



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS**

**BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DA ESPONJA MARINHA *Aaptos sp.* POR  
ANÁLISE PROTEÔMICA**

**FORTALEZA**

**2015**

**MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS**

**BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DA ESPONJA MARINHA *Aaptos* sp. POR  
ANÁLISE PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Aquáticos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kyria Santiago do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- M344b Martins, Maria Gleiciane de Queiroz.  
Bioprospecção de proteínas da esponja marinha *Aaptos* sp. por análise proteômica / Maria Gleiciane de Queiroz Martins. – 2015.  
68 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Aquáticos  
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.  
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Biotecnologia. 2. Eletroforese. 3. Esponja marinha. I. Título.

---

CDD 639.2

**MARIA GLEICIANE DE QUEIROZ MARTINS**

**BIOPROSPECÇÃO DE PROTEÍNAS DA ESPONJA MARINHA *Aaptos* sp. POR  
ANÁLISE PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Recursos Aquáticos.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Co-Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Wladimir Ronaldo Lobo Farias

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior

Universidade Regional do Cariri (URCA)

---

Profa. Dra. Creuza Maria Silveira Araújo Farias

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus.

Aos meus queridos pais, Honório e Raimunda.

## AGRADECIMENTO

A Deus por sempre guiar e iluminar meus caminhos, pelas minhas conquistas, por todas as coisas boas que ele tem proporcionado e por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida.

Aos meus pais, Francisco Honório Martins e Raimunda Nonata de Queiroz, pelo carinho, admiração, proteção e pelos seus ensinamentos os quais me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia.

Às minhas irmãs Gessiane e Gerliane e aos meus irmãos, que por mim têm amor, admiração e respeito.

A todos os meus familiares e amigos que por mim têm carinho, respeito, admiração e que de alguma forma têm ajudado quando precisei de apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Kyria Santiago, por sua orientação, ensinamentos na pesquisa, compreensão, dedicação além de tudo pela sua amizade.

A meu co-orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavado pela sua atenção e orientação sempre que precisava.

Aos amigos do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol), pela ajuda sempre que necessária e pela amizade. E em especial ao MSc Rômulo Farias por seder as imagens tiradas da esponja marinha (*Aaptos* sp.) usadas nesse trabalho.

Aos amigos de trabalho do laboratório de proteômica do BioMol, local onde desenvolvi minhas análises proteômicas. E em especial a minha amiga Cláudia Figueiredo Lóssio por sempre ajudar de alguma forma quando precisava com os experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda financeira com a bolsa de auxílio à pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará-UFC e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca por fornecer a possibilidade de Pós-graduação em Engenharia de Pesca.

A todos que de alguma forma me ajudaram, meu muito obrigada.

“Para os crentes, Deus está no principio de todas as coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.”

*Max Planck*

## RESUMO

As esponjas marinhas constituem uma rica reserva de substâncias naturais, muitas delas de imenso interesse biotecnológico. Elas compreendem um grupo promissor no fornecimento de compostos bioativos para a humanidade. Desta forma, pesquisas de novas drogas de fontes naturais sugerem que as esponjas marinhas possuem importantes compostos bioativos com ponteciais: farmacológico, antimicrobiano; antitumoral; antiviral; antiinflamatório; imunossupresor; cardiovascular; neurosupresor; relaxante muscular bem como biomarcador de poluição. A análise de proteínas expressas é uma abordagem importante para determinar a função dessas moléculas em um determinado organismo. Esse trabalho teve como objetivo bioprospectar proteínas expressas pela esponja marinha *Aaptos* sp. coletada no Icaraí de Amontada, Ceará, que possam apresentar potencial biotecnológico. Para a realização dessa abordagem, foram utilizadas como estratégias a eletroforese bidimensional (2-DE) e a bioinformática. A 2-DE é uma ferramenta utilizada para separar proteínas de diversos organismos. Conhecendo-se as proteínas expressas na esponja estudada pode-se estabelecer padrões protéicos característicos da espécie em estudo. Com base no exposto, neste estudo foi utilizado 2DE para investigar as proteínas expressas de *Aaptos* sp. A fim de fazer a extração de proteínas totais foi realizada a partir de 400 mg da esponja marinha *Aaptos* sp. Para análise quantitativa e qualitativa das proteínas foi utilizado o método de Bradford e SDS-PAGE, respectivamente. A partir das proteínas totais extraídas foi determinado o mapa bidimensional de referência para a esponja marinha em estudo. O ajuste das imagens dos géis bidimensionais, a detecção de *spots* protéicos e a avaliação dos dados para determinação massa molecular aparente (MM) e ponto isoelétrico (pI) dos *spots* foi feito pelo programa *ImageMaster 7*. Proteínas expressas foram identificadas utilizando os valores de pI e MM do *spot* contra um banco de dados de proteínas *UniProt* disponível no servidor ExPASy. O número médio de *spots* protéicos das replicas dos géis 2DE foi de 124. A maior abundância de proteínas foi observada nos géis 2DE na faixa de pH de 4 a 6,7 e com MM entre 13 a 119,67 quilodalton (kDa). A partir do gel 2DE de referencia foi identificado 122 proteínas das quais 61, 46 e 15 pertencem aos táxon cnidária, deuterostomia e porífera, respectivamente. As proteínas identificadas de porífera pertencem a categoria funcional: ligante de ATP, componente estrutural do ribossomo, atividade catalítica, ligante de GTP, ligante de íon de cálcio e atividade dissulfeto oxidoreductase. Sendo a categoria funcional ligante de ATP e de GTP com maior número de *spots*. Adicionalmente, houve proteínas expressas com



importantes funções moleculares já relada na literatura, porém não em *Aaptos* sp., assim indicando a importância destas esponjas marinhas como fonte de informação proteica que poderão ser estudadas no futuro quanto ao seu potencial uso como ferramentas biotecnológicas em diversas áreas, podendo ser empregadas em estudos que possam elucidar as vias metabólicas bem como o desenvolvimento de fármacos contra possíveis patologias.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Eletroforese. Esponja marinha.

