram coletadas por centrifugação a 18.000 x g por 10min e ressuspensas em 1mL de Tris-HCl 25mM, pH 7,2, PMSF 1mM. Células foram sonicadas por 6 ciclos de 25s a 25Hz alternados com intervalos de 1min, sempre em gelo. Suspensões celulares foram centrifugadas a 12.000 x g por 1h a 4°C. O sobrenadante, contendo a primeira extração de proteínas, em ausência de detergente, tiveram as proteínas totais quantificadas através do Kit 2-D QuantKit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante e armazenadas a -80°C.

Extrações das proteínas remanescentes foram realizadas em presença de detergente a partir desses precipitados celulares. Para isso, os precipitados foram ressuspensos em uréia 8M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, NP-40 1%, anfólitos 3-10 0,5%, DTT 65mM ou uréia 7M, tiouréia 2M, tris base 40mM, ASB-14 1%, anfólitos 3-10 0,5%, PMSF 1mM. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12.000 x g por 20min a 4°C. a concentração das proteínas do sobrenadante foi determinada como descrito acima e as amostras foram armazenadas a -80°C.

2.3 – Concentração de meios e extração de proteínas extracelulares

Amostras de 500 mL de caldo Frey sem proteínas inoculados com *M. synoviae* foram concentrados em um concentrador de bancada Quix Stand Benchtop através de uma coluna GE Healthcare Xampler™ UFP-10-C-4X2MA, membrana com Corte Nominal de Massa Molecular (NMWC, do inglês Nominal Molecular Weight Cut-off) de 10 kDa. Ácido Tricloroacético (TCA, do inglês *Trichloroacetic acid*) foi adicionado até uma concentração final de 12% e amostras foram deixadas em repouso por 1h em gelo. Proteínas foram precipitadas por centrifugação a 16.000 x g por 20min a 4°C e os precipitados foram lavados três vezes com acetona gelada (-20°C). As amostras foram secadas por ventilação e solubilizadas em solução tamponada de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 4%, tampão para Gradiente Imobilizado de pH (IPG, do inglês *Immobilized pH Gradient*) 3-10 0,5%, ditiotretitol (DTT) 18 mM e azul de bromofenol 0,002%. Concentração de proteínas totais foi determinada utilizando o kit

comercial de dosagem de proteínas 2D Quant Kit (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 – Cultivo das plantas e Extração das Raízes

Videiras: Porta-enxertos SO4 de *Vitis* (obtido a partir da hibridização entre *V.berlandieri* e *V.riparia*) são mantidas como plantas-mãe pelo INRA (do francês, Instituto Nacional de Pesquisa Agronomica), domínio de Epoisses, Bretenière, França, onde fragmentos do caule já em processo de produção de raízes são produzidos e gentilmente cedidos para fins de pesquisa na sede do instituto em Dijon, França. Os fragmentos são deixados por três semanas em terragreen + solo de Epoisses 1:1 e regados diariamente com água destilada. Em seguida, o solo é removido da raiz recém-formada lavando-se a planta com água destilada e a planta é reinserida em um vaso maior contendo a mesma mistura para crescimento por mais cinco semanas.

Limpeza e armazenagem das raízes: Após o crescimento das raízes as plantas são removidas da terra, lavadas em água destilada com gelo moído produzido a partir de água destilada para minimizar alterações proteômicas causadas pela manipulação, cortadas do fragmento do caule, pesadas, envoltas em papel alumínio e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as raízes são armazenadas a -80°C até a extração protéica.

2.5 – Trituração das Raízes

As raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) foram trituradas mecanicamente com auxílio de graal e pilão, em presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e branco. Para minimizar a vaporização do nitrogênio líquido durante o processo de maceração, todos os procedimentos foram realizados em câmara fria, a 4°C . Foi também testada a presença de areia de Fontainebleau ($150\text{-}300\mu\text{m}$) com a finalidade de maximizar a trituração de tecidos rígidos em proporções de 0,5; 1, 2 e 4g de areia por grama de tecido fresco. Ocasionalmente, ao processo de trituração, foram adicionados quelantes de compostos fenólicos, seja PVPP (Sigma Aldrich P6755) ou carvão ativado (Sigma Aldrich C4386), em razões variáveis, determinadas empiricamente ao longo do processo, conforme indicado em cada etapa.

2.6 – Suspensão do triturado

Para se iniciar o processo de purificação das membranas, o pó obtido por trituração em presença de nitrogênio líquido deve ser

suspendido em um tampão que permita separar o material celular (membranas e proteínas citoplasmáticas) do material particulado, artefato da trituração, composto de restos de paredes celulares, tecidos rígidos e fragmentos de caule. Assim, após o processo de trituração, o pó formado foi pouco a pouco adicionado a um dos seguintes tampões, sob agitação em gelo no interior de câmara fria (4°C) em:

Tris-MES pH 8,0 50mM; sacarose 0,5M; PMSF 1mM

ou

Tris-MES pH 8,0 50mM; sacarose 0,5M; EDTA 20mM; DTT 0,1mM; PMSF 1mM

ou

Tris HCl pH 7,5 100mM; sacarose 100mM; EDTA 20mM; DTT 0,1mM; PMSF 1mM

ou

BTP (Bis-Tris Propano)-MES pH 9,0 5mM; tris 80mM; sacarose 0,25M; EDTA 3mM; Glicerol 10%; PVPP* 0,2%; DTT 1mM; ácido ascórbico 5mM; PMSF 1mM.

*Alternativamente, o PVPP foi misturado ao triturado antes de misturá-lo com o tampão. Nesses casos, a quantidade de PVPP empregada foi de 5% em relação ao peso fresco das raízes.

Após a total mistura do triturado ao tampão, a suspensão foi deixada sob agitação em gelo no interior da câmara fria por intervalos que variaram de 20min a 2h.

Exceto nos casos em que o processo de trituração foi feito em presença de carvão ativado, uma quantidade de tampão 3x maior que a quantidade de amostras (v/p) se mostrou suficiente para uma correta homogeneização. Em presença de carvão ativado, esse volume precisou ser aumentado, pouco a pouco, até obter-se uma suspensão com viscosidade suficientemente pequena para possibilitar a homogeneização por agitador magnético.

2.7 – Eliminação da matéria particulada

O material suspenso no tampão de trituração foi separado dos restos de paredes celulares e tecidos rígidos através de centrifugação, em que a matéria particulada é precipitada e o sobrenadante, contendo a fração de interesse, é transferido para outro tubo.

De acordo com a composição da matéria particulada, o precipitado mostrou-se com diferentes níveis de consistência, exigindo adaptações empíricas no processo de centrifugação. Normalmente, a centrifugação foi feita em duas etapas:

12.000 x g, 20min, 4°C com transferência do sobrenadante para um outro tubo igual

16.000 x g, 20min, 4°C com coleta do sobrenadante e transferência do sobrenadante para tubo de ultracentrifugação.

Os precipitados de ambas centrifugações são desprezados.

Ocasionalmente, o processo de centrifugação foi precedido por filtragem através de malha de nylon para remover os detritos mais grosseiros antes do processo de centrifugação.

2.8 – Isolamento da fração microsomal

A fração microsomal, ou seja, o conjunto membranar de plasmalema, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, foi precipitado a partir do sobrenadante obtido na etapa anterior por ultracentrifugação a 100.000 x g, 4°C, 1h. Após a ultra centrifugação, as membranas são ressuspensas em tampão adequado, para um posterior fracionamento. O tampão em questão é composto de

Tris-MES pH 7,2 1mM; MgSO₄ 1mM; sacarose 15%

ou

BTP-MES pH 9,0 5mM; tris 80mM; sacarose 0,25M; EDTA 3mM; glicerol 10%; PVPP 0,2%; DTT 1mM; ácido ascórbico 5mM; PMSF 1mM.

Para garantir uma ótima suspensão das membranas, é feita uma homogeneização do material com auxílio de homogeneizador em vidro do tipo Potter (marca Kontes Duall, n 22) sobre gelo em câmara fria (a 4°C).

2.9 – Fracionamento de membranas por gradiente de sacarose

O gradiente de sacarose permite separar as membranas internas da célula (retículo e complexo de Golgi) da plasmalema. Em um tubo de ultracentrífuga são depositados 5mL de solução de sacarose a 38%, em seguida solução de sacarose a 33%. As duas soluções não se misturam formando uma interface entre as regiões de sacarose a 33 e 38%.

Sobre essas duas soluções, é depositado o extrato de membranas obtido no passo anterior. O tubo é então submetido a uma ultracentrifugação. Para não perturbar o gradiente de sacarose ao longo do processo de centrifugação, esta é feita em tubos oscilantes (“swing”) (Rotor Beckman 45Ti) e aceleração e desaceleração lentas. A centrifugação é feita a 110.000 x g, 4°C, 1h.

Após o processo de centrifugação, o que se observa é que a plasmalema fica suspensa entre as fases de sacarose a 33 e a 38%.

As diferentes frações são coletadas, ultracentrifugadas a 100.000 x g por 1h a 4°C e os precipitados são ressuspensos em Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, glicerol 20%, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL.

2.10 – Limpeza da Plasmalema

A fração de interesse, ou seja, região entre as fases de 33 e 38% de sacarose contendo a plasmalema é coletada e ressuspensa em tampão de limpeza e em seguida ultracentrifugado, a 100.000 x g por 1h a 4°C. O referido tampão é composto por Tris-MES pH 7,3 10mM; sacarose 250mM; EDTA 1mM; PMSF 1mM; DTT 2mM.

Ressuspensão de proteínas membranares para ensaios de eletroforese

Para análise por eletroforese monodimensional, uma alíquota do precipitado é suspensa diretamente em: Tris-HCl pH 6,8 62,5mM; β-mercaptoetanol 5%; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,002%.

Misturas protéicas suspensas nesse tampão são aquecidas a 95°C durante 5min sob agitação a 600 rpm (Thermomixer Comfort Eppendorf) e em seguida vortexadas antes da aplicação no gel de poliacrilamida, a não ser que descrito de outro modo.

Para ensaios de eletroforese bidimensional, o precipitado é suspenso, a princípio em uréia 7M; tiuréia 2M; CHAPS 4%; anfólitos (IPG Buffer 3-10 GE Healthcare) 2%; DTT 40mM, a não ser que descrito de outro modo.

2.11 – Liofilização e Diálise

Amostras excessivamente diluídas foram congeladas em nitrogênio líquido por alguns minutos e em seguida submetidas a vácuo por 12h, mínimo, até a formação de um pó seco nos tubos.

Amostras com excesso de sais foram dialisadas empregando-se o sistema Millipore Ultrafree-MC, 10,000 NMWL (retenção a partir de 10kDa).

As frações foram centrifugadas a 4000 x g por 4horas a 4°C. Após a centrifugação, o filtrado de cada amostra foi eliminado e o que foi retido foi ressuspensa em 400µL de tampão contendo Tris-HCl 50mM pH 8,8 e detergente CHAPS 1%. A operação foi repetida mais duas vezes.

As condições de diálise acima descritas foram determinadas empiricamente, fazendo-se testes com as frações 1 e 2 a em ciclos de

centrifugação de 2000 x g por 15 e 30min, 3000 x g por 30min, 4000 x g por 30min, 1h, 2h e 4h. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C.

2.12 – Precipitação de proteínas vegetais por acetona

Proteínas em solução foram precipitadas quando necessário utilizando-se acetona adicionando-se um volume de acetona pré-refrigerada a -20°C 3x maior do que o volume de amostra, agitação em vórtex, repouso de 1 hora a -20°C e centrifugação por 5min a 4°C. Após a centrifugação a acetona é desprezada e precipitado protéico é deixado secar por vaporização no fluxo laminar.

2.13 – Precipitação de proteínas vegetais com TCA

Alternativamente, proteínas em suspensão foram precipitadas em presença de Ácido Tricloroacético (TCA), de acordo com o seguinte procedimento

- Adição de TCA 100% na razão 1:9 (Concentração final de TCA = 10%) e incubação em gelo durante 1 hora.

- Centrifugação a 15.000 x g por 30min a 4°C. Remoção do sobrenadante com auxílio de uma pipeta, nova centrifugação a 15.000 x g por 5min a 4°C e remoção do restante do sobrenadante com auxílio de uma pipeta.

- Adição de acetona resfriada (a -20°C), ressuspensão do precipitado e incubação por 30min a -20°C. Centrifugação a 15.000 x g por 10min a 4°C e eliminação do sobrenadante. Esta etapa foi repetida 3x ou até a obtenção de um precipitado límpido.

- Vaporização à temperatura ambiente no interior de fluxo laminar.

2.14 – Solubilização de proteínas membranares

Distintos tratamentos foram empregados para se otimizar a solubilização de proteínas membranares de Vitis – Porta-enxertos SO4.

A fração microsomal, suspensa em Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, glicerol 20%, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL foi alíquotada e cada uma das alíquotas foi submetida a um dos seguintes tratamentos:

Controle

- Diretamente precipitado em presença de acetona e suspensão em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, IPG (Anfólitos Pharmalyte General Electric Healthcare pH 3-10) 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002%.

Triton X-100

- Adição de Triton X-100 até uma concentração de 0,2%
- Agitação leve a 4°C durante 10min
- Centrifugação a 120.000 x g por 45min a temperatura ambiente
- Suspensão do precipitado em 400µL de Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, glicerol 20%, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL.
- Ultracentrifugação a 120.000 x g por 45min a temperatura ambiente
- Suspensão do precipitado em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002%.
- Precipitação do sobrenadante em presença de acetona e ressuspensão do precipitado no mesmo tampão (Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002%).
- Carbonato
 - Diluição em um volume 200x maior de carbonato de cálcio 0,1M
 - Repouso por 30min a 0°C
 - Centrifugação a 15.000 x g por 60min a 4°C
 - Suspensão do precipitado em 400µL de Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, glicerol 20%, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL.
 - Precipitação em presença de acetona e ressuspensão em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, Pharmalyte 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002%.
- Clorofórmio/Metanol (5:4)
 - Diluição o extrato em um volume de clorofórmio/metanol (5:4) 9x maior
 - Repouso por 15min a 0°C
 - Centrifugação pa 12.000 x g por 20min a 4°C
 - Fracionamento das tres fases obtidas: metanol, interface, clorofórmio
 - Liofilização das fases metanol e clorofórmio e secagem da interface por vaporização em fluxo laminar.
 - Ressuspensão de cada uma das frações em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002%.

2.15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Ensaio de eletroforese foram desenvolvidos utilizando-se minigéis (8cm x 7,3cm x 1mm) a 12% preparados com auxílio do sistema Mini-PROTEAN 3 Cell Bio-Rad, seguindo-se as instruções do fabricante. Em géis monodimensionais foram aplicadas quantidades suficientes de amostra para atingir entre 20 e 50 μ g de proteínas totais sem exceder o volume de 25 μ L e para géis bidimensionais foram aplicadas quantidades suficientes de amostra para atingir entre 50 e 100 μ g de proteínas totais sem exceder o volume de 100 μ L.

Composição dos géis de eletroforese (gel de separação):

Tris HCl pH 8,8 380mM; acril/PDA 37,5:1 12%; SDS 0,1; APS 0,1%; TEMED 0,14%.

Géis monodimensionais exigem um gel de deposição sobre o gel de separação, com a seguinte composição:

Tris HCl pH 6,8 125mM; acril/PDA 37,5:1 3,75%; SDS 0,1%; APS 0,05%; TEMED 0,1%.

A separação das proteínas é feita submetendo-se os géis a uma corrente elétrica com amperagem fixa. A intensidade inicial da corrente nas migrações é de 10mA por gel na cuba de eletroforese por alguns minutos, até que a frente de migração marcada pelo azul de bromofenol presente nas amostras penetre no gel de migração, tendo saído totalmente do gel de deposição (eletroforese monodimensional) ou do gel de agarose (eletroforese bidimensional).

O peso molecular aparente das proteínas agrupadas em bandas ou bandas nos géis de eletroforese foi estimado por comparação utilizando padrões de peso molecular Precision Plus Protein Unstained Standards – Bio-Rad, com os pesos moleculares de 250, 150, 100, 65, 50, 37, 25, 20, 15 e 10kDa (Figura 4).

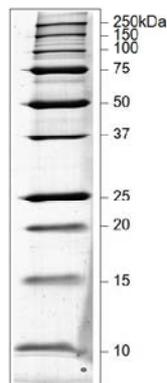


Figura 4: Marcadores de peso molecular molecular Precision Plus Protein Unstained Standards – Bio-Rad, com os pesos moleculares indicados em kDa.

Dois métodos de coloração foram empregados, de acordo com o objetivo do experimento e a qualidade obtida no gel: a coloração com o azul de Coomassie coloidal e a coloração com nitrato de prata. A coloração em azul de Coomassie permite quantificação das bandas, sendo mais adequada para uma análise comparativa, além de apresentar melhor compatibilidade com a espectrometria de massa, enquanto a coloração com prata é um método mais sensível, sendo mais adequada para se detectar bandas minoritárias ou quando a quantidade de proteínas é insuficiente para uma detecção com o azul de Coomassie.

2.16 – Eletroforese bidimensional

Amostras em solução de reidratação (250µg de proteínas totais) foram aplicadas sobre géis com gradiente imobilizado de pH (géis IPG) (GE Healthcare), pH 3-10 e mantidas por 8 a 12h a temperatura ambiente antes da Focalização Isoelétrica (IEF, do inglês *isoelectric focusing*). IEF foi realizada com auxílio do aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) com temperatura máxima fixada em 20°C e uma voltagem total de 17 kVh (500 V por 1 h, gradiente de 500 V a 1000 V em 1 h, gradiente de 1000 V a 8000 V em 2 h 30 min, 8000 V por 30 min) e uma corrente máxima fixada em 25 µA por gel IPG. Após IEF, géis IPG foram equilibrados por 20min em uréia 6 M, glicerol 30%, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*) 2%, Tris-HCl mM 8,8 50 mM, DTT 1% e mais 20min em solução semelhante contendo iodoacetamida 4% em vez de DTT. Tratamentos de equilibração foram feitos sob agitação suave a temperatura ambiente. A segunda dimensão foi realizada por Eletroforese em Géis homogêneos de Poliacrilamida 12% em presença de SDS (SDS-PAGE, do inglês *Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Após eletroforese, os géis foram fixados em ácido fosfórico a 8% e etanol a 40% e corados com Coomassie Brilliant Blue coloidal (CBB) G-250 (Bio-Rad). Géis corados foram digitalizados com auxílio de scanner GE Healthcare ImageScanner III e as imagens obtidas foram analisadas com auxílio do programa GE Healthcare ImageMaster 2D Platinum v. 7.2, que permite o cálculo de massa molecular aparente (M_r) e ponto isoelétrico (pI) de cada banda. Bandas foram cortadas manualmente do gel e mantidas em ácido acético a 0,5%.

2.17 – Digestão in gel, análise por espectrometria de massa e identificação de proteínas

Os fragmentos retirados dos géis foram lavados três vezes com bicarbonato de amônio 25mM em acetonitrila 50% para remoção do corante e desidratados em acetonitrila 100%. Fragmentos secos foram reidratados com solução de tripsina (Tripsina Promega Gold Mass Spectrometry Grade 10 µg/mL em bicarbonato de amônio 25 mM) e incubadas por 12 a 16 h a 37°C. Peptídeos foram extraídos dos fragmentos de gel por três lavagens consecutivas com acetonitrila 50%, Ácido Trifluoroacético (TFA, do inglês *Trifluoroacetic acid*) 5% durante 30min a cada lavagem e extratos de peptídeos foram combinados e secados em um concentrador a vácuo (*Eppendorf Vacuum Concentrator Plus*). Peptídeos foram ressuspensos em TFA 0,1% e misturados com igual volume de solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 10mg/mL em acetonitrila/metanol 1:1 contendo TFA a 0,1%), aplicados no alvo de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI, do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e cocristalizados a temperatura ambiente. Espectros de massa foram obtidos em uma gama de 400 a 4.300 Da usando um laser (334 nm, 200 Hz) como fonte de ionização. Cada espectro foi formado com dados acumulados de pelo menos 900 disparos usando o programa Bruker Daltonics flexControl 3.3. O instrumento (Autoflex III MALDI-TOF Bruker Daltonics) foi utilizado em modo reflectron positivo com uma voltagem de aceleração de 19kV. Calibração externa foi realizada com a utilização de uma mistura de polipeptídeos fornecida pelo próprio fabricante do equipamento contendo angiotensina II, angiotensina I, substância P, bombesina, ACTH Chip 1-17, ACTH Chip 18-39 e somatostatina 29. Picos gerados pela matriz e por autólise da tripsina foram utilizados como padrões internos de calibração. Listas de massas foram comparadas com a base de dados do Centro “Nacional” de Informação Biotecnológica (NCBI, do inglês *National Center for Biotechnology Information*) utilizando o motor de busca Mascot (Em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 28 setembro 2012). Parâmetros de busca foram estabelecidos como descrito a seguir: enzima: tripsina; taxon: Mycoplasma; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância de massa: 100ppm; espectros monoisotópicos; massas carregadas 1+, decoy ativado. Escore Mascot foi o principal fator de confiança para identificação das proteínas, sendo consideradas identificações positivas aquelas com score acima de 57 ($p < 0,05$), atribuído pelo próprio sistema Mascot para identificação de proteínas de

M. synoviae com os parâmetros de busca estabelecidos. Identificações foram consideradas positivas apenas quando a lista de proteínas candidatas renderam identificações não ambíguas, ou seja, a proteína identificada apresenta score Mascot muito superior aos scores das demais proteínas candidatas (Figura 5). Foi observado que proteínas com identificação abaixo do score mínimo de aceitação são atribuídas a outras espécies do gênero *Mycoplasma*, enquanto todas as identificações acima do score foram sempre associadas a *M. synoviae*, indicando a robustez dos critérios de identificação (Tabela 1). Também considerados dados de massa molecular e ponto isoelétricos teóricos e obtidos, número de peptídeos coincidentes e a percentagem da cobertura total da sequência da Fase de Leitura Aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) pelos peptídeos.

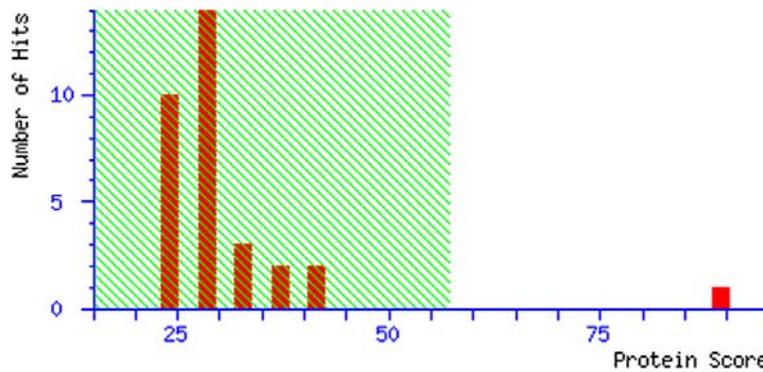


Figura 5: Gráfico representativo de identificação positiva de proteína de *Mycoplasma synoviae* através do motor de pesquisa Mascot (fosfodiesterase de proteína carreadora de acil). A não ambiguidade da identificação é demonstrada pela diferença de score entre a proteína identificada (89) e as demais proteínas candidatas (detalhes na tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre os scores de uma identificação representativa pelo motor de pesquisa Mascot. Identificação aceita em negrito.

Código gi	Score	Confiança	Proteína	Espécie
gi 71894112	89	3,4e⁻⁰⁵	Fosfodiesterase de proteína carreadora de acil	<i>M. synoviae</i>
gi 42560943	29	34	Pirofosfatase inorgânica	<i>M. mycoides</i>
gi 42561542	28	51	Proteína hipotética MSC_1029	<i>M. mycoides</i>
gi 15829166	43	1,4	Esterase/lípase	<i>M. pulmonis</i>

2.18 – Western Blotting

Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose: após a separação por peso molecular, pressionar o SDS-PAGE contra a membrana de nitrocelulose conforme ilustração (Figura 6), imergir em tris 0,24%; glicina 1,152%; SDS 0,4%; metanol 20%. O sanduíche assim formado é assim submetido a uma corrente elétrica de 200mA (anodo do lado da membrana, catodo do lado do gel) durante 3 a 4 horas, fazendo com que as proteínas sejam transferidas para o gel.

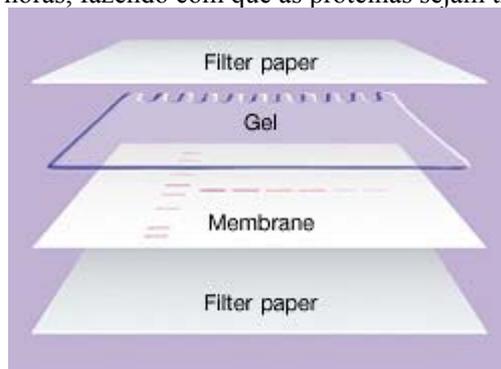


Figura 6: acoplamento do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) à membrana de nitrocelulose para transferência de proteínas (Bio-Rad, 2010).

Coloração com Vermelho de Ponceau: a membrana é deixada durante 10min sob agitação leve na solução de vermelho de Ponceau. Esta coloração permite que toda a proteína fique temporariamente corada (Figura 7), o que serve para fotografar a membrana para assim auxiliar na identificação das marcas no filme radiográfico ao final do experimento de Western Blot.

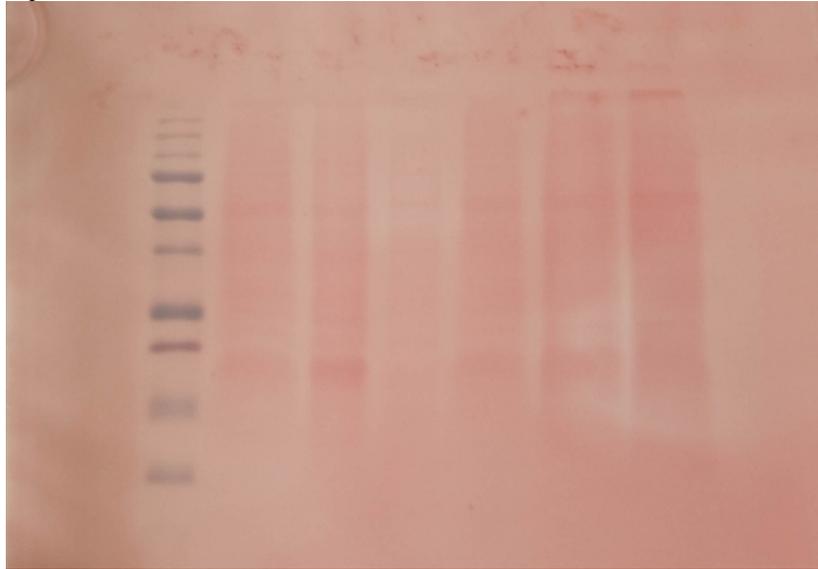


Figura 7: Membrana de nitrocelulose após a transferência corada com vermelho de Ponceau.

Saturação da membrana: após a transferência a membrana é mergulhada em TBS (Tris HCl pH 7,5 20mM; NaCl 0,5M)-Tween 0,05% com leite em pó desnatado a 5% durante 1h à temperatura ambiente sob agitação suave. O final do processo, a membrana pode ser mantida a 4°C por até 12h. Antes de incubar a membrana com o anticorpo primário, a membrana é lavada 3x (banhos de 5min) em TBS-Tween 0,05%.

Incubação com anticorpos primários e secundários: a membrana é em seguida exposta aos anticorpos primários diluídos na razão recomendada pelo fabricante durante uma hora à temperatura ambiente (sem agitação), lavada 3x (banhos de 5min) em TBS-Tween 0,05% e, em seguida, incubada com os anticorpos secundários da mesma maneira.

Reação de Imunofluorescência e impressão do filme radiográfico: a membrana é mergulhada na mistura das soluções do kit ECL (Perkin

elmer) e deixada durante 5min. Em seguida, a membrana é presnada ao filme radiográfico ao abrigo da luz durante 5min e o filme é mergulhado em solução reveladora, onde permanece sob agitação até o surgimento das bandas, lavado em água e mergulhado em solução fixadora. Se a exposição não for suficiente, um novo filme radiográfico pode ser exposto por intervalos consideravelmente maiores, tais como 30min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Proteínas de *Mycoplasma*

3.1.1 – Proteínas celulares de *Mycoplasma synoviae*

Após 48 h de incubação em um caldo Frey modificado sem proteínas, a partir de proteínas extraídas dos precipitados celulares foi possível identificar 27 diferentes proteínas. Dessas, 8 já haviam sido detectadas em um estudo prévio de proteínas de *M. synoviae* como proteínas celulares (MENEGATTI, TAVARES et al., 2010). Essas proteínas são 6-fosfofrutoquinase, endopeptidase O, glicose-6-fosfato isomerase, leucil aminopeptidase, fosfoenolpiruvato-proteína fosfatase, serina/treonina-proteína quinase, fator de alongação GreA e XAA-Pro aminopeptidase.

3.1.2 – Proteínas celulares de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Duas amostras de proteínas celulares de *M. hyopneumoniae* 7448 e *M. hyopneumoniae* J foram extraídas em tampão sem detergente e analisados por 2DE em IPG de 13 cm, pH 3-10, acoplados a géis de PAGE de 10cm de altura (Figura 8). Um máximo de 400 bandas bem definidas foi observado em um único gel para a cepa 7448 e 259 bandas para a cepa J. As proteínas resolvidas nesses géis são provavelmente proteínas citosólicas, principalmente, ou proteínas solúveis associadas extrinsecamente à membrana plasmática.

Após a remoção das proteínas solúveis num sistema de tampão sem detergentes, o precipitado protéico resultante foi ressuspenso em um tampão de lise contendo CHAPS 4% combinado com NP-40 1% ou ASB-14 1%. Géis bidimensionais de 13cm, pH 3-10 permitiram a separação adequada de 53 e 57 bandas para as proteínas de *M. hyopneumoniae* J suspensas em presença de ASB-14 e 90 e 330 bandas para as proteínas celulares da linhagem 7448 ressuspendidas em presença de CHAPS (Figura 9). Estudos comparando a eficiência de diferentes detergentes na extração de proteínas de solubilidade limitada, demonstrando que, enquanto as proteínas solúveis podem ser facilmente extraídas de misturas celulares complexas, várias proteínas membranares tendem a perder-se junto com os precipitados durante a ultracentrifugação (MOLLOY, HERBERT et al., 1998; BABU, WHEELER et al., 2004; MARMAGNE, ROUE et al., 2004). Em alguns casos específicos, para solubilizar determinados conjuntos de proteínas de cada vez, diferentes combinações de detergentes zwitteriônicos podem oferecer melhores resultados do que solubilizações em presença

do detergente tradicionalmente utilizado CHAPS (SANTONI, RABILLOUD et al., 1999; MOLLOY, HERBERT et al., 2000). Por outro lado, para a solubilização de complexas misturas de proteínas membranares, combinações de detergentes como CHAPS/NP-40 vêm sendo utilizadas com resultados promissores (ZHANG, MA et al., 2008). Isso pode dever-se à complexidade de proteínas membranares intrínsecas e a ação de um detergente não iônico, como NP-40 pode complementar com a ação de um detergente zwitteriônico como o CHAPS (ZHANG, L., XIE, J. et al., 2005).

Enriquecer proteínas, seja por fracionamento celular ou por tratamentos que permitam a solubilização de umas proteínas mas não outras podem ajudar a identificação de proteínas com níveis de expressão mais baixos por separar de antemão algumas proteínas mais abundantes que podem mascarar a presença de proteínas expressadas em níveis mais baixo (ZHANG, WANG et al., 2006). Neste trabalho nós também fomos capazes de realizar um enriquecimento parcial de proteínas menos solúveis através da extração prévia das proteínas mais solúveis em tampão de extração sem detergentes, antes da extração em presença de CHAPS/NP-40 ou ASB-14. A sobreposição das imagens das duas frações extraídas dessa maneira, permite a visualização de proteínas com diferentes níveis de expressão dentro de uma paisagem em grande parte similar de outras proteínas (Figura 10).

3.1.2 – Proteínas extracelulares de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Análises bidimensionais de proteínas extracelulares foram feitas incubando precipitados de células viáveis de *M. hyopneumoniae* em seis amostras de meio Friis sem proteínas e incubando os meios inoculados a 37°C por 24h ou 48h antes de precipitar as proteínas em tampão de reidratação. Géis de 7cm, pH 3-10, permitiram a resolução de um total de 623 bandas somadas em todos os 5 géis analisados, com grande variação entre os diferentes géis (exemplo de gel em Figura 11). Comparações entre cada perfil de proteínas extracelulares com todos os perfis celulares foram feitas e não se observou clara correlação entre as diferentes frações. Isso significa que, ainda que ocorra espontânea lise celular, foi possível criar um perfil de secretoma que nitidamente difere dos perfis proteômicos celulares, o que indica que proteínas secretadas podem ter sido enriquecidas através desse procedimento.

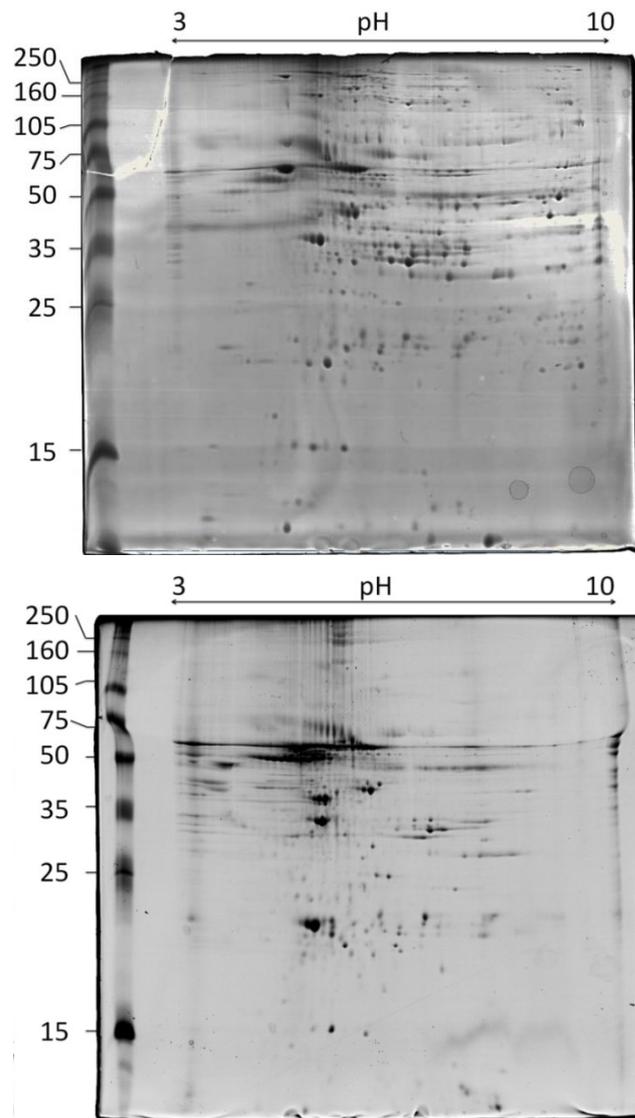


Figura 8: Proteínas celulares de *M. hyopneumoniae* 7448 (superior) e J (inferior) extraídas em tampão sem detergente. IEF realizada em gradiente imobilizado de pH de 13cm, pH 3-10. 300 μ g de proteínas aplicadas em cada gel. Géis corados com Coomassie Blue.