## ABSTRACT

Marine sponges are a rich reserve of natural substances, many of them of immense biotechnological interest. They comprise a promising group in providing bioactive compounds for humanity. Thus, research on new drugs from natural sources suggest that marine sponges have important bioactive compounds ponteciais: pharmacological, antimicrobial; antitumor; antiviral; anti-inflammatory; immunosuppressive; cardiovascular; neurosupressor; muscle relaxant and pollution biomarker. Analysis of expressed proteins is an important approach to determine the function of these molecules in a given organism. This study aimed to bioprospect proteins expressed by the marine sponge *Aaptos* sp. collected in Icarai de Amontada, Ceará, who may have biotechnological potential. For the realization of this approach were used as strategies the two-dimensional electrophoresis (2-DE) and bioinformatics. The 2-DE is a tool used to separate proteins from different organisms. Knowing the proteins expressed in the study sponge can be established Protein patterns characteristic of the species under study. Based on the above, this study used 2DE to investigate the expressed protein *Aaptos* sp. In order to make the extraction of total proteins was performed using 400 mg of the marine sponge *Aaptos* sp. For qualitative and quantitative analysis of proteins was used the method of Bradford and SDS-PAGE, respectively. From the total protein extract was determined the two-dimensional reference map for marine sponge in the study. The adjustment of images of two-dimensional gels, the protein spot detection and evaluation of data to determine apparent molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) of the spots was made by the ImageMaster software 7. Expressed proteins were identified using the values of pI and MM spot against a UniProt protein database available on the ExpASy server. The average number of protein spots of replicas of the gels 2DE was 124. The highest abundance proteins was observed in 2DE gels in the pH range of 4 to 6.7 and with MM between 13 to 119.67 kilodalton (kDa). From the 2DE reference gel was identified 122 proteins of which 61, 46 and 15 belong to the Cnidaria taxon deuterostomia and Porifera, respectively. The proteins identified Porifera belong to functional category: ATP binding, structural component of the ribosome, catalytic activity, GTP binding, calcium ion binding and disulfide oxidoreductase activity. The functional category binding of ATP and GTP with more spots. Adicionadamente, was expressed proteins with important molecular functions already hued in the literature but not in *Aaptos* sp., thus indicating the importance of these marine sponges as a source of protein information that may be studied in the future for their

potential use as biotechnological tools in several areas and can be used in studies to elucidate the metabolic pathways and the development of drugs against possible pathologies.

**Keywords:** Biotechnology. Electrophoresis. Marine sponge.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia básica de Porifera.....	20
Quadro 1 – Principais bancos de dados para estudos com proteômica.....	27
Figura 2 – Esponja marinha <i>Aaptos</i> sp. utilizada no trabalho.....	37
Figura 3 – Eletroforese em poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% de proteínas totais obtidas de esponja marinha <i>Aaptos</i> sp. corado com PhastGel Blue G-250.....	38
Figura 4 – Mapa de eletroforese bidimensional parcial de proteínas totais obtidas de esponja marinha <i>Aaptos</i> sp. ....	40
Figura 5 - Géis 2DE de proteínas obtidas de <i>Aaptos</i> sp. Triplicatas: R1, R2 e R3.....	42
Gráfico 1- Gráfico de dispersão das replicas dos géis de <i>Aaptos</i> sp. ....	44
Gráfico 2 – Número médio de <i>Spots</i> das replicas dos géis bidimensionais de <i>Aaptos</i> sp. distribuídos por ponto isoelétrico (pI).....	45
Figura 6 – Géis 2DE de <i>Haliclona aquarius</i> na presença e ausência de cádmio.....	46
Gráfico 3 – Número médio de <i>Spots</i> das réplicas de géis bidimensionais de <i>Aaptos</i> sp. distribuídos por massa molecular (MM).....	47
Figura 7 – Géis 2DE de referência de <i>Aaptos</i> sp. mostrando <i>spots</i> marcados que correspondem a proteínas.....	48
Figura 8– Filogenia simplificada do Reino Animal (Metazoários).....	49
Figura 9 – Géis 2DE de referência de <i>Aaptos</i> sp. mostrando <i>spots</i> marcados que correspondem a proteínas.....	50
Gráfico 4 – Proteínas identificadas por pI e MM contra banco de dados <i>UniProt</i> .....	51
Figura 10 – Gel 2DE de referência de <i>Aaptos</i> sp. mostrando proteínas que corresponderam ao táxon porífera separadas em quadrantes de acordo com sus funções moleculares.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do Gel de empilhamento.....	32
Tabela 2 - Composição do Gel de separação.....	32
Tabela 3 - Parâmetro do programa IPGphor III usado para a focalização.....	34
Tabela 4- Composição do Gel de Poliacrilamida.....	35
Tabela 5 - Perfil quantitativo das proteínas totais extraídas da esponja marinha <i>Aaptos sp.</i> .....	37
Tabela 6 - Proteínas de <i>Aaptos sp.</i> com base no banco de dados <i>UniProt</i> .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>2DE</b>	Eletroforese Bidimensional
<b>18S</b>	Subunidade 18S ribossomal
<b>2-D</b>	Eletroforese Bidimensional
<b>20S</b>	Subunidade 20S ribossomal
<b>28S</b>	Subunidade 28S ribossomal
<b>40S</b>	Subunidade 40S ribossomal
<b>5,85S</b>	Subunidade 5,85S ribossomal
<b>5S</b>	Subunidade 5S ribossomal
<b>60S</b>	Subunidade 60S ribossomal
<b>A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub></b>	Relação entre as absorbâncias de 260 e 280 nm
<b>ABS</b>	Absorbância
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>C</b>	Concentração
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CHAPS</b>	3-cholamidopropyl]dimethylammonio
<b>Corr.</b>	Correlação
<b>Count.</b>	Coincidentes
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBI</b>	Instituto Europeu de Bioinformática

<b>ExPASy</b>	<i>Expert Protein Analysis System</i>
<b>GDP</b>	Ganosina difosfato
<b>GTP</b>	Ganosina Trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HH:mm</b>	Horas por minuto
<b>IEF</b>	Focalização Isoelétrica
<b>IPG</b>	Gradiente de pH Imobilizado
<b>MM</b>	Massa Molecular
<b>MW</b>	Massa molecular
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dicucleotido fosfato
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NRTKs</b>	Proteínas quinases não-receptoras
<b>P</b>	Grupo fósforo
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio iónico
<b>pI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>PKs</b>	Proteínas quinase
<b>PMSF</b>	Fenil Metil Sulfonil Fluoridro
<b>PSA</b>	Persulfato de amônia
<b>r</b>	Correlação linear
<b>R1</b>	Replica 1 do Gel 2DE de <i>Aaptos</i> sp.
<b>R2</b>	Replica 2 do Gel 2DE de <i>Aaptos</i> sp.
<b>R3</b>	Replica 3 do Gel 2DE de <i>Aaptos</i> sp.

<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RTKs</b>	Proteínas quinases receptoras
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)
<b>SIB</b>	Instituto Suíço de Bioinformática
<b>SRK1</b>	Gene da proteína tirosina quinase
<b>TCA</b>	Ácido Tricloro Acético
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TIFF</b>	<i>Tagged Image File Format</i>
<b>TRIS</b>	Trisaminometano
<b>Trx</b>	Tioredoxina
<b>TrxR</b>	Tioredoxina redutase
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>v/v/v</b>	Volume/volume/volume



## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>%</b>	Porcento
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>≤</b>	Igual ou menor que
<b>cm</b>	Centímetro
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>Kv</b>	Quilovolt
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperagem
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mg/mL</b>	Miligrama por mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nM</b>	Nanometro
<b>v</b>	Voltagem
<b>x g</b>	Força Centrifuga Relativa
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 Origem dos seres vivos</b> .....	17
<b>1.2 Esponjas marinhas</b> .....	18
<b>1.3 Esponja do gênero <i>Aaptos</i></b> .....	21
<b>1.4 Aplicações biotecnológicas das esponjas marinhas</b> .....	22
<b>1.5 Proteômica de esponjas marinhas</b> .....	24
<b>1.6 Identificação de proteínas</b> .....	26
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>2.1 Esponja marinha</b> .....	30
<b>2.2 Extração das proteínas totais</b> .....	30
<b>2.3 Quantificação de proteínas totais</b> .....	31
<b>2.4 SDS-PAGE</b> .....	31
<b>2.5 Eletroforese bidimensional</b> .....	33
<b>2.5.1 Reidratação das strips</b> .....	33
<b>2.5.2 Focalização isoeletrica</b> .....	33
<b>2.5.3 Equilíbrio das strips</b> .....	34
<b>2.5.4 Segunda dimensão</b> .....	34
<b>2.5.5 Obtenção das imagens do géis 2DE</b> .....	35
<b>2.5.6 Identificação das proteínas</b> .....	36
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	37
<b>3.1 Extração das proteínas totais</b> .....	37
<b>3.2 Eletroforese bidimensional</b> .....	38
<b>3.2.1 Pré-análise do proteoma de esponja marinha <i>Aaptos sp.</i></b> .....	39
<b>3.2.2 Análise do proteoma da esponja marinha <i>Aaptos sp.</i></b> .....	40
<b>3.2.3 Distribuição dos spots por ponto isoeletrico e massa molecular</b> .....	44
<b>3.2.4 Proteínas identificadas utilizando ponto isoeletrico e massa molecular contra banco de dados de proteína, UniProt</b> .....	48
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Origem dos seres vivos

Varias são as teorias para compreender e explicar a origem do Universo e da Vida. No entanto, quando se fala da origem do Universo há vários questionamentos e, as teorias para explicá-la não são tão aceitas quando comparadas com aquelas que definem o aparecimento dos primeiros seres vivos. Isso acontece devido tais Teorias serem elaboradas com base em uma física desconhecida, as quais muitas vezes não podem ser comprovadas experimentalmente. A origem da vida é explicada através de teorias químicas que têm argumentos plausíveis (GLEISER, 2000; GOULD, 1994; STEINER, 2006; BAPTISTA, 2006)

Com base em estudos químicos, tem se estabelecido que a vida na Terra surgiu a cerca de 3,8 bilhões de anos atrás após um período de evolução molecular, isso é comprovado por registros fósseis de procariontes (KUTSCHERA; NIKLAS, 2004). A combinação progressiva de pequenas moléculas orgânicas fez com que aparecesse a forma de vida mais simples. Com a síntese de moléculas auto-replicáveis, formou-se conjuntos de microrganismos vivos (HICKMAN; ROBERTS, 2004). Entre 2,0 e 1,5 bilhões de anos passados apareceram às primeiras células eucarióticas demonstradas por evidencias tanto paleontológicas quanto bioquímicas (KUTSCHERA; NIKLAS, 2004). Registros fósseis revelam que grande parte dos filos dos animais apareceu no início do período Cambriano. (HICKMAN; ROBERTS, 2004). O progenitor dos animais multicelulares modernos é datado de mais de 600 milhões de anos atrás, onde evoluíram de um organismo unicelular com presença de flagelo dando origem a toda a diversidade de metazoários, que vai desde os multicelulares mais simples como as esponjas, até os mais complexos como os seres humanos (KING, 2004).