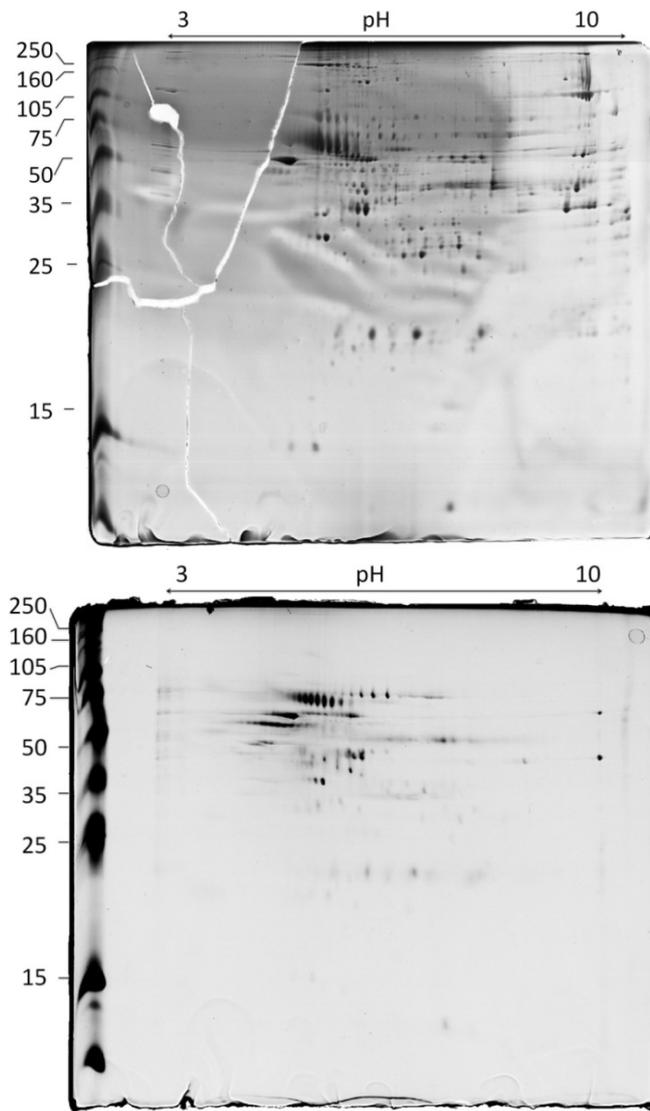


Figura 9: Proteínas celulares de *M. hyopneumoniae* 7448 extraídas em tampão acrescido de CHAPS/NP-40 (superior) ou ASB-14 (inferior). IEF realizada em gradiente imobilizado de pH de 13cm, pH 3-10. 300 μ g de proteínas aplicadas em cada gel. Géis corados com Coomassie Blue.

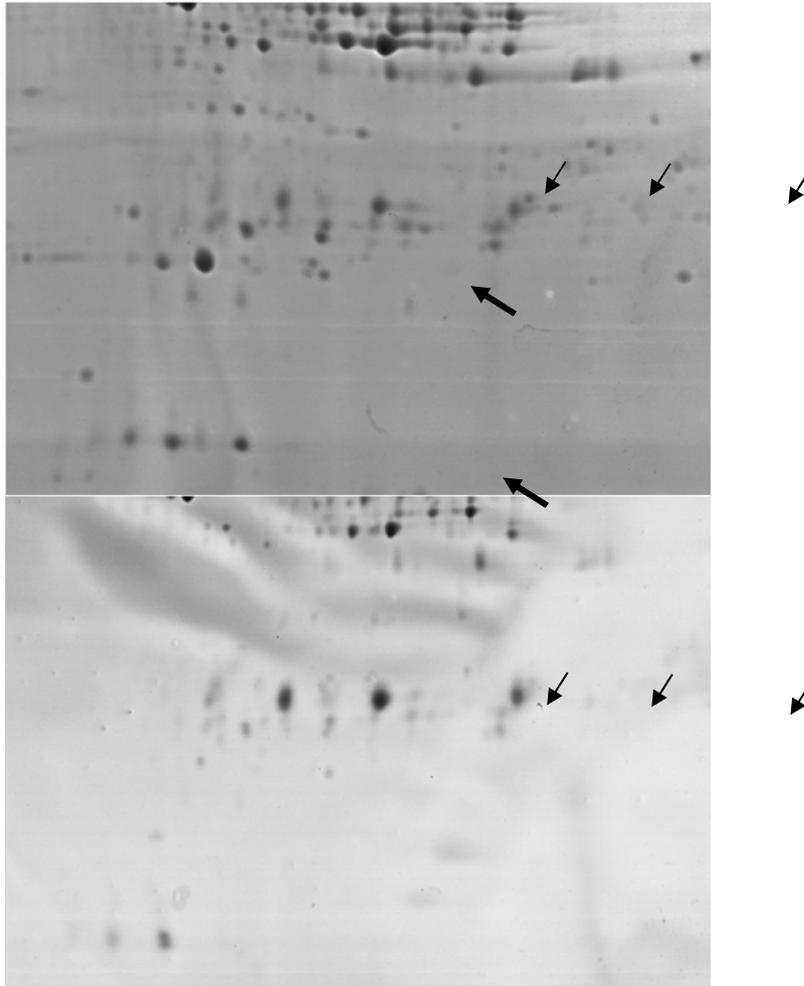


Figura 10: Comparação de perfis bidimensionais de proteínas celulares de *M. hyopneumoniae* 7448 extraídas em ausência de detergente (superior) e em presença de CHAPS/NP-40 (inferior). Flechas finas indicam bandas presentes na fração extraída sem detergentes mas enriquecidas na extração subsequente em presença de CHAPS/NP-40. Flechas largas indicam proteínas presentes na fração extraída sem detergente e aparentemente ausentes na extração feitas em presença de CHAPS/NP-40.

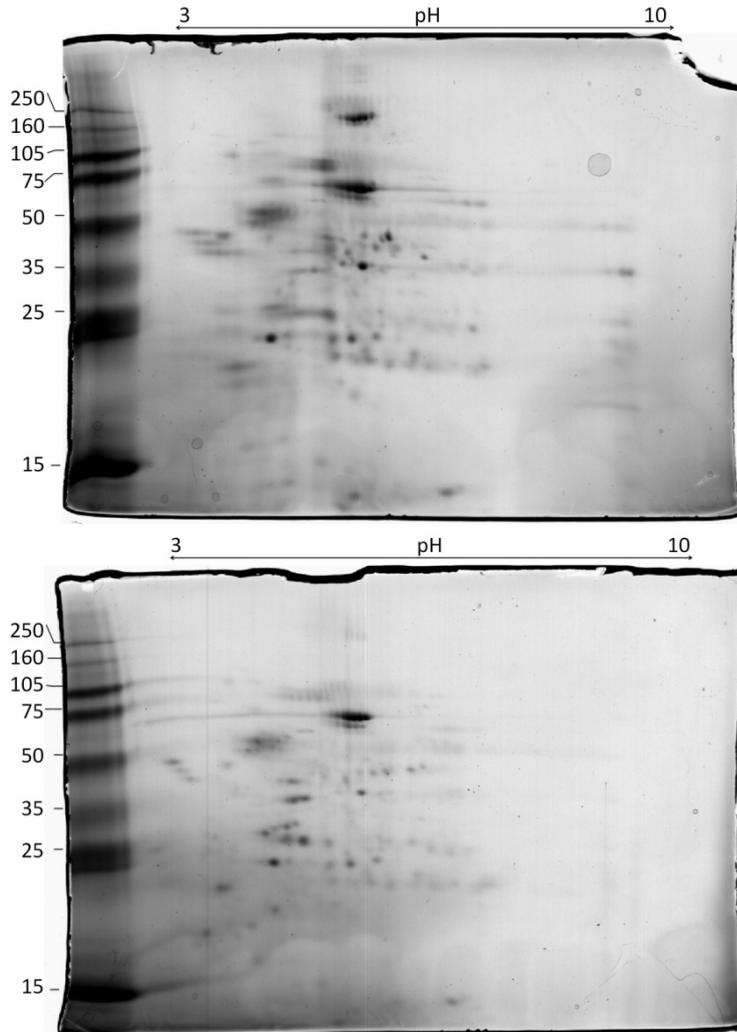


Figura 11: Gel bidimensional representativo de meio Friis livre de proteínas incubado por 48h a 37°C em presença de *M. hyopneumoniae* 7448 (superior) e J (inferior). IEF realizada em gradients imobilizados de pH de 7cm de comprimento, pH 3-10. Coloração em Coomassie Blue.

3.1.2 – Proteínas extracelulares de *Mycoplasma synoviae*

Estudos foram feitos também comparando-se proteínas celulares e proteínas extracelulares de *Mycoplasma synoviae* 53, conforme metodologia descrita anteriormente para *M. hyopneumoniae*. Em estudos preliminares, foi possível observar grandes mudanças no perfil em função das diferentes frações, embora algumas proteínas encontravam-se nitidamente presentes tanto entre as proteínas da fração celular quanto entre as proteínas da fração extracelular (Figura 12).

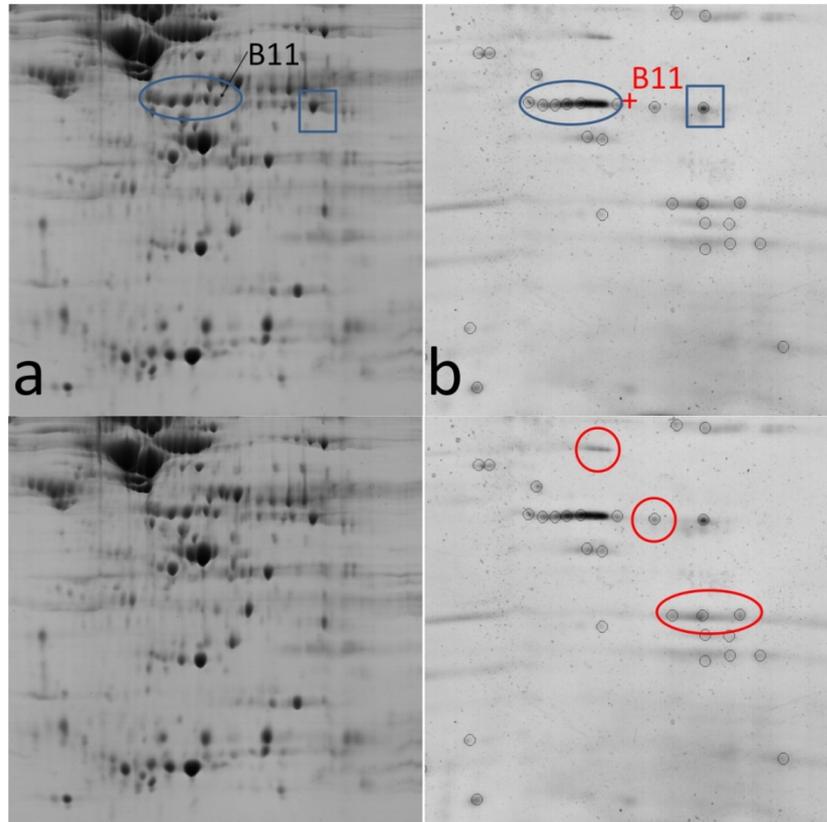


Figura 12: Setores de eletroforese bidimensional de proteínas celulares (a) e extracelulares (b) de *M. synoviae*. Figuras nos painéis superiores indicam similaridades entre os dois perfis. Painéis inferiores são cópias idênticas dos painéis superiores e observa-se em destaque proteínas presentes na fração extra-celular não claramente detectadas na fração celular.

Na fração extracelular, foi possível identificar 3 proteínas não caracterizadas e 16 diferentes proteínas caracterizadas (Figura 13 e Tabela 2), oito das quais não foram observadas na fração celular (Tabela 3). A não observação dessas proteínas na fração celular não significa que elas estejam ausentes do citoplasma mas, mais provavelmente, que sua presença seja mascarada pela presença de proteínas citoplasmáticas mais abundantes. Essas proteínas são: proteína de divisão celular, DNA polimerase III – subunidade beta, fator de elongação G, frutose-bifosfato aldolase, fosfodiesterase da proteína carreadora de acil e as proteínas hipotéticas MS53_0566, MS53_0115, e MS53_0598.

Quando presentes no citoplasma, as proteínas identificadas participam de diversas vias metabólicas, como defesas antioxidantes, biossíntese de proteínas, biossíntese de lipídios, via glicolítica e gluconeogênese. A tioredoxina redutase reduz o sítio ativo ditiol ou dissulfeto da tioredoxina, uma proteína que, por sua vez, é capaz de reduzir outras proteínas, atuando assim como antioxidante. Os fatores de elongação, EF-Tu e EF G permitem, respectivamente, que o RNA transportador complexado com aminoácido associe-se ao ribossomo durante a síntese de proteínas e que o ribossomo desloque-se ao longo da fita de RNA mensageiro para formar cada ligação peptídica de modo dependente de GTP. A chaperona molecular DnaK, também conhecida como proteína de choque térmico Hsp70 (massa molecular de 70kDa) é uma chaperona que carrega consigo um ATP. No momento de síntese de uma nova proteína, ela entra em contato com o polipeptídeo em formação, hidrolisa o ATP e liga-se fortemente a essa proteína, impedindo que ela se agregue ou se enovele de modo incorreto antes do fim da síntese. Sua expressão mostra-se aumentada em condições de estresse, o que caracteriza a DnaK como uma proteína de choque térmico. A fosfodiesterase de proteína carreadora de acil cataliza a ligação fosfodiéster entre o radical acil e a proteína carreadora de acil durante a biossíntese de ácidos graxos. A frutose bifosfato aldolase catalisa o quarto passo da via glicolítica, quebrando uma molécula de frutose 1,6 bifosfato em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato de forma reversível, tal que essa enzima participa tanto da via glicolítica quanto da gliconeogênese. A fosfopiruvato hidratase, também conhecida como enolase, catalisa o nono passo da viaglicolítica, desidrata o 2-fosfoglicerato, formando o fosfoenolpiruvato. O complexo piruvato desidrogenase converte piruvato em acetil para que haja sua transferência para a coenzima A, que permitirá mais tarde a entrada no ciclo do ácido cítrico, enquanto a acetato quinase fosforila o acetato para que este possa se associar à coenzima A.

A acetato quinase e a fosfodiesterase da proteína carreadora de acil causam respostas imunológicas em gado infectado por *Mycoplasma mycoides* e *Mycoplasma bovis*, respectivamente (JORES, MEENS et al., 2009; NASEEM, MEENS et al., 2010), o que significa que provavelmente são expostas (secretadas ou presentes na superfície da bactéria) em algum momento durante o processo infeccioso nessas espécies. A tioredoxina redutase (Figura 13, banda 12) foi descrita como exposta na superfície de *Trichomonas vaginalis*. Por modificar as ligações dissulfeto, sugere-se que a enzima interfira na viscosidade do muco do hospedeiro, possivelmente auxiliando na instalação do patógeno na superfície mucosa do trato respiratório (KUCKNOOR, MUNDODI et al., 2007).

A frutose bifosfato aldolase (Figura 13, banda 14), que encontra-se exposta na superfície de *Enterococcus faecalis* (BØHLE, RIAZ et al., 2011) é imunogênica para gado infectado por *M. mycoides* (JORES, MEENS et al., 2009). Ambas unidades alfa e beta do componente E1 da piruvato desidrogenase foram observadas na fração extracelular em nossos experimentos (Figura 13, bandas 9 e 13, respectivamente). Em bacilos e micoplasmas essas duas proteínas mostram-se como imunogênicas (DELVECCHIO, CONNOLLY et al., 2006; JORES, MEENS et al., 2009; MCGOWIN, SPAGNUOLO et al., 2010) e a subunidade alfa desse complexo apresenta-se exposta na superfície de *Mycoplasma genitalium* (MCGOWIN, SPAGNUOLO et al., 2010). Além disso, ambas subunidades alfa e beta apresentam expressão aumentada em clones de *Mycoplasma pulmonis* resistentes aos antibióticos gentamicina e melitina (FEHRI, SIRAND-PUGNET et al., 2005).

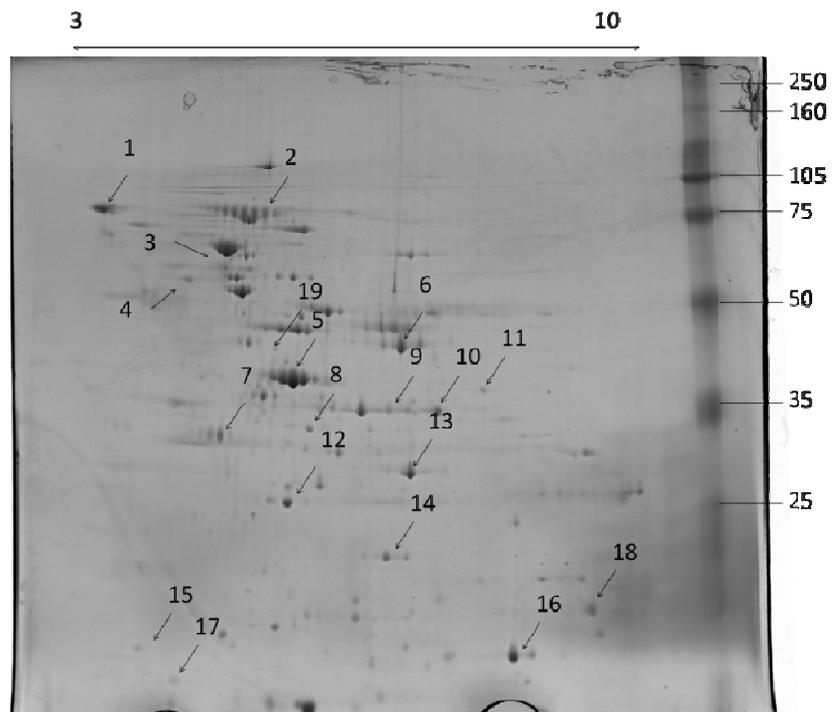


Figura 13 – Perfil de eletroforese bidimensional de fração extracelular de meio de cultura Frey livre de proteínas incubado com *M. synoviae* 52. Flechas numeradas correspondem a identidades de proteínas listadas na tabela 3.

Tabela 2. Proteínas celulares identificadas em *Mycoplasma synoviae*.

Identidade	Registro gi	MS	Observado		Teórico	
			Mr	pI	Mr	pI
6-fosfofrutoquinase	gi 144575058	96	33747	9,24	33891	8,67
Acetato quinase	gi 144575215	120	37945	7,61	44515	7,10
Fosfodiesterase de proteína carreadora de acil	gi 71894112	96	13718	8,42	22687	7,74
Proteína de divisão celular	gi 71894355	106	70988	3,51	62539	4,38
Fator de alongação EF-Ts	gi 71894429	91	31657	5,87	31938	5,72
Fator de alongação Tu	gi 71894677	126	39239	5,50	43230	5,61
Endopeptidase O	gi 71894512	162	64809	7,21	42295	6,08
F0F1 ATP sintase – subunidade beta	gi 71894420	89	47222	6,01	50804	5,76
Glicose-6-fosfato isomerase	gi 71894495	65	44765	7,56	48990	6,99
Proteína hipotética MS53_0316	gi 71894332	68	73092	4,86	81668	5,48
Leucil aminopeptidase	gi 71894176	151	47812	5,65	52277	5,83
Chaperona molecular DnaK	gi 71894366	115	54392	5,37	65096	5,17
Fosfoenolpiruvato-proteína fosfatase	gi 71894534	103	58361	5,23	63753	5,19
Fosfopiruvato hidratase	gi 71894034	108	45607	7,20	63753	5,19

Tabela 2. Proteínas celulares identificadas em *Mycoplasma synoviae* (cont.).

Identidade	Registro gi	MS	Observado		Teórico	
			Mr	pI	Mr	pI
Fosfotransacetilase	gi 71894663	98	34133	6,46	35000	6,06
Possível lipoproteína	gi 144574996	124	92020	4,96	100677	5,13
Possível lipoproteína	gi 71894364	103	96688	5,71	112804	5,94
Possível lipoproteína	gi 71894528	66	81447	5,73	85199	5,72
Possível fator gatilho	gi 71894613	126	55239	5,26	53932	5,31
Componente E1 da piruvato desidrogenase – subunidade beta	gi 144575045	126	30000	7,41	35853	6,73
Ribonucleotídeo-difosfato redutase - subunidade beta	gi 71894414	153	34317	6,10	39239	5,09
Serina/treonina-proteína quinase	gi 47459394	77	37945	6,15	37008	9,35
Proteína ligante simples fita	gi 71894544	155	15419	4,29	21239	4,50
Tiol peroxidase	gi 71894383	125	8897	5,45	18263	5,93
Tiorredoxina redutase	gi 71894606	107	32559	6,32	27439	5,37
Fator de alongação de transcrição GreA	gi 71894394	66	8597	4,69	17916	4,95
XAA-Pro aminopeptidase	gi 71894172	78	37710	6,73	40194	6,12

Tabela 3. Proteínas presentes na fração extracelular de meio de cultura incubado com *M. synoviae*.

Identidade	Registro gi	MS	Observado		Teórico	
			Mr	pI	Mr	pI
1 Proteína de divisão celular	gi 144575078	97	77515	3,66	62539	4,38
2 Fator de alongação G	gi 71894071	79	72218	5,25	77259	5,28
3 Chaperona molecular DnaK	gi 71894366	61	63596	3,51	65096	5,17
4 Proteína de divisão celular	gi 71894355	120	79326	3,49	62539	4,38
5 Fator de alongação Tu	gi 71894677	111	37523	5,43	43230	5,61
6 Fosfopiruvato hidratase	gi 71894034	62	43611	6,01	49330	6,59
7 Ribonucleotídeo-difosfato redutase - subunidade beta	gi 71894414	127	34255	3,88	39239	5,09
8 Fosfoacetilase	gi 71894663	169	34605	4,94	35000	6,06
9 Componente E1 da piruvato desidrogenase – subunidade alfa	gi 71894294	68	36239	5,87	42131	6,20
1 0 Acetato quinase	gi 144575215	80	36194	6,10	44515	7,10

Tabela 3. Proteínas presentes na fração extracelular de meio de cultura incubado com *M. synoviae* (cont.).

Identidade	Registro gi	MS	Observado		Teórico	
			Mr	pI	Mr	pI
1 DNA polimerase III – subunidade beta	gi 71894027	104	38563	6,96	43399	7,62
1						
2 Tiorredoxina redutase	gi 144575189	110	31039	4,67	27439	5,37
1						
3 Componente E1 da piruvato desidrogenase – subunidade beta	gi 144575045	224	32423	6,12	35853	6,73
1						
4 Frutose-bifosfato aldolase	gi 71894369	76	26539	5,82	31237	6,27
1						
5 Proteína ligante simples fita	gi 71894544	88	14149	3,00	21239	4,50
1						
6 Fosfodiesterase de proteína carreadora de acil	gi 71894112	94	13164	7,29	22687	7,74
1						
7 Proteína hipotética MS53_0566	gi 144575177	90	10711	3,36	20869	4,96
1						
8 Proteína hipotética MS 53_0115	gi 71894139	103	18926	8,23	21059	8,77
1						
9 Proteína hipotética MS 53_0598	gi 71894608	97	42120	4,67	44307	5,60

LEGENDAS Tabelas 2 e 3

Mr: massa molecular (em Da)

pI: ponto isoelétrico

Proteínas identificadas pela primeira vez em *M. synoviae* em negrito.

MS: score Mascot

O fator de alongação G (Figura 13, banda 2), que é secretado por *Paenicillus larvae* (ANTÚNEZ, ANIDO et al., 2010) é produzido por *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis* e é imunogênico para seus hospedeiros (DELVECCHIO, CONNOLLY et al., 2006), do mesmo modo como ocorre em gado infectado por *M. bovis* (NASEEM, MEENS et al., 2010) e *M. mycoides* (BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, BIDOVEC et al., 2008), e frangos infectados por *M. synoviae* (BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, BIDOVEC et al., 2008).

EF-Tu (Figura 13, banda 5) tem expressão aumentada na cepa altamente aderente de *Lactobacillus plantarum* WHE92 (IZQUIERDO, HORVATOVICH et al., 2009) e apresenta-se como proteína extracelular em *Mycobacterium tuberculosis*, com capacidade de ligar-se a e ativar plasminogênio humano (XOLALPA, VALLECILLO et al., 2007). Também é secretada por *B. anthracis*, *Bacillus cereus* e *B. thuringiensis*, com efeitos imunogênicos sobre seus hospedeiros (DELVECCHIO, CONNOLLY et al., 2006; CHITLARU, GAT et al., 2007). Cerca de 17% do total de EF-Tu de *Mycoplasma pneumoniae* encontra-se associado à membrana (DALLO, KANNAN et al., 2002), ocorrendo também na superfície de *M. genitalium* e *M. pneumoniae* (BALASUBRAMANIAN, KANNAN et al., 2008; MCGOWIN, SPAGNUOLO et al., 2010). É imunogênico para camundongos infectados com *M. genitalium* (MCGOWIN, SPAGNUOLO et al., 2010), gado infectado com *M. mycoides* (JORES, MEENS et al., 2009), porcos infectados com *Mycoplasma hyopneumoniae* (PINTO, CHEMALE et al., 2007) e frangos infectados com *M. synoviae* (BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, BIDOVEC et al., 2008).

Do mesmo modo que EF-Tu, a chaperona molecular DnaK (Figura 13, banda 3), também conhecida como Hsp70, mostra expressão aumentada na cepa WHE92 (IZQUIERDO, HORVATOVICH et al., 2009) de *L. plantarum* e também é observada na superfície de *E. faecalis*, juntamente com a frutose bifosfato aldolase (BØHLE, RIAZ et al., 2011). Em *M. tuberculosis* foi detectada a sua presença no ambiente extracelular, com ação imunogênica e capaz de ligar-se a plasminogênio humano (BARTOW e MCMURRAY, 1997; MATTOW, SCHAIBLE et al., 2003; XOLALPA, VALLECILLO et al., 2007). DnaK é secretada por *B. anthracis*, imunogênica e parece atuar como fator de virulência (CHITLARU, GAT et al., 2007). Porcos infectados com *M. pneumoniae* (PINTO, CHEMALE et al., 2007), gado com *M. mycoides* (JORES, MEENS et al., 2009) e *M. bovis* (NASEEM, MEENS et al., 2010), camundongos com *M. genitalium* (MCGOWIN, SPAGNUOLO et al., 2010) e frangos com *M. synoviae*

(BERČIČ, SLAVEC, LAVRIČ, NARAT, BIDOVEC et al., 2008), todos produzem anticorpos contra a chaperona molecular DnaK. Essas evidências sugerem que a chaperona DnaK que, como mencionado, é capaz de ligar-se fortemente a proteínas mediante hidrólise de ATP, é secretada por diversos patógenos e pode ser importante no processo infeccioso mediando adesão a tecidos hospedeiros.

Finalmente, a Frutose bifosfato aldolase, também conhecida como enolase, é uma enzima amplamente descrita como secretada ou exposta na superfície em diversos organismos dos gêneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (LAMONICA, WAGNER et al., 2005; ANTIKAINEN, KUPANNEN et al., 2007; CASTALDO, VASTANO et al., 2009; FENG, PAN et al., 2009; ANTÚNEZ, ANIDO et al., 2010), mostrando propriedades imunogênicas (DELVECCHIO, CONNOLLY et al., 2006; CHITLARU, GAT et al., 2007; FENG, PAN et al., 2009) e capacidade de ligar-se a fibronectina (ESGLEAS, LI et al., 2008; CASTALDO, VASTANO et al., 2009). A enolase também mostra-se como um fator de virulência em *P. larvae* (ANTÚNEZ, ANIDO et al., 2011) e encontra-se na superfície de *Lactobacillus crispatus* de modo dependente de pH, sendo liberado para o meio em pH próximo ao seu pI ou mais alcalino (ANTIKAINEN, KUPANNEN et al., 2007). Em micoplasmas, essa proteína foi detectada na superfície de *M. gallisepticum* e *M. fermentans*, em ambos os casos capaz de ligar-se a plasminogênio (YAVLOVICH, RECHNITZER et al., 2007; CHEN, YU et al., 2011). Em *M. suis* seu papel de adesão a células foi claramente demonstrado através da inserção do gene dessa enolase em *Escherichia coli* que, uma vez transformada, tornou-se capaz de aderir a eritrócitos suínos (SCHREINER, SOKOLI et al., 2012).

3.2 – Estudos das interações micorrízicas arbusculares

Preparação de amostra a partir de tecidos vegetais pode ser particularmente problemático por causa de substâncias que interferem, tais como polissacarídeos, ácidos nucléicos, lipídeos e compostos fenólicos, presentes em grandes concentrações (LEROUXEL, CAVALIER et al., 2006), enquanto proteínas existem em baixa abundância. Damerval em 1986 propôs o uso de nitrogênio líquido para auxiliar na trituração dos tecidos vegetais em um gral e de se lavar o pó obtido com acetona a -20°C contendo beta-mercaptoetanol (DAMERVAL, DEVIENNE et al., 1986). Esse procedimento apresentava, entretanto, a desvantagem de se perder proteínas de baixo pH no processo (WESTERMEIER, R. e NAVEN, T., 2002). Hoje, o

procedimento de trituração em presença de nitrogênio líquido é amplamente utilizado, com a vantagem também de se minimizar efeitos como proteólise e outros modos de degradação das proteínas durante o processo de ruptura das células (WANG, TAI et al., 2008). Alternativas para se contornar os problemas gerados por contaminantes tais como polifenóis e oxidação dependem normalmente da espécie vegetal e do tecido, sendo necessário uma adaptação empírica da técnica de extração de proteínas para cada caso (WANG, TAI et al., 2008).

3.2.1 – Extração de proteínas membranares de raízes de *Medicago truncatula*

Para se testar o protocolo de extração de proteínas membranares já estabelecido e utilizado de forma sistemática pela equipe de proteômica do INRA, foi realizada uma extração protéica a partir de 100g de raízes da planta modelo *Medicago truncatula*. De modo resumido, a extração foi feita seguindo-se as seguintes etapas, sendo que a cada etapa foi retirada uma pequena alíquota para dosagem de proteínas e verificação em gel monodimensional:

Trituração de 20g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,5M, EDTA 20mM, DTT 1mM, PMSF 1mM. A partir dessa mistura foi retirada a primeira fração (F1).

Agitação da mistura durante 20min em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C). A partir do sobrenadante foi retirada a segunda fração (F2).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-MES 1mM pH7,2, MgSO₄ 1mM, sacarose 15%. Dessa suspensão foi retirada a fração microsomal (M).

Separação da plasmalema por ultracentrifugação com gradiente de sacarose. A partir dessa centrifugação foram extraídas as frações I1 (Interface entre as regiões contendo sacarose a 15% e a 33%); I2 (região onde a concentração de sacarose é de 33%); I3 (Interface entre as regiões contendo sacarose a 33% e a 38%) e P (precipitado contendo as membranas internas da célula) (Figura 14).

Limpeza da Plasmalema em Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM

Suspensão em Tris-MES 10mM pH 7,3, sacarose 250mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, glicerol 20%, aprotinina 10µg/mL, leupeptina 10µg/mL.

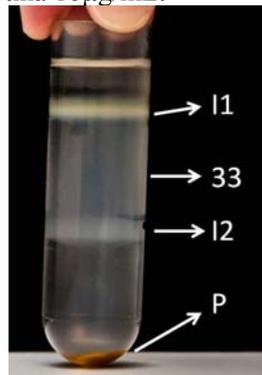


Figura 14: Disposição das diferentes frações do microsoma após ultracentrifugação em gradiente de sacarose. I1: Interface entre as regiões contendo sacarose a 15% e a 33%. 33: região onde a concentração de sacarose é de 33%. I2: Interface entre as regiões contendo sacarose a 33% e a 38%. P: precipitado contendo as membranas internas da célula.

As alíquotas retiradas em cada uma das etapas anteriormente descritas foram aplicadas em um gel de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 12%, com coloração em azul coloidal (Figura 15).

A análise por eletroforese demonstra que a extração foi bem sucedida, no sentido em que há pouca degradação das proteínas. Isso é atestado pela clareza das bandas formadas e que ao longo do processo observa-se o enriquecimento de determinadas bandas, particularmente na região entre 50 e 75kDa. As amostras em questão foram submetidas posteriormente a análise por eletroforese do tipo azul nativo para a visualização e identificação de complexos protéicos por Christelle Guiller, do INRA-Dijon (resultados não publicados).

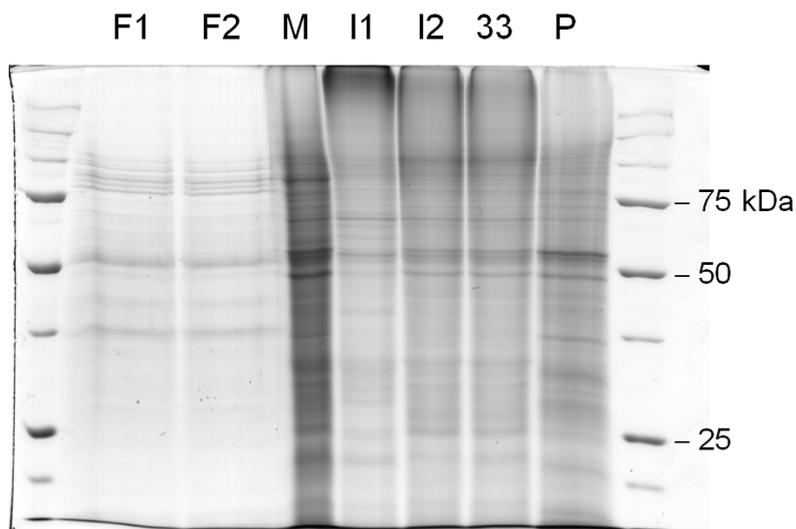


Figura 15: Perfil eletroforético de proteínas extraídas de raízes de *Medicago truncatula* ao longo das diversas etapas de fracionamento das membranas celulares. **F1**: fração retirada da suspensão celular logo após a trituração das raízes em nitrogênio líquido e suspensão em tampão de trituração, **F2**: fração retirada do sobrenadante após precipitação dos restos de paredes por centrifugação a 16.000 x g, **M**: fração microsomal, obtida por ultracentrifugação do sobrenadante da etapa anterior, **I1**, **I2**, **33** e **P**: frações obtidas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (Figura 15).

3.2.2 – Focalização isoeétrica em solução (sistema Rotofor Bio-Rad) de proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4)

Uma das grandes desvantagens da digestão em gel de proteínas separadas por eletroforese bidimensional para posterior análise por espectrometria de massa é a dificuldade que o processo impõe para se automatizar o procedimento (WISNIEWSKI, ZOUGMAN et al., 2009). Por essa razão é interessante, quando possível, procurar-se alternativas para esse processo, que permitam uma digestão de proteínas em solução. Uma dessas alternativas parte da focalização isoeétrica em solução.

Foi feita uma extração de proteínas microsomais de *Vitis* (porta-enxertos SO4) no intuito de se avaliar a possibilidade de uma

focalização isoelétrica em solução utilizando-se o sistema Rotofor Bio-Rad, de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

Ao longo de todo o processo de focalização isoelétrica foi possível observar-se a formação de precipitados protéicos depositados no fundo da câmara de focalização isoelétrica. As frações foram coletadas simultaneamente, centrifugadas e os precipitados foram ressuspensos em Tris-HCl pH 6,8, 62,5mM, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0,02%, Glicerol 10% para separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 16).

Os géis evidenciam que ao longo do processo houve falha ou inadequação que implicou em perda de uma quantidade considerável de proteínas, a constar pela fraca intensidade das bandas. Numa tentativa de se recuperar e concentrar proteínas solubilizadas, as frações foram liofilizadas. O processo resultou em uma grande formação de cristais, o que indica excesso de sais. As amostras foram então dialisadas utilizando-se o sistema Millipore Ultrafree-MC 10,000 NMWL, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi feita uma dosagem de proteínas de cada uma das alíquotas, revelando quantidades totais de proteína entre 0 e 33 μ g.

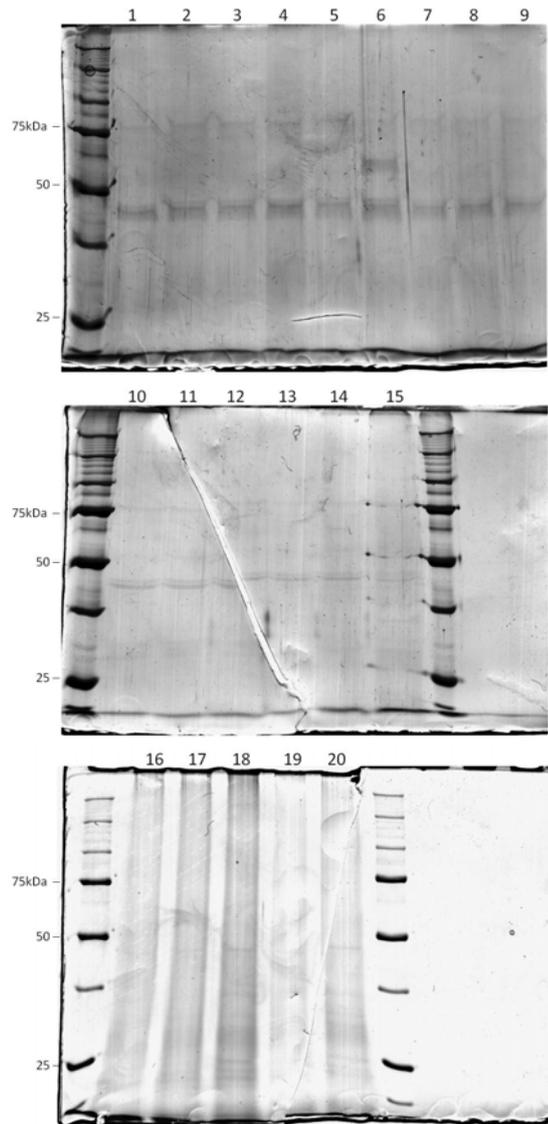


Figura 16: Frações (1-20) de focalização isoeétrica de proteínas microsomais de *Vitis* (porta-enxertos SO4) através do sistema Rotofor Bio-Rad.

Em seguida, 20 μ L de cada uma das frações 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida. A revelação com prata, como esperado, mostrou uma quantidade ínfima de proteínas, ainda que fosse possível se visualizar a formação de bandas de separação protéica a partir das frações 14 e 16 (Figura 17).

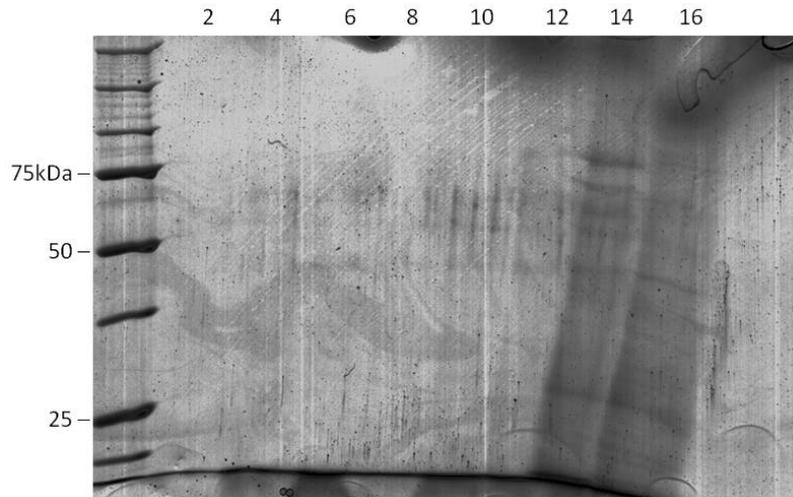


Figura 17: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 20 μ L de cada uma das frações 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16.

O sistema Rotofor se mostrou ineficiente na resolução de proteínas conforme a técnica descrita. Em primeiro lugar observou-se uma perda de grande quantidade de proteínas na fase de focalização isoeétrica. Em segundo lugar, não há uma evidente mudança no perfil eletroforético das frações, embora seja possível distinguir-se uma única banda exclusiva de peso molecular aparente um pouco superior a 50kDa na fração 6 (Figura 21), o que significa que as espécies protéicas retidas em cada fração não são diferentes umas das outras.

Para se aumentar a eficiência da solubilização das proteínas de membrana, um novo experimento foi desenhado, utilizando-se tampões com detergentes alternativos e a focalização isoeétrica foi feita em sistema convencional sobre gradiente imobilizado de pH.

3.2.3 – Solubilização de proteínas membranares

Proteínas membranares, diferente das proteínas citoplasmáticas que são na maioria solúveis, têm a propriedade de apresentar uma região

hidrofóbica e particularmente uma tendência a formar complexos, o que muitas vezes dificulta o processo de solubilização. Avanços foram observados em proteômica de membranas, em que a maior parte dos refinamentos foi direcionada para a preparação de amostras, aumentando a solubilidade de frações membranares através da utilização de solventes orgânicos ou detergentes não iônicos ou zwitteriônicos para géis bidimensionais (ZHANG, L. J., XIE, J. Y. et al., 2005).

Na literatura foram descritos o tratamento de proteínas membranares com carbonato, bem como o uso de detergentes tais como Triton X-114, Triton X-100, detergentes zwitteriônicos, como ASB-14, ASB-16, C8Ø e extração em solventes orgânicos para melhorar a solubilização dessas proteínas antes de submetê-las a eletroforese bidimensional (SANTONI, KIEFFER et al., 2000; HENNINGSEN, GALE et al., 2002; ZHANG, L. J., XIE, J. Y. et al., 2005; MITRA, WALTERS et al., 2009).

Com base nesses estudos, um protocolo de extração foi desenhado, em que não houve alteração das primeiras etapas, até o momento da precipitação da fração microsomal por ultracentrifugação. O precipitado foi então ressuspensionado em Tris-MES 10mM pH 7,3, EDTA 1mM, PMSF 1mM, DTT 2mM, Aprotinina 10µg/µL, Leupeptina 10µg/µL e submetido a tratamentos com triton X-100, carbonato ou clorofórmio/metanol 5:4 antes de ser suspenso em uréia 8M, tiuréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 1%, IPG 2%, PMSF 0,5mM e azul de bromofenol 0,002% para focalização isoeletrica em géis de focalização isoeletrica (Immobiline DryStrip pH 3-10, 7cm).

Embora o uso do detergente ASB-14 e Triton X-100 (SANTONI, KIEFFER et al., 2000), assim como tratamentos com carbonato associado à extração em presença de CHAPS e com clorofórmio/metanol 5:1 (ZHANG, L. J., XIE, J. Y. et al., 2005) melhoraram sensivelmente a extração de proteínas membranares em células-modelo, esse efeito não foi observado nos testes realizados para células de raízes de *Vitis* (Porta-enxertos SO4). Em todos os tratamentos efetuados verificou-se uma formação de grumos, tipicamente atribuídos à deposição de proteínas não solubilizadas nos géis de focalização isoeletrica (Figura 18). A não formação desses grumos no gel controle, ou seja, em que a fração foi diretamente precipitada com acetona, pode indicar que as proteínas não foram absorvidas por esse gel de focalização isoeletrica no processo de reidratação. Uma possível explicação é a ineficiente solubilização dessas proteínas.

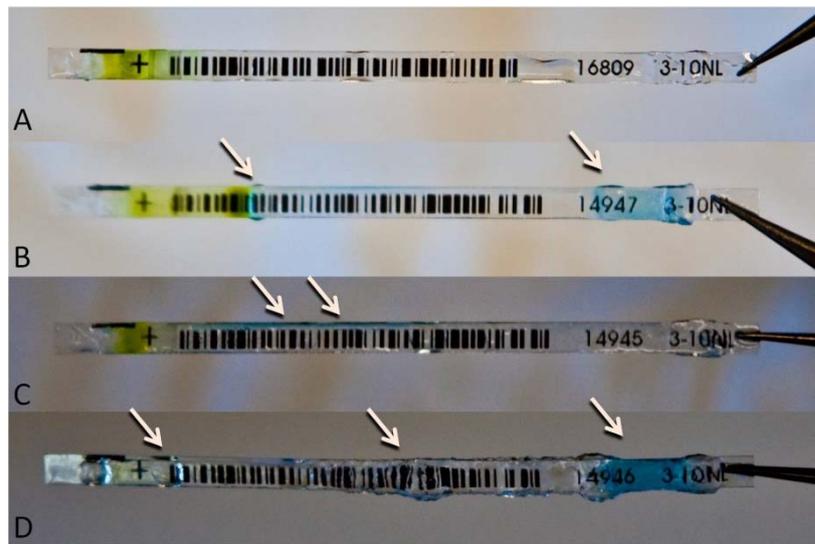


Figura 18: géis de focalização isoeletrica (GE Healthcare Immobiline DryStrip pH 3-10, 7cm) de proteínas membranares de *Vitis* (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após precipitação por acetona (A) ou submetidas a tratamento com Triton X-100 (sobrenadante) (B), Triton X-100 (precipitado) (C) ou carbonato (D). Grumos atribuídos a precipitação de proteínas não solúveis indicados por setas.

A formação dos grumos nos géis de focalização isoeletrica, normalmente tem graves consequências para a eletroforese bidimensional. Em primeiro lugar, os grumos podem formar obstruções que impedem a correta migração das proteínas ao longo do gradiente de pH. Esse efeito é particularmente bem observado no gel relativo ao sobrenadante da fração tratada com Triton X-100 e no da fração tratada com carbonato (Figura 18, B e D, respectivamente), em que se observa uma clara perturbação na focalização isoeletrica, bem como na separação de peso molecular sobre as regiões onde se formam os grumos mais evidentes. Na focalização isoeletrica da fração tratada com carbonato (Figura 18, C) observou-se uma precipitação das proteínas de maneira uniforme ao longo de mais da metade do gradiente de pH, especialmente na região alcalina. No respectivo gel de eletroforese esse efeito foi refletido na formação de linhas horizontais que indicam uma separação por peso molecular relativamente boa e uma focalização

isoeletrica praticamente inexistente (Figura 19, C). Esses efeitos não foram observados na fração que não sofreu nenhum desses tratamentos (Figura 19, A). Uma possível explicação para essa observação é a presença de proteínas solúveis misturadas à fração microsomal, embora seja necessária a identificação das proteínas resolvidas nesse gel para se confirmar essa hipótese.

Não foram observados os efeitos de formação de grumos nos géis de focalização isoeletrica das amostras tratadas com metanol/clorofórmio (5:4), o que resultou em menor perda de proteínas na passagem dos géis de focalização isoeletrica para os géis de poliacrilamida. Como esperado, a maior parte das proteínas obtidas com esse tratamento estava presente na interface entre as fases de metanol e clorofórmio, entretanto, não foi constatada melhora na qualidade da focalização isoeletrica devido a esse tratamento em nenhuma das frações coletadas (Figura 20, A-C).

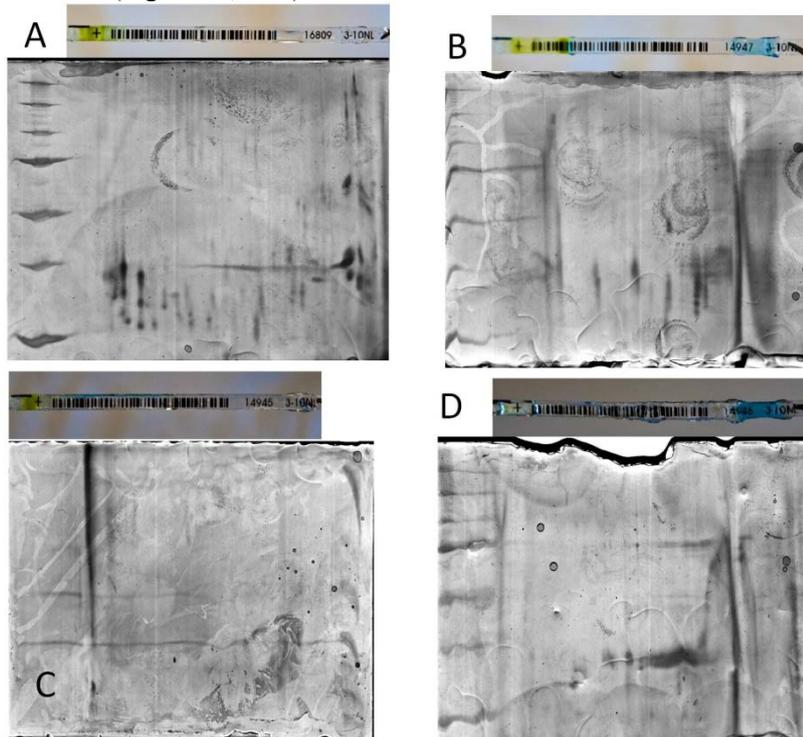


Figura 19: perfis de eletroforese bidimensionais de eletroforese em géis de poliacrilamida acoplados digitalmente aos respectivos géis de

focalização isoeétrica (GE Healthcare Immobiline DryStrip pH 3-10, 7cm) de proteínas membranares de *Vitis* (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%, IPG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após precipitação por acetona (**A**) ou submetidas a tratamento com Triton X-100 (sobrenadante) (**B**), Triton X-100 (precipitado) (**C**) ou carbonato (**D**).

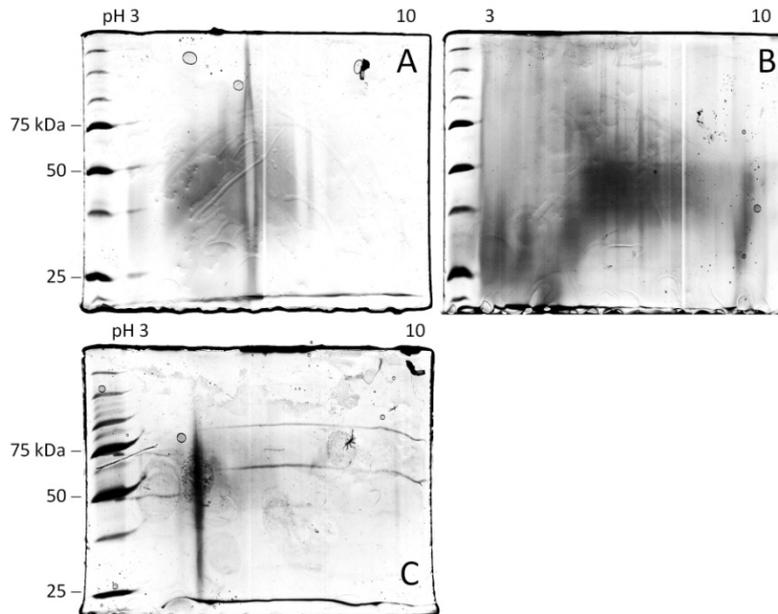


Figura 20: perfis de eletroforese bidimensionais de eletroforese em géis de poliacrilamida de proteínas membranares de *Vitis* (porta-enxertos SO4) solubilizadas diretamente em Uréia 8M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, CHAPS 4%, NP-40 a 1%, PG 0,5%, PMSF 0,5mM, azul de bromofenol 0,002% após tratamento com clorofórmio/metanol (5:4). Géis a partir das frações metanol (**A**), interface (**B**) e clorofórmio (**C**).

Tendo em vista que nenhum dos tratamentos mencionados anteriormente foi capaz de promover uma melhora na focalização isoeétrica das proteínas da fração microsomal de lisados de raízes de *Vitis*, foi buscada uma estratégia para se melhorar a qualidade da extração antes da obtenção da fração microsomal, ou seja, em se variando o tampão em que as proteínas são solubilizadas. Um novo

protocolo foi então desenhado, com base no trabalho de tese de Benoît Valot, sobre as proteínas membranares de raízes de *Medicago truncatula* em interação com o fungo micorrizogênico *Glomus intraradices* (VALOT, 2005).

Há duas diferenças principais entre este desenho experimental e o anterior. Em primeiro lugar a adição de uma etapa de limpeza das proteínas membranares antes da ressuspensão no tampão adequado para a extração das proteínas, afim de se eliminar as proteínas solúveis misturadas na fração microsomal. Em segundo lugar, a hidratação do gel de IEF é feita sem a presença de proteínas da amostra e as proteínas são aplicadas apenas no momento da isofolcalização, em uma das extremidades do gel, com auxílio de um reservatório com capacidade para até 100µL.

Esse modo de aplicação pode ser vantajosa para proteínas básicas ou muito ácidas devido a fenômenos de estabilidade dessas proteínas uma vez que elas atingem seus respectivos pontos isoeletricos (GE_HEALTHCARE, 2004). De modo consistente com esse fenômeno, Benoît Valot obteve melhores resultados, incluindo uma formação de bandas de focalização isoeletrica mais claras e obtenção de uma quantidade maior de bandas de eletroforese bidimensional fazendo aplicações anódicas mas não catódicas de extratos microsomais de raízes de *Medicago truncatula* (VALOT, 2005).

Em linhas gerais, o procedimento empregado foi o seguinte:

Trituração de 11g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,5M, EDTA 20mM, DTT 1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-HCl 500mM pH7,5, KCl 0,1M, EDTA 5mM, PMSF 1mM (limpeza da amostra) e quantificação de proteínas.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e solubilização das proteínas membranares em uréia 7M, tiouréia 2M, Triton X-100 0,5%, ASB-14 2%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%.

Aplicação de 80µL de amostra, contendo aproximadamente 50µg de proteínas no lado anódico do gel de focalização isoeletrica pré-hidratado em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, TBP 2mM, IPG 2%.

Focalização isoeétrica, eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com azul coloidal de Coomassie, conforme anteriormente descritos.

Utilizando o método descrito, Benoît Valot foi capaz de isolar em torno de 440 bandas de eletroforese bidimensional a partir da fração microsomal (VALOT, 2005), enquanto o mesmo método empregado para *Vitis* mostrou-se incapaz de melhorar a resolução de bandas de focalização isoeétrica (Figura 21).

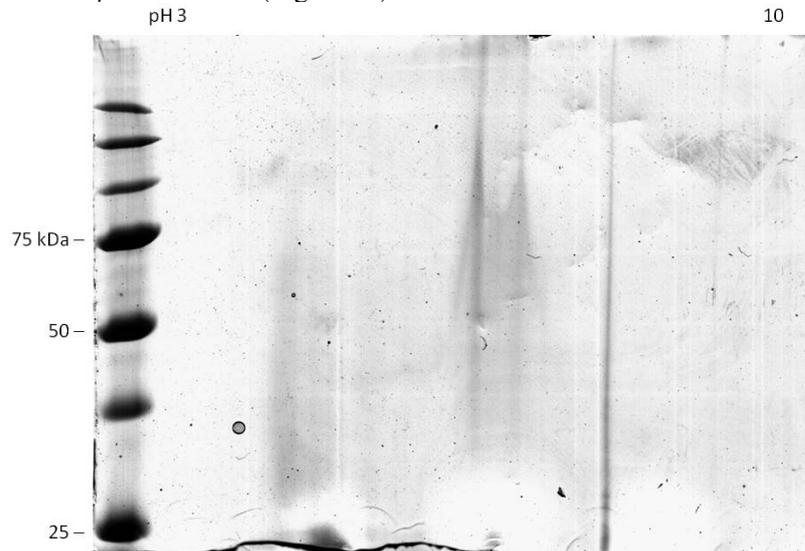


Figura 21: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Aplicação anódica de 80 μ L de amostra, contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas da fração microsomal de *Vitis* (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeétrica.

Para eliminar-se a hipótese de que a ausência de proteínas presentes no perfil bidimensional apresentado (Figura 21) tenha sido provocada por perda de proteínas relacionada com o modo de aplicação, foi feita uma aplicação convencional da mesma quantidade de amostras. Na aplicação convencional observou-se similar pobreza na etapa de focalização isoeétrica e separação por peso molecular, associadas à deposição de um precipitado protéico próximo a cada uma das extremidades do gel ao longo do processo de focalização isoeétrica, que resultaram em linhas verticais no gel bidimensional (Figura 22).

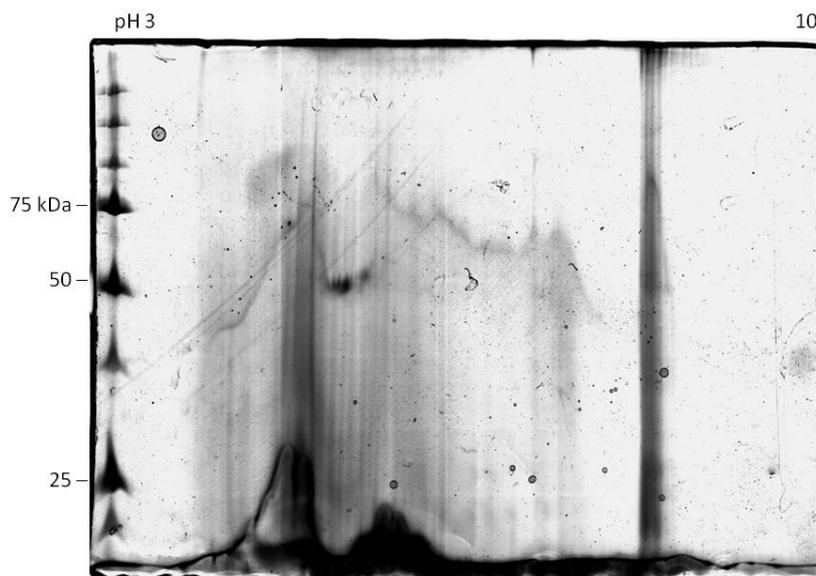


Figura 22: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Aplicação convencional de 80 μ L de amostra, contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica.

Nova extração de proteínas de raízes de *Vitis* foi realizada para se testar a aplicação catódica em vez de anódica da amostra. Em linhas gerais, o procedimento empregado foi o seguinte:

Trituração de 12g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, com 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido.

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,05M, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM (limpeza da amostra) e quantificação de proteínas.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e solubilização das proteínas membranares em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%.

Aplicação de 30 μ L de amostra, contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas + 20 μ L de uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2% no lado catódico do gel de focalização isoeétrica pré-hidratado em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, TBP 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002%.

Focalização isoeétrica, eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com azul coloidal de Coomassie, conforme anteriormente descritos.

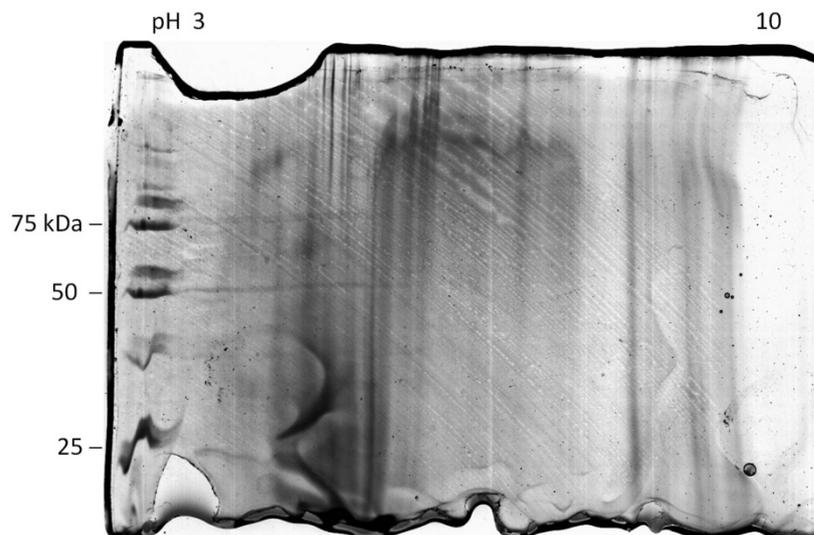


Figura 23: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Aplicação catódica de 80 μ g (em 50 μ L de uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%) de proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeétrica.

A comparação dos perfis de eletroforese bidimensional de aplicação anódica, catódica e a aplicação convencional não revelou nenhuma melhora na resolução de bandas de focalização isoeétrica ou de separação por peso molecular das proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) (Figura 23). Em virtude desse resultado, foram temporariamente abandonadas as tentativas de se fazer esse tipo de aplicação, devido ao risco de perda da amostra a cada aplicação, risco especialmente elevado no momento de se acoplar o reservatório de amostra ao gel de focalização isoeétrica.

Tecidos vegetais podem apresentar em sua composição natural uma grande variedade de compostos hidrofóbicos, notadamente compostos fenólicos (DOS SANTOS, LOPES et al., 2007; FERRANDINO e GUIDONI, 2010; KATALINIC, MOZINA et al., 2010; XU, ZHANG et al., 2010), presentes em raízes de plantas das mais diversas espécies (KOŁODZIEJ, 2007; RUDIKOVSKAYA, FEDOROVA et al., 2008; DALL'ACQUA, SHRESTHA et al., 2009; KOSALEC, GREGUREK et al., 2009; KOVACIK, KLEJDUS et al., 2009) que contaminam os extratos protéicos e interferem nas análises subsequentes (ISAACSON, DAMASCENO et al., 2006).

Como uma tentativa de se contornar o problema de uma possível interferência relacionada à presença de polifenóis, especialmente taninos, presentes em videiras (KALLITHRAKA, TSOUTSOURAS et al., 2006; PINELO, ARNOUS et al., 2006; DANI, OLIBONI et al., 2007; DOPICO-GARCIA, VALENTAO et al., 2007; SHINOHARA, TOYOHIRA et al., 2007; BAIL, STUEBIGER et al., 2008; DOPICO-GARCIA, FIQUE et al., 2008; BRUNETTO, CERETTA et al., 2009; OBREQUE-SLIER, PENA-NEIRA et al., 2009; HEREDIA, ESCUDERO-GILETE et al., 2010), foi desenhado um novo protocolo em se fazendo a trituração de uma amostra em presença de Polivinilpirrolidona (PVPP), descrito na literatura como eficaz quelante de compostos fenólicos no processo de trituração (ISAACSON, DAMASCENO et al., 2006; NEGRI, PRINSI et al., 2008). Em linhas gerais, o procedimento empregado foi o seguinte:

Trituração de 8g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, com 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido e 1g de PVPP (Sigma Aldrich P6755).

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,05M, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM (limpeza da amostra) e quantificação de proteínas. Neste momento a amostra foi fracionada, separando-se uma alíquota para a eletroforese bidimensional e uma alíquota para eletroforese monodimensional.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e solubilização das proteínas membranares em Tris 62,5mM, β-bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%

para eletroforese monodimensional ou uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002%, para eletroforese bidimensional.

Para a eletroforese monodimensional 20 μ L da amostra (aproximadamente 5 μ g de proteínas) solubilizada em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% foram aplicadas ao gel de poliacrilamida a 12% (Figura 24).

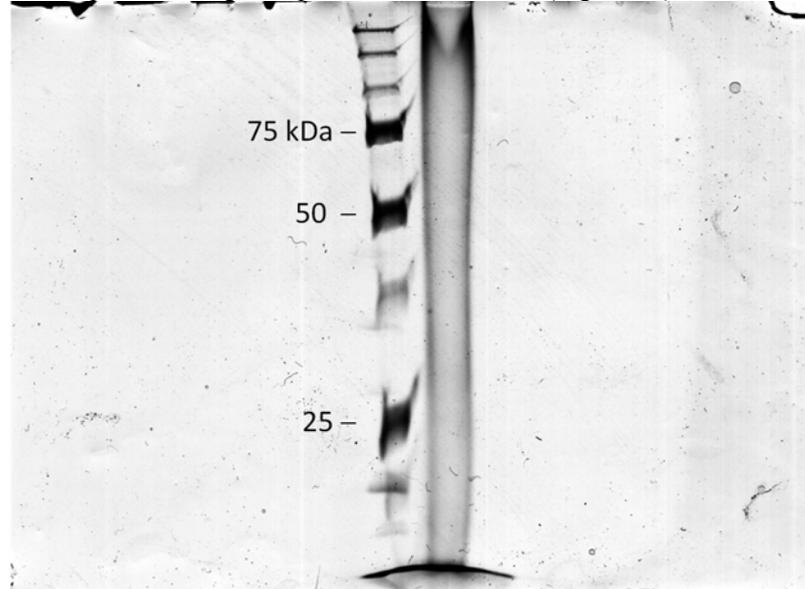


Figura 24: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 20 μ L de extrato de proteínas microsomais (aproximadamente 5 μ g de proteínas) de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.

Para a eletroforese bidimensional géis de focalização isoeétrica foram hidratados diretamente com 100 μ L de amostra (aproximadamente 42 μ g de proteínas) solubilizada em 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002% durante 12h à temperatura ambiente. As condições de focalização isoeétrica, equilíbrio, e separação por peso molecular foram feitas como descrito anteriormente (Figura 25).

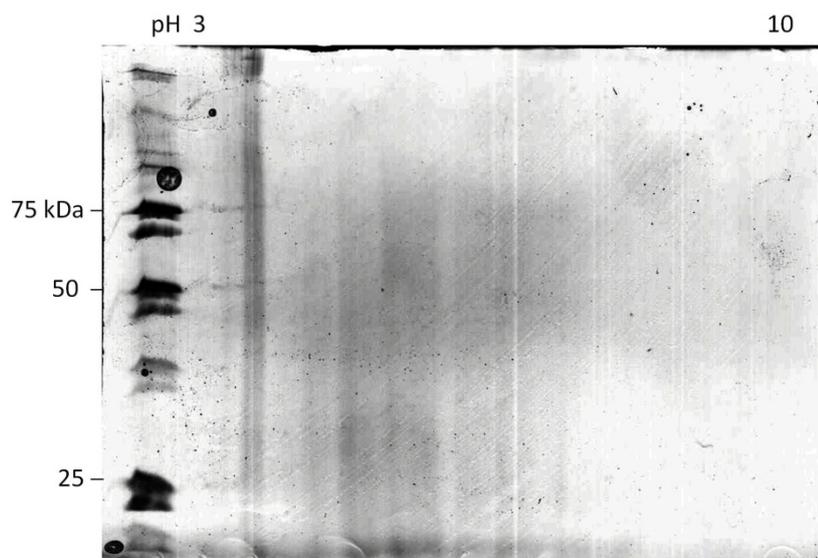


Figura 25: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Aplicação de 100 μ L de amostra, contendo aproximadamente 42 μ g de proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica. A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.

Nas condições testadas, a presença de PVPP não foi eficiente para melhorar a definição dos géis de eletroforese, nem mono, nem bidimensionais (Figuras 24 e 25). A estratégia seguinte foi o uso de carvão ativado, que também tem como propriedade a capacidade de adsorver compostos fenólicos presentes em meio acuoso (ABER, KHATAEE et al., 2009; ALHAMED, 2009; GIRODS, DUFOUR et al., 2009; NABAIS, GOMES et al., 2009), em vez de PVPP durante o processo de trituração. Em linhas gerais, o procedimento empregado foi o seguinte:

Trituração de 7,1g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, com 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido e 1,4 g de carvão ativado (Sigma Aldrich C4386).

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,05M, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM (limpeza da amostra).

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação. Neste momento, uma pequena fração do precipitado microsomal foi coletada para posterior análise em eletroforese monodimensional (fração 1D) e dosagem de proteínas, sendo o restante utilizado para eletroforese bidimensional (fração 2D).

Para eletroforese monodimensional foi feita a solubilização das proteínas membranares em Tris 62,5mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. Foram feitas, então, a separação por peso molecular, fixação e coloração em azul de Coomassie, nas mesmas condições como descrito anteriormente (Figura 26).

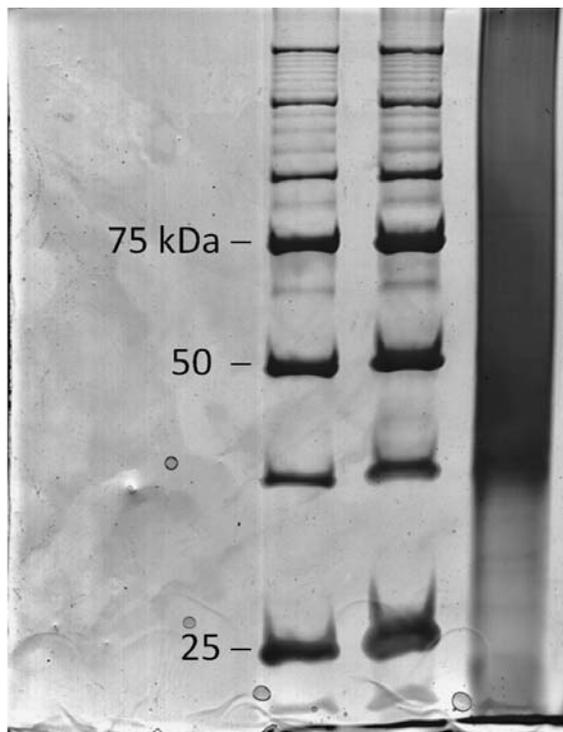


Figura 26: eletroforese em gel de poliacrilamida realizado a partir de 16 μ L de extrato de proteínas microsomais (aproximadamente 10 μ g de proteínas) de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de carvão ativado na razão 1:5 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.

Para eletroforese bidimensional a solubilização foi feita em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002%. Para garantir uma máxima solubilização das proteínas membranares, o material correspondente à fração 2D foi homogeneizado em microtubo com auxílio de pistilo dedicado a esse fim (Micropestle Eppendorf) e ultracentrifugado novamente, para eliminar tudo o que não foi solubilizado no tampão empregado. A hidratação do gel de focalização isoeletrica foi feita em seguida com o sobrenadante por 12h à temperatura ambiente, nas mesmas condições que descrito anteriormente, assim como as etapas de focalização isoeletrica, equilíbrio e separação por peso molecular.

Após a fixação, o gel foi corado com azul coloidal de Coomassie (Figura 27).

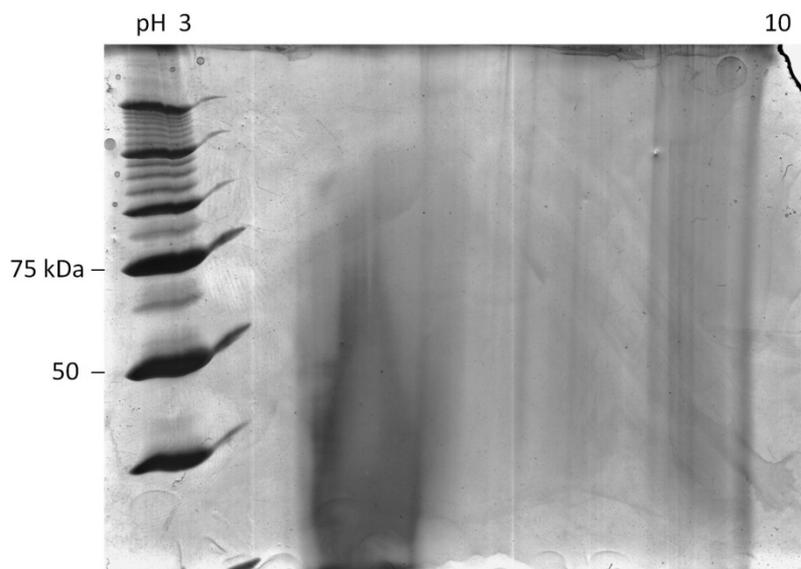


Figura 27: perfil de eletroforese bidimensional da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Aplicação de 100µL de amostra, contendo aproximadamente 30µg de proteínas da fração microsomal de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) em gel de focalização isoeletrica. A extração foi feita a partir de raízes trituradas em nitrogênio líquido em presença de PVPP na razão 1:10 em relação ao peso fresco de tecido vegetal.

O processo de trituração foi bastante dificultado pela presença do carvão ativado. Em primeiro lugar, é muito mais difícil observar a partir de que ponto a trituração é tida como suficiente, por causa do enegrecimento da amostra. Em segundo lugar, o carvão ativado aumenta enormemente a viscosidade da suspensão, exigindo a adição de uma quantidade consideravelmente maior de tampão para suspender as raízes trituradas em nitrogênio líquido.

Nova tentativa foi feita, então, em se diminuindo drasticamente a quantidade de carvão ativado empregada no intuito de se facilitar a técnica de trituração e de extração e adicionando-se areia de Fontainebleau para aumentar a eficiência do processo de trituração. Em linhas gerais, o procedimento foi executado nas seguintes etapas:

Trituração de 15g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido, 0,38g de carvão ativado (razão 1:40) e 8g de areia de Fontainebleau (0,5g de areia para 1g de tecido vegetal, aproximadamente).

Suspensão em Tris-MES 50mM pH 8, sacarose 0,05M, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Passagem da suspensão por malha fina de nylon, no intuito de remover os resíduos mais grosseiros de trituração.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM (limpeza da amostra).

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação, fracionamento e dosagem de proteínas, do mesmo modo como descrito no experimento anterior.

Para eletroforese monodimensional foi feita a solubilização das proteínas membranares em Tris 62,5mM, β-bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. Para evitar precipitação das proteínas membranares, desta vez a amostra foi aquecida a 37°C em vez de 95°C. Foram feitas, então, a separação por peso molecular, fixação e coloração em azul de Coomassie, nas mesmas condições como descrito anteriormente (Figura28).