As propriedades da vida na atualidade são diferentes daquelas existentes na sua origem. Ao longo da história da vida ocorreram várias transformações, as quais chamamos de Evolução. Assim, a vida foi progredindo e, em um dado momento sofreu ramificações dando origem a milhões de espécies viventes atualmente com novas propriedades e longas moléculas definidas como macromoléculas. Nos organismos vivos, as principais categorias de macromoléculas encontradas são ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios (HICKMAN; ROBERTS, 2004).

## 1.2 Esponjas marinhas

As esponjas são organismos pertencentes ao Filo Porífera (Latim *porus*, poro, + *fera*, portador de), estão entre os animais metazoários mais antigos e os multicelulares mais simples (DRESCH *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2007). Elas correspondem a uma significativa comunidade bentônica diversificada e bem sucedida de invertebrados aquáticos em todo o mundo. (TAYLOR *et al.*, 2007; RÜTZLER, 2004; HOOPER; SOEST, 2002).

Em anos remotos, taxonomistas classificavam as esponjas isoladamente dos seres organizados. Na sociedade grega antiga, as esponjas eram referidas como produto doméstico como esponjas de banho. Aristóteles foi o primeiro a se referir as esponjas como objeto de investigação científica e compará-las com animais. Então, era questionado se as esponjas seriam um ser vivo do reino vegetal ou animal ou ainda se era um intermediário entre estes dois reinos. Vários foram os debates para classificar as esponjas em um reino. O primeiro parecer científico informando a natureza animal das esponjas ocorreu no século XVIII. No final do século XIX e início do século XX foi estabelecida a sistemática de Porífera, a partir de intensas pesquisas com esponjas (HOOPER; SOEST, 2002). Pelo simples fato das esponjas não apresentarem aspectos ou comportamentos dos animais, é compreensivo que até o século XIX elas não tenham sido aceitas pelos zoólogos no reino animal (HICKMAN; ROBERTS, 2004). No entanto, evidências moleculares sugerem que as esponjas compartilham um ancestral comum com Urmetazoa e com os demais metazoários (DRESCH *et al.*, 2008; MÜLLER *et al.*, 2004; HICKMAN; ROBERTS, 2004) mas, a partir de dados moleculares fornecidos em uma década de estudos com as esponjas, tem se estabelecido informações monofiléticas importantes para todos os animais multicelulares (MÜLLER *et al.*, 2004).

O filo Porífera reúne cerca de 15.000 espécies de esponjas, mas apenas cerca de 7.000 espécies foram descritas e nomeadas (LEYS *et al.* 2005; HOOPER; SOEST, 2002). As esponjas praticamente mantiveram suas estruturas corporais inalteradas desde o período Pré-cambriano. Embora a grande parte das esponjas tenham entrado em extinção, elas apresentam uma diversidade de representantes em todos os tipos de ecossistemas aquáticos (HOOPER; SOEST, 2002), sendo cerca de 150 espécies de água doce, mais de 5.000 espécies marinhas e algumas poucas espécies habitantes em água salobra (HICKMAN; ROBERTS, 2004).

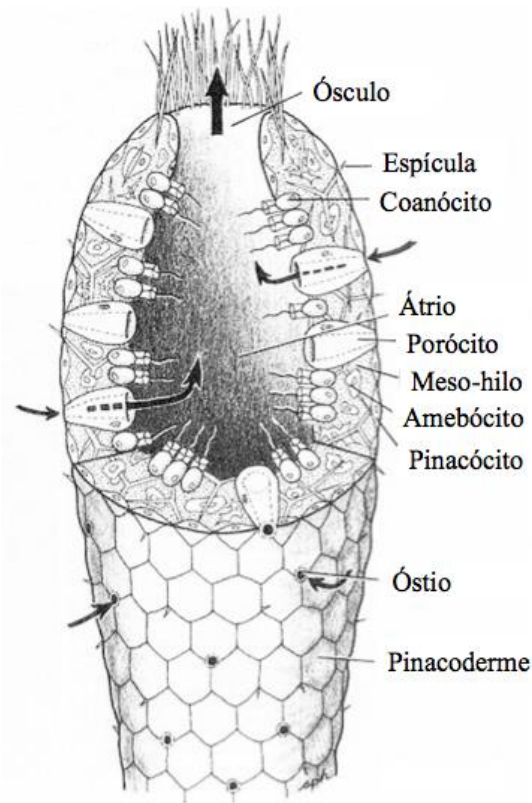
O filo Porífera é constituído de três classes: Hexactinellida (Grego *hex*, seis, *aktis*, raio, + Latim *-ellus*, sufixo diminutivo), Calcarea (Latim *Cálcis*, calcário) e Demospongiae

(Grego *demos*, povos, + *spongos*, esponja), sendo este último grupo o representante da maioria das espécies existentes (TAYLOR *et al.*, 2007 ). A classe Hexactinellida, também conhecida como esponjas de vidro é a mais antiga e apresenta características distintas das demais classes como a presença de um esqueleto de sílica de seis raios e é sincicial em vez de celulares. A classe Calcarea é a mais jovem e é caracterizada por um esqueleto de carbonato de cálcio, dessa forma suas representantes são denominadas de esponjas calcárias e correspondem uma pequena parcela das esponjas vivas, apenas 5%. A classe Demospongiae compreende as esponjas que apresentam esqueleto silicoso, mas não no formato de seis raios e contém 95% das espécies viventes (HICKMAN; ROBERTS, 2004; LEYS *et al.* 2005).

As esponjas são predominantemente marinhas, com poucos representantes de água doce. Possuem por toda sua estrutura vários canais e poros minúsculos, os quais formam um sistema de filtragem/alimentação que é único e importante para o hábito de vida sésil das esponjas.

A água circundante é filtrada e dela é retirada seus alimentos e o oxigênio para sobrevivência do animal (HICKMAN; ROBERTS, 2004; TAYLOR *et al.*, 2007 ). Este sistema de canais também tem a finalidade de transportar, para o exterior da esponja, seus dejetos corpóreos. O corpo das esponjas é formado por várias camadas de células diferentes e apresentam estruturas simples, onde não há presença de tecidos verdadeiros e nenhum órgão. São basicamente formadas de células inseridas em uma matriz gelatinosa enrijecida por esqueleto de espículas e proteínas (HICKMAN; ROBERTS, 2004), Figura 1.

Figura 1 – Morfologia básica de Porifera.



As setas correspondem o fluxo de água sendo filtrada pelo porífero. Fonte: <http://www.sfu.ca/~fankbone/v/lab02.html>

A camada exterior ou pinacoderme é formada da união de pinacócitos também conhecidas por células epiteliais. Essas células podem se estender até as superfícies interiores da esponja ao longo de poros inalantes (óstios), auxiliando na regulação da taxa de entrada de água.

A alimentação da esponja ocorre no interior de câmaras denominadas de coanoderme, formada pelo conjunto de células contendo flagelos denominadas de coanócitos, os quais estão envolvidos no bombeamento da água através dos canais e filtram os nutrientes como, por exemplo, bactérias e microalgas. Estas partículas alimentares são transferidas para o meso-hilo, uma demasiada camada de tecido conjuntivo, onde são fagocitadas por células denominadas archaeócitos, nas quais são digeridas. Os archaeócitos (amebócitos) podem se diferenciar em qualquer tipo celular, por isso são denominados células totipotentes (HICKMAN; ROBERTS, 2004; TAYLOR *et al.*, 2007). Depois que a água é filtrada no sistema da esponja, ela é exalada por um póro especializado denominado ósculo. Segundo Vogel (1977), um quilograma de esponja em um único dia é capaz de bombear cerca de vinte quatro litros de água.

A reprodução das esponjas pode ser assexuada (que pode ocorrer por brotamento, fragmentação e gêmulas) e sexuada (que ocorre por meio da fecundação de gametas formando um embrião livre-natante que se desenvolve em larva) (HICKMAN; ROBERTS, 2004; LEYS *et al.* 2005).

A morfologia das esponjas é altamente diversificada, apresentando aspectos de taça, mássico (amorfo), ramificações típicas e algumas têm simetria radial, mas muitas apresentam formas irregulares. As esponjas apresentam uma série de cores, muitas espécies apresentam pigmentos em suas células dérmicas. Ao serem removidas da água apresentam cor empalidecida. Seus indivíduos podem variar de tamanho entre milímetros e metros de diâmetro. Frequentemente, a morfologia das esponjas está correlacionada com o ambiente em que estão inseridas, refletindo relações ecológicas (HICKMAN; ROBERTS, 2004; TAYLOR *et al.*, 2007). As formas achatadas podem ser explicadas pela simbiose com cianobactérias que precisam captar a luz solar para realizar a fotossíntese (SARA *et al.*, 1998; WILKINSON, 1992). Esponjas da mesma espécie podem apresentar aspectos diferentes e marcantes na sua forma pelo fato de estarem inseridas em ecossistemas que apresentam condições ambientais diferentes. Dessa forma, seus padrões de crescimento podem ser influenciados por direção e velocidade das correntes de água, forma do substrato de fixação e disponibilidade de espaço (HICKMAN; ROBERTS, 2004).

Quanto a sua distribuição, as esponjas podem ser encontradas nas regiões temperadas, tropicais e polares, dessa forma demonstram uma ampla capacidade de adaptação e sobrevivência em condições extremas para a vida (HOOPER; SOEST, 2002).

### **1.3 Esponja do gênero *Aaptos***

Esponja marinha do gênero *Aaptos* tem sido relatada como fonte de compostos bioativos como por exemplo Aaptaminas, são alcalóides (LARGHI *et al.*, 2009). As Aaptaminas foram isolados inicialmente de esponjas marinhas do gênero *Aaptos* e apresentam várias atividades biológicas como anticancerígena, antimicrobiana, antirretroviral (DYSHLOVOY *et al.*, 2014; ERPENBECK; VAN SOEST, 2007) e dentre outras. As pesquisas com *Aaptos* tem sido descritas frequentemente para o isolamento de aaptaminas com aplicações anticancerígena frente a linhagens de células tumorais humanas (BOWLING, *et al.*, 2008; DYSHLOVOY *et al.*, 2014).

Em 2012, Dyshlovoy e colaboradores (2012) mostraram em seu trabalho que a aaptamina de *Aaptos* tem efeito negativo na proliferação de células cancerígenas humanas e mostraram também por análise proteômica comparativa de linhagens de células humanas cancerígenas cultivadas na presença e ausência de aaptamina era possível verificar proteínas diferencialmente expressas na condição tratamento, sugerindo que as proteínas diferencialmente expressas por essas células cancerígenas era devido a presença de aaptamina, assim fornecendo valiosas informações sobre esse composto no desenvolvimento do câncer.