Para eletroforese bidimensional a solubilização foi feita em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002%. A mistura foi em seguida ultracentrifugada para eliminar tudo aquilo que não foi solubilizado pelo tampão. A hidratação do gel de focalização isoeétrica foi feita em seguida com o sobrenadante por 12h à temperatura ambiente, nas mesmas condições que descrito anteriormente, assim como as etapas de focalização isoeétrica, equilibração e separação por peso molecular. Após a fixação, o gel foi corado com azul coloidal de Coomassie (Figura 29).

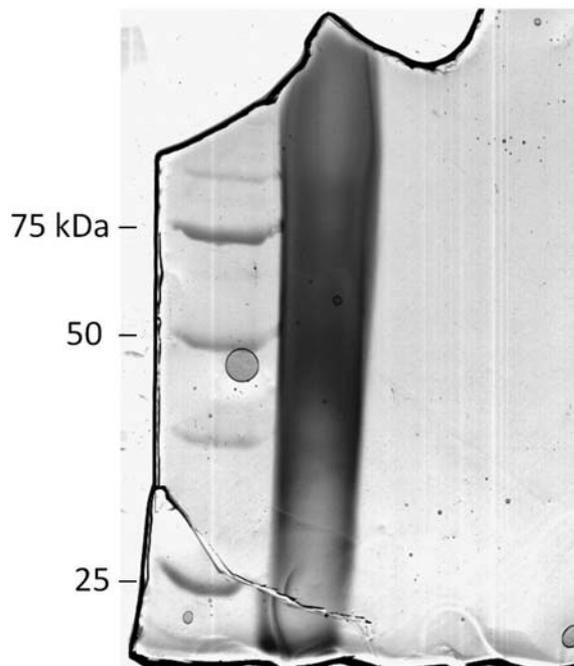


Figura 28: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em presença de carvão ativado e areia de Fontainebleau. Aplicação de 20 μ L de amostra contendo aproximadamente 14 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie (gel quebrado no processo de fixação e coloração).

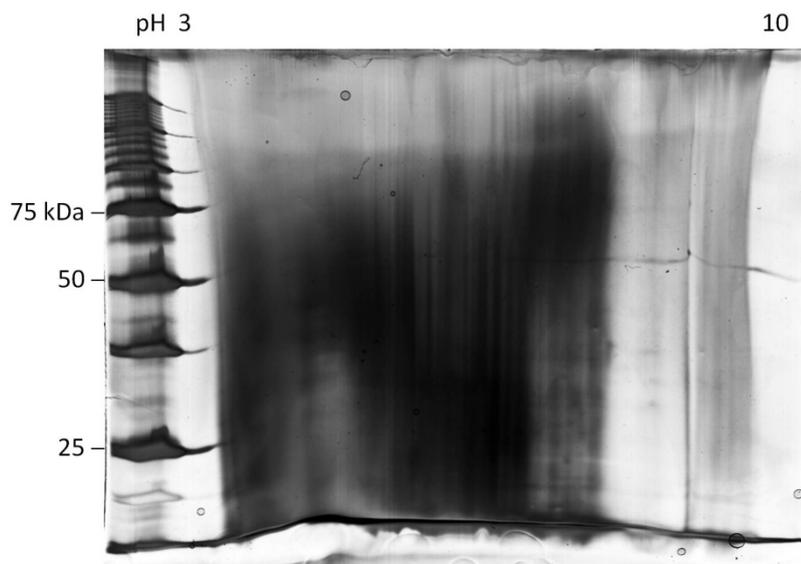


Figura 29: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em presença de carvão ativado e areia de Fontainebleau. Aplicação de 100 μ L de amostra contendo aproximadamente 70 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

Com a convicção de que a dificuldade em se extrair as proteínas microsomais reside em problemas no momento da trituração, um esforço foi empregado em se modificando a técnica empregada, especialmente nessa etapa. A areia, normalmente, auxilia na obtenção de um triturado mais fino em tecidos vegetais ricos em fibras (WANG, TAI et al., 2008), mas a presença desse composto dificulta a visualização para se determinar (empiricamente) se a ação é suficiente. Para se contornar a dificuldade de trituração imposta pela presença de carvão ativado e da própria areia, foi feita uma tentativa de máxima trituração em nitrogênio líquido sem esses compostos, para em seguida uma trituração continuada na presença deles antes de se adicionar a mistura lentamente ao tampão de suspensão do triturado. Em linhas gerais, o procedimento adotado foi o seguinte:

Trituração de 12g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido.

Adição de 6g de areia de Fontainebleau (razão 1:2 em relação ao peso fresco de tecido vegetal) e 0,3g de carvão ativado (Sigma Aldrich

C4386) (razão 1:50 em relação ao peso fresco de tecido vegetal) e homogeneização nas mesmas condições que a trituração.

Suspensão em 60mL de Tris HCl 100mM pH 7,5, sacarose 100mM, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (12.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 20min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM. O sobrenadante obtido nesta etapa, contendo proteínas solúveis foi analisado em gel de eletroforese monodimensional. Para tanto, 2µL foram misturados a 18µL de Tris 62,5mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% e outros 20µL do sobrenadante foram acrescidos de 5µL de Tris 240mM, β-mercaptoetanol 20%, SDS 8%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,008%.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação. Neste momento, uma pequena fração do precipitado microsomal foi coletada para posterior análise em eletroforese monodimensional (fração 1D) e dosagem de proteínas, sendo o restante utilizado para eletroforese bidimensional (fração 2D).

Para eletroforese monodimensional foi feita a solubilização das proteínas membranares em Tris 62,5mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. Restos não solubilizados foram eliminados por ultracentrifugação. Foram feitas, então, a separação por peso molecular, fixação e coloração em azul de Coomassie, nas mesmas condições como descrito anteriormente (Figura 30).

Para eletroforese bidimensional a solubilização foi feita em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002% e restos não solubilizados foram eliminados por ultracentrifugação. A hidratação do gel de focalização isoeletrica foi feita em seguida com o sobrenadante por 12h à temperatura ambiente, nas mesmas condições que descrito anteriormente, assim como as etapas de focalização isoeletrica, equilíbrio e separação por peso molecular. Após a fixação, o gel foi corado com azul coloidal de Coomassie (Figura 31).

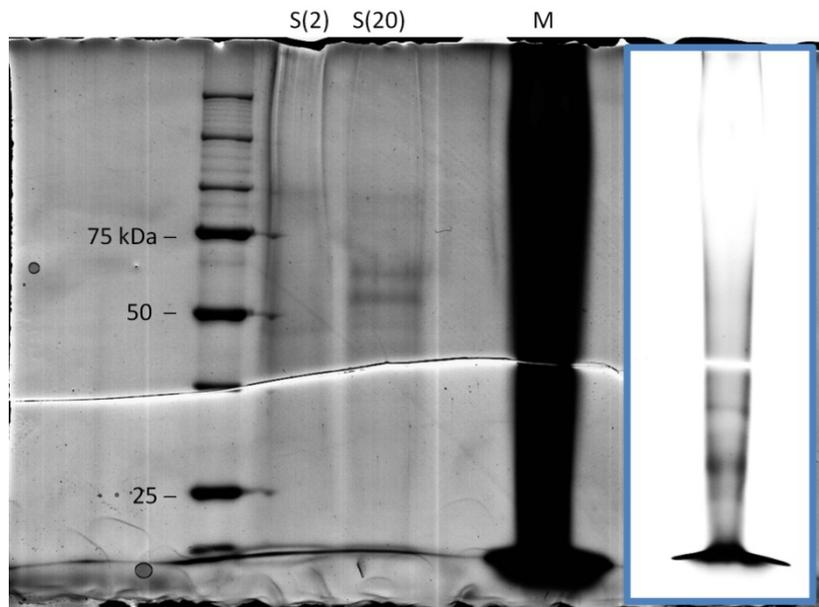


Figura 30: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com carvão ativado em presença de areia de Fontainebleau. Aplicação de 2 μ L e 20 μ L do sobrenadante obtido na etapa de centrifugação dos detritos celulares (S (2) e S (20), respectivamente) e de 20 μ L da suspensão microsomal (M) contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas. Dois tratamentos digitais foram feitos na imagem para evidenciar as bandas observadas na fração S e na fração M (detalhe). Coloração em azul coloidal de Coomassie.

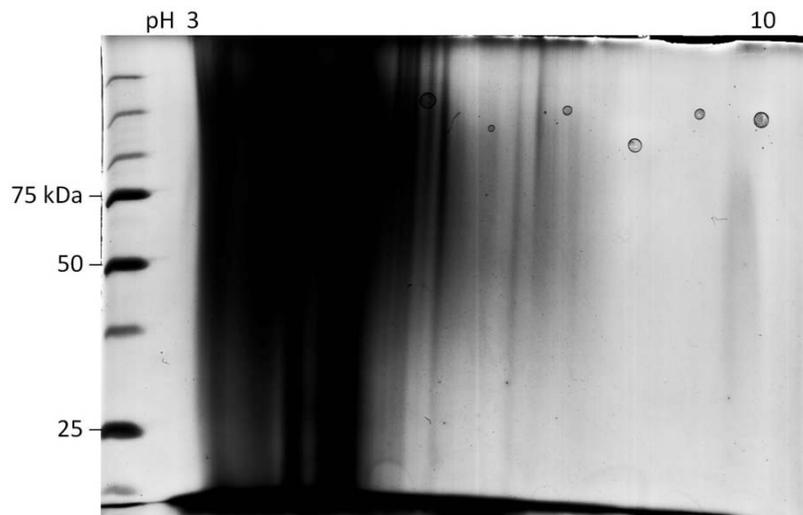


Figura 31: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com carvão ativado em presença de areia de Fontainebleau. Aplicação de 100 μ L de amostra contendo aproximadamente 50 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

Foi verificado que a trituração de raízes de *Vitis* é aparentemente mais eficiente sem a presença de carvão ativado ou areia de Fontainebleau. Após a trituração, o carvão ativado foi adicionado como em etapas anteriores, com o objetivo de se quelar os compostos fenólicos e a areia foi adicionada para possivelmente facilitar a ação mecânica da trituração continuada. Somente após a obtenção de uma mistura homogênea o material foi adicionado pouco a pouco ao tampão, conforme descrito.

Aplicando-se 20 μ L do sobrenadante obtido na primeira centrifugação ao gel de eletroforese monodimensional foi possível observar a presença de duas bandas de proteínas solúveis (Figura 30, colunas S (2) e S (20)). A formação de bandas com boa definição entre as proteínas solúveis indica que o processo que interfere com a extração contaminando e/ou degradando as proteínas membranares não está afetando as proteínas solúveis de modo severo. A separação das proteínas insolúveis por peso molecular, assim como nos resultados

anteriores é ainda de muito baixa qualidade (Figura 30, M), embora seja possível visualizar um princípio de concentração de proteínas nas regiões de 25 e 35kDa, evidenciado na imagem por um clareamento artificial por computador (Figura 30, detalhe). Como esperado após a análise do gel monodimensional, a focalização isoeletrica também não demonstrou melhoras expressivas (Figura 31).

O próximo passo foi, então, uma nova tentativa de extração em presença de PVPP em vez de carvão ativado, sem a areia de Fontainebleau que aparentemente não melhorou a eficácia da trituração nos ensaios anteriores. Em linhas gerais, o procedimento foi o seguinte:

Trituração de 20g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido.

Adição de 0,7g de PVPP (Sigma Aldrich P6755) (razão 1:40 em relação ao peso fresco de tecido vegetal) e homogeneização nas mesmas condições que a trituração.

Suspensão em 100mL de Tris HCl 100mM pH 7,5, sacarose 100mM, EDTA 20mM, DTT 0,1mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 1h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (16.000 x g, 20min, 4°C + 16.000 x g, 40min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado em Tris-MES 1mM pH 7,2, Sacarose 15%, MgSO₄ 1mM. Dosagem de proteínas. Nesta etapa uma alíquota foi separada para a eletroforese monodimensional (fração 1D, 21µg de proteínas aproximadamente) e o restante foi reservado para eletroforese bidimensional (fração 2D, 840µg de proteínas, aproximadamente).

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação das duas frações de modo independente.

Para eletroforese monodimensional foi feita a solubilização das proteínas membranares em Tris 62,5mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. Restos não solubilizados foram eliminados por ultracentrifugação. Foram feitas, então, a separação por peso molecular, fixação e coloração em azul de Coomassie, nas mesmas condições como descrito anteriormente (Figura 32).

Para eletroforese bidimensional a solubilização foi feita em uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Triton X-100 a 0,1%, Tributílfosfina 2mM, IPG 2%, azul de bromofenol 0,002% e restos não solubilizados foram eliminados por ultracentrifugação. A hidratação do gel de focalização isoeletrica foi feita em seguida com o sobrenadante por 12h

à temperatura ambiente, nas mesmas condições que descrito anteriormente, assim como as etapas de focalização isoeétrica, equilíbrio e separação por peso molecular. Após a fixação, o gel foi corado com azul coloidal de Coomassie (Figura 26).

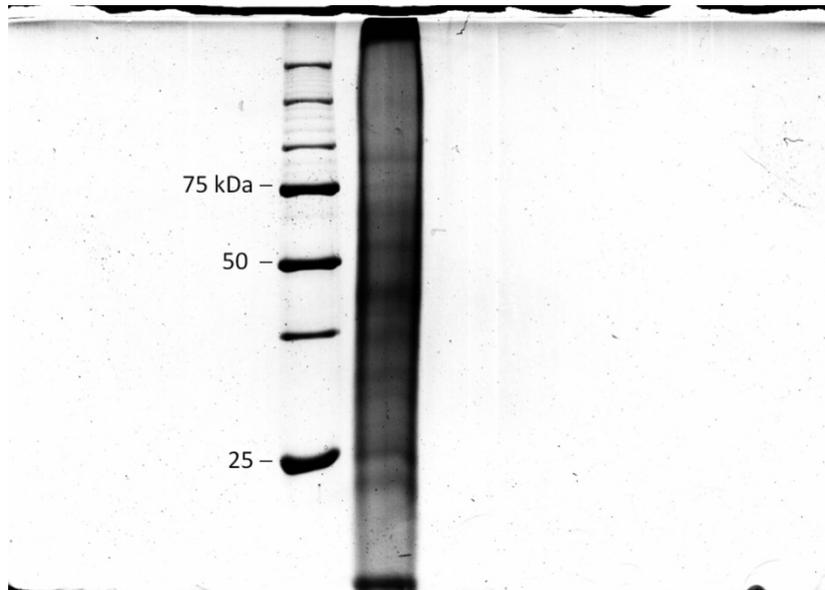


Figura 32: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com PVPP. Aplicação de 20 μ L da suspensão microsomal contendo aproximadamente 20 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

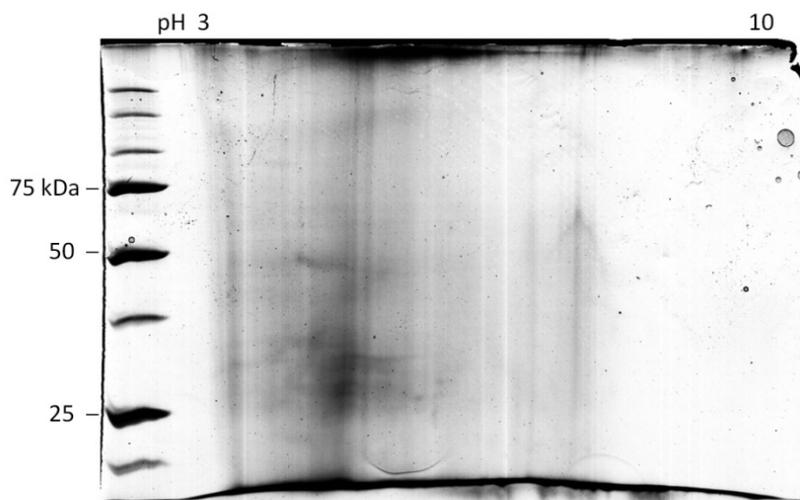


Figura 33: Perfil eletroforético bidimensional da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido seguida de tratamento com PVPP. Aplicação de 58 μ L de amostra contendo aproximadamente 40 μ g de proteínas. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

Comparando-se os resultados obtidos nas últimas duas extrações de proteínas, conclui-se que há uma aparente melhora na qualidade das proteínas extraídas em presença de PVPP em relação às proteínas extraídas em presença de carvão ativado. Isso é atestado pela presença de bandas, ainda que não bem definidas, ao longo de todo o perfil eletroforético monodimensional (Figura 32) e o surgimento de bandas de focalização isoeletrica na região alcalina a 50kDa e entre as regiões de 25 e 37 kDa (Figura 33).

O fato de a presença do PVPP melhorar sensivelmente a qualidade da extração protéica indica que a presença de compostos fenólicos exerce importante influência na extração de proteínas das raízes de *Vitis*. Entretanto, apenas a presença do PVPP não é suficiente para se obter extratos protéicos de boa qualidade para análise em gel de poliacrilamida mono e bidimensionais. Uma possível explicação para a pobre focalização isoeletrica e separação por peso molecular é a presença de agentes contaminantes que estejam causando a degradação das proteínas. O PMSF, por reagir com a serina, inibe a ação de serino-proteinases (BARRETT, 1994; NAM, KIM et al., 2009) e vem sendo

amplamente utilizado como um inibidor de proteínas em extrações protéicas (SARMA, OEHRLE et al., 2008; FERREIRA, MAGLIANO et al., 2009; WU, ZHOU et al., 2009; SILVA, REIS et al., 2010), o que indica que a causa da falta de definição observada não seja por causa da degradação de proteínas por serinoproteases.

Para proteger as proteínas contra agentes oxidantes, um novo ensaio de extração foi feito, desta vez em presença de ácido ascórbico (antioxidante). Para se obter maior evidência nos resultados, a quantidade de raízes empregadas no processo foi consideravelmente maior, desta vez. Em linhas gerais, o procedimento foi o seguinte:

Trituração de 50g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade em presença de nitrogênio líquido.

Suspensão em 600mL de BTP-MES 5mM pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, PVPP 0,2%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 2h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (16.000 x g – aceleração lenta, 20min, 4°C + 16.000 x g, 40min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado no mesmo tampão da etapa anterior, seja BTP-MES 5mM pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM. Dosagem de proteínas.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado (aproximadamente 4mg de proteínas) em 200µL de Tris 62,5mM, β-bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%.

Aquecimento da suspensão por 5min a 95°C e eliminação da matéria não solubilizada por ultracentrifugação.

Do sobrenadante obtido, 100µL foram submetidos a uma diluição seriada no mesmo tampão na razão 1:1 a cada etapa. Desse modo foram obtidas as frações S1 (não diluída) e suas diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

O precipitado foi ressuspendido em 100µL do mesmo tampão (Tris 62,5mM, β-bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%), aquecido por 5min a 37°C e ultracentrifugado obtendo-se, assim, a fração do segundo sobrenadante S2.

O novo precipitado foi novamente ressuspendido em 100µL do mesmo tampão (Tris 62,5mM, β-bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%), e brevemente centrifugado (10s,

centrífuga de bancada MiniSpin). O sobrenadante foi coletado S3A e o processo foi repetido duas outras vezes, gerando as frações S3B e S3C.

Finalmente, o precipitado foi coletado em 100 μ L do mesmo tampão (Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%) e submetido a uma diluição seriada, ainda no mesmo tampão, para aplicação no gel sem passar por nenhuma centrifugação (fração P).

As diferentes frações foram aplicadas em gel de poliacrilamida, posteriormente fixado e colorado com azul coloidal de Coomassie, conforme anteriormente descrito.

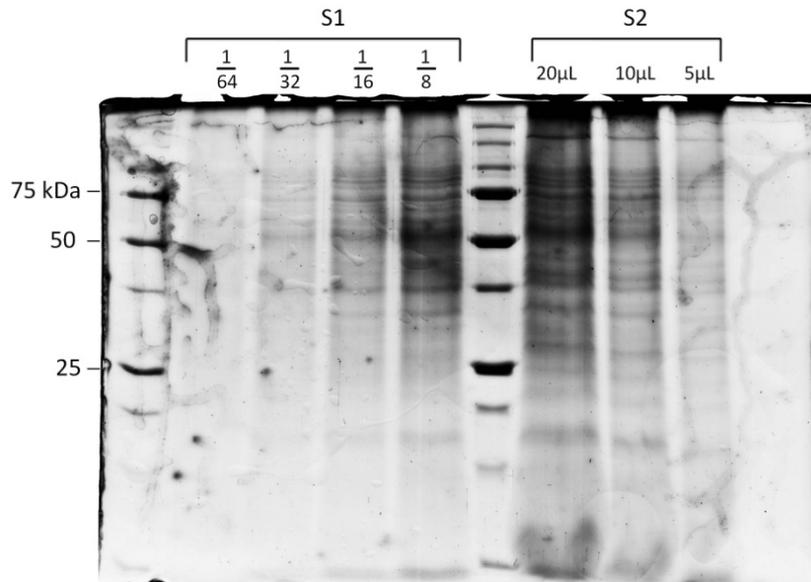


Figura 34: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspensa em presença de PVPP. S1: alíquotas de 20 μ L de quatro das diluições seriadas (razões de diluição indicadas) do sobrenadante da ultracentrifugação após primeira solubilização da fração microsomal em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. S2: 20, 10 e 5 μ L do sobrenadante obtido após ressuspensão do precipitado da etapa anterior no mesmo tampão e ultracentrifugação. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

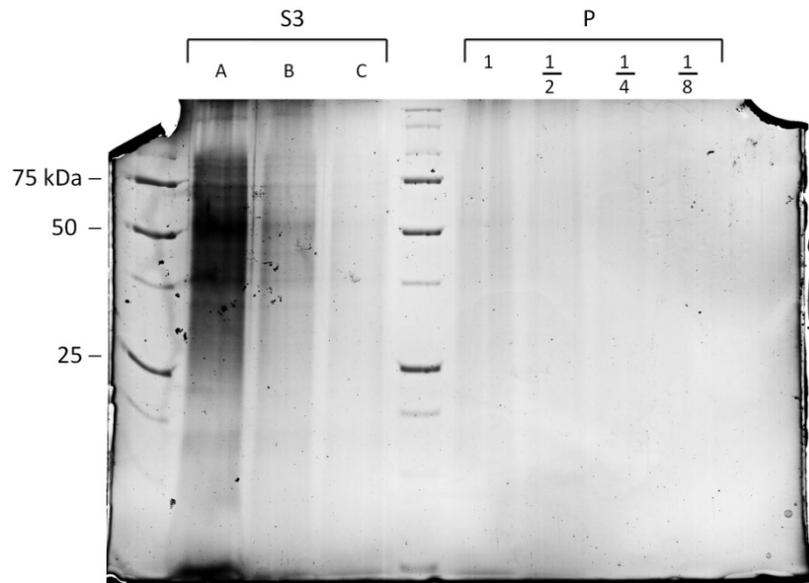


Figura 35: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspensa em presença de PVPP. S3: Frações de 20 μ L obtido em se ressuspensa o precipitado obtido da centrifugação na etapa anterior em Tris 62,5mM, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% e submetendo-se a suspensão a uma breve centrifugação (centrífuga de bancada, 10s) por três vezes sucessivas (A, B e C). P: 20 μ L do precipitado suspenso em 100 μ L do mesmo tampão e 20 μ L de diluições seriadas dessa mistura (razões de diluição indicadas). Coloração em azul coloidal de Coomassie.

Detergentes como o SDS têm o uso restringido em proteômica por que podem perturbar alguns procedimentos importantes, tais como a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) ou espectrometria de massa (WISNIEWSKI, ZOUGMAN et al., 2009), além de impedir o fracionamento membranar por ultracentrifugação em gradiente de glicose.

A solubilização de proteínas da fração microsomal diretamente em presença de SDS, entretanto, revelou-se eficaz, com a formação de

uma série de bandas de diferentes pesos moleculares bem definidas, o que indica, além da boa solubilização dessas proteínas. Além disso, em comparação com os resultados anteriores, a presença de ácido ascórbico revelou grande efeito na qualidade do extrato protéico (Figura 34). Esse resultado indica que a degradação das proteínas por oxidação exerce importante papel no momento da extração das proteínas, especialmente quando se suspende o pó obtido por trituração em nitrogênio líquido em tampão para se remover a matéria particulada. Ws'niowski e colaboradores mostraram que o problema da presença de SDS para espectrometria de massa pode ser contornado mais tarde, através de diálise da amostra, abrindo assim campo para a exploração de proteínas particularmente difíceis de se solubilizar, tais como as proteínas membranares (WISNIEWSKI, ZOUGMAN et al., 2009).

Sucessivas ressuspensões do precipitado protéico após a primeira extração com SDS não exibiram bons perfis eletroforéticos (Figura 35), indicando que a primeira extração foi suficiente para solubilizar a maior parte das proteínas.

Para garantir que o processo de aquecimento das amostras após a solubilização em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%, a etapa foi testada em se comparando o aquecimento a 95°C com um aquecimento a 37°C pelo mesmo período de tempo (5min). Ainda, para garantir que não há perda de proteínas importantes no processo de ultracentrifugação que segue essa solubilização, foi feita uma comparação entre amostras aquecidas a 37°C ultracentrifugadas ou submetidas a breve centrifugação em centrífuga de bancada. O restante do procedimento foi idêntico ao procedimento do teste anterior. Pequenos ajustes relacionados à manuseabilidade da técnica, tais como volume de tampões aplicados e procedimento para suspensão de precipitados foram também alterados. Em linhas gerais, tem-se:

Trituração de 50g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, 8 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido.

Suspensão em 250mL de BTP-MES 5mM pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, PVPP 0,2%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 2h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (16.000 x g – aceleração lenta, 20min, 4°C + 16.000 x g, 40min, 4°C).

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado no mesmo tampão da etapa anterior, seja BTP-MES 5mM

pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, PVPP 0,2%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM. Dosagem de proteínas.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado (aproximadamente 4mg de proteínas) em 400 μ L de Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%.

Três frações de 100 μ L (a 60 μ g de proteínas por μ L) foram separadas desse material. Uma foi aquecida a 37°C e ultracentrifugada (37u), utilizando-se o sobrenadante para eletroforese, outra a 37°C e brevemente centrifugada em centrífuga de bancada e outra a 97°C e brevemente centrifugada (centrífuga de bancada) da mesma forma. Volumes de 10 e 20 μ L de cada fração foram aplicadas no gel de pliacrilamida para separação eletroforética por peso molecular (Figura 36).

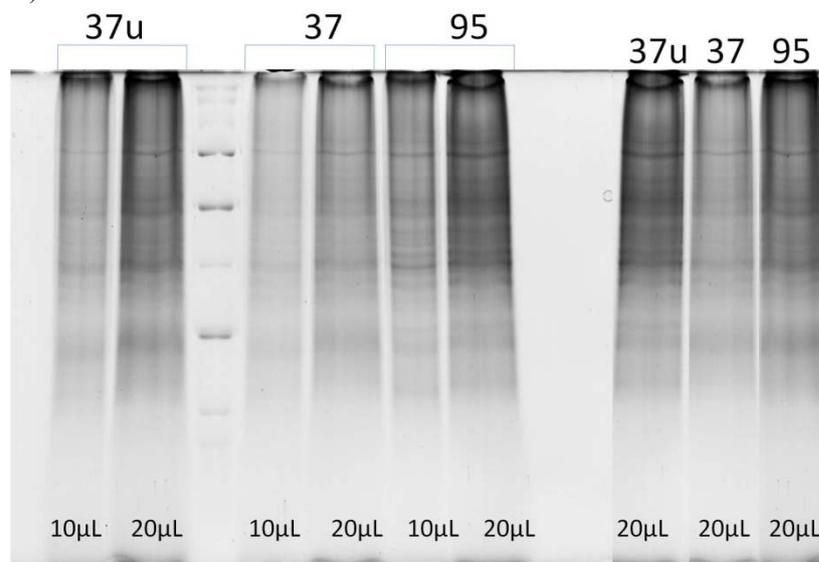


Figura 36: Perfil eletroforético da fração microsomal extraída de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4) a partir de trituração em nitrogênio líquido em presença de ácido ascórbico e ressuspendida em presença de PVPP. 37u: sobrenadante obtido por ultracentrifugação da fração aquecida a 37°C após solubilização em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. 37: fração aquecida a 37°C submetida a breve centrifugação. 95: fração aquecida a 95°C submetida a breve centrifugação. Volumes aplicados indicados na

Figura. À direita, as vias de 20 μ L das três frações cortadas digitalmente e alinhadas para melhor comparação. Coloração em azul coloidal de Coomassie.

O processo de ultracentrifugação precedendo a solubilização das proteínas em tampão de eletroforese não causa perda visível de espécies majoritárias de proteínas, embora também não aporte ganho considerável na definição das bandas de separação eletroforética por peso molecular nas condições testadas (Figura 36, vias 37u e 37). Em contrapartida, o aquecimento das amostras a 95°C parece melhorar essa definição, possivelmente por facilitar o contato entre as proteínas e o detergente SDS, aumentando assim a eficiência no processo de desnaturação das proteínas (Figura 36, vias 37 e 95).

Para se demonstrar um enriquecimento de proteínas da fração microsomal, contendo a membrana plasmática das células bem como as membranas internas, foi feito um ensaio de Western Blotting, utilizando-se como anticorpo primário um anticorpo dirigido ao fator de ribosilação de ADP1, presente nas membranas do complexo de Golgi.

A seguir, são resumidamente discriminados os procedimentos para a extração de proteínas e Western Blotting.

Trituração de 20g (peso fresco) de raízes de *Vitis* – porta-enxertos SO4, com 20 semanas de idade, em presença de nitrogênio líquido. Adição de 1g de PVPP e mistura até a total vaporização do nitrogênio líquido.

Suspensão em 200mL de BTP-MES 5mM pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM.

Agitação da mistura durante 2h em gelo no interior de câmara fria a 4°C.

Eliminação da matéria particulada por centrifugação (16.000 x g – aceleração lenta, 20min, 4°C + 16.000 x g, 40min, 4°C). No sobrenadante encontram-se todas as proteínas solúveis e as proteínas membranares, ainda integradas às membranas celulares. Neste momento foi coletada uma alíquota de 1800 μ L, denominada proteínas totais (T). 200 μ L de TCA 100% foram adicionados, a mistura foi deixada durante 1h em gelo e centrifugada a 1500 x g por 30min a 4°C. O precipitado foi lavado 1x com acetona, recentrifugado, secado por vaporização e ressuspenso em Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% para posterior eletroforese.

Precipitação do microsoma por ultracentrifugação. O sobrenadante após esta centrifugação contém as proteínas solúveis. Uma

alíquota de 1500 μ foi retirada e misturada a 500 μ L de Tris 250mM, β -bercaptoetanol 20%, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,008% para posterior eletroforese.

O precipitado foi ressuspenso em BTP-MES 5mM pH 9,0, Tris 80mM, Sacarose 0,25M, EDTA 3mM, glicerol 10%, DTT 1mM, ácido ascórbico 5mM, PMSF 1mM.

Reprecipitação do microsoma por ultracentrifugação e suspensão do precipitado (aproximadamente 4mg de proteínas) em 400 μ L de Tris 62,5mM, β -bercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%. A amostra foi aquecida em seguida a 95° durante 5min sob agitação. Uma alíquota de 400 μ L foi separada nesse estágio e ultracentrifugada, para eliminar a matéria não solubilizada. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C para posterior eletroforese em gel de acrilamida.

Dosagens de proteínas foram feitas em várias etapas ao longo do processo, mas os resultados não foram considerados devido à interferência causada por contaminantes na amostra. Volumes de 5 e 20 μ L de cada alíquota foram aplicados ao gel de eletroforese para ajustar as quantidades desejadas para um blotting. Assim, num único gel de eletroforese (acrilamida 12%) foram aplicados volumes de 5 e 20 μ L das proteínas totais (T), solúveis (S), microsomais (M) e microsomais ultracentrifugadas (Mu) (Figura 37).

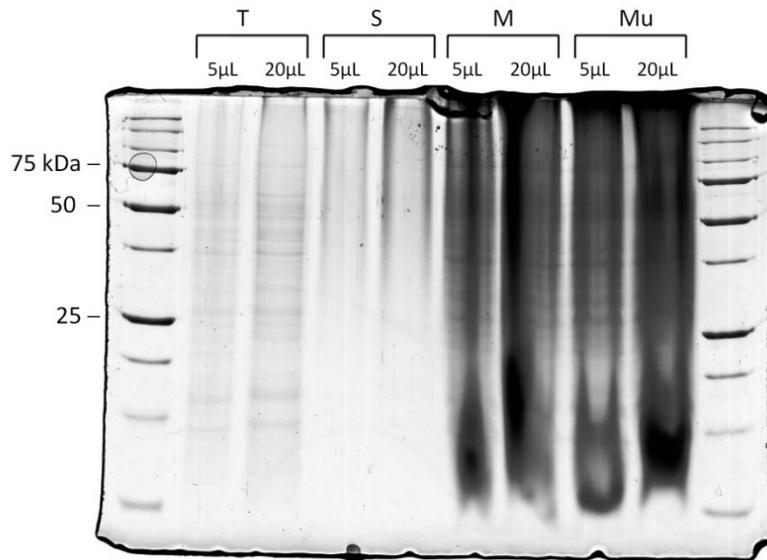


Figura 37: Perfil eletroforético de frações retiradas ao longo do processo de extração de proteínas de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). T: proteínas Totais, S: proteínas solúveis, M: fração microsomal.

O gel demonstra que as proteínas solúveis apresentam-se de muito baixa qualidade (Figura 37, coluna S). Não foi possível determinar a razão. Uma possível explicação é uma maior presença de contaminantes devido à idade das plantas no momento da extração das raízes. Essa alíquota não foi utilizada em testes posteriores.

Também é possível observar no gel que a concentração de proteínas das duas alíquotas da fração microsomal (M e Mu) são muito maiores que as concentrações de proteínas da fração de proteínas totais (T) e solúveis (S), dificultando a comparação em gel (Figura 37). Por essa razão, essas duas frações foram diluídas na razão 1:10 em Tris 62,5mM, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002% e aplicadas a um novo gel de eletroforese, em que foram aplicados 10, 20 e 30 μ L da fração com proteínas totais diluídas 10x (T/10) e 1, 10 e 15 μ L das alíquotas microsomal e microsomal ultracentrifugada diluídas na razão 1:10 (M/10 e Mu/10, respectivamente) (Figura 38).

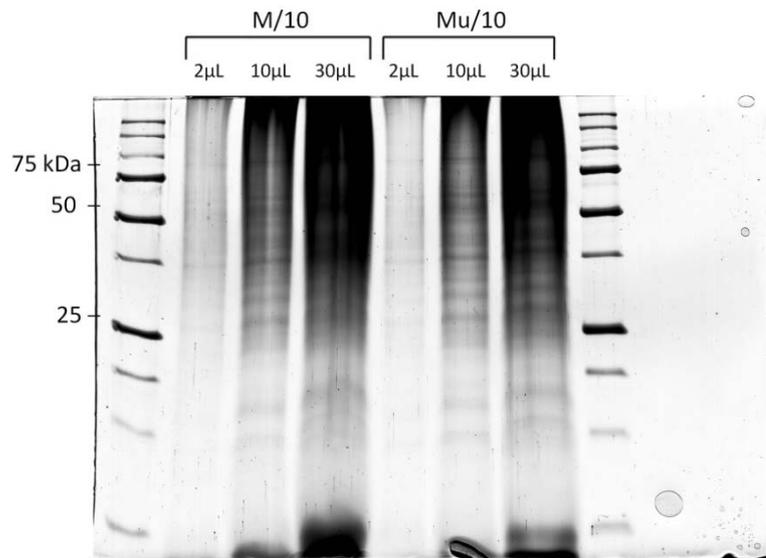


Figura 38: Perfil eletroforético da fração microsomal e da fração microsomal livre de matéria não solubilizada, ambas diluídas na razão 1:10 (M/10 e Mu/10, respectivamente) de raízes de *Vitis* (porta-enxertos SO4). Volumes de amostra aplicados indicados.

Comparando-se os géis de eletroforese, tem-se uma aproximação grosseira da quantidade de proteínas aplicadas no gel em se aplicando 20 µL das proteínas totais (T) e um intermediário entre 2 e 10 µL das frações microssomais diluídas na razão 1:10 (M/10 e Mu/10, respectivamente) (Figura 38). Para um ensaio de Wester Blotting objetivando meramente o aprendizado da técnica, foram aplicados, portanto, 10, 20 e 30 µL da fração de proteínas totais e 5, 10 e 15 µL de cada uma das alíquotas da fração microsomal.