Não há até esse momento relatos na literatura sobre o perfil proteico de esponja marinha do gênero *Aaptos*, dessa forma é de suma importância estudos proteômicos para análise do perfil proteico de esponja marinha do gênero *Aaptos* para a bioprospecção de proteínas que possam apresentar e/ou serem usadas como ferramentas biotecnologias para desenvolvimento de fármacos bem como possível elucidação da proliferação de células cancerígenas e dentre outras aplicações biotecnológicas.

#### **1.4 Aplicações biotecnológicas das esponjas marinhas**

Muitos cientistas estudam esponjas para entender processos biológicos fundamentais como, por exemplo, a biossíntese de produtos químicos, evolução imunológica dos eucariontes, totipotência, fisiologia adaptativa a ambientes extremos, função gênica, evolução dos Metozoos, impactos ambientais marinhos causados pela atividade antropológica dentre outros.

A cada ano são isoladas de animais marinhos novas biomoléculas com potenciais ações farmacológicas, sendo boa parte dessas moléculas isoladas de esponjas.

As esponjas têm importante potencial econômico como fornecimento de matéria prima para a produção de esponjas de banho comerciais e biomoléculas com potenciais terapêuticos, este último tem despertado o interesse de investigação das esponjas por cientistas de todo o mundo (HOOPER; SOEST, 2002).

Dentre os potenciais biotecnológicos dos produtos isolados de esponjas marinhas, foram encontradas ação antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória, imunossupressora, neurosupressora, relaxante muscular e cardiovascular (BURNS *et al.*, 2003; SIPKEMA *et al.*, 2005). Relatos na literatura definem que estes compostos bioativos são produzidos pelas esponjas com a finalidade de evitar sua predação, já que elas são organismos incapazes de se locomoverem (BURNS *et al.*, 2003).



Alguns trabalhos relatam que os compostos bioativos são produzidos por microrganismos que vivem em simbiose com as esponjas. Estas associações de microrganismos podem corresponder a 40% do volume do tecido da esponja. A partir de estudos moleculares tem sido demonstrado altos níveis de diversidade metabólica e morfológica na associação com simbiontes microbianos. E esta simbiose pode ter sido importante para o sucesso evolutivo das esponjas (TAYLOR *et al.*, 2007).

Processo morfogenético dos metazoários pode ser explicado a partir das esponjas durante a embriogênese, similar para o reino animal, e é controlado por sinais extracelulares que está correlacionado com seus receptores específicos, assim ativando cascatas de tradução de sinais bem como genes reguladores (MÜLLER *et al.*, 2004). Os genes *homeobox*, isolados de esponjas, fazem parte deste grupo de genes reguladores da tradução envolvidos com a proliferação celular (MÜLLER *et al.*, 2004; LEYS *et al.* 2005).

O uso sustentável do mar pode ser atingido se houver o monitoramento da qualidade daquele ecossistema. Organismos vivos podem ser usados em estudos de monitoramento de poluição apresentando biomarcadores que são importantes ferramentas para avaliar o nível de poluição ambiental. Esses biomarcadores podem ocorrer mesmo antes que apareça na comunidade e população local, alterações fenotípicas, podendo ser usados como uma forma precoce de diagnosticar causas da poluição, assim desenvolver estratégias para recuperar o ecossistema (TSANGARIS *et al.*, 2006). A acetilcolinesterase é uma enzima envolvida no bom funcionamento do sistema nervoso e sua expressão pode ser inibida em um dado organismo caso o ambiente que ele esteja inserido apresente contaminado, pela atividade antrópica, por poluentes como agrotóxicos (FULTON; KEY, 2001) e metais pesados (BOCQUÉ *et al.*, 1997).

Se por um lado, inúmeras proteínas de esponjas marinhas necessitam ser estudadas, por outro lado, poucos são os dados de genomas e proteômas encontrados na literatura. Dessa forma, fica claro que é extremamente válido investigar de forma profunda as proteínas expressas por esponjas, a fim de conhecer a função fisiológica dessas moléculas bem como investigar seu uso como potenciais ferramentas terapêuticas, por exemplo. Dentro desse enfoque, para se estudar o conjunto de proteínas expressas em determinada esponja marinha, é importante ferramenta, a eletroforese bidimensional (WILLIAMS; HOCHSTRASSER, 1997; TYERS; MANN, 2003).

## 1.5 Proteômica de esponjas marinhas

A complexidade de um organismo não é determinada pela quantidade de genes que o mesmo possui, mas sim pela variedade de proteínas que um organismo é capaz de expressar. Alguns processos complexos como diferentes combinações de éxons por *splincing* alternativo, processamento pós traducional, por exemplo clivagens proteolíticas e modificações pós traducionais como acetilação, glicosilação e fosforilação, podem somente ser avaliados quando submetidos a análises complementares à genômica. Para tanto pode ser empregada a proteômica que é a ciência a qual estuda as proteínas expressas por um organismo em resposta a determinadas condições ambientais (LIEBLER, 2002). A proteômica pode ser separada em dois ramos de pesquisa, um em que estuda a expressão de proteínas e um outro que estuda a interação entre essas proteínas. No estudo da expressão é feito análise das proteínas de amostras biológica do organismo em questão a partir de técnicas com a eletroforese bidimensional e para o estudo da interação dessas proteínas pode ser feito por ferramentas computacionais (PALZKILL, 2002).

A análise proteômica permite uma descrição dinâmica da regulação da expressão gênica, através do estudo das proteínas de um indivíduo e suas modificações pós-traducionais. Uma abordagem proteômica é baseada em algumas metodologias como: (i) eletroforese bidimensional que separa milhares de proteínas presentes em uma única amostra e (ii) bioinformática, ferramentas utilizadas para identificar a função das proteínas estudadas bem como a determinação da sequencia de peptídeos constituintes das proteínas separadas. Para a análise proteômica da esponja marinha *Aaptos* sp., coletada no litoral cearense, foram utilizados neste trabalho ferramentas como a eletroforese bidimensional e bioinformática.

O surgimento de técnicas especializadas para o desenvolvimento da genômica, proteômica e dentre as outras ômicas, possibilitou a análise do genoma funcional de diversos organismos. O genoma funcional compreende a investigação do conjunto de proteínas expressas em um dado momento que pode ser feito por análise proteômica, ou o conjunto de transcritos que pode ser feito por análise transcriptômica.

A proteômica é o estudo mais apropriado para se entender o produto final dos genes (PANDEY; MANN, 2000), isto é, refere-se à coleção de proteínas derivada da tradução do genoma de um organismo ou tipo celular (HAYNES; YATES, 2000) e tem sido usada amplamente para pesquisa global de síntese de proteínas (CASH, 2000). A vantagem principal do uso da proteômica é que somente através dela é possível determinar o controle de tudo o que

foi transcrito bem como caracterizar as modificações que ocorre após a tradução proteica como glicosilação, acetilação, fosforilação etc. Essas informações de modificações pós-tradução não estão contidas nem no genoma nem no transcriptoma dos indivíduos e são valiosas no que diz respeito a função desempenhada por muitas proteínas dentro das células. É sabido, por exemplo, que a fosforilação esta envolvida no processo de sinalização celular. Dessa forma, a identificação de uma proteína fosforilada dentro de um organismo nunca estudado poderá contribuir para determinar sua função, que poderá ser confirmada juntamente com outras ferramentas bioquímicas e de biologia molecular.

Muitos pesquisadores têm observado através da eletroforese bidimensional, modificações nos padrões de expressão gênica, em resposta a diferentes condições de estresse ambientais submetidas em função do tempo, possibilitando assim a construção de catálogo proteômico de referência para determinadas condições de perturbações do ambiente. Adicionalmente, o ambiente celular é refletido por modificações no perfil molecular a nível de proteoma em resposta aos estímulos internos e externos e que ao contrário do genoma de um organismo, que se mantém estável, está em contínuas mudanças (CASH, 2002, CHAVES, 2008; PATERSON; AEBERSOLD, 2003; WILKINS, 1995).

Em 1975, O'Farrel (1975) e Klose (1975), desenvolveram a eletroforese bidimensional (2DE), uma técnica mais direta para mapear o proteoma, conjunto de proteínas expressas por um indivíduo (CAHILL *et al.*, 2001). Essa técnica consiste na separação de uma mistura complexa de proteínas de uma amostra biológica de um determinado organismo em duas dimensões, onde na primeira dimensão é utilizando tiras com gradiente de pH imobilizado (GÖRK *et al.*, 2007), e para a segunda dimensão gel de poliacrilamida em condições desnaturante, para tanto a preparação da amostra é importante para que possa ter bons resultados, onde as proteínas da amostra apresentarão completa solubilidade, desagregação, desnaturação e redução. A separação das proteínas ocorre através de parâmetros físico-químicos das mesmas como ponto isoelétrico, pela focalização isoelétrica e massa molecular, por SDS-PAGE (2-D Electrophoresis – Principles and Methods, 2007; LOPEZ, 1999; SANTOS *et al.*, 2004).

A eletroforese bidimensional possibilita fazer análises de expressão gênica comparando os padrões protéicos, proporcionando uma ideia de quantidade relativa de cada proteína expressa, que pode ser calculado através de métodos de coloração (ONG; MANN, 2005). Essas informações refletem o estado de funcionamento do indivíduo em condições fisiológicas e metabólicas específicas que é determinado pela expressão funcional do genoma (ANDERSON;

SEILHAMER, 1997). A caracterização do proteoma a partir de análise de proteínas utilizando eletroforese bidimensional tem sido aplicada por varias áreas de investigações específicas (CASH, 1998, TAM *et al.*, 2006).

Em 2013, Wanick e colaboradores, através de abordagem proteômica comparativa, utilizou a esponja marinha *Haliclona aquarius* para avaliar os efeitos da poluição por cádmio em ambientes marinhos. Para tanto foram avaliadas as proteínas diferencialmente expressas comparando géis bidimensionais de poliacrilamida de *H. aquarius* quando foram expostas na presença e ausência cádmio. Após as análises dos géis foram observadas 46 proteínas diferencialmente expressas e 17 dessas foram identificadas através de espectrometria de massas, onde 75% dessas proteínas identificadas correspondiam a microorganismos associados a esponja e 24% a *H. aquarius*. Algumas das proteínas identificadas estão correlacionadas com funções celulares como a proliferação e diferenciação celular bem como funções moleculares envolvidas em processos de stress oxidativo e a aquisição de energia. Esse estudo fornece novas abordagens para avaliar os efeitos da poluição ambiental marinha por cádmio utilizando a *H. aquarius*.

## 1.6 Identificação de proteínas

A identificação das proteínas obtidas na investigação proteômica de organismos como por exemplo esponjas é feita com auxílio de ferramentas de bioinformática. Essas ferramentas utilizam bancos de dados de genes e proteínas já estudadas e descritas em esponjas marinhas.