O Western Blotting foi feito conforme descrito na seção de material e métodos. Em resumo, as amostras foram submetidas a uma nova eletroforese em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo de coelho Anti-Fator de ribosilação de ADP 1 (Arf-1) (Agrisera # AS08325), de peso molecular 21kDa e como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo de ovelha anti-coelho, conjugado a peroxidase (Bio-Rad, ref # 166-2408 EDU).

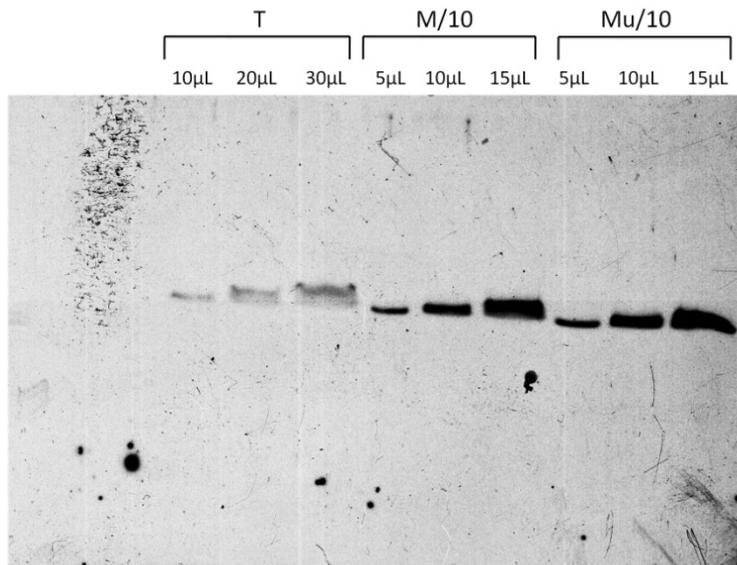


Figura 39: Western Blotting mostrando aparente enriquecimento de uma proteína de membrana do complexo de Golgi, o fator de ribosilação de ADP na fração microsomal (M/10 e Mu/10) em comparação com a fração de proteínas totais (T).

Comparando-se a reação dos anticorpos contra a alíquota de proteínas totais (T) com as alíquotas de fração microsomal levemente centrifugada (M) e ultracentrifugada para remoção de resíduos protéicos não solubilizados (Mu), observa-se um nítido enriquecimento do fator de ribosilação de ATP na fração microsomal, o que indica um enriquecimento das proteínas membranares nessa alíquota (Figura 39).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível concluir que através da incubação de células de *M. synoviae* em meio Frey modificado livre de proteínas foi possível produzir perfis de gel claramente diferentes utilizando proteínas extraídas da fração celular ou da fração extracelular, demonstrando proteínas exclusivas em cada uma das frações.

São proteínas exclusivas da fração celular: 6-fosfofrutoquinase, Fator de alongação EF-Ts, Endopeptidase O, FOF1 ATP sintase – subunidade beta, Glicose-6-fosfato isomerase, Leucil aminopeptidase, Fosfoenolpiruvato-proteína fosfatase, Serina/treonina-proteína quinase, Tiol peroxidase, Fator de alongação de transcrição Grea, XAA-Pro aminopeptidase. São exclusivas da fração extracelular: Fator de alongação G, Chaperona molecular DnaK, Componente E1 da piruvato desidrogenase – subunidade alfa, DNA polimerase III – subunidade beta, Tiorredoxina redutase, Componente E1 da piruvato desidrogenase – subunidade beta, Frutose-bifosfato aldolase.

Na fração extracelular foram observadas proteínas que originalmente são descritas como citosólicas mas que em estudos mais recentes foram identificadas também como proteínas expostas na superfície ou secretadas por outros micro-organismos patogênicos, imunogênicas ou capazes de ligar-se a componentes estruturais do hospedeiro como fibronectina ou plasminogênio, contribuindo desse modo para o processo infeccioso. Essas proteínas são a acetato quinase, os fatores de alongação G e Tu, a fosfodiesterase de proteína carreadora de acil, a frutose bisfosfato aldolase, a tioredoxina redutase, a DnaK, ambas unidades alfa e beta do componente E1 da piruvato desidrogenase e a enolase. Essas evidências sugerem que essas proteínas, apesar de serem típicas proteínas citoplasmáticas, participantes de diversas vias metabólicas fundamentais para a célula, podem ser secretadas por *M. synoviae* e, assim, estar implicadas no processo de instalação e manutenção da doença.

Ao longo do período do estágio no INRA (Institute National de la Recherche Agronomique, Dijon, França), foi possível desenvolver um protocolo eficaz para a extração de proteínas membranares das raízes de *Vitis*, observando-se uma boa resolução em géis monodimensionais de eletroforese (Figuras) e há fortes evidências de que houve um enriquecimento de proteínas membranares em relação às proteínas solúveis (figuras).

A partir de agora, estudos podem ser feitos comparando-se o perfil eletroforético monodimensional de proteínas membranares das

raízes de *Vitis* micorrizadas e não micorrizadas visando a se identificar proteínas com níveis de expressão modificados em função dessa interação. Otimizando-se em seguida o uso de detergentes, proteínas membranares poderão ser solubilizadas e resolvidas em géis bidimensionais, rendendo-se assim uma melhor resolução nos perfis proteômicos e facilitando a identificação por espectrometria de massa.

Repetindo-se os experimentos com uma quantidade maior de raízes, a partir do protocolo de extração de proteínas membranares desenvolvido neste trabalho complementado com a separação da plasmalema, será possível ainda enriquecer as amostras com as proteínas membranares mais diretamente envolvidas no processo da simbiose, complementando os resultados.

5 CURSOS, CONGRESSOS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Participação no curso tutorial intitulado “Bioinformática para Análise de Espectrometria de Massa” em Genebra de 26 a 29 de janeiro de 2009 (Anexo A).

Curso teórico de espectrometria de massa com duração de 3 horas intitulado “Espectrometria de Massa e Abordagem Proteômica” (Anexo B).

Envio de Resumo a congresso ICOM 6 - International Conference on Mycorrhiza, de 9 a 14 de agosto de 2009, Belo Horizonte Brasil. Resumo intitulado: “Proteomics of Vitis root cuttings: a step forward to understanding molecular mechanisms involved in mycorrhizal symbiosis of a woody plant species”, de autoria de Guillier, Christelle e Rebollo, Manuel (Anexo C).

Participação em congresso SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique) em Dijon de 14 a 17 de setembro de 2009 (Anexo D).

Participação em semanários de grupo a cada três semanas durante todo o período do estágio (Anexo E).

Submissão e aceite do artigo intitulado “Proteínas Extracelulares de *Mycoplasma synoviae*”, na revista ISRN – Veterinarian Science (Anexo F).

Submissão e aceite do artigo intitulado “Estudos proteômicos de associações micorrízicas arbusculares” na revista Advances in Biological Chemistry (ABC) (Anexo G).

6 REFERÊNCIAS

ABBASPOUR, H.; SAEIDI-SAR, S.; AFSHARI, H.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 169, n. 7, p. 704-709, 2012.

ABER, S.; KHATAEE, A.; SHEYDAEI, M. Optimization of activated carbon fiber preparation from Kenaf using K₂HPO₄ as chemical activator for adsorption of phenolic compounds. *Bioresource Technology* [S.I.], v. 100, n. 24, p. 6586-6591, 2009.

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K. I.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* [S.I.], v. 435, n. 7043, p. 824-827, 2005.

AL-KARAKI, G.; MCMICHAEL, B.; ZAK, J. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 263-269, 2004.

ALDRIDGE, K. E. Growth and cytopathology of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryo cell cultures. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 12, n. 1, p. 198-204, 1975.

ALHAMED, Y. A. Adsorption kinetics and performance of packed bed adsorber for phenol removal using activated carbon from dates' stones. *Journal of Hazardous Materials* [S.I.], v. 170, n. 2-3, p. 763-770, 2009.

ALOU, A.; RECORBET, G.; GOLLOTTE, A.; ROBERT, F.; VALOT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; ASCHI-SMITI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 420-433, Jan 2009.

ANTIKAINEN, J.; KUPANNEN, V.; LÄHTEENMÄKI, K.; KORHONEN, T. K. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 189, n. 12, p. 4539-4543, 2007.

ANTÚNEZ, K.; ANIDO, M.; ARREDONDO, D.; EVANS, J. D.; ZUNINO, P. *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 147, n. 1-2, p. 83-89, 2011.

ANTÚNEZ, K.; ANIDO, M.; EVANS, J. D.; ZUNINO, P. Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 141, n. 3-4, p. 385-389, 2010.

AVAKIAN, A. P.; KLEVEN, S. H. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* studied by immunoblotting. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 24, p. 155-169, 1990.

AVAKIAN, A. P.; LEY, D. H.; KLEVEN, S. H. Comparison of *Mycoplasma synoviae* isolates by immunoblotting. *Avian Pathology* [S.I.], v. 21, p. 633-642, 1992.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 457-464, 1996.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* [S.I.], v. 68, n. 1-4, p. 1-24, 1997.

BABU, G. J.; WHEELER, D.; ALZATE, O.; PERIASAMY, M. Solubilization of membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis: Identification of sarcoplasmic reticulum membrane proteins. *Analytical Biochemistry* [S.I.], v. 325, n. 1, p. 121-125, 2004.

BAGO, B.; DONAIRE, J. P.; AZCÓN-AGUILAR, C. ATPase activities of root microsomes from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants. *New Phytologist* [S.I.], v. 136, n. 2, p. 305-311, 1997.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* [S.I.], v. 124, n. 3, p. 949-957, 2000.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; ZIPFEL, W.; LAMMERS, P.; SHACHAR-HILL, Y. Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. Metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* [S.I.], v. 244, n. 1-2, p. 189-197, 2002.

BAIL, S.; STUEBIGER, G.; KRIST, S.; UNTERWEGER, H.; BUCHBAUER, G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* [S.I.], v. 108, n. 3, p. 1122-1132, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S.; KANNAN, T. R.; BASEMAN, J. B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 76, n. 7, p. 3116-3123, 2008.

BARKER, S. J.; EDMONDS-TIBBETT, T. L.; FORSYTH, L. M.; KLINGLER, J. P.; TOUSSAINT, J.-P.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Root infection of the reduced mycorrhizal colonization (rmc) mutant of tomato reveals genetic interaction between symbiosis and parasitism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [S.I.], v. 67, n. 6, p. 277-283, 2005.

BARRETT, A. J. Classification of Peptidases. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* [S.I.], v. 244, p. 1-15, 1994.

BARTOW, R. A.; MCMURRAY, D. N. Cellular and humoral immune responses to mycobacterial stress proteins in experimental pulmonary tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease* [S.I.], v. 78, n. 3-4, p. 185-193, 1997.

BENCINA, D.; DROBNIC-VALIC, M.; HORVAT, S.; NARAT, M.; KLEVEN, S. H.; DOVC, P. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 203, n. 1, p. 115-123, 2001.

BENCINA, D.; NARAT, M.; DOVC, P.; DROBNIC-VALIC, M.; HABE, F.; H. KLEVEN, S. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 173, n. 1, p. 85-94, 1999.

BERČIČ, R. L.; SLAVEC, B.; LAVRIČ, M.; NARAT, M.; BIDOVEC, A.; DOVČ, P.; BENČINA, D. Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 127, n. 1-2, p. 147-154, 2008.

BERČIČ, R. L.; SLAVEC, B.; LAVRIČ, M.; NARAT, M.; ZORMAN-ROJS, O.; DOVČ, P.; BENČINA, D. A survey of avian *Mycoplasma* species for neuraminidase enzymatic activity. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 130, n. 3-4, p. 391-397, 2008.

BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A. VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environmental and Experimental Botany* [S.I.], v. 33, n. 1, p. 159-173, 1993.

BØHLE, L. A.; RIAZ, T.; EGGE-JACOBSEN, W.; SKAUGEN, M.; BUSK, Ø. L.; EIJSINK, V. G. H.; MATHIESEN, G. Identification of surface proteins in *Enterococcus faecalis* V583. *BMC Genomics* [S.I.], v. 12, n. 135, 2011.

BOLDT, K.; PÖRS, Y.; HAUPT, B.; BITTERLICH, M.; KÜHN, C.; GRIMM, B.; FRANKEN, P. Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 168, n. 11, p. 1256-1263, 2011.

BONA, E.; MARSANO, F.; MASSA, N.; CATTANEO, C.; CESARO, P.; ARGESE, E.; DI TOPPI, L. S.; CAVALETTO, M.; BERTA, G. Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in *Pteris vittata* roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Proteomics* [S.I.], v. 74, n. 8, p. 1338-1350, 2011.

BONFANTE, P.; ANCA, I. A. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual review of microbiology* [S.I.], v. 63, p. 363-383, 2009.

BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Tansley-Review no 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* [S.I.], v. 130, n. 1, p. 3-21, 1995.

BOOMSMA, C. R.; VYN, T. J. Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Field Crops Research* [S.I.], v. 108, n. 1, p. 14-31, 2008.

BOTARO, D.; TORRES, J. P. M.; MALM, O.; REBELO, M. F.; HENKELMANN, B.; SCHRAMM, K.-W. Organochlorine pesticides residues in feed and muscle of farmed Nile tilapia from Brazilian fish farms. *Food and Chemical Toxicology* [S.I.], v. 49, n. 9, p. 2125-2130, 2011.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry* [S.I.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUNETTO, G.; CERETTA, C. A.; KAMINSKI, J.; DE MELO, G. W.; GIROTTO, E.; TRENTIN, E. E.; LOURENZI, C. R.; VIEIRA, R. C. B.; GATIBONI, L. C. Grapes yield and chemistry composition in Cabernet Sauvignon grapevine with nitrogen fertilization. *Ciencia Rural* [S.I.], v. 39, n. 7, p. 2035-2041, 2009.

BUIM, M. R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; METTIFOGO, E.; UENO, P. M.; TIMENETSKY, J.; SANTELLI, G. M. M.; PIANTINO FERREIRA, A. J. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: Elucidation of the *Mycoplasma* pathogenesis in chicken. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* [S.I.], v. 34, p. 41-47, 2011.

BUIM, M. R.; SOARES, N. M. *Mycoplasma synoviae*: um desafio na produção de ovos. *Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos* [S.I.], n. 151, 2011.

CAMERON, D. D.; JOHNSON, I.; READ, D. J.; LEAKE, J. R. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist* [S.I.], v. 180, n. 1, p. 176-184, 2008.

CAMPOS-SORIANO, L.; GARCÍA-GARRIDO, J. M.; SEGUNDO, B. S. Activation of basal defense mechanisms of rice plants by *Glomus intraradices* does not affect the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* [S.I.], v. 188, n. 2, p. 597-614, 2010.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* [S.I.], v. 31, n. 3, p. 501-514, May 2009.

CASTALDO, C.; VASTANO, V.; SICILIANO, R. A.; CANDELA, M.; VICI, M.; MUSCARIELLO, L.; MARASCO, R.; SACCO, M. Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microbial Cell Factories* [S.I.], v. 8, n. 14, 2009.

CHAE, C. Vaccinating pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection: Failure to prevent transmission. *The Veterinary Journal* [S.I.], v. In Press, Corrected Proof, 2010.

CHAVES, D. F. S.; DE SOUZA, E. M.; MONTEIRO, R. A.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F. A two-dimensional electrophoretic profile of the proteins secreted by *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Journal of Proteomics* [S.I.], v. 73, n. 1, p. 50-56, 2009.

CHEN, H.; YU, S.; SHEN, X.; CHEN, D.; QIU, X.; SONG, C.; DING, C. The *Mycoplasma gallisepticum* α -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen. *Microbial Pathogenesis* [S.I.], v. 51, n. 4, p. 285-290, 2011.

CHITLARU, T.; GAT, O.; GROSFELD, H.; INBAR, I.; GOZLAN, Y.; SHAFFERMAN, A. Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 75, n. 6, p. 2841-2852, 2007.

CHRISMAN, J. D. R.; KOIFMAN, S.; DE NOVAES SARCINELLI, P.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* [S.I.], v. 212, n. 3, p. 310-321, 2009.

CHRISTIE, P.; LI, X. L.; CHEN, B. D. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil* [S.I.], v. 261, n. 1-2, p. 209-217, 2004.

CORDWELL, S. J.; NOUWENS, A. S.; WALSH, B. J. Comparative proteomics of bacterial pathogens. *PROTEOMICS* [S.I.], v. 1, n. 4, p. 461-472, 2001.

COX, G. U. Y.; TINKER, P. B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* [S.I.], v. 77, n. 2, p. 371-378, 1976.

DABO, S. M.; CONFER, A. W.; HARTSON, S. D. Adherence of *Pasteurella multocida* to fibronectin. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 110, n. 3-4, p. 265-275, 2005.

DALL'ACQUA, S.; SHRESTHA, B. B.; COMAI, S.; INNOCENTI, G.; GEWALI, M. B.; JHA, P. K. Two phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* Gaertn. *Fitoterapia* [S.I.], v. 80, n. 5, p. 279-282, 2009.

DALLO, S. F.; KANNAN, T. R.; BLAYLOCK, M. W.; BASEMAN, J. B. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Molecular Microbiology* [S.I.], v. 46, n. 4, p. 1041-1051, 2002.

DAMERVAL, C.; DEVIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic-variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. *Food and Chemical Toxicology* [S.I.], v. 45, p. 2574-2580, 2007.

DASSI, B.; SAMRA, A.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S. Different polypeptide profiles from tomato roots following interactions with arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae*) or pathogenic (*Phytophthora parasitica*) fungi. *Symbiosis* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 65-77, 1999.

DAVIES, F. T.; PURYEAR, J. D.; NEWTON, R. J.; EGILLA, J. N.; GROSSI, J. A. S. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and

tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 158, n. 6, p. 777-786, 2001.

DELVECCHIO, V. G.; CONNOLLY, J. P.; ALEFANTIS, T. G.; WALZ, A.; QUAN, M. A.; PATRA, G.; ASHTON, J. M.; WHITTINGTON, J. T.; CHAFIN, R. D.; LIANG, X.; GREWAL, P.; KHAN, A. S.; MUJER, C. V. Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 72, n. 9, p. 6355-6363, 2006.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* [S.I.], v. 312, n. 5771, p. 212-217, 2006.

DOPICO-GARCIA, M. S.; FIQUE, A.; GUERRA, L.; AFONSO, J. M.; PEREIRA, O.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. Principal components of phenolics to characterize red Vinho Verde grapes: Anthocyanins or non-coloured compounds? *Talanta* [S.I.], v. 75, n. 5, p. 1190-1202, 2008.

DOPICO-GARCIA, M. S.; VALENTAO, P.; GUERRA, L.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M. Experimental design for extraction and quantification of phenolic compounds and organic acids in white "Vinho Verde" grapes. *Analytica Chimica Acta* [S.I.], v. 583, n. 1, p. 15-22, 2007.

DOS SANTOS, T. P.; LOPES, C. M.; RODRIGUES, M. L.; DE SOUZA, C. R.; RICARDO-DA-SILVA, J. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S.; CHAVES, M. M. Effects of deficit irrigation strategies on cluster microclimate for improving fruit composition of Moscatel field-grown grapevines. *Scientia Horticulturae* [S.I.], v. 112, n. 3, p. 321-330, 2007.

DUFOUR-GESBERT, F.; DHEILLY, A.; MAROIS, C.; KEMPF, I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 114, n. 1-2, p. 148-154, 2006.

DUMAS-GAUDOT, E.; VALOT, B.; BESTEL-CORRE, G.; RECORBET, G.; ST-ARNAUD, M.; FONTAINE, B.; DIEU, M.; RAES, M.; SARAVANAN, R. S.; GIANINAZZI, S. Proteomics as a way to identify extra-radicular fungal proteins from *Glomus intraradices*

- RiT-DNA carrot root mycorrhizas. *Fems Microbiology Ecology* [S.I.], v. 48, n. 3, p. 401-411, 2004.

EDDLESTON, M.; BATEMAN, D. N. Major reductions in global suicide numbers can be made rapidly through pesticide regulation without the need for psychosocial interventions. *Social Science & Medicine* [S.I.], v. 72, n. 1, p. 1-2, 2011.

EDWARD, D. G.; FREUNDT, E. A. Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *International Journal of Systematic Bacteriology* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 267-268, 1967.

ESGLEAS, M.; LI, Y.; HANCOCK, M. A.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. D.; GOTTSCHALK, M. Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. *Microbiology* [S.I.], v. 154, n. 9, p. 2668-2679, 2008.

FARIA, N. M. X.; DA ROSA, J. A. R.; FACCHINI, L. A. Poisoning by pesticides among family fruit farmers, Bento Goncalves, Southern Brazil. *Revista De Saude Publica* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 335-344, 2009.

FEHRI, L. F.; SIRAND-PUGNET, P.; GOURGUES, G.; JAN, G.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Resistance to antimicrobial peptides and stress response in *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [S.I.], v. 49, n. 10, p. 4154-4165, 2005.

FENG, Y.; PAN, X.; SUN, W.; WANG, C.; ZHANG, H.; LI, X.; MA, Y.; SHAO, Z.; GE, J.; ZHENG, F.; GAO, G. F.; TANG, J. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *Journal of Infectious Diseases* [S.I.], v. 200, n. 10, p. 1583-1592, 2009.

FERRANDINO, A.; GUIDONI, S. Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. *European Food Research and Technology* [S.I.], v. 230, n. 3, p. 417-427, 2010.

FERREIRA, A.; MAROCO, E.; YONAMINE, M.; DE OLIVEIRA, M. L. F. Organophosphate and carbamate poisonings in the northwest of Parana state, Brazil from 1994 to 2005: clinical and epidemiological

aspects. *Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas* [S.I.], v. 44, n. 3, p. 407-415, 2008.

FERREIRA, G. A.; MAGLIANO, A. C. M.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C. Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga*. *Acta Tropica* [S.I.], v. 112, n. 2, p. 156-163, 2009.

FERROL, N.; BAGO, B.; FRANKEN, P.; GOLLOTTE, A.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ALEXANDRA HARRIER, L.; LANFRANCO, L.; VAN TUINEN, D.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Genomics of arbuscular mycorrhizal fungi. In: DILIP, K. A.; GEORGE, G. K. (Ed.). *Applied Mycology and Biotechnology*: Elsevier, 2004. p. 379-403.

FRANKEN, P.; GNADINGER, F. Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: Infection development and mRNA levels of defense-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* [S.I.], v. 7, n. 5, p. 612-620, 1994.

FREY, M. L.; HANSON, R. P.; ANDRSON, D. P. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. *American Journal of Veterinary Research* [S.I.], v. 29, n. 11, p. 2163-2171, 1968.

FRIIS, N. F. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk veterinaermedicin* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 337-339, 1975.

FRIIS, N. F.; AHRENS, P.; LARSEN, H. *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta veterinaria Scandinavica* [S.I.], v. 32, n. 4, p. 425-429, 1991.

GANGE, A. C.; LINDSAY, D. E.; ELLIS, L. S. Can arbuscular mycorrhizal fungi be used to control the undesirable grass *Poa annua* on golf courses? *Journal of Applied Ecology* [S.I.], v. 36, p. 909-919, 1999.

GARMENDIA, I.; GOICOECHEA, N.; AGUIRREOLEA, J. Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annum* L.) against verticillium wilt. *Biological Control* [S.I.], v. 31, n. 3, p. 296-305, 2004.

GE_HEALTHCARE. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. v. Handbook 80-6429-60AC, 2004.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; FACCIO, A.; BARKER, D. G.; BONFANTE, P. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* [S.I.], v. 20, n. 5, p. 1407-1420, May 2008.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; TIMMERS, T.; BONFANTE, P.; BARKER, D. G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* [S.I.], v. 17, n. 12, p. 3489-3499, 2005.

GERCHMAN, I.; LYSNYANSKY, I.; PERK, S.; LEVISOHN, S. In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 131, n. 3-4, p. 266-276, 2008.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 1871-1883, 1996.

GIRI, B.; KAPOOR, R.; MUKERJI, K. G. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology* [S.I.], v. 54, p. 753-760, 2007.

GIRODS, P.; DUFOUR, A.; FIERRO, V.; ROGAUME, Y.; ROGAUME, C.; ZOULALIAN, A.; CELZARD, A. Activated carbons prepared from wood particleboard wastes: Characterisation and phenol adsorption capacities. *Journal of Hazardous Materials* [S.I.], v. 166, n. 1, p. 491-501, 2009.

GOLE, V. C.; CHOUSALKAR, K. K.; ROBERTS, J. R. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma synoviae* in laying hens and possible effects on egg shell quality. *Preventive Veterinary Medicine* [S.I.], v. 106, n. 1, p. 75-78, 2012.

GÖRG, A.; DREWS, O.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* [S.I.], v. 30, n. SUPPL. 1, p. S122-S132, 2009.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* [S.I.], v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GRAB, D. J.; GIVENS, C.; KENNEDY, R. Fibronectin-binding activity in *Borrelia burgdorferi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [S.I.], v. 1407, n. 2, p. 135-145, 1998.

HAMMOND, P. P.; RAMÍREZ, A. S.; MORROW, C. J.; BRADBURY, J. M. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene vlhA and its value for strain typing. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 136, n. 1-2, p. 61-68, 2009.

HARRIER, L. A.; WATSON, C. A. The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science* [S.I.], v. 60, n. 2, p. 149-157, Feb 2004.

HARRISON, M. J. Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. *Journal of Experimental Botany* [S.I.], v. 50, p. 1013-1022, 1999a.

HARRISON, M. J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [S.I.], v. 50, p. 361-389, 1999b.

HENNINGSSEN, R.; GALE, B. L.; STRAUB, K. M.; DENAGEL, D. C. Application of zwitterionic detergents to the solubilization of integral membrane proteins for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* [S.I.], v. 2, n. 11, p. 1479-1488, Nov 2002.

HEREDIA, F. J.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HERNANZ, D.; GORDILLO, B.; MELENDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; GONZALEZ-MIRET, M. L. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-

fermentative cold maceration. *Food Chemistry* [S.I.], v. 118, n. 2, p. 377-383, 2010.

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* [S.I.], v. 68, n. 1, p. 139-146, 2007.

HOL, W. H. G.; COOK, R. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. *Basic and Applied Ecology* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 489-503, 2005.

INGHAM, R. E. Interactions between nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [S.I.], v. 24, n. 1–3, p. 169-182, 1988.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C. M. B.; SARAVANAN, R. S.; HE, Y.; CATALA, C.; SALADIE, M.; ROSE, J. K. C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols* [S.I.], v. 1, n. 2, p. 769-774, 2006.

IZQUIERDO, E.; HORVATOVICH, P.; MARCHIONI, E.; AOUDERWERNER, D.; SANZ, Y.; ENNAHAR, S. 2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers. *Electrophoresis* [S.I.], v. 30, n. 6, p. 949-956, 2009.

JAITI, F.; MEDDICH, A.; EL HADRAMI, I. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology* [S.I.], v. 71, n. 4–6, p. 166-173, 2007.

JORDAN, F. T. W. Avian mycoplasma and pathogenicity - A review. *Avian Pathology* [S.I.], v. 4, n. 3, p. 165-174, 1975.

JORES, J.; MEENS, J.; BUETTNER, F. F. R.; LINZ, B.; NAESSENS, J.; GERLACH, G. F. Analysis of the immunoproteome of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type reveals immunogenic homologues to other known virulence traits in related *Mycoplasma* species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [S.I.], v. 131, n. 3-4, p. 238-245, 2009.

JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes and Infection* [S.I.], v. 3, n. 10, p. 831-840, 2001.

KALLITHRAKA, S.; TSOUTSOURAS, E.; TZOUROU, E.; LANARIDIS, P. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry* [S.I.], v. 99, n. 4, p. 784-793, 2006.

KANG, M. S.; GAZDZINSKI, P.; KLEVEN, S. H. Virulence of recent isolates of *Mycoplasma synoviae* in turkeys. *Avian Diseases* [S.I.], v. 46, n. 1, p. 102-110, 2002.

KATALINIC, V.; MOZINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIC, I.; ABRAMOVIC, H.; MILOS, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry* [S.I.], v. 119, n. 2, p. 715-723, 2010.

KHIARI, A. B.; MARDASSI, B. B. A. Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant vlhA gene. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 156, n. 3-4, p. 322-329, 2012.

KOLODZIEJ, H. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo (R). *Phytomedicine* [S.I.], v. 14, p. 9-17, 2007.

KOSALEC, I.; GREGUREK, B.; KREMER, D.; ZOVKO, M.; SANKOVIC, K.; KARLOVIC, K. Croatian barberry (*Berberis croatica* Horvat): a new source of berberine-analysis and antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* [S.I.], v. 25, n. 1, p. 145-150, 2009.

KOVACIK, J.; KLEJDUS, B.; BACKOR, M. Phenolic metabolism of *Matricaria chamomilla* plants exposed to nickel. *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 166, n. 13, p. 1460-1464, 2009.

KUCKNOOR, A. S.; MUNDODI, V.; ALDERETE, J. F. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cellular Microbiology* [S.I.], v. 9, n. 11, p. 2586-2597, 2007.

LAMMERS, A.; NUIJTEN, P. J. M.; SMITH, H. E. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 180, n. 1, p. 103-109, 1999.

LAMONICA, J. M.; WAGNER, M.; ESCHENBRENNER, M.; WILLIAMS, L. E.; MILLER, T. L.; PATRA, G.; DELVECCHIO, V. G. Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 73, n. 6, p. 3646-3658, 2005.

LANGENFELD-HEYSER, R.; GAO, J.; DUCIC, T.; TACHD, P.; LU, C. F.; FRITZ, E.; GAFUR, A.; POLLE, A. *Paxillus involutus* mycorrhiza attenuate NaCl-stress responses in the salt-sensitive hybrid poplar *Populus (X) canescens*. *Mycorrhiza* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 121-131, 2007.

LATEF, A. A. H. A.; CHAOXING, H. Arbuscular mycorrhizal influence on growth, photosynthetic pigments, osmotic adjustment and oxidative stress in tomato plants subjected to low temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 1217-1225, 2011.

LECOMTE, J.; ST-ARNAUD, M.; HIJRI, M. Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* [S.I.], v. 317, n. 1, p. 43-51, 2011.

LEE, B. R.; MUNEEER, S.; AVICE, J. C.; JUNG, W. J.; KIM, T. H. Mycorrhizal colonisation and P-supplement effects on N uptake and N assimilation in perennial ryegrass under well-watered and drought-stressed conditions. *Mycorrhiza* [S.I.], p. 1-10, 2012.

LENDZEMO, V. W.; KUYPER, T. W. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on damage by *Striga hermonthica* on two contrasting cultivars of sorghum, *Sorghum bicolor*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 29-35, 2001.

LENDZEMO, V. W.; KUYPER, T. W.; KROPFF, M. J.; VAN AST, A. Field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi reduces *Striga hermonthica* performance on cereal crops and has the potential to

contribute to integrated *Striga* management. *Field Crops Research* [S.I.], v. 91, n. 1, p. 51-61, 2005.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Current Opinion in Plant Biology* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 621-630, 2006.

LEVISOHN, S.; DYKSTRA, M. J.; LIN, M. Y.; KLEVEN, S. H. Comparison of in vivo and in vitro methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection. *Avian Pathology* [S.I.], v. 15, p. 233-246, 1986.

LIU, L. Z.; GONG, Z. Q.; ZHANG, Y. L.; LI, P. J. Growth, cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* [S.I.], v. 21, n. 3, p. 319-327, 2011.

LOCKABY, S. B.; HOERR, F. J.; LAUERMAN, L. H.; KLEVEN, S. H. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler chickens. *Veterinary Pathology* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 178-190, 1998.

LONDON, L.; BESELER, C.; BOUCHARD, M. F.; BELLINGER, D. C.; COLOSIO, C.; GRANDJEAN, P.; HARARI, R.; KOOTBODIEN, T.; KROMHOUT, H.; LITTLE, F.; MEIJSTER, T.; MORETTO, A.; ROHLMAN, D. S.; STALLONES, L. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *NeuroToxicology* [S.I.], v. 33, n. 4, p. 887-896, 2012.

MACLENNAN, P. A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S. L. Mortality among triazine herbicide manufacturing workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* [S.I.], v. 66, n. 6, p. 501-517, Mar 2003.

MACLENNAN, P. A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S. L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V. W.; WU, X. C. Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* [S.I.], v. 44, n. 11, p. 1048-1058, Nov 2002.

MAES, D.; SEGALES, J.; MEYNS, T.; SIBILA, M.; PIETERS, M.; HAESEBROUCK, F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae*

infections in pigs. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 126, n. 4, p. 297-309, 2008.

MAES, D.; VERBEKE, W.; VICCA, J.; VERDONCK, M.; DE KRUIF, A. Benefit to cost of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds under Belgian market conditions from 1996 to 2000. *Livestock Production Science* [S.I.], v. 83, n. 1, p. 85-93, 2003.

MALDONADO, A. M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; JEAN-BAPTISTE, S.; HERNÁNDEZ, M.; JORRÍN-NOVO, J. V. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics* [S.I.], v. 71, n. 4, p. 461-472, 2008.

MALLOCH, D. W.; PIROZYNSKI, K. A.; RAVEN, P. H. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* [S.I.], v. 77, n. 4, p. 2113-2118, 1980.

MARIAPPAN, V.; VELLASAMY, K. M.; THIMMA, J. S.; HASHIM, O. H.; VADIVELU, J. Identification of immunogenic proteins from *Burkholderia cepacia* secretome using proteomic analysis. *Vaccine* [S.I.], v. 28, n. 5, p. 1318-1324, 2010.

MARMAGNE, A.; ROUE, M. A.; FERRO, M.; ROLLAND, N.; ALCON, C.; JOYARD, J.; GARIN, J.; BARBIER-BRYGOO, H.; EPHRITIKHINE, G. Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* [S.I.], v. 3, n. 7, p. 675-691, 2004.

MAROIS, C.; GOTTSCHALK, M.; MORVAN, H.; FABLET, C.; MADEC, F.; KOBISCH, M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 135, n. 3-4, p. 283-291, 2009.

MAROIS, C.; OUFOUR-GESBERT, F.; KEMPF, I. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 73, n. 4, p. 311-318, 2000.

MATA, A. P.; GUEDES, C. A. B.; BARRADAS, C. A. A.; CARVALHO, C. H. M.; DE ALMEIDA, C. R. G.; ARAÚJO, H. C.; FERRY, R. V.; BRANCO, T. C. V.; DA SILVA-FILHO, V. L. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola* [S.I.], v. 25, n. 8, p. 1-88, 2012.

MATTOW, J.; SCHAIBLE, U. E.; SCHMIDT, F.; HAGENS, K.; SIEJAK, F.; BRESTRICH, G.; HAESSELBARTH, G.; MÜLLER, E. C.; JUNGBLUT, P. R.; KAUFMANN, S. H. E. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* [S.I.], v. 24, n. 19-20, p. 3405-3420, 2003.

MAY, M.; BROWN, D. R. Diversifying and stabilizing selection of sialidase and N-acetylneuraminase catabolism in *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 191, n. 11, p. 3588-3593, 2009.

MAY, M.; KLEVEN, S. H.; BROWN, D. R. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* [S.I.], v. 51, n. 4, p. 829-833, 2007.

MCGOWIN, C. L.; SPAGNUOLO, R. A.; PYLES, R. B. *Mycoplasma genitalium* rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 78, n. 2, p. 726-736, 2010.

MENEGATTI, A. C. O.; TAVARES, C. P.; VERNAL, J.; KLEIN, C. S.; HUERGO, L.; TERENCEZI, H. First partial proteome of the poultry pathogen *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 145, n. 1-2, p. 134-141, 2010.

MEYNS, T.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A.; CALUS, D.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* [S.I.], v. 24, n. 49-50, p. 7081-7086, 2006.

MEYNS, T.; MAES, D.; DEWULF, J.; VICCA, J.; HAESEBROUCK, F.; KRUIF, A. D. Quantification of the spread of *Mycoplasma*

hyopneumoniae in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive Veterinary Medicine* [S.I.], v. 66, n. 1-4, p. 265-275, 2004.

MILIGI, L.; COSTANTINI, A. S.; VERALDI, A.; BENVENUTI, A.; VINEIS, P.; WILL. Cancer and pesticides: An overview and some results of the Italian Multicenter case-control study on hematolymphopoietic malignancies. In: Conference on Framing the Future in Light of the Past - Living in a Chemical World, Sep 18-21, Bologna, ITALY. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005. p.366-377. Disponível em:<<Go to ISI>://000241943500027>. Acesso em.

MITRA, S. K.; WALTERS, B. T.; CLOUSE, S. D.; GOSHE, M. B. An Efficient Organic Solvent Based Extraction Method for the Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Plasma Membranes. *Journal of Proteome Research* [S.I.], v. 8, n. 6, p. 2752-2767, 2009.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; SLADE, M. B.; RABILLOUD, T.; NOUWENS, A. S.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal of Biochemistry* [S.I.], v. 267, n. 10, p. 2871-2881, 2000.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; WALSH, B. J.; TYLER, M. I.; TRAINI, M.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* [S.I.], v. 19, n. 5, p. 837-844, 1998.

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* [S.I.], v. 77, n. 7, p. 1045-1050, 1987.

NABAIS, J. M. V.; GOMES, J. A.; SUHAS; CARROTT, P. J. M.; LAGINHAS, C.; ROMAN, S. Phenol removal onto novel activated carbons made from lignocellulosic precursors: Influence of surface properties. *Journal of Hazardous Materials* [S.I.], v. 167, n. 1-3, p. 904-910, 2009.

NAM, K. H.; KIM, S.-J.; PRIYADARSHI, A.; KIM, H. S.; HWANG, K. Y. The crystal structure of an HSL-homolog EstE5 complex with PMSF reveals a unique configuration that inhibits the nucleophile

Ser144 in catalytic triads. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 389, n. 2, p. 247-250, 2009.

NARAT, M.; BENČINA, D.; KLEVEN, S. H.; HABE, F. The hemagglutination-positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 66, n. 12, p. 6004-6009, 1998.

NASEEM, S.; MEENS, J.; JORES, J.; HELLER, M.; DÜBEL, S.; HUST, M.; GERLACH, G. F. Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 142, n. 3-4, p. 285-292, 2010.

NEGRI, A. S.; PRINSI, B.; SCIENZA, A.; MORGUTTI, S.; COCUCCI, M.; ESPEN, L. Analysis of grape berry cell wall proteome: A comparative evaluation of extraction methods. *Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 165, n. 13, p. 1379-1389, 2008.

NOORMOHAMMADI, A. H.; MARKHAM, P. F.; WHITHEAR, K. G.; WALKER, I. D.; GUREVICH, V. A.; LEY, D. H.; BROWNING, G. F. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase-variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 65, n. 7, p. 2542-2547, 1997.

O'FARRELL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

OBREQUE-SLIER, E.; PENA-NEIRA, A.; LOPEZ-SOLIS, R.; RAMIREZ-ESCUADERO, C.; ZAMORA-MARIN, F. Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology* [S.I.], v. 229, n. 6, p. 859-866, 2009.

OKAHASHI, N.; NAKATA, M.; SAKURAI, A.; TERAOKA, Y.; HOSHINO, T.; YAMAGUCHI, M.; ISODA, R.; SUMITOMO, T.; NAKANO, K.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [S.I.], v. 391, n. 2, p. 1192-1196, 2010.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology* [S.I.], v. 256, n. 3, p. 379-385, 2011.

PFEFFER, P. E.; DOUDS, D. D.; BECARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* [S.I.], v. 120, n. 2, p. 587-598, 1999.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* [S.I.], v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

PINTO, P. M.; CHEMALE, G.; DE CASTRO, L. A.; COSTA, A. P. M.; KICH, J. D.; VAINSTEIN, M. H.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 121, n. 1-2, p. 83-93, 2007.

PITMAN, A.; KRYSINSKA, K.; OSBORN, D.; KING, M. Suicide in young men. *The Lancet* [S.I.], v. 379, n. 9834, p. 2383-2392, 2012.

PUMPLIN, N.; HARRISON, M. J. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* [S.I.], v. 151, n. 2, p. 809-819, Oct 2009.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* [S.I.], v. 18, n. 3-4, p. 307-316, 1997.

RABILLOUD, T.; LUCHE, S.; SANTONI, V.; CHEVALLET, M. Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [S.I.], v. 355, p. 111-119, 2007.

RAJ, G. D.; LATHA, B.; CHANDRASEKHAR, M. S.; THIAGARAJAN, V. Production, characterization and application of monoclonal antibodies against chicken IgY. *Veterinarski Arhiv* [S.I.], v. 74, n. 3, p. 189-199, 2004.

RAMÍREZ, A. S.; NAYLOR, C. J.; HAMMOND, P. P.; BRADBURY, J. M. Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 118, n. 1-2, p. 76-82, 2006.

RAZIN, S.; GLASER, G.; AMIKAM, D. Molecular and biological features of mollicutes (mycoplasmas). *Annales de Microbiologie* [S.I.], v. 135 A, n. 1, p. 9-15, 1984.

REBOLLO-COUTO, M. S.; KLEIN, C. S.; VOSS-RECH, D.; TERENCEZI, H. Extracellular Proteins of *Mycoplasma synoviae*. *ISRN Veterinary Science* [S.I.], v. 2012, 2012.

REPETTO, O.; BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist* [S.I.], v. 157, n. 3, p. 555-567, 2003.

ROSENGARTEN, R.; WISE, K. S. Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. *Science* [S.I.], p. 315-318, 1990.

RUDGE, C. V. C.; SANDANGER, T.; RÖLLIN, H. B.; CALDERON, I. M. P.; VOLPATO, G.; SILVA, J. L. P.; DUARTE, G.; NETO, C. M.; SASS, N.; NAKAMURA, M. U.; ODLAND, J. Ø.; RUDGE, M. V. C. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of São Paulo State, Brazil. *Environment International* [S.I.], v. 40, n. 0, p. 162-169, 2012.

RUDIKOVSKAYA, E. G.; FEDOROVA, G. A.; DUDAREVA, L. V.; MAKAROVA, L. E.; RUDIKOVSKII, A. V. Effect of growth temperature on the composition of phenols in pea roots. *Russian Journal of Plant Physiology* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 712-715, 2008.

RUIZ-LOZANO, J. M.; ALGUACIL, M. D.; BARZANA, G.; VERNIERI, P.; AROCA, R. Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Molecular Biology* [S.I.], v. 70, n. 5, p. 565-579, 2009.

SANTONI, V.; KIEFFER, S.; DESCLAUX, D.; MASSON, F.; RABILLOUD, T. Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* [S.I.], v. 21, p. 3329-3344, 2000.

SANTONI, V.; RABILLOUD, T.; DOUMAS, P.; ROUQULE, D.; MANSION, M.; KIEFFER, S.; GARIN, J.; ROSSIGNOL, M. Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* [S.I.], v. 20, n. 4-5, p. 705-711, 1999.

SARMA, A. D.; OEHRLE, N. W.; EMERICH, D. W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* [S.I.], v. 379, n. 2, p. 192-195, 2008.

SATHIAKUMAR, N.; DELZELL, E. A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer. *Critical Reviews in Toxicology* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 599-612, 1997.

SATHIAKUMAR, N.; DELZELL, E.; COLE, P. Mortality among workers at two triazine herbicide manufacturing plants. *American Journal of Industrial Medicine* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 143-151, Feb 1996.

SCHLIEMANN, W.; AMMER, C.; STRACK, D. Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 112-146, 2008.

SCHREINER, S. A.; SOKOLI, A.; FELDER, K. M.; WITTENBRINK, M. M.; SCHWARZENBACH, S.; GUHL, B.; HOELZLE, K.; HOELZLE, L. E. The surface-localised α -enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein. *Veterinary Microbiology* [S.I.], v. 156, n. 1-2, p. 88-95, 2012.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* [S.I.], v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SENTÍES-CUÉ, G.; SHIVAPRASAD, H. L.; CHIN, R. P. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. *Avian Pathology* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 137-142, 2005.

SHINOHARA, Y.; TOYOHIRA, Y.; UENO, S.; LIU, M.; TSUTSUI, M.; YANAGIHARA, N. Effects of resveratrol, a grape polyphenol, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells. *Biochemical Pharmacology* [S.I.], v. 74, p. 1608-1618, 2007.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Journal* [S.I.], v. 181, n. 3, p. 221-231, 2009.

SILVA, L. B.; REIS, A. P.; PEREIRA, E. J. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* [S.I.], v. 155, n. 1, p. 12-19, 2010.

SMITH, F. W.; RAE, A. L.; HAWKESFORD, M. J. Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* [S.I.], v. 1465, n. 1-2, p. 236-245, 2000.

SMITH, S.; FACELLI, E.; POPE, S.; ANDREW SMITH, F. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* [S.I.], v. 326, n. 1, p. 3-20, 2010.

SMITH, S. E.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* [S.I.], v. 39, p. 221-244, 1988.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* [S.I.], v. 114, n. 1, p. 1-38, 1990.

SOLÍS-DOMÍNGUEZ, F. A.; VALENTÍN-VARGAS, A.; CHOROVER, J.; MAIER, R. M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Science of the Total Environment* [S.I.], v. 409, n. 6, p. 1009-1016, 2011.

TAVARES, C. P. *Análise Proteômica de Proteínas de Membrana de Mycoplasma hyopneumoniae e Mycoplasma synoviae*. (2010). 62 f. Dissertação de Mestrado (Título de Mestrado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

THACKER, E. L. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* [S.I.], v. 5, n. 2, p. 317-320, 2004.

TRACHTENBERG, S. Mollicutes. *Current Biology* [S.I.], v. 15, n. 13, p. R483-R484, 2005.

TROST, M.; WEHMHÖNER, D.; KÄRST, U.; DIETERICH, G.; WEHLAND, J.; JÄNSCH, L. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *PROTEOMICS* [S.I.], v. 5, n. 6, p. 1544-1557, 2005.

VALOT, B. *Etude des protéines membranaires de racines de Medicago truncatula colonisées par le champignon mycorrhizogène Glomus intraradices. Développement et application d'approches de protéomique sub-cellulaire*. (2005). 453 f. (Tese de Doutorado) - PME, INRA-CMSE, Université de Bourgogne, Dijon, France, 2005.

VASCONCELOS, A. T. R.; FERREIRA, H. B.; BIZARRO, C. V.; BONATTO, S. L.; CARVALHO, M. O.; PINTO, P. M.; ALMEIDA, D. F.; ALMEIDA, L. G. P.; ALMEIDA, R.; ALVES-FILHO, L.; ASSUNÇÃO, E. N.; AZEVEDO, V. A. C.; BOGO, M. R.; BRIGIDO, M. M.; BROCCHI, M.; BURITY, H. A.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, S. S.; CAREPO, M. S.; CARRARO, D. M.; DE MATTOS CASCARDO, J. C.; CASTRO, L. A.; CAVALCANTI, G.; CHEMALE,

G.; COLLEVATTI, R. G.; CUNHA, C. W.; DALLAGIOVANNA, B.; DAMBRÓS, B. P.; DELLAGOSTIN, O. A.; FALCÃO, C.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; FELIPE, M. S. S.; FIORENTIN, L.; FRANCO, G. R.; FREITAS, N. S. A.; FRÍAS, D.; GRANGEIRO, T. B.; GRISARD, E. C.; GUIMARÃES, C. T.; HUNGRIA, M.; JARDIM, S. N.; KRIEGER, M. A.; LAURINO, J. P.; LIMA, L. F. A.; LOPES, M. I.; LORETO, É. L. S.; MADEIRA, H. M. F.; MANFIO, G. P.; MARANHÃO, A. Q.; MARTINKOVICS, C. T.; MEDEIROS, S. R. B.; MOREIRA, M. A. M.; NEIVA, M.; RAMALHO-NETO, C. E.; NICOLÁS, M. F.; OLIVEIRA, S. C.; PAIXÃO, R. F. C.; PEDROSA, F. O.; PENA, S. D. J.; PEREIRA, M.; PEREIRA-FERRARI, L.; PIFFER, I.; PINTO, L. S.; POTRICH, D. P.; SALIM, A. C. M.; SANTOS, F. R.; SCHMITT, R.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHRANK, A.; SCHRANK, I. S.; SCHUCK, A. F.; SEUANEZ, H. N.; SILVA, D. W.; SILVA, R.; SILVA, S. C.; SOARES, C. M. A.; SOUZA, K. R. L.; SOUZA, R. C.; STAATS, C. C.; STEFFENS, M. B. R.; TEIXEIRA, S. M. R.; URMENYI, T. P.; VAINSTEIN, M. H.; ZUCCHERATO, L. W.; SIMPSON, A. J. G.; ZAHA, A. Swine and poultry pathogens: The complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology* [S.I.], v. 187, n. 16, p. 5568-5577, 2005.

VILLARREAL, I.; MEYNS, T.; DEWULF, J.; VRANCKX, K.; CALUS, D.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *The Veterinary Journal* [S.I.], v. In Press, Corrected Proof, 2010.

WANG, F. Y.; WANG, L.; SHI, Z. Y.; LI, Y. J.; SONG, Z. M. Effects of AM inoculation and organic amendment, alone or in combination, on growth, P nutrition, and heavy-metal uptake of tobacco in Pb-Cd-contaminated soil. *Journal of Plant Growth Regulation* [S.I.], p. 1-11, 2012.

WANG, W.; TAI, F. J.; CHEN, S. N. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of separation science* [S.I.], v. 31, n. 11, p. 2032-2039, Jun 2008.

WANG, Y. Y.; VESTBERG, M.; WALKER, C.; HURME, T.; ZHANG, X. P.; LINDSTROM, K. Diversity and infectivity of arbuscular

mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. *Mycorrhiza* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 59-68, Feb 2008.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Expression Proteomics. In: GMBH, W.-V. V. (Ed.). *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis*, 2002.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. *Proteomics in practice : a laboratory manual of proteome analysis*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERYSMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio-Technology* [S.I.], v. 14, n. 1, p. 61-65, Jan 1996.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 68, n. 7, p. 4238-4244, 2000.

WISNIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 359-U60, May 2009.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; HE, X. H.; LUO, P. Arbuscular mycorrhizal fungi can alter some root characters and physiological status in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings. *Plant Growth Regulation* [S.I.], v. 65, n. 2, p. 273-278, 2011.

WU, Y. P.; ZHOU, J. Y.; ZHANG, X.; ZHENG, X. J.; JIANG, X. T.; SHI, L. X.; YIN, W.; WANG, J. H. Optimized sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis of soluble proteins from chicken bursa of Fabricius. *Proteome Science* [S.I.], v. 7, 2009.

XOLALPA, W.; VALLECILLO, A. J.; LARA, M.; MENDOZA-HERNANDEZ, G.; COMINI, M.; SPALLEK, R.; SINGH, M.; ESPITIA, C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* [S.I.], v. 7, n. 18, p. 3332-3341, 2007.

XU, C. M.; ZHANG, Y. L.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chemistry* [S.I.], v. 119, n. 4, p. 1557-1565, 2010.

YATES, J. R. Mass spectral analysis in proteomics. *Annual Review of Biomedical Engineering* [S.I.], v. 33, p. 297-316, 2004.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering* [S.I.], v. 11, p. 49-79, 2009.

YAVLOVICH, A.; RECHNITZER, H.; ROTTEM, S. α -Enolase resides on the cell surface of *Mycoplasma fermentans* and binds plasminogen. *Infection and Immunity* [S.I.], v. 75, n. 12, p. 5716-5719, 2007.

ZHANG, J.; MA, H.; FENG, J.; ZENG, L.; WANG, Z.; CHEN, S. Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening. *Journal of Experimental Botany* [S.I.], v. 59, n. 11, p. 2979-2990, 2008.

ZHANG, J. M.; STEWART, R.; PHILLIPS, M.; SHI, Q. C.; PRINCE, M. Pesticide exposure and suicidal ideation in rural communities in Zhejiang province, China. *Bulletin of the World Health Organization* [S.I.], v. 87, n. 10, p. 745-753, Oct 2009.

ZHANG, L.; XIE, J.; WANG, X.; LIU, X.; TANG, X.; CAO, R.; HU, W.; NIE, S.; FAN, C.; LIANG, S. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction to enrich Hydrophobic membrane proteins. *PROTEOMICS* [S.I.], v. 5, n. 17, p. 4510-4524, 2005.

ZHANG, L. J.; WANG, X. E.; PENG, X.; WEI, Y. J.; CAO, R.; LIU, Z.; XIONG, J. X.; YIN, X. F.; PING, C.; LIANG, S. Proteomic analysis of low-abundant integral plasma membrane proteins based on gels. *Cellular and Molecular Life Sciences* [S.I.], v. 63, n. 15, p. 1790-1804, 2006.

ZHANG, L. J.; XIE, J. Y.; WANG, X.; LIU, X. H.; TANG, X. K.; CAO, R.; HU, W. J.; NIE, S.; FAN, C. M.; LIANG, S. P. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: Use of differential extraction

to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics* [S.I.], v. 5, n. 17, p. 4510-4524, Nov 2005.

**ANEXO A – Participação no curso tutorial entitulado
Bioinformática para análise de espectrometria de massa em
Genebra de 26 a 29 de janeiro de 2009.**



Manuel Rebollo

Geneva, January 30, 2009

CERTIFICATE

We hereby certify that

Manuel Rebollo

attended the tutorial entitled "Bioinformatics for mass spectrometry analysis" in Geneva, January 26-29, 2009, organized by the Swiss Institute of Bioinformatics, the Swiss Proteomics Society and the European Proteomics Association.

Patricia Palagi
Course organiser

ANEXO B – Curso teórico de espectrometria de massa com duração de 3 horas intitulado “Espectrometria de Massa e Abordagem Proteômica”

Christelle Guillier
Research Ingenier
« Plante Microbe Environnement »
INRA Dijon, France



I, Christelle Guillier, testify that I gave a 3 hours mass spectrometry theoretical course, entitled "Mass spectrometry and Proteomic Approach" to Manuel Rebollo during his training in France. This

Christelle Guillier

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. Guillier', is written over the printed name.

ANEXO C – Envio de Resumo a congresso ICOM 6 - International Conference on Mycorrhiza, de 9 a 14 de agosto de 2009, Belo Horizonte Brasil. Resumo intitulado: “Proteomics of Vitis root cuttings: a step forward to understanding molecular mechanisms involved in mycorrhizal symbiosis of a woody plant species”, de autoria de Guillier, Christelle e Rebollo, Manuel

ICOM 6 - International Conference on Mycorrhiza

In alleviating the metal toxicity, but AM effects were not related to increase in P uptake suggesting these factors act independently. We also show that application of formononetin stimulates colonization and reduces metal toxicity for corn. Ongoing researches are evaluating AM applications in land rehabilitation.

P3.23 - Beneficial effect of arbuscular mycorrhizal fungi and indigenous filamentous fungi on chromium accumulation by plants grown on tannery sludge

Sharma, S.(The Energy and Resources Institute (TERI), Uppal, H.5.(The Energy and Resources Institute (TERI), Achaleya, A.(The Energy and Resources Institute (TERI)

Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) are known to enhance the metal accumulation in plants. Some authors have also confirmed the existence of synergistic effects of filamentous fungi on the effectiveness of AMF in plant resistance to heavy metals in soils. Therefore, a study was undertaken to find out the response of indigenous AMF trap culture, *Glomus intraradices* and two indigenous filamentous fungi (*Aspergillus niger* and *A. flavus*) separately and in different combinations towards the growth and heavy metal accumulation by five different plants (Aloe vera, *Vetiver zizanioides*, *Strioph curvata*, *Melia azadirachta* and *Calbergia stans*) grown in Chromium (Cr) sludge. The analysis of results revealed that all the plant species showed variations towards metal accumulation. In *Vetiver*, *Jatropha* and *Melia*, filamentous fungi significantly enhance % root colonization through indigenous AMF and *G. intraradices*. Highest accumulation of Cr was found in the plants inoculated with indigenous AMF+A. *niger*, indigenous AMF and *G. intraradices*. Whereas *Vetiver* and *Aloe vera* inoculated with indigenous AMF +A. *niger* and indigenous AMF respectively showed higher accumulation of Cr than other plant species. The application of indigenous AMF – A. *niger* to *Vetiver* and Indigenous AMF to *Aloe vera* found to be most promising solution for phyto-bioremediation in Cr contaminated sites.

P3.24 - Effect of soil salinity on growth and P uptake by *T. alexandrinum* L.
Ghaineh, M.H.(Remin Agricultural and Nature Resources University)

In a pot experiment, different sources of soluble salt (NaCl, Na²SO₄, MgCl₂ and MgSO₄) at 3 levels of salinity were added to a sterilized soil to obtain soil electrical conductivity of 2.2, 5.0 and 10.3 dSm⁻¹. Six clover seedlings (*T. alexandrinum* L.) were transplanted into each pot and grown for 8 weeks. Treatments were 4 kinds of salts x 3 levels of salinity x 2 mycorrhiza (with and without *G. intraradices*). The results showed that increasing soil salinity by each above salts decreased shoot d.wt. of both mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) plants, although shoot d.wt. of M plant was greater than that of NM plant. A similar trend was observed for root growth and plant height. The detrimental effects of NaCl on plant growth were much higher than those of MgCl₂, Na₂SO₄ and MgSO₄ as salinity was increased. The detrimental effects of added salts on plant growth was as NaCl>MgCl₂>Na₂SO₄>MgSO₄. Results of this study, with respect to the specific effects of ions, show that clover plants as a sensitive plant to soil salinity considerably affected by sodium and chloride than by magnesium and sulphate. Increasing soil salinity decreased the percentage of root colonization. This led to a decline in P uptake. Decline in P uptake can be attributed to the reduction in root colonization due to the increase in soil salinity. In fact, the decline in root colonization with increasing soil salinity leads to a decline in surface area of interlace for nutrients transfer to the host plant.

P3.25 - Proteomics of *Vitis* root cuttings: a step forward to understanding molecular mechanisms involved in mycorrhizal symbiosis of a woody plant species

Guillier, C.(UMR INRA/CNRS /Université Bourgogne Plante-Microbe-Environnement, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, F),Rebollo, M.(Centro de Biologia Molecular Estrutural, Dept CCB Univ. Fed. de Santa Catarina, Florianópolis, SC-Br),Cangahuala-Inocente, G.

Grapevine vineyard surfaces are increasing every year in Brazil... Due to *Phylloxera* attacks, *Vitis vinifera* has to be grafted onto resistant rootstocks. The rootstock *V. berlandieri* x *V. riparia* is largely utilized, though it can be attacked by other pathogens. The implementation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for controlling root diseases is a promising approach. However, better knowledge of molecular mechanisms involved in symbiotic interactions in woody plants is required. In this context, we have applied canonical 2-DE-based proteomics on total proteins to SO4 root cuttings colonized or not by *Glomus mosseae* or *G. intraradices*. This has resulted in the largest "mycorrhizal proteome" so far identified in a woody plant species. Many plant proteins were commonly regulated in response to both fungi and a few proteins responded to one or the other.

No fungal proteins could be detected by datamining of available databases. However, about ten *G. intraradices* proteins were identified in the *Glomus* EST database. These proteins belong mainly to stress-induced protein families. We have also uncerntvestigations performed in the Brazilian Northeast, the diversity of AMF was low in the studied areas and further studies, including more collections should be performed to confirm the data.

ANEXO D – Participação em congresso SMAP (Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique) em Dijon de 14 a 17 de setembro de 2009

SMAP 2009
Spectrométrie de Masse
et Analyse Protéomique

DIJON

Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique 26^{èmes} Journées Françaises de la Spectrométrie de Masse



Le 14 septembre 2009 à DIJON,

Objet : Attestation de participation au Congrès **SMAP 2009**

Ce document atteste de la participation de

Monsieur REBOLLO COUTO MANUEL SEBASTIAN

au Congrès **SMAP 2009** organisé par la SFSEM et la SFEAP, qui s'est tenu du 14 au 17 septembre 2009 au Palais des Congrès de Dijon.

Au nom de l'équipe organisatrice

Patrick DUCOROY




Clipp
Plate-forme
Protéomique
l'innovation en recherche clinique

Clipp
1 rue du Professeur Molin, 21000 Dijon
Tel : 03 80 73 77 67 – Web : www.clipproteomic.fr

ANEXO E – Participação em semanários de grupo a cada três semanas durante todo o período do estágio no Instituto Nacional de la Recherche Agronomique – INRA – Dijon, França.



Centre de Microbiologie du Sol et de l'Environnement
UMR 1088 INRA 1000/ CNRS 3104/UB
 « Plante-Microbe-Environnement »

Dr. Eliane Dumas-Gaudot
 UMR PME INRA, 17 rue Sully, BP 86510
 21065 DIJON Cedex
 Tél : 03.80.69.31.26
 Fax : 03.80.69.37.53
 e-mail : dumas@diijon.inra.fr
<http://mtproteomics.com>
<http://www.costfa0603.eu/>
<http://diijon.inra.fr/pme>

A qui de droit,

En qualité de responsable du projet de collaboration CAPES/COFECUB N° 553/07, j'atteste par la présente lettre que Monsieur Rebello Manuel a effectué du 16 décembre 2008 au 18 décembre 2009 un séjour au sein de l'UMR PME 1088 afin d'effectuer ses recherches doctorales dans l'équipe travaillant sur les « Programmes cellulaires des interactions durables entre symbiotes mycorhiziens, et exploitations biotechnologiques ».

Au cours de ce séjour, outre les expériences qu'il a conduites dans le cadre de son programme de recherche sur l'enrichissement en protéines membranaires des racines de vigne, cet étudiant a suivi les séminaires scientifiques de l'UMR PME qui ont lieu toutes les 3 semaines environ sur la période de l'année universitaire ainsi que les réunions scientifiques de l'équipe mycorhizée au sein de laquelle s'inséraient ses travaux.

UMR INRA / CNRS / UB PME
 INRA
 17 rue Sully
 BP 86510
 21065 DIJON Cedex
 Tél. : 03 80 69 30 00
 Fax : 03 80 69 37 53

Fait à Dijon le 21 Décembre 2009

ANEXO F
Proteínas Extracelulares de *Mycoplasma synoviae*
Artigo aceito na revista
ISRN – Veterinarian Science

Revista: ISRN Veterinary Science
Vol: 2012
doi:10.5402/2012/802308
Submissão: 21 julho 2012
Aceite: 9 agosto 2012

Extracellular proteins of *Mycoplasma synoviae*

COUTO, Manuel Sebastián Rebollo ^a; KLEIN, Catia Silene ^b; VOSS-RECH, Daiane ^b; TERENZI, Hernán ^a

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Embrapa Swine and Poultry, Laboratory of Genetics and Animal Health Concórdia, SC, Brazil

Corresponding author at:

Centro de Biologia Molecular Estrutural, CEBIME UFSC, 88040-900 Florianópolis, SC,
Brazil. Tel.: +55 48 3721 6426; fax: +55 48 3721 9672.
E-mail address: manuel.rebollo@ifsc.edu.br (M.Rebollo).

Keywords: avian, pathogen, synovitis, secretome, MALDI-TOF.

Abstract

Mycoplasma synoviae is a Gram positive bacteria lacking of cell wall that affects chickens and turkeys causing infection in the upper respiratory tract and in some cases arthritis, with economical impact to broiler breeders. Treatment and prevention of avian synovitis depend on knowledge of the infectious process. Secreted or surface-exposed proteins play a critical role in disease because they often mediate interactions between host and pathogen. In the present work we sought to identify possible *M. synoviae* secreted proteins by cultivating the bacteria in a modified protein-free Frey medium. Using this approach we were able to detect in the cell-free fraction a number of proteins that have been shown in other organisms to be secreted, suggesting that may also be secreted by *M. synoviae*.

Introduction

The growth of poultry industry is often limited by infectious diseases that affect birds. *Mycoplasma synoviae* is a major avian extracellular pathogen associated with synovitis in chickens and turkeys [1-2]. Disease can occur as chronic subclinical to severe upper respiratory infection and, under unknown conditions, become systemic and cause arthritis [3]. The disease causes economic losses by retarding growth and downgrading at slaughter [3]. Strategies to control this pathogen rely mainly in better management practices, improvement in housing conditions and antibiotic usage, whereas an effective vaccine is still not available [4].

Secreted proteins of pathogenic bacteria are key factors in host colonization. The analysis of these proteins, called secretome, can therefore permit the identification of new putative virulence factors that are fundamental for host invasion and survival in the environment within the host [5]. In this context, two-dimensional electrophoresis (2DE) along with peptide fingerprinting by mass spectrometry (MS) and subsequent protein identification have become a powerful method to unravel pathogenicity factors in microorganisms [6-7].

We have recently reported a proteomic analysis of *M. synoviae* cell extracts in conventional Frey medium [8]. In the present work, we have grown *M. synoviae* in the same typical culture medium and then incubated the cells in a protein-free modified Frey medium as a strategy to indicate proteins that can be secreted to the medium by the bacteria.

Methods

2.1 Mycoplasma synoviae cultures

M. synoviae strain 53 isolated from a broiler breeder was grown in the Laboratory of Genetics and Animal Health from EMBRAPA Swine and Poultry (Concórdia, Santa Catarina, Brazil) as described by Frey and coworkers (1968). The cells were cultured in Frey broth [9] supplemented with 12% swine serum, 0.1 g/l nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), 0.1 g/l cysteine hydrochloride hydrate, 106 IU penicillin G and 0.25 g/l thalium acetate at 37 °C until the culture reached mid-log phase as indicated by color change and turbidity. Cells were pelleted by centrifugation and washed three times with 'protein-free' modified Frey broth (3 g/l glucose, 0.1 g/l NAD, 0.1 g/l cysteine hydrochloride hydrate, 106 IU penicillin G and 0.25 g/l thalium acetate) to reduce the level of contaminant proteins present in the growth medium.

Cells were cultured in this protein-free medium for 48 h and then centrifuged. Cell pellets were stored at -80 °C and supernatants at -20 °C. In order to assess the presence of contaminant proteins, equal volumes of protein-free Frey broth not exposed to *M. synoviae* cells were concentrated and analysed by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) as described below.

2.2 Medium concentration and protein extraction

Samples of 500 ml of protein-free Frey broth inoculated with *M. synoviae* were concentrated to 50 ml in a Quix Stand Benchtop concentrator through a GE Healthcare Xampler™ UFP-10-C-4X2MA membrane, 10,000 NMWC cut-off. Trichloroacetic acid (TCA) was added to a final concentration of 12 % and samples were allowed to precipitate for at least 1h on ice. Proteins were then pelleted by centrifugation at 16,000 x g for 20 min at 4 °C and pellets were washed three times with cold acetone (-20 °C). Samples were then air-dried and solubilized in rehydration solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% IPG buffer, pH 3-10, 18 mM dithiothreitol (DTT), and 0.002% bromophenol blue. Total protein concentration was determined using the 2-D Quant Kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

2.3 Two-dimensional electrophoresis

Samples in rehydration solution (250 µg of total proteins) were applied on 13 cm long GE Immobiline DryStrip Gels (Ge Healthcare, Uppsala, Sweden), pH 3-10, and kept overnight at room temperature prior to isoelectric focusing (IEF). IEF was performed using the Ettan IPGphor 3 system (Ge Healthcare, Uppsala, Sweden) with maximum temperature set to 20 °C with a total voltage of 17 kVh (500 V for 1 h, 500 V to 1000 V gradient in 1 h, 1000 V to 8000 V gradient in 2 hours 30 min, 8000 V for 30 min) and maximum current set at 25 µA/strip. After IEF, strips were equilibrated for 20 min in 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.8 containing 1% DTT and another 20 min in the same solution containing 4% iodoacetamide instead of DTT. Equilibration treatments were performed under gentle shaking at room temperature. Second dimension was run in homogeneous 12% acrylamide gels. The gels were then fixed in 8% phosphoric acid and 40% ethanol and stained with Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Hercules, UAA). The stained gels were scanned in a GE Healthcare ImageScanner III and images were analysed with the GE Healthcare ImageMaster 2D Platinum 7.2 software, having their molecular mass and isoelectric point calculated. Spots were excised manually and kept in 0.5% acetic acid.

2.4. In-gel digestion, mass spectrometry analysis and protein identification

Gel plugs were washed three times in 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile for destaining and dehydrated in 100% acetonitrile. Dry plugs were rehydrated with trypsin solution (10 µg/ml Promega Trypsin Gold Mass Spectrometry grade in 25 mM ammonium bicarbonate) and incubated for 12 to 16 h at 37 °C. Peptides were extracted from gel plugs by three successive washes with 50% acetonitrile, 5% trifluoroacetic acid (TFA) for 30min per wash and combined peptide extracts were dried in a vacuum concentrator (Eppendorf Vacuum Concentrator Plus). Peptides were resuspended in 0.1% TFA and mixed with equal volume of matrix solution (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 0,1% TFA in 1:1 acetonitrile/methanol), applied on the MALDI target plate and allowed to crystallize at room temperature. Mass spectra were obtained in a mass range of 400 to 4,300 Da using a laser (337 nm, 200 Hz) as the ionization source. Each spectrum was formed by accumulated data from at least 900 shots, using the Bruker Daltonics flexControl 3.3 program. The instrument (Autoflex III MALDI-TOF Bruker Daltonics) was used in reflectron positive mode

with an acceleration voltage of 19 kV. As external calibrant a Bruker Daltonics mix containing angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, ACTH Chip 1-17, ACTH Chip 18-39, and somatostatin 28, was used. Matrix and autolytic peaks of trypsin were used as internal calibration standards. Peptide lists were compared to the NCBI nr database, using MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>). Search parameters were set as follows: enzyme: trypsin; taxon: Mycoplasma; fixed modifications: cysteine carbamidomethylation; variable modifications: methionin oxidation; mass tolerance: 100 ppm; monoisotopic spectra; 1+ charged masses, and decoy enabled. MASCOT score was the main confidence factor for protein identification being also considered data of theoretical and obtained molecular weight and isoelectric point values, number of peptide matches and the percentage of the total translated ORF sequence coverage by the peptides.

Results and Discussion

After 48h of incubation in a protein-free Frey modified broth, protein extraction from cell pellets yielded the identification of 27 protein species, 8 of which were not detected previously from cell extracts of *Mycoplasma synoviae* cultivated in conventional Frey broth conditions[8]. These proteins are 6-phosphofructokinase, endopeptidase O, glucose-6-phosphate isomerase, leucyl aminopeptidase, phosphoenolpyruvate-protein phosphatase, serine/threonine protein kinase, transcription elongation factor GreA, and XAA-Pro aminopeptidase.

In the extracellular fraction we have identified 3 uncharacterized proteins and 16 different characterized proteins (Figure 1 and Table 1), eight of which were not present in the cell fraction (Table 2), where their presence may have been masked by the presence of more prominent protein species. These proteins are cell division protein, DNA polymerase III beta subunit, elongation factor G, fructose-bisphosphate aldolase, and hypothetical proteins MS53_0566, MS53_0115, and MS53_0598.

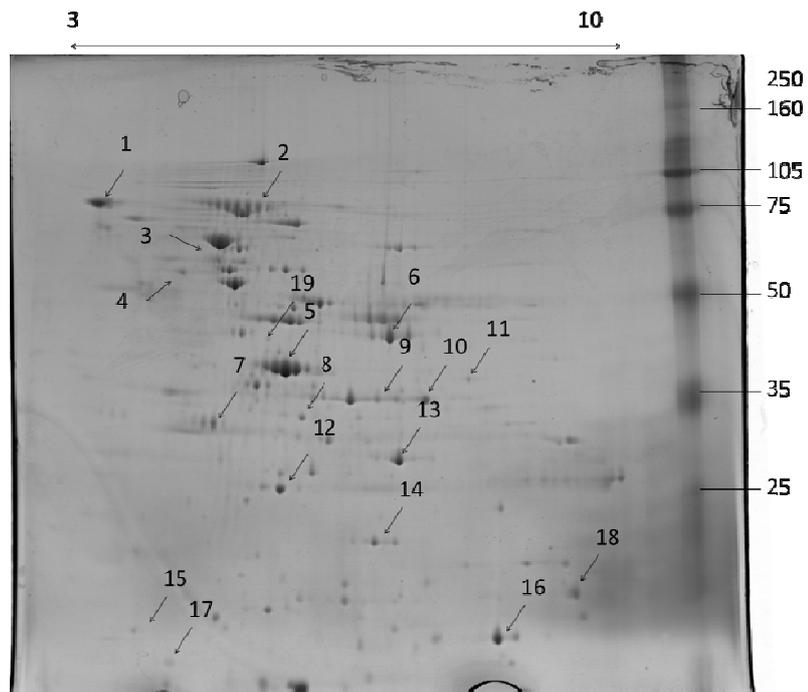


Figure 1. Two-dimensional gel electrophoresis profile of extracellular fraction of culture media incubated with *Mycoplasma synoviae*. Numbered arrows correspond to protein identities listed in table 2.

Table 1. Cellular proteins identified in *Mycoplasma synoviae*.

Identity	gi entry	MASCOT	Observed		Theoretical	
		Score	MW	pI	MW	pI
6-phosphofruktokinase	gi 144575058	96	33747	9.24	33891	8.67
Acetate kinase	gi 144575215	120	37945	7.61	44515	7.10
Acyl carrier protein phosphodiesterase	gi 71894112	96	13718	8.42	22687	7.74
Cell division protein	gi 71894355	106	70988	3.51	62539	4.38
Elongation factor EF-Ts	gi 71894429	91	31657	5.87	31938	5.72
Elongation factor Tu	gi 71894677	126	39239	5.50	43230	5.61
Endopeptidase O	gi 71894512	162	64809	7.21	42295	6.08
FOF1 ATP synthase subunit beta	gi 71894420	89	47222	6.01	50804	5.76
Glucose-6-phosphate isomerase	gi 71894495	65	44765	7.56	48990	6.99
Hypothetical protein MS53_0316	gi 71894332	68	73092	4.86	81668	5.48
Leucyl aminopeptidase	gi 71894176	151	47812	5.65	52277	5.83
Molecular chaperone DnaK	gi 71894366	115	54392	5.37	65096	5.17
Phosphoenolpyruvate-protein phosphatase	gi 71894534	103	58361	5.23	63753	5.19
Phosphopyruvate hydratase	gi 71894034	108	45607	7.20	63753	5.19
Phosphotransacetylase	gi 71894663	98	34133	6.46	35000	6.06
Putative lipoprotein	gi 144574996	124	92020	4.96	100677	5.13
Putative lipoprotein	gi 71894364	103	96688	5.71	112804	5.94
Putative lipoprotein	gi 71894528	66	81447	5.73	85199	5.72
Putative trigger factor	gi 71894613	126	55239	5.26	53932	5.31
Pyruvate dehydrogenase E1 component, beta subunit	gi 144575045	126	30000	7.41	35853	6.73
Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	gi 71894414	153	34317	6.10	39239	5.09

Table 1. Cellular proteins identified in *Mycoplasma synoviae* (continuation).

Identity	gi entry	MASCOT	Observed		Theoretical	
		Score	MW	pI	MW	pI
Serine/threonine protein kinase	gi 47459394	77	37945	6.15	37008	9.35
Single stranded binding protein	gi 71894544	155	15419	4.29	21239	4.50
Thiol peroxidase	gi 71894383	125	8897	5.45	18263	5.93
Thioredoxin reductase	gi 71894606	107	32559	6.32	27439	5.37
Transcription elongation factor GreA	gi 71894394	66	8597	4.69	17916	4.95
XAA-Pro aminopeptidase	gi 71894172	78	37710	6.73	40194	6.12

Table 2. Proteins present in the extracellular fraction of culture media incubated with *Mycoplasma synoviae*.

Identity		gi entry	MASCOT Score	Observed MW	pI	Theoretical MW	pI
1	Cell division protein	gi 144575078	97	77515	3.66	62539	4.38
2	Elongation factor G	gi 71894071	79	72218	5.25	77259	5.28
3	Molecular chaperone DnaK	gi 71894366	61	63596	3.51	65096	5.17
4	Cell division protein	gi 71894355	120	79326	3.49	62539	4.38
5	Elongation factor Tu	gi 71894677	111	37523	5.43	43230	5.61
6	Phosphopyruvate hydratase	gi 71894034	62	43611	6.01	49330	6.59
7	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	gi 71894414	127	34255	3.88	39239	5.09
8	Phosphotransacetylase	gi 71894663	169	34605	4.94	35000	6.06
9	Pyruvate dehydrogenase E1 component. alpha subunit	gi 71894294	68	36239	5.87	42131	6.20
10	Acetate kinase	gi 144575215	80	36194	6.10	44515	7.10
11	DNA polymerase III beta subunit	gi 71894027	104	38563	6.96	43399	7.62
12	Thioredoxin reductase	gi 144575189	110	31039	4.67	27439	5.37
13	Pyruvate dehydrogenase E1 component. beta subunit	gi 144575045	224	32423	6.12	35853	6.73
14	Fructose-bisphosphate aldolase	gi 71894369	76	26539	5.82	31237	6.27
15	Single stranded binding protein	gi 71894544	88	14149	3.00	21239	4.50
16	Acyl carrier protein phosphodiesterase	gi 71894112	94	13164	7.29	22687	7.74
17	Hypothetical protein MS53_0566	gi 144575177	90	10711	3.36	20869	4.96
18	Hypothetical protein MS 53_0115	gi 71894139	103	18926	8.23	21059	8.77

Table 2. Proteins present in the extracellular fraction of culture media incubated with *Mycoplasma synoviae* (continuation).

Identity		gi entry	MASCOT Score	Observed MW	pI	Theoretical MW	pI
19	Hypothetical protein MS 53_0598	gi 71894608	97	42120	4.67	44307	5.60

Acetate kinase and acyl carrier protein phosphodiesterase cause immunogenic responses in cattle infected by *M. mycoides* and *M. bovis*, respectively [10-11]. As these proteins are able to promote an immune response in their hosts, it seems that they may be secreted or surface-exposed during the infectious process.

Thioredoxin reductase was described as surface-exposed in *Trichomonas vaginalis*, and the authors suggest that they may change host mucus viscosity by modifying disulphide bonds [12].

Fructose-bisphosphate aldolase, which is surface-exposed in *Enterococcus faecalis* [13] is immunogenic to cattle infected with *M. mycoides* [10].

Both subunits alpha and beta of pyruvate dehydrogenase component E1 from bacilli and mycoplasmas show immunogenicity [10, 14-15], and the subunit alpha of this complex was shown to be surface-exposed in *M. genitalium* [14]. Moreover, both subunits alpha and beta have increased expression in *M. pulmonis* clones resistant to gentamicin and melittin [16].

Elongation factor G, which is secreted by *Paenibacillus larvae* [17] is produced by *Bacillus anthracis* and *B. thuringiensis* and are immunogenic to their hosts [15], as it happens in cattle infected by *M. bovis* [11] and *M. mycoides* [18], and chickens infected by *M. synoviae* [18].

EF-Tu has expression up-regulated in the highly adhesive strain *Lactobacillus plantarum* WHE92 [19], and was demonstrated as extracellular in *Mycobacterium tuberculosis*, with capacity to bind to human plasminogen [20]. It is also secreted by *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* with immunogenic effects [15, 21]. About 17% of total *M. pneumoniae* EF-Tu is associated to the membrane [22], being also demonstrated on the surface of *M. genitalium* and *M. pneumoniae* [14, 23]. It is immunogenic to mice infected with *M. genitalium* [14], to cattle infected with *M. mycoides* [10], to pigs infected with *M. hyopneumoniae* [24], and to chickens infected with *M. synoviae* [18].

As it happens to EF-Tu, the molecular chaperone DnaK shows up-regulation in the highly adhesive strain of *L. plantarum* WHE 92 [19]. It was also observed on the surface of *E. faecalis*, along with fructose-bisphosphate aldolase [13], and in *M. tuberculosis* it has been demonstrated as extracellular, immunogenic and capable to bind to human plasminogen [20, 25-26]. *B. anthracis* DnaK is secreted, immunogenic and seems to act as virulence factor [21]. These evidences suggest that the chaperone DnaK is secreted by a number of pathogens and may be important in the disease process by mediating adhesion to

host tissues. Pigs infected with *M. hyopneumoniae* [24], cattle with *M. mycoides* [10] and *M. bovis* [11], mice with *M. genitalium* [14], and chickens infected with *M. synoviae* [18] all rise antibodies against the molecular chaperone DnaK.

Finally, enolase is an enzyme widely described as secreted or surface-exposed in several microorganisms of the genera *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* [17, 27-30], showing immunogenic properties [15, 21, 29] and ability to bind to fibronectin [30-31]. Enolase is also shown to be a virulence factor in *P. larvae* [32] and is found on the surface of *L. crispatus* in a pH-dependent way, being released to the medium at pH close to its isoelectric point or more alkaline [28]. In Mycoplasmas it has been detected on the surface of *M. gallisepticum* and *M. fermentans*, in both cases able to bind to plasminogen [33-34]. In *M. suis* its role in cell adhesion was clearly demonstrated by inserting the gene in *Escherichia coli* that once transformed became able to bind to swine red blood cells [35].

4. Concluding Remarks

We conclude that by incubating *M. synoviae* cells in protein-free modified Frey medium we were able to produce clearly different gel profiles using protein extracts from the cellular and extracellular fractions, showing exclusive proteins for each fraction. In the extracellular fraction we have found proteins that are originally described as cytosolic but in more recent studies are shown in other pathogenic microorganisms to be either surface-exposed or secreted, immunogenic or able to bind host components as fibronectin or plasminogen, thus participating in the infectious process. These proteins are acetate kinase, elongation factor G, elongation factor Tu, acyl carrier protein phosphodiesterase, fructose bisphosphate aldolase, thioredoxin reductase, DnaK, both alpha and beta units of pyruvate dehydrogenase E1 component, and enolase. These evidences suggest that they may be secreted by *M. synoviae* and can thus be implicated in disease process.

Acknowledgements

This work was supported by grants from INBEB-CNPq, CAPES, FAPESC, MCTI, FINEP, and GENOPROT. We would also like to thank Dr Luciano Huergo for his great support to this work.

The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Kang, M.S., P. Gazdzinski, and S.H. Kleven, *Virulence of recent isolates of Mycoplasma synoviae in turkeys*. Avian Diseases, 2002. **46** (1): p. 102-110.
2. Lockaby, S.B., F.J. Hoerr, L.H. Lauerman, and S.H. Kleven, *Pathogenicity of Mycoplasma synoviae in Broiler chickens*. Veterinary Pathology, 1998. **35** (3): p. 178-190.
3. Dufour-Gesbert, F., A. Dheilily, C. Marois, and I. Kempf, *Epidemiological study on Mycoplasma synoviae infection in layers*. Veterinary Microbiology, 2006. **114** (1-2): p. 148-154.
4. Gerchman, I., I. Lysnyansky, S. Perk, and S. Levisohn, *In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae isolates from meat-type turkeys*. Veterinary Microbiology, 2008. **131** (3-4): p. 266-276.
5. Trost, M., D. Wehmhoner, U. Karst, G. Dieterich, J. Wehland, and L. Jansch, *Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species*. PROTEOMICS, 2005. **5** (6): p. 1544-1557.
6. Cordwell, S.J., A.S. Nouwens, and B.J. Walsh, *Comparative proteomics of bacterial pathogens*. PROTEOMICS, 2001. **1** (4): p. 461-472.
7. Jungblut, P.R., *Proteome analysis of bacterial pathogens*. Microbes and Infection, 2001. **3** (10): p. 831-840.
8. Menegatti, A.C.O., C.P. Tavares, J. Vernal, C.S. Klein, L. Huergo, and H. Terenzi, *First partial proteome of the poultry pathogen Mycoplasma synoviae*. Veterinary Microbiology, 2010. **145** (1-2): p. 134-141.
9. Frey, M.L., R.P. Hanson, and D.P. Anderson, *A medium for the isolation of avian mycoplasmas*. American Journal of Veterinary Research, 1968. **29** (11): p. 2163-2171.
10. Jores, J., J. Meens, F.F.R. Buettner, B. Linz, J. Naessens, and G.F. Gerlach, *Analysis of the immunoproteome of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony type reveals immunogenic homologues to other known virulence traits in related Mycoplasma species*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009. **131** (3-4): p. 238-245.
11. Naseem, S., J. Meens, J. Jores, M. Heller, S. Dubel, M. Hust, and G.F. Gerlach, *Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from*

- Mycoplasma mycoides subsp. mycoides small colony type*. Veterinary Microbiology, 2010. **142** (3-4): p. 285-292.
12. Kucknoor, A.S., V. Mundodi, and J.F. Alderete, *The proteins secreted by Trichomonas vaginalis and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65*. Cellular Microbiology, 2007. **9** (11): p. 2586-2597.
 13. Bøhle, L.A., T. Riaz, W. Egge-Jacobsen, M. Skaugen, Ø.L. Busk, V.G.H. Eijnsink, and G. Mathiesen, *Identification of surface proteins in Enterococcus faecalis V583*. BMC Genomics, 2011. **12** (135).
 14. McGowin, C.L., R.A. Spagnuolo, and R.B. Pyles, *Mycoplasma genitalium rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation*. Infection and Immunity, 2010. **78** (2): p. 726-736.
 15. DeIVecchio, V.G., J.P. Connolly, T.G. Alefantis, A. Walz, M.A. Quan, G. Patra, J.M. Ashton, J.T. Whittington, R.D. Chafin, X. Liang, P. Grewal, A.S. Khan, and C.V. Mujer, *Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72** (9): p. 6355-6363.
 16. Fehri, L.F., P. Sirand-Pugnet, G. Gourgues, G. Jan, H. Wróblewski, and A. Blanchard, *Resistance to antimicrobial peptides and stress response in Mycoplasma pulmonis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. **49** (10): p. 4154-4165.
 17. Antúnez, K., M. Anido, J.D. Evans, and P. Zunino, *Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, Paenibacillus larvae*. Veterinary Microbiology, 2010. **141** (3-4): p. 385-389.
 18. Berčič, R.L., B. Slavec, M. Lavrič, M. Narat, A. Bidovec, P. Dovč, and D. Benčina, *Identification of major immunogenic proteins of Mycoplasma synoviae isolates*. Veterinary Microbiology, 2008. **127** (1-2): p. 147-154.
 19. Izquierdo, E., P. Horvatovich, E. Marchioni, D. Aoude-Werner, Y. Sanz, and S. Ennahar, *2-DE and MS analysis of key proteins in the adhesion of Lactobacillus plantarum, a first step toward early selection of probiotics based on bacterial biomarkers*. Electrophoresis, 2009. **30** (6): p. 949-956.
 20. Xolalpa, W., A.J. Vallecillo, M. Lara, G. Mendoza-Hernandez, M. Comini, R. Spallek, M. Singh, and C. Espitia, *Identification*

- of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis*. PROTEOMICS, 2007. **7** (18): p. 3332-3341.
21. Chitlaru, T., O. Gat, H. Grosfeld, I. Inbar, Y. Gozlan, and A. Shafferman, *Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the Bacillus anthracis secretome*. Infection and Immunity, 2007. **75** (6): p. 2841-2852.
 22. Dallo, S.F., T.R. Kannan, M.W. Blaylock, and J.B. Baseman, *Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae*. Molecular Microbiology, 2002. **46** (4): p. 1041-1051.
 23. Balasubramanian, S., T.R. Kannan, and J.B. Baseman, *The surface-exposed carboxyl region of Mycoplasma pneumoniae elongation factor Tu interacts with fibronectin*. Infection and Immunity, 2008. **76** (7): p. 3116-3123.
 24. Pinto, P.M., G. Chemale, L.A. de Castro, A.P.M. Costa, J.D. Kich, M.H. Vainstein, A. Zaha, and H.B. Ferreira, *Proteomic survey of the pathogenic Mycoplasma hyopneumoniae strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins*. Veterinary Microbiology, 2007. **121** (1-2): p. 83-93.
 25. Mattow, J., U.E. Schaible, F. Schmidt, K. Hagens, F. Siejak, G. Brestrich, G. Haeselbarth, E.C. Müller, P.R. Jungblut, and S.H.E. Kaufmann, *Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen*. Electrophoresis, 2003. **24** (19-20): p. 3405-3420.
 26. Bartow, R.A. and D.N. McMurray, *Cellular and humoral immune responses to mycobacterial stress proteins in experimental pulmonary tuberculosis*. Tubercle and Lung Disease, 1997. **78** (3-4): p. 185-193.
 27. Lamonica, J.M., M. Wagner, M. Eschenbrenner, L.E. Williams, T.L. Miller, G. Patra, and V.G. DeVecchio, *Comparative secretome analyses of three Bacillus anthracis strains with variant plasmid contents*. Infection and Immunity, 2005. **73** (6): p. 3646-3658.
 28. Antikainen, J., V. Kupannen, K. Lähteenmäki, and T.K. Korhonen, *pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Lactobacillus*

- crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *Journal of Bacteriology*, 2007. **189** (12): p. 4539-4543.
29. Feng, Y., X. Pan, W. Sun, C. Wang, H. Zhang, X. Li, Y. Ma, Z. Shao, J. Ge, F. Zheng, G.F. Gao, and J. Tang, *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. **200** (10): p. 1583-1592.
30. Castaldo, C., V. Vastano, R.A. Siciliano, M. Candela, M. Vici, L. Muscariello, R. Marasco, and M. Sacco, *Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein*. *Microbial Cell Factories*, 2009. **8** (14).
31. Esgleas, M., Y. Li, M.A. Hancock, J. Harel, J.D. Dubreuil, and M. Gottschalk, *Isolation and characterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus suis*. *Microbiology*, 2008. **154** (9): p. 2668-2679.
32. Antúnez, K., M. Anido, D. Arredondo, J.D. Evans, and P. Zunino, *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology*, 2011. **147** (1-2): p. 83-89.
33. Chen, H., S. Yu, X. Shen, D. Chen, X. Qiu, C. Song, and C. Ding, *The Mycoplasma gallisepticum α -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen*. *Microbial Pathogenesis*, 2011. **51** (4): p. 285-290.
34. Yavlovich, A., H. Rechnitzer, and S. Rottem, *α -Enolase resides on the cell surface of Mycoplasma fermentans and binds plasminogen*. *Infection and Immunity*, 2007. **75** (12): p. 5716-5719.
35. Schreiner, S.A., A. Sokoli, K.M. Felder, M.M. Wittenbrink, S. Schwarzenbach, B. Guhl, K. Hoelzle, and L.E. Hoelzle, *The surface-localised α -enolase of Mycoplasma suis is an adhesion protein*. *Veterinary Microbiology*, 2012. **156** (1-2): p. 88-95.

ANEXO G
Estudos proteômicos de associações micorrízicas arbusculares

Revista: Advances in Biological Chemistry (ABC)

Vol: 2012

Submissão: 24 outubro 2012

Aceite: 9 novembro 2012

Proteomic studies of arbuscular mycorrhizal associations

COUTO, Manuel Sebastián Rebollo^a

LOVATO, Paulo Emilio^b

WIPF, Daniel^c

DUMAS-GAUDOT, Eliane^c

^a Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Engenharia Rural, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Rua Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

^c Institute National de la Recherche Agronomique INRA, UMR1347 INRA/Agrosup/Université de Bourgogne Agroécologie, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes - ERL 6300 CNRS, 17 Rue Sully, BP 86510, F-21065 Dijon Cedex, France 17 rue Sully, 21065 Dijon, France

Corresponding author at:

Centro de Biologia Molecular Estrutural, CEBIME UFSC, 88040-900 Florianópolis, SC,

Brazil. Tel.: +55 48 3721 6426; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: manuel.rebollo@ifsc.edu.br (M.Rebollo).

Keywords: Mycorrhiza, Symbiosis, Proteomics, 2DE, Mass Spectrometry

Abstract

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are soil-borne microorganisms forming mutualistic associations with the vast majority of land plants, including most agricultural relevant crops. In this association the plant provides the fungus with plant photosynthates allowing it to complete its life cycle, while the fungus provides the plant with mineral nutrients, mainly phosphorus and can also help the plant to tolerate biotic and abiotic stresses. In regard to these benefits there is growing interest on the use of AM fungi to improve productivity and sustainability in agricultural systems. AM fungi and their interactions with plants have been extensively studied using proteomic techniques, but some difficulties have been faced. 1) Little is known about the AM fungal typical protein repertoire because it is currently impossible to grow AM fungi in pure axenic cultures. 2) Plant tissues often contain high amounts of interfering substances that make protein extraction for the study of AM interactions a difficult procedure. 3) Most nutrient exchanges between AM fungi and their host plants involve participation of membrane proteins, still poorly resolved in most separation techniques. Finally, 4) the formation of the arbuscule is an asynchronous process, making it difficult to distinguish which proteins are essential in the early or late stages of AM associations. In this review we present a historical summary of how these difficulties have been overcome by technological advances in proteomics and we discuss current and future trends in the study of the proteins involved in AM interactions.

Introduction

Plants interact with a wide range of soil-borne microorganisms through their roots. Some of these microorganisms behave as pathogens, causing diseases to the plant, whilst others (mutualistic symbionts) are able to support plant development and benefit in return from plant photosynthates. Among these, research has highlighted rhizobial bacteria, that favor their host plants by fixing and providing forms of nitrogen that plants can assimilate, and mycorrhizal fungi, which provide plants with mineral nutrients taken up from the soil. These fungi can be functionally divided into two main categories, ecto- and endomycorrhizas. Ectomycorrhizal fungi infiltrate the root cortex without invading plant cells and elicit plant cells responses that make nutrient exchanges possible. Endomycorrhizal fungi are, in contrast, able to cross epidermal and cortical root cells through hyphopodia and intercellular hyphae before penetration into the inner cortical cells,

where they form highly branched hyphal transient structures called arbuscules. Arbuscules are assumed to be the sites where most nutrient exchanges between endomycorrhizal fungi and their host plants take place (Smith and Smith 1990). About 80% of vascular plants establish symbioses with AM fungi, forming ubiquitous interactions present in all terrestrial ecosystems, including natural and agricultural lands (Harrier and Watson 2004).

In natural or agricultural terrestrial ecosystems plant roots are exposed to a series of biotic and abiotic stress factors that can damage the plant and decrease survival, growth, and productivity. In AM associations, plants often benefit from increased tolerance to these stress factors. AM fungi are able to promote root growth and branching (Berta, Fusconi et al. 1993; Azcón-Aguilar and Barea 1997), while they develop an extraradical hyphal network that is connected to the roots and increases the depletion zone far beyond the rhizosphere (Smith and Gianinazzi-Pearson 1988). This surface increase enhances the efficiency of nutrient uptake, especially phosphorus, but also other macro- and micronutrients (Smith and Smith 1990; Smith, Rae et al. 2000), improving plant nutritional status, particularly in poor soils. In return, the fungus is supplied with organic forms of carbon derived from the host plant photosynthesis (Bago, Donaire et al. 1997; Pfeffer, Douds et al. 1999; Bago, Pfeffer et al. 2000; Bago, Pfeffer et al. 2002).

AM fungi improve plant resistance to pathogen attacks, and damages caused to the roots seem to be compensated by an increase in the depletion zone as mentioned above (Azcón-Aguilar and Barea 1996). Also, AM fungi grants protection against drought (Boomsma and Vyn 2008; Abbaspour, Saeidi-Sar et al. 2012), salt (Al-Karaki, McMichael et al. 2004; Giri, Kapoor et al. 2007; Langenfeld-Heyser, Gao et al. 2007; Ruiz-Lozano, Alguacil et al. 2009), and heavy metal stresses (Davies, Puryear et al. 2001; Christie, Li et al. 2004; Hildebrandt, Regvar et al. 2007). These benefits have drawn the attention of scientists for the use of AM fungi in environmental conservation actions and sustainable agriculture practices as an alternative to the use of pesticides and chemical fertilizers (Gange, Lindsay et al. 1999; Harrier and Watson 2004; Wang, Vestberg et al. 2008; Lecomte, St-Arnaud et al. 2011).

AM fungi belong to the exclusive phylum Glomeromycota (Schüßler, Schwarzott et al. 2001). They are obligate biotrophs and to date it has been impossible to obtain fungal structures like arbuscules in axenic cultures (Dassi, Samra et al. 1999; Dumas-Gaudot, Valot et al. 2004; Ferrol, Bago et al. 2004). As the association greatly interferes with plant physiology, especially in their roots, deep changes in protein expression

are expected to happen due to the association. A significant amount of work has been directed to molecular studies on different aspects of the AM symbiosis, ranging from applications to taxonomic and phylogenetic studies (Young 2012) to ecological effects of the associations. However, studies on physiological aspects need to uncover the different substances action at the post translational levels. Having that in mind, several studies of transcript and protein profile changes induced by AM associations have been performed. In this review we will discuss the methods employed to study the relations between AM fungi and their host plants by proteomic approaches. Our objective is to give an overview of the state of the art, pointing out advances and difficulties faced in the historical process.

First steps on AM symbiosis protein studies

The first protein studies of the AM symbiosis involved extractions from colonized roots in aqueous buffers and analyses by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), in search for changes in protein patterns caused by the establishment of the mycorrhizal association. For that purpose, plant tissues were homogenized in aqueous buffers our ground in liquid nitrogen before mixing with the extraction buffer at low temperature. As simple as this extraction method may be, it was shown to be fairly efficient for extracting readily soluble proteins from tissues that do not have high contents of non-proteinaceous interfering substances, like polysaccharides, lipids, or proteases. Such studies were initially performed on tobacco, onion, leek and pea plants (Dumas, Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Dumas-Gaudot, Grenier et al. 1992).

Very often plant tissue samples contain proteolytic enzymes that are released into the buffer solution during cell rupture. These enzymes can cause degradation of proteins of interest in the sample, causing bands of higher molecular weight to disappear from the electrophoresis pattern, while producing other bands corresponding to artifactual smaller polypeptides that are actually fragments of larger proteins (Görg, Weiss et al. 2004). Most of the proteolytic enzymatic activity is reduced or eliminated at low temperatures and with the use of high-pH extraction buffer (Hochstrasser, Harrington et al. 1988). However, most often the addition of one or more protease inhibitors to the lysis buffer is required. PMSF provides such protection against enzymatic proteolysis, as shown in a subsequent work with mycorrhizal tobacco roots (Dumas-Gaudot, Asselin et al. 1994). PMSF is an efficient inhibitor for serine proteases

broadly used in protein extraction procedures from plant tissues, in concentrations that generally range between 1 and 2M, although use of lower concentrations has been reported (Wu, Susnea et al. 2011).

Protein separation methods: improving resolution

Protein identification in earlier studies on AM interactions, based on Edman N-terminal sequencing, was very difficult because this method depends heavily on significant amount of purified proteins. This is particularly challenging in the case of the AM symbiosis since not all the root system of a plant is colonized in any given moment. Moreover, very often the N-terminal residue is blocked in plant proteins, hindering the identification by N-terminal Edman degradation. In this context, the first protein studies of AM interactions were limited to the use of electrophoresis-based methods to detect changes in root protein profiles induced by mycorrhization. Through this approach AM root protein profiles were first analyzed by native PAGE. Immunological assays were performed aiming to check if the differentially expressed proteins cross-reacted with antibodies raised against proteins induced by plant-root pathogen interactions, but the results were not conclusive (Dumas, Gianinazzi-Pearson et al. 1989). Later, leek, onion, and pea roots were also analyzed by native PAGE, but resolution was improved by coupling the native gels to denaturing SDS gels (SDS-PAGE), which resulted in two-dimensional native/SDS-PAGE gels (Dumas-Gaudot, Grenier et al. 1992). In the same study, differentially expressed proteins were shown to be associated to chitinase, chitosanase and beta-1,3-glucanase activities, enzymes previously reported as related to plant response to pathogen attack. Native/SDS-PAGE and enzymatic assays were also used in further studies with roots of mycorrhizal pea mutants, and in addition to constitutive isoforms of chitinase, there were also one chitinase isoform induced by the presence of *Glomus mosseae* in the roots (Dumas-Gaudot, Asselin et al. 1994). In tomato roots with proteins separated exclusively by native PAGE it was similarly possible to detect three constitutive chitinase isoforms and one isoform that were shown to be induced by *Glomus intraradices* colonization (Pozo, Azcón-Aguilar et al. 1999).

In order to improve electrophoresis resolution, protein extracts from mycorrhizal roots of red clover were fractionated by ion exchange chromatography before SDS-PAGE (Arines, Palma et al. 1993). Roots were ground in liquid nitrogen and the resulting powder was

homogenized in K-phosphate buffer, and polyvinylpyrrolidone (PVPP) and ascorbic acid were added to the lysis buffer to avoid interference caused by phenolic compounds and oxidizing agents present within the sample. Compounds that could interfere with chromatography were removed in an extra clean-up step by precipitating proteins with ammonium sulfate saturations, and salts were removed by dialysis from the precipitates. Proteins were then vacuum concentrated and ressolubilized (Arines, Palma et al. 1993). Chromatography was used for subsequent analysis of the fractions through two independent separation methods, isoelectric focusing (IEF) and SDS-PAGE. Pre-fractioning allows for the simplification of the sample, giving clearer electrophoresis patterns and revealing the presence of proteins that are expressed in lower numbers of copies that otherwise would be masked by the presence of more abundant proteins in the sample. In addition, simpler electrophoresis patterns make it easier to detect differentially displayed proteins. This allowed the detection of protein bands responsive to AM colonization which were not detected on crude extract electrophoresis separations (Arines, Palma et al. 1993). Differentially expressed proteins related to AM symbiosis were detected by both IEF and SDS-PAGE separations in this study, and in one of the AM-induced IEF bands superoxide dismutase activity was detected. These findings associated with previous observations of increased activity of chitinase, chitosanase and glucanase in mycorrhizal roots suggested that plant responses to AM colonization might involve the activation of defense mechanisms in at least one of the phases of the colonization process.

The procedure was repeated for studies on AM colonized pea roots (Arines, Quintela et al. 1994), and the non-ionic detergent Triton X-100 was added to the lysis buffer to improve protein solubilization. The solubilized sample was then chromatographed, fractions were vacuum concentrated, and proteins were solubilized either in Laemmli or IEF buffer. Similarly to what was observed in red clover, pea roots showed the presence of polypeptides that were induced by AM colonization, and these changes were detectable by IEF or SDS-PAGE separations after chromatography fractionation. No correlation could be established, however, between SOD activity induction and AM mycorrhization in pea roots (Arines, Quintela et al. 1994). Finally, a purification protocol based on sequential fractioning was designed for AM-colonized pea roots allowing to identify by N-terminal sequencing a mycorrhizal specific isoform of chitinase belonging to the chitinases Class I (Slezack, Negrel et al. 2001).

Cleaning proteins up by TCA/acetone precipitation

Coupling IEF to SDS-PAGE protein separation procedures results in what today is considered as the conventional two-dimensional electrophoresis (2DE) gels. Technical advances accomplished along the last decade improved the typical resolving power of a few hundred spots in one-dimensional SDS-PAGE to up to three thousand spots in a single gel (Maldonado, Echevarría-Zomeño et al. 2008). Due to this resolution power IEF/SDS-PAGE 2DE soon became the main technique used for protein separation in proteomic studies. On the other hand, this procedure is much more sensitive to interfering compounds in the samples than SDS-PAGE, and it requires protein extracts with much higher purity. An efficient and widely employed procedure to rid protein samples from interfering compounds prior to IEF is to perform protein precipitation by trichloroacetic acid (TCA) in acetone.

TCA in acetone is a very efficient precipitant and it also has high denaturing power, which immediately suppresses all proteolytic and other modifying enzyme activities that could cause artifactual changes in the sample proteins (Carpentier, Witters et al. 2005; Faurobert, Pelpoir et al. 2006). In addition, the method is relatively fast and simple, not involving handling of toxic compounds, though care should be taken when handling TCA because it is highly corrosive. The major drawback of TCA/acetone precipitation method is that several protein species may be lost along the process. Some proteins may not precipitate with addition of TCA/acetone and be lost when the supernatant is discarded, while others, once precipitated, may be difficult to resolubilize after the treatment (Görg, Weiss et al. 2004).

TCA/acetone precipitation was used to study proteins from the shoots of mycorrhized ferns cultivated in arsenic contaminated soil. Although ferns are naturally resistant to arsenic stress and are able to accumulate this element in their fronds, clear alleviation for arsenic stress was promoted by plant mycorrhization. 2DE analysis of shoot protein extracts showed an increase in polypeptides, identified by tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC-MS/MS) as glycolytic enzymes, which suggests that alleviation of arsenic stress is possibly related to a shift in glucose metabolism (Bona, Cattaneo et al. 2010). That shows that this separation technique could be useful for physiological studies, including the complex reactions to metal toxicity.

Phenol extraction of proteins

An alternative to TCA/acetone precipitation is the extraction based on solubilization of proteins in water- or in buffer-saturated phenol (Schuster and Davies 1983). In a comparative study, this method was shown to be efficient for microsomal protein extraction from plant tissues, yielding superior results when compared to direct extraction in the presence of chaotropes and detergents, including SDS, followed in this case by TCA/acetone clean-up (Hurkman and Tanaka 1986). This work was followed by others, comparing phenol extraction with different methods, including TCA/acetone precipitation, showing it as a robust technique for protein extraction from a wide range of plant organs, including highly recalcitrant tissues (Saravanan and Rose 2004; Carpentier, Witters et al. 2005; Jellouli, Salem et al. 2010).

From its first use for the extraction of total proteins of tobacco roots colonized by two *Glomus* species, phenol extraction procedure has been employed in most studies on mycorrhizal associations. Since complete databases available for protein identification were lacking, these studies were primarily based on pattern differences between colonized and non colonized roots (Simoneau, Louisy-Louis et al. 1994; Samra, Dumas-Gaudot et al. 1997; Dassi, Samra et al. 1999). Ensuing investigations combined phenol extraction of proteins with 2DE and mass-spectrometry analysis, which allowed the identification of several proteins related to AM symbiosis, as well as symbiotic responses to biotic and abiotic stresses. These studies demonstrated that similarly to ferns, AM association induces a shift in glucose metabolism in *Medicago truncatula*, besides induction of antioxidant defenses (Aloui, Recorbet et al. 2011). A similar work showed that AM colonization improved *M. truncatula* tolerance to arsenic possibly by stimulating expression of proteins that help detoxification and metabolisation of this metal (Bona, Marsano et al. 2011).

More recently, phenol extraction of proteins was shown to be very efficient also for recalcitrant tissues, such as grapevine roots (Cangahuala-Inocente, da Silva et al. 2011). In that work both *G. mosseae* and *G. irregulare* were shown to induce modifications in the display of 39 proteins, 25 of which were identified by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) spectrometry. These identifications showed that several proteins with decreased expression in mycorrhizal plants are involved in response to hypoxia, and downregulation of proteins involved in production of free radical

and antioxidant defenses was also observed (Cangahuala-Inocente, da Silva et al. 2011).

Interestingly, phenol extraction of proteins was shown to be also suitable for RNA extraction, which makes possible RNA- and protein extractions from the same sample. This feature opens the possibility for synchronized proteomic and transcriptomic studies (Dumas-Gaudot, Amieur et al. 2004; Dumas-Gaudot, Recorbet et al. 2009). By using this methodology it was possible to detect that cadmium-induced proteins in roots, were absent or less abundant in plants that were grown in presence of cadmium and *G. intraradices*-inoculated. These proteins were subjected to LC-MS/MS analysis and several were identified as proteins involved in free radical detoxification. These observations indicate that AM colonization in *M. truncatula* alleviates the stress caused by cadmium and that this effect can be detected by variations in protein expression levels. Analysis by Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) indicated direct correlation between transcript amounts of two genes and the accumulation of the correspondent proteins, which indicates that this regulation may happen at the transcription level (Aloui, Recorbet et al. 2009). Later, tandem mass spectrometry sequencing of proteins induced by inoculation of *M. truncatula* by either *G. mosseae* or *G. intraradices* allowed for the identification of eleven proteins of fungal origin into the root system, the first insight into fungal proteins involved in AM colonization (Recorbet, Valot et al. 2010).

No protein extraction method totally prevents protein losses; therefore each of them has their own drawbacks and/or advantages. For example, there is an increased number of proteins with high molecular masses in gels from phenol-extracted proteins, whereas TCA/acetone precipitation is more efficient for the extraction of proteins with molecular masses lower than 25 kDa (Görg, Weiss et al. 2004; Carpentier, Witters et al. 2005). In addition, phenol is able to selectively dissolve proteins and lipids (Xiong, Yang et al. 2011), allowing the separation of proteins from polysaccharides and nucleic acids, contributing to yield of highly clean protein extracts (Görg, Weiss et al. 2004; Carpentier, Witters et al. 2005). Therefore, although phenol extraction may lead to better quality of protein extractions in some situations, the two procedures should be considered as complementary rather than mutually exclusive methods (Jellouli, Salem et al. 2010).

Attempts have been made to combine the clean-up and extraction power of these two methods to obtain proteins from highly recalcitrant plant tissues. In a work on olive leaves, known for their high content in phenolic compounds, clear protein extracts were obtained from ground

olive leaves through successive protein washing steps in TCA/acetone, TCA/water, acetone 80% repeatedly prior to phenol extraction, and subsequent further washings in ammonium acetate/methanol, and again in acetone (Wang, Scali et al. 2003). This protocol was later optimized in order to save time, and it proved to be efficient for contaminant removal in a broad range of highly recalcitrant plant tissues, including woody plant parts, low-protein containing tissues or plant parts with high contents of acids, phenolic compounds, polysaccharides and lipids (Wang, Vignani et al. 2006). An independent comparative study also showed that the two combined methods could lead to better results than either phenol extraction or TCA/acetone precipitation alone (Saravanan and Rose 2004).

Subsequent proteomics investigations on the AM interactions have had considerable increase in the coverage of mycorrhizal-related proteins with the use of the above-depicted extraction methods and 2DE, as illustrated in table 1. This is due to the increasing amount of available DNA sequence information for plant species and filamentous fungi in databases, and also to improvements in mass spectrometry equipments (as reviewed by Yates, Ruse et al. 2009; Cox and Mann 2011). However it should be underlined that at that stage most of the identified proteins were cytosolic, with very little information about membrane proteins obtained by proteomic studies.

Membrane proteins and arbuscular mycorrhizal interactions

A significant part of basic research on the mycorrhizal association has focused the early events in the establishment of the symbiosis, since this would shed light not only on the functioning of this association, but also on other mutualistic and parasitic relationships involving plants and microbes. During the colonization process, fungal hyphopodia penetrate into the plant host root and gain access to the cortical tissue. Once they reach the inner cortical cells they are able to penetrate their cell walls and start branching within the plant cells to form the arbuscules. On its turn, the plant cell membrane does not disaggregate. Rather it invaginates, surrounding the arbuscule and forming the so-called periarbuscular membrane (Gianinazzi-Pearson 1996; Harrison 1998). The formation of this structure is associated with a 4- to 10 fold increase in the membrane surface (Bago, Donaire et al. 1997), and there is evidence of *de novo* synthesis of membrane components (Bonfante and Perotto 1995; Gianinazzi-Pearson 1996).

Most nutrient exchanges between AM fungi and their host plants are thought to happen through the periarbuscular membrane (Smith and Smith 1990; Javot, Penmetsa et al. 2007). This claim is supported by several publications that report and discuss specific proteins that seem to be induced by AM association, some of them present only in colonized cells and even only in the periarbuscular membrane. Among these proteins there are active transporters of protons (Gianinazzi-Pearson, Smith et al. 1991; Smith and Read 1997; Ramos, Martins et al. 2009), phosphate (Harrison, Dewbre et al. 2002; Javot, Penmetsa et al. 2007; Pumplin, Zhang et al. 2012), nitrogen (Guether, Neuhauser et al. 2009; Kobae, Tamura et al. 2010), and sugars (Harrison 1997; Smith and Read 1997; Boldt, Pörs et al. 2011; Helber, Wippel et al. 2011; Doidy, Grace et al. 2012). While nutrient transfers between plants and pathogens are generally seen as unidirectional or, at least, occurring with a negative balance for the plants, nutrient exchanges between host plants and AM fungi are proved to be bidirectional, and the symbiosis may not persist if mutual benefits are not established (Cameron, Johnson et al. 2008; Doidy, Grace et al. 2012). In this association the mechanisms involved in carbon and mineral nutrient transfers have not yet been fully clarified (Talbot and Treseder 2010; Boldt, Pörs et al. 2011; Guether, Volpe et al. 2011; Helber, Wippel et al. 2011; Doidy, Grace et al. 2012).

Surprisingly, few reports on membrane proteins based on proteomics are available for AM symbiosis. In the first of these studies microsomal proteins of tomato roots colonized by *G. mosseae* were analyzed and a number of spots were shown to be responsive to AM mycorrhization (Benabdellah, Azcón-Aguilar et al. 1998).

In a subsequent study plasma membranes of tomato roots colonized by *G. mosseae* were isolated from endomembranes partitioned in an aqueous polyethylene glycol (PEG)/dextran two phase system (Benabdellah, Azcon-Aguilar et al. 2000). This allowed detection of up to 200 reproducible spots of plasma membrane proteins resolved by 2DE, 16 of them showing differential expression related to the presence of mycorrhizal fungi. Due to the lack of a detailed database and to the identification method used, based on Edman N-terminal sequencing, only one of these proteins was identified as an AM down regulated vacuolar H⁺-ATPase.

Medicago truncatula has been adopted as a model species for microbe-plant mutualism, and it already had more than 190,000 expression sequence tags available at 2004 (Colditz, Nyamsuren et al. 2004). The methods of phenol extraction, TCA/acetone precipitation and methanol/chloroform fractioning were compared for this plant species

(Valot, Gianinazzi et al. 2004), and phenol extraction was shown to be the most efficient method for the extraction of soluble proteins for 2DE. However, the same result was not obtained for microsome-associated proteins, because high definition IEF applied to hydrophobic proteins is still not feasible. Fractioning the microsomal protein suspension in methanol/chloroform made it possible to eliminate the most hydrophobic microsomal proteins, and improved IEF resolution was obtained with mildly hydrophobic proteins. It was also observed that sample cup-loading near the anode end of the immobilized pH gradient (IPG) strip enhanced IEF resolution and was therefore more accurate than passive or active IPG strip rehydration in the presence of sample proteins (Dumas-Gaudot, unpublished results). In a subsequent work, microsomal proteins of *G. mosseae* colonized roots of *M. truncatula* were analyzed using an optimized protocol based on these observations. Soluble proteins were phenol-extracted and separated by 2DE, while microsome proteins were fractionated in a methanol/chloroform two-phase system, and the mildly hydrophobic proteins were separated by 2DE whilst the strictly hydrophobic ones were separated by SDS-PAGE. Using this method, 25 microsome associated proteins, out of 36 differentially displayed spots were identified, and seven proteins were shown to be down-accumulated either upon mycorrhization or phosphate fertilization of non-inoculated plants, reinforcing the statement that AM symbiosis strongly contributes to phosphate acquisition by the plant (Valot, Dieu et al. 2005).

Apart from the aqueous two-phase system PEG/dextran system mentioned above, plasma membrane proteins can also be isolated from other endomembranes present in the microsomal fraction by ultracentrifugation in a sucrose gradient. This procedure was used successfully for the study of membrane proteins of *M. truncatula* root cells that responded to *G. intraradices* colonization (Valot, Negroni et al. 2006). Membrane proteins were then analyzed by SDS-PAGE or 2DE and then further fractionation was achieved by one- or two-dimensional liquid chromatography prior to MS/MS analysis. The combination of these techniques led to the identification of 78 proteins, most of which previously described as membrane-associated proteins, including a proton efflux ATPase and a copper-binding protein (Valot, Negroni et al. 2006). Off-gel isoelectric focusing combined with isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and coupled to LC-MS/MS is a promising field for the study of membrane proteins involved in AM interactions (Abdallah, Sergeant et al. 2012).

Recent achievements

Proteomic studies have contributed to relevant advances in the understanding of biochemical mechanisms fundamental for the establishment and maintenance of the symbiotic process between plants and AM fungi. Most of these mechanisms have been shown to be related to defense, signaling and energetic metabolism. Yet, these findings lead to new questions. Which fungal proteins accumulate *in planta* during AM symbiosis? What are the differences between plant responses that promote AM symbiosis and those that avoid pathogen infection? What proteins participate specifically in each stage of the association process, from the mutual recognition by plant and fungus prior to physical contact, up to the establishment of completely functional arbuscules?

In more recent studies on AM interactions, new approaches are being used to address these questions. One of these strategies is to direct proteomic analyses towards isolated fractions of the symbiotic associations. As it is not yet possible to grow AM fungi in axenic cultures, it is not easy to isolate hyphae from plant roots for studying fungal proteins. To circumvent this problem, a culture system with two interconnected compartments is created (Bécard and Fortin 1988). In this system, while growth of genetically modified carrot roots is restricted to a compartment, the fungal hyphae can spread from the roots to a root free compartment, allowing the isolation of extra radical hyphae, and fungal spores. Using this bi-compartmental *in vitro* system it was possible to settle a reference 2D map for *G. intraradices* proteins (Dumas-Gaudot, Valot et al. 2004), and then, in a deeper study based on shotgun proteomics (GeLC-MS/MS) several fungal proteins were identified (Recorbet, Rogniaux et al. 2009). It is also possible to study internal compartments within the cell, such as nuclei, mitochondria and chloroplasts, as exemplified by several studies, but to date only one proteomic study has been performed on *M. truncatula* root plastids, in which 266 proteins have been identified by GeLC-MS/MS (Daher, Recorbet et al. 2010). The comparison within root plastid proteins between non-inoculated and mycorrhizal roots, which demands the use of a robust MS/MS-based quantification method, is ongoing. (Daher et al., personal communication). It should be underlined that subproteomics (proteomics of cell fractions) allow simplification of protein mixtures, in addition to yield direct information about the location of the identified proteins.

Early proteomic studies on AM interactions, made it clear that the proteins responsive to AM symbiosis at the early stages of the

colonization are not quite the same induced in the late stages, when the symbiosis is established and functional (Dumas-Gaudot, Asselin et al. 1994; Dumas-Gaudot, Guillaume et al. 1994; Simoneau, Louisy-Louis et al. 1994; Samra, Dumas-Gaudot et al. 1997; Bestel-Corre, Dumas-Gaudot et al. 2002). Nevertheless, it is difficult to distinguish responses for the very early stages of AM symbioses from the ones happening at the late stages, since AM colonization is an asynchronous process. After the first arbuscule is formed, new penetration events are promoted by extra-radical hyphae at the root surface, and arbuscules are continuously formed, so that all stages of arbuscule formation can be found in a single root system. Some studies have focused on the period between the inoculation moment and formation of the first arbuscules, within the first 5 to 7 days after inoculation. These studies showed that physiological responses of plant cells are detectable at protein level even before there is contact between root and fungus. By comparing three *M. truncatula* mutants, a wild type, a mycorrhizal-defective one, and a hyper-mycorrhizal one, it has been shown that plant responses previous to hyphal contact involve defense mechanisms, cell signaling, and cytoskeleton rearrangements (Amiour, Recorbet et al. 2006; Dumas-Gaudot, Recorbet et al. 2009). Later, through the use of 2D-Differential Gel Electrophoresis (2D-DIGE) it was possible to detect the first changes in proteins within the first 6 to 12 hours after inoculation of *M. truncatula* with *G. intraradices*. This response involved defense mechanisms such as free radical production and antioxidant defenses, much alike what is observed when plants are inoculated with rhizobial bacteria or challenged with fungal pathogens, such defense responses seemingly decreasing with time, thus allowing the establishment of the AM symbiosis (Schenkluhn, Hohnjec et al. 2010).

With the use of confocal microscopy techniques it was possible to understand the major cytoplasmic events that follow the contact between the hyphopodia and the roots. It was observed that root epidermal cells undergo profound changes in their architecture that involve nucleus repositioning, endoplasmic reticulum reorganization, and rearrangement of cytoskeleton elements. This rearrangement forms an internal tube called the pre-penetration apparatus that allows the entrance of the appressorium into the epidermal cell and conduces the hyphae across the cell to gain access to the outer cortical root cells (Genre, Chabaud et al. 2005). These will behave the same manner conducting in turn the hyphopodium to the inner cortical cells where it will eventually penetrate and branch to form the arbuscule (Genre, Chabaud et al. 2008). Thanks to the development of more sensitive and efficient MS

equipment, together with the completion of *M. truncatula* genome sequencing and the use of plant mutants arrested at specific stages of the AM symbiosis, we might hope that proteins specifically involved in such peculiar events will be soon identified.

Recently, in order to analyze specific proteomic changes in arbuscule-containing cells of *G. intraradices*-colonized *M. truncatula* roots, another powerful technique has emerged that combined laser capture microdissection (LCM) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Gaude, Schulze et al. 2012), allowing the identification of proteins with specific or increased expression in arbuscule-containing cells. Consistently with previous transcriptome data, the proteome of arbuscule-containing cells showed an increased number of proteins involved in lipid metabolism, most likely related to the synthesis of the periarbuscular membrane. In addition, transcriptome data of non-colonized cells of mycorrhizal roots suggest mobilization of carbon resources and their symplastic transport toward arbuscule-containing cells for the synthesis of periarbuscular membranes. This highlights the periarbuscular membrane as important carbon sink in the mycorrhizal symbiosis. The same approach is being used, in which more than 230 proteins have been identified in arbusculated cells (Dumas-Gaudot et al., unpublished data), and its combination with quantitative proteomics will provide new insights in the functioning of the AM symbiosis.

Table 1: List of proteomic studies carried out up to now for studying arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Fraction	Organisms Plant/AM fungus	Type of analysis	Total of resolved proteins per gel	Observed protein modifications	Protein identifications	Reference
Total root proteome	<i>Mt J5 /Gm</i> <i>Mt J5/Sm</i>	2DE, MALDI- TOF, 2DE, ESI-Q-TOF	500	55: <i>Gm</i> 51: <i>Sm</i>	MALDI-TOF 1: <i>Sm</i> ESI-Q-TOF 4: constitutive 8: <i>Gm</i> 7: <i>Sm</i> 2 <i>Gm</i>	(Bestel-Corre, Dumas-Gaudot et al. 2002)
Total root proteome	<i>Mt J5 /Gm</i> <i>Mt J5/Sm</i>	2DE, MALDI- TOF, 2DE, ESI-Q-TOF		34: <i>Gm</i> 41: <i>Sm</i>		(Bestel-Corre, Gianinazzi et al. 2004)
Total root proteome	<i>Mt A17/Ae</i> <i>Mt Sus/Ae</i> <i>Mt Res/Ae</i> <i>Mt A17/Gi</i>	2DE, MALDI- TOF	500-700	<i>Mt res/Ae</i> : 6 <i>Mt SUS/Ae</i> : 8 <i>Mt A17/Gi</i> : 7	<i>Mt A17/Gi</i> : 7	(Colditz, Braun et al. 2005)
Total root proteome (early stages)	<i>Mt J5 /Gi</i> <i>Mt sunn /Gi</i> <i>Mt d mi3 /Gi</i>	2DE, MALDI- TOF		8 9 8	13	(Amiour, Recorbet et al. 2006)

Table 1: List of proteomic studies carried out up to now for studying arbuscular mycorrhizal symbiosis (continuation).

Fraction	Organisms Plant/AM fungus	Type of analysis	Total of resolved proteins per gel	Observed protein modifications	Protein identifications	Reference
Total root proteome (early stages)	<i>M. truncatula</i> J5 /Gm	2DE, MALDI- TOF		19	10	(Dumas- Gaudot, Recorbet et al. 2009)
Total root proteome	<i>Mt J5 /Gi</i> <i>Mt J5 /Gi</i> + cádmio	2DE, LC- MS/MS	600+	30	26 <i>Gi</i>	(Aloui, Recorbet et al. 2009)
Total root proteome	<i>Mt J5 /Gi</i> <i>Mt J5 / Gm</i>	2-DE-LC- MS/MS	20170	99	21 fungal proteins 11 plant proteins	(Recorbet, Valot et al. 2010)
Total root proteome	<i>Mt J A17/Gi</i>	2D-DIGE, MALDI- TOF	1000	87	21	(Schenkluhn, Hohnjec et al. 2010)
Total root proteome	<i>Vt/Gi</i> <i>Vt /Gm</i>	2DE, MALDI- TOF	600	52	39	(Cangahuala- Inocente, da Silva et al. 2011)

Table 1: List of proteomic studies carried out up to now for studying arbuscular mycorrhizal symbiosis (continuation).

Fraction	Organisms Plant/AM fungus	Type of analysis	Total of resolved proteins per gel	Observed protein modifications	Protein identifications	Reference
Total root proteome	<i>Pv</i> / <i>Gm</i> + arsenic	2DE, LC- MS/MS	470	37	21	(Bona, Cattaneo et al. 2010)
Total root proteome	<i>Os</i> cv Senia / <i>Gi</i>	2DE, MALDI- TOF-TOF		WT/ <i>Gi</i> : 91 PRms : 39 PRms/ <i>Gi</i> : 19	53 39 19	(Campos- Soriano, García-Garrido et al. 2010)
Total shoot proteome	<i>Mt</i> J5/ <i>Gi</i> <i>Mt</i> J5/ <i>Gi</i> + cadmium <i>Mt</i> J5/ cadmium	2DE, LC- MALDI- TOF	500	23	21: <i>Gi</i> 8: Cadmium	(Aloui, Recorbet et al. 2011)
Total shoot proteome	<i>Pv</i> / <i>Gm</i> <i>Pv</i> / <i>Gim</i> <i>Pv</i> / <i>Gim</i> + arsenic	2DE, LC- MS/MS	240	Arsenic: 88 Mycorrhiza: 174	112	(Bona, Cattaneo et al. 2010)
Subcellular proteomes						

Table 1: List of proteomic studies carried out up to now for studying arbuscular mycorrhizal symbiosis (continuation).

Fraction	Organisms Plant/AM fungus	Type of analysis	Total of resolved proteins per gel	Observed protein modifications	Protein identifications	Reference
Microsomal proteins	<i>Mt J5/Gi</i>	1D, LC- MS/MS 2D, LC- MS/MS	440	40	36	(Valot, Dieu et al. 2005)
Fraction enriched with PM proteins	<i>Mt J5/Gi</i>	1D, LC- MS/MS 2D, LC- MS/MS		2	2	(Valot, Negroni et al. 2006)
Cell specific proteome				Total of identified proteins	AM induced proteins	
Arbuscule containing-cells	<i>Mt/Gi</i>	LCM-LC- MS/MS		<i>Mt</i> : 401 <i>Gi</i> : 99	188	(Gaude, Schulze et al. 2012)

Sm: *Sinorhizobium meliloti*

Ae: *Aphanomyces euteiches*

Sus: Susceptível a *Aphanomyces euteiches*

Res: Resistente a *Aphanomyces euteiches*

Mt: *Medicago truncatula*

Vt: Vitis, Porta exertos SO4

Pv: Pteris vittata

Os: Oriza sativa japonica

Gim: Gigaspora margarita

PRms: *Oryzae sativa ssp japonica* overexpressing the gene PRms (pathogenesis related maize gene)

MS: Mass spectrometry,

2-DE: two-dimensional gel electrophoresis,

ESI-Q-TOF: electrospray ionisation quadrupole time-of-flight,

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight,

MS/MS: tandem MS,

PM: plasma membrane,

LCM: Laser capture microdissection

Conclusions and Perspectives

Proteomics interfaces with and complements genomics to provide information on quantitative protein expression in any biological system. In the particular field of plant–microorganism interactions (including the mycorrhizal symbioses), its potential is still far from being fully explored. To obtain mycorrhiza-related protein identification at a higher throughput, attempts to define more precisely both the mycorrhizal stage under study and the particular cell compartment should be continued. In this respect, recent comparative sub-cellular proteomics directed towards microsomes coupled with label-free quantitative mass spectrometry by LC-MS/MS (Abdallah et al. 2012 submitted) and plasmalemma (Aloui et al. in preparation) have proven their usefulness to identify proteins previously not reported as being expressed in AM symbiosis, together with providing information of their accumulation patterns. These two recent investigations allow for example to establish a core microsomal and a core plasmalemma of *M. truncatula* root proteome, of respectively 882 and 650 putative membrane proteins. In these two recent studies, improved membrane protein extraction protocols and advanced techniques for their fractionation, identification and quantification have been employed to detect low abundant and membrane proteins, greatly helping to expand the depth and breadth of membrane proteome changes and its fundamental role in the complex network of the AM interaction.

Comparative proteomics of several other cell compartments such as, for example, the cell wall (for improving our understanding of the recognition events accompanying the first stage of mycorrhizal infection), or the mitochondrion and/or vacuolar compartments (for decrypting parts of the regulation events during the mycorrhizal process), need to be investigated.

New insights into the complex cellular process accompanying the mycorrhizal symbiosis may also be expected from the use of more sophisticated proteomic strategies, together with the exponential increase of data in general database. So clearly, more refined proteomic tools that have emerged could be applied to the study of symbioses. Fluorescence-based DIGE allows the differential analysis of two samples concomitantly run within the same gel, circumventing reproducibility problems and image analysis (Ünlü, Morgan et al. 1997). Likewise, AM fungal proteomics will certainly soon benefit from the full genome sequencing of *Rhizophagus irregularis* formerly known as

G. intraradices (Tisserant, Kohler et al. 2012), opening avenues for new advances in the research of mutualistic symbioses.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES-COFECUB.
The authors have declared no conflict of interest.

References

- Abbaspour, H., S. Saeidi-Sar, et al. (2012). "Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions." *Journal of Plant Physiology* **169** (7): 704-709.
- Abdallah, C., K. Sergeant, et al. (2012). "Optimization of iTRAQ labelling coupled to OFFGEL fractionation as a proteomic workflow to the analysis of microsomal proteins of *Medicago truncatula* roots." *Proteome Science*: 37.
- Al-Karaki, G., B. McMichael, et al. (2004). "Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress." *Mycorrhiza* **14** (4): 263-269.
- Aloui, A., G. Recorbet, et al. (2009). "On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study." *Proteomics* **9** (2): 420-433.
- Aloui, A., G. Recorbet, et al. (2011). "Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula*." *BMC Plant Biology* **11**.
- Amiour, N., G. Recorbet, et al. (2006). "Mutations in DMI3 and SUNN modify the appressorium-responsive root proteome in arbuscular mycorrhiza." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** (9): 988-997.
- Arines, J., J. M. Palma, et al. (1993). "Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular–arbuscular mycorrhizal roots of red clover." *New Phytologist* **123** (4): 763-768.
- Arines, J., M. Quintela, et al. (1994). "Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants." *Plant and Soil* **166** (1): 37-45.
- Azcón-Aguilar, C. and J. M. Barea (1996). "Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved." *Mycorrhiza* **6** (6): 457-464.

- Azcón-Aguilar, C. and J. M. Barea (1997). "Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials." Scientia Horticulturae **68** (1-4): 1-24.
- Bago, B., J. P. Donaire, et al. (1997). "ATPase activities of root microsomes from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants." New Phytologist **136** (2): 305-311.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, et al. (2000). "Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas." Plant Physiology **124** (3): 949-957.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, et al. (2002). "Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. Metabolism and transport in AM fungi." Plant and Soil **244** (1-2): 189-197.
- Bécard, G. and J. A. Fortin (1988). "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots." New Phytologist **108** (2): 211-218.
- Benabdellah, K., C. Azcon-Aguilar, et al. (2000). "Alterations in the plasma membrane polypeptide pattern of tomato roots (*Lycopersicon esculentum*) during the development of arbuscular mycorrhiza." Journal of Experimental Botany **51** (345): 747-754.
- Benabdellah, K., C. Azcón-Aguilar, et al. (1998). "Soluble and membrane symbiosis-related polypeptides associated with the development of arbuscular mycorrhizas in tomato (*Lycopersicon esculentum*)." New Phytologist **140** (1): 135-143.
- Berta, G., A. Fusconi, et al. (1993). "VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems." Environmental and Experimental Botany **33** (1): 159-173.
- Bestel-Corre, G., E. Dumas-Gaudot, et al. (2002). "Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry." Electrophoresis **23** (1): 122-137.
- Boldt, K., Y. Pörs, et al. (2011). "Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza." Journal of Plant Physiology **168** (11): 1256-1263.
- Bona, E., C. Cattaneo, et al. (2010). "Proteomic analysis of *Pteris vittata* fronds: Two arbuscular mycorrhizal fungi differentially modulate protein expression under arsenic contamination." Proteomics **10** (21): 3811-3834.
- Bona, E., F. Marsano, et al. (2011). "Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in *Pteris vittata* roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis." Journal of Proteomics **74** (8): 1338-1350.

- Bonfante, P. and S. Perotto (1995). "Tansley-Review no 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants." New Phytologist **130** (1): 3-21.
- Boomsma, C. R. and T. J. Vyn (2008). "Maize drought tolerance: Potential improvements through arbuscular mycorrhizal symbiosis?" Field Crops Research **108** (1): 14-31.
- Cameron, D. D., I. Johnson, et al. (2008). "Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*." New Phytologist **180** (1): 176-184.
- Cangahuala-Inocente, G. C., M. F. da Silva, et al. (2011). "Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits proteome responses opposite of P-starvation in SO4 grapevine rootstock upon root colonisation with two *Glomus* species." Mycorrhiza **21** (6): 473-493.
- Carpentier, S. C., E. Witters, et al. (2005). "Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis." Proteomics **5** (10): 2497-2507.
- Christie, P., X. L. Li, et al. (2004). "Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc." Plant and Soil **261** (1-2): 209-217.
- Colditz, F., O. Nyamsuren, et al. (2004). "Proteomic approach: Identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*." Plant Molecular Biology **55** (1): 109-120.
- Cox, J. and M. Mann (2011). "Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology." Annual Review of Biochemistry **80**: 273-299.
- Daher, Z., G. Recorbet, et al. (2010). "Proteomic analysis of *Medicago truncatula* root plastids." Proteomics **10** (11): 2123-2137.
- Dassi, B., A. Samra, et al. (1999). "Different polypeptide profiles from tomato roots following interactions with arbuscular mycorrhizal (*Glomus mosseae*) or pathogenic (*Phytophthora parasitica*) fungi." Symbiosis **26** (1): 65-77.
- Davies, F. T., J. D. Puryear, et al. (2001). "Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*)." Journal of Plant Physiology **158** (6): 777-786.
- Doidy, J., E. Grace, et al. (2012). "Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi." Trends in Plant Science **17** (7): 413-422.
- Dumas-Gaudot, E., N. Amieur, et al. (2004). "A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root-fungus interactions." Proteomics **4** (2): 451-453.

- Dumas-Gaudot, E., A. Asselin, et al. (1994). "Chitinase isoforms in roots of various pea genotypes infected with arbuscular mycorrhizal fungi." Plant Science **99** (1): 27-37.
- Dumas-Gaudot, E., J. Grenier, et al. (1992). "Chitinase, chitosanase and β -1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species." Plant Science **84** (1): 17-24.
- Dumas-Gaudot, E., P. Guillaume, et al. (1994). "Changes in polypeptide patterns in tobacco roots colonized by two *Glomus* species." Mycorrhiza **4** (5): 215-221.
- Dumas-Gaudot, E., G. Recorbet, et al. (2009). Functional Genomic of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Why and How Using Proteomics Symbiotic Fungi. A. Varma and A. C. Kharkwal, Springer Berlin Heidelberg. **18**: 243-274.
- Dumas-Gaudot, E., B. Valot, et al. (2004). "Proteomics as a way to identify extra-radicular fungal proteins from *Glomus intraradices* - RiT-DNA carrot root mycorrhizas." Fems Microbiology Ecology **48** (3): 401-411.
- Dumas, E., V. Gianinazzi-Pearson, et al. (1989). "Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation." Agriculture, Ecosystems and Environment **29** (1-4): 111-114.
- Faurobert, M., E. Pelpoir, et al. (2006). Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. Plant proteomics. Methods and protocols. M. Zivy. Totowa, NJ, Humana Press. **355**: 9-14.
- Ferrol, N., B. Bago, et al. (2004). Genomics of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied Mycology and Biotechnology. K. A. Dilip and G. K. George, Elsevier. **Volume 4**: 379-403.
- Gange, A. C., D. E. Lindsay, et al. (1999). "Can arbuscular mycorrhizal fungi be used to control the undesirable grass *Poa annua* on golf courses?" Journal of Applied Ecology **36**: 909-919.
- Gaude, N., W. X. Schulze, et al. (2012). "Cell type-specific protein and transcription profiles implicate periarbuscular membrane synthesis as an important carbon sink in the mycorrhizal symbiosis." Plant Signaling and Behavior **7** (4): 461-464.
- Genre, A., M. Chabaud, et al. (2008). "Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*." Plant Cell **20** (5): 1407-1420.
- Genre, A., M. Chabaud, et al. (2005). "Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection." Plant Cell **17** (12): 3489-3499.

- Gianinazzi-Pearson, V. (1996). "Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: Getting to the roots of the symbiosis." Plant Cell **8** (10): 1871-1883.
- Gianinazzi-Pearson, V., S. E. Smith, et al. (1991). "Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhizas, V.: Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolyzing enzyme-activities in plant fungus interfaces?" New Phytologist **117** (1): 61-74.
- Giri, B., R. Kapoor, et al. (2007). "Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues." Microbial Ecology **54**: 753-760.
- Görg, A., W. Weiss, et al. (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." Proteomics **4** (12): 3665-3685.
- Guether, M., B. Neuhauser, et al. (2009). "A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi." Plant Physiology **150** (1): 73-83.
- Guether, M., V. Volpe, et al. (2011). "LjLHT1.2-a mycorrhiza-inducible plant amino acid transporter from *Lotus japonicus*." Biology and Fertility of Soils **47** (8): 925-936.
- Harrier, L. A. and C. A. Watson (2004). "The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems." Pest Management Science **60** (2): 149-157.
- Harrison, M. J. (1997). "The arbuscular mycorrhizal symbiosis: An underground association." Trends in Plant Science **2** (2): 54-60.
- Harrison, M. J. (1998). Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant fungal symbioses. 11th International Workshop on Plant Membrane Biology, Cambridge, England.
- Harrison, M. J., G. R. Dewbre, et al. (2002). "A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi." Plant Cell **14** (10): 2413-2429.
- Helber, N., K. Wippel, et al. (2011). "A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants." Plant Cell **23** (10): 3812-3823.
- Hildebrandt, U., M. Regvar, et al. (2007). "Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance." Phytochemistry **68** (1): 139-146.

- Hochstrasser, D. F., M. G. Harrington, et al. (1988). "Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis." *Analytical Biochemistry* **173** (2): 424-435.
- Hurkman, W. J. and C. K. Tanaka (1986). "Solubilization of plant membrane-proteins for analysis by two-dimensional gel-electrophoresis." *Plant Physiology* **81** (3): 802-806.
- Javot, H., R. V. Penmetsa, et al. (2007). "A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (5): 1720-1725.
- Jellouli, N., A. B. Salem, et al. (2010). "Evaluation of Protein Extraction Methods for *Vitis vinifera* Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis." *Journal of Integrative Plant Biology* **52** (10): 933-940.
- Kobae, Y., Y. Tamura, et al. (2010). "Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean." *Plant and Cell Physiology* **51** (9): 1411-1415.
- Langenfeld-Heyser, R., J. Gao, et al. (2007). "*Paxillus involutus* mycorrhiza attenuate NaCl-stress responses in the salt-sensitive hybrid poplar *Populus (X) canescens*." *Mycorrhiza* **17** (2): 121-131.
- Lecomte, J., M. St-Arnaud, et al. (2011). "Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi." *FEMS Microbiology Letters* **317** (1): 43-51.
- Maldonado, A. M., S. Echevarría-Zomeño, et al. (2008). "Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis." *Journal of Proteomics* **71** (4): 461-472.
- Pfeffer, P. E., D. D. Douds, et al. (1999). "Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza." *Plant Physiology* **120** (2): 587-598.
- Pozo, M. a. J., C. Azcón-Aguilar, et al. (1999). "β-1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection." *Plant Science* **141** (2): 149-157.
- Pumplin, N., X. Zhang, et al. (2012). "Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** (11): E665-E672.
- Ramos, A. C., M. A. Martins, et al. (2009). "Arbuscular mycorrhizal fungi induce differential activation of the plasma membrane and vacuolar H⁺ pumps in maize roots." *Mycorrhiza* **19** (2): 69-80.

- Recorbet, G., H. Rogniaux, et al. (2009). "Fungal proteins in the extra-radical phase of arbuscular mycorrhiza: a shotgun proteomic picture." New Phytologist **181** (2): 248-260.
- Recorbet, G., B. Valot, et al. (2010). "Identification of in planta-expressed arbuscular mycorrhizal fungal proteins upon comparison of the root proteomes of *Medicago truncatula* colonised with two *Glomus* species." Fungal Genetics and Biology **47** (7): 608-618.
- Ruiz-Lozano, J. M., M. D. Alguacil, et al. (2009). "Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins." Plant Molecular Biology **70** (5): 565-579.
- Samra, A., E. Dumas-Gaudot, et al. (1997). "Detection of symbiosis-related polypeptides during the early stages of the establishment of arbuscular mycorrhiza between *Glomus mosseae* and *Pisum sativum* roots." New Phytologist **135** (4): 711-722.
- Saravanan, R. S. and J. K. C. Rose (2004). "A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues." Proteomics **4** (9): 2522-2532.
- Schenkluhn, L., N. Hohnjec, et al. (2010). "Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome." Journal of Proteomics **73** (4): 753-768.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, et al. (2001). "A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution." Mycological Research **105** (12): 1413-1421.
- Schuster, A. M. and E. Davies (1983). "Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls I. The aging process." Plant Physiology **73** (3): 809-816.
- Simoneau, P., N. Louisy-Louis, et al. (1994). "Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae." Appl Environ Microbiol **60** (6): 1810-1813.
- Slezack, S., J. Negrel, et al. (2001). "Purification and partial amino acid sequencing of a mycorrhiza-related chitinase isoform from *Glomus mosseae*-inoculated roots of *Pisum sativum* L." Planta **213**: 781-787.
- Smith, F. W., A. L. Rae, et al. (2000). "Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants." Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes **1465** (1-2): 236-245.
- Smith, S. E. and V. Gianinazzi-Pearson (1988). "Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal

plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **39**: 221-244.

Smith, S. E. and D. J. Read (1997). 14 - Uptake, translocation and transfer of nutrients in mycorrhizal symbioses. Mycorrhizal Symbiosis (Second Edition). London, Academic Press: 379-VII.

Smith, S. E. and F. A. Smith (1990). "Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport." New Phytologist **114** (1): 1-38.

St-Arnaud, M., C. Hamel, et al. (1996). "Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots." Mycological Research **100** (3): 328-332.

Talbot, J. M. and K. K. Treseder (2010). "Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen." Pedobiologia **53** (3): 169-179.

Tisserant, E., A. Kohler, et al. (2012). "The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont." New Phytologist **193** (3): 755-769.

Ünlü, M., M. E. Morgan, et al. (1997). "Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts." Electrophoresis **18** (11): 2071-2077.

Valot, B., M. Dieu, et al. (2005). "Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis." Plant Molecular Biology **59** (4): 565-580.

Valot, B., S. Gianinazzi, et al. (2004). "Sub-cellular proteomic analysis of a *Medicago truncatula* root microsomal fraction." Phytochemistry **65** (12): 1721-1732.

Valot, B., L. Negroni, et al. (2006). "A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions." Proteomics **6 Suppl 1**: S145-155.

Wang, W., M. Scali, et al. (2003). "Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds." Electrophoresis **24** (14): 2369-2375.

Wang, W., R. Vignani, et al. (2006). "A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis." Electrophoresis **27** (13): 2782-2786.

Wang, Y. Y., M. Vestberg, et al. (2008). "Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China." Mycorrhiza **18** (2): 59-68.

Wu, B., I. Susnea, et al. (2011). "Study of metal-containing proteins in the roots of *Elsholtzia splendens* using LA-ICP-MS and LC-tandem mass spectrometry." International Journal of Mass Spectrometry **307** (1-3): 85-91.

Xiong, J., Q. Yang, et al. (2011). "Simultaneous isolation of DNA, RNA, and protein from *Medicago truncatula* L." Electrophoresis **32** (2): 321-330.

Yates, J. R., C. I. Ruse, et al. (2009). "Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances and applications." Annual Review of Biomedical Engineering **11**: 49-79.

Young, J. P. W. (2012). "A molecular guide to the taxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi." New Phytologist **193** (4): 823-826.