A bioinformática faz uso de computadores para aquisição, gerenciamento e análise de informações biológicas (BROWN, 2000). No inicio dos estudos com proteômica as análises dos spots de proteínas dos géis de eletroforeses bidimensionais eram feitas manualmente sem a presença de software, dessa forma essas análises eram imperfeitas havendo a necessidade do desenvolvimentos de softwares para que fosse possível uma melhor comparação dos géis (BIRON, *et al.*, 2006).

Com o desenvolvimento de pacotes de software a análise de imagens de géis de eletroforese tornou-se automatizada, assim sendo possível detectar e avaliar os padrões dos *spots* de proteínas a partir de uma imagem de gel digitalizada. Os *spots* identificados nos géis têm seus ponto isoelétricos, massa molecular aparente e intensidade determinados, além disso pode ser feito análise estatística dos géis intra e interclasse além de inúmeras outras funções.

Também pode ser feita a identificação de proteínas usando os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular aparente a partir de ferramentas de bioinformática como o TagIdent ( ImageMaster 2D platinum: User Manual, 2008; BLUEGGEL; *et al.* 2004).

Atualmente são varias as ferramentas de bioinformatica disponíveis para a análise de proteínas presentes em géis de eletroforese bidimensional. Um exemplo é a ferramenta TagIdent disponível no servidor *ExPASy* (<http://www.expasy.org/tools/tagident.html>) que permite realizar busca por proteínas usando intervalos de pI, massa molecular aparente e restrição do táxon do organismo em estudo bem com o compartimento celular que a proteína corresponde. Essa busca é feita contra bancos de dados disponível com por exemplo o *UniProt* (GASTEIGER; *et al.*, 2005; BAIROCH, *et al.*, 2005).

O *ExPASy* (Expert Protein Analysis System) é um servidor mundial de dados proteômicos disponível em: <http://www.expasy.org>. Esse servidor pertence ao Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) e funciona em parceria com o Instituto Europeu de Bioinformática (EBI) . No *ExPASy* estão disponíveis para o acesso uma diversidade de bancos de dados e ferramentas para estudos de proteínas e proteômica. As ferramentas de análise podem ser utilizadas em questões relevantes em proteômica como: a busca por similaridade; busca por padrões e perfis protéicos; prognóstico de modificações pós-translacionais, previsão topologia, análise e alinhamento de sequências primárias, secundárias e terciárias. Uma das principais características do *ExPASy* é a integração e interconexão que ele estabelece entre todos os bancos de dados e as ferramentas disponíveis (GASTEIGER, *et al.*, 2003). No Quadro 1 encontra-se listado os principais bancos de dados de interesse para o estudo proteômico bem como os sites os quais estão disponíveis, respectivamente.

Quadro 1 – Principais bancos de dados para estudos com proteômica.

Banco de dados	Site	Referência
<i>UniProt</i>	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>	BAIROCH, <i>et al.</i> , 2005
Swiss-Prot	<a href="http://www.expasy.org/sprot/">http://www.expasy.org/sprot/</a>	GASTEIGER, <i>et al.</i> , 2003
<i>GenBank</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	PROSDOCIMI, 2007

O Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) dos Estados Unidos da America é também um importante banco de dados que contém informações genômicas, sendo o

GenBank o principal banco de dados do NCBI que armazena sequências de DNA, RNA e proteínas. Várias ferramentas de bioinformática auxiliam na análise dos dados no GenBank .

No NCBI existem poucos dados de sequências de genes e proteínas quando comparados com os dados gerados pelos 6.649 projetos genomas completos sequenciados (Genome Online DataBase). No entanto, os dados obtidos na literatura podem contribuir significativamente para identificação de proteínas de projetos proteômicos de esponja.

Alguns pesquisadores criaram bancos de dados de organismos específicos, como no caso das esponjas. Segundo Breter e colaboradores (2003), as análises dos genomas das esponjas *Suberites domuncula* e *Geodia cydonium* mostraram que cerca de 300.000 genes foram encontrados, indicando que as esponjas são uma enorme fonte de compostos bioativos. Essas sequências foram estudadas e depositadas no banco de dados *SpongeBase* (<http://spongebase.uni-mainz.de/cgi-bin/blast/blastserver.cgi>), contribuindo para o desenvolvimento da biotecnologia marinha através da análise molecular dos indivíduos marinhos. Vale ressaltar que outros projetos de sequenciamento de esponjas estão em andamento, como o projeto de esponjas Reniera, nos Estados Unidos, <http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/CSP2005/reniera.html>) (LEYS *et al.* 2005).

Até o momento, a literatura mostra o uso de metabólitos de esponjas marinhas como ferramentas no controle do câncer e proliferação viral. Dessa forma, a proteômica contribuirá para identificar, em massa, proteínas expressas por esponjas marinhas que poderão ser utilizadas, no futuro, como ferramentas biotecnológicas em diversas áreas. Dessa forma, este trabalho pretende contribuir com esse tipo de investigação proteômica ao utilizar a esponja marinha *Aaptos sp.* coletada no litoral do Ceará.

Esse trabalho teve como objetivo bioprospectar proteínas expressas pela esponja marinha *Aaptos sp.* coletada na costa do Ceará que possam apresentar potencial biotecnológico. Para tanto foi desenvolvido uma metodologia de extração de proteínas de esponja marinha para obter um extrato proteico produtivo (contendo o máximo de proteínas do organismo em estudo) e de qualidade (livre de contaminantes). Uma vez as proteínas obtidas elas foram separadas da mistura complexa através de focalização isoeletrica seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida, afim de se obter o perfil proteico de boa resolução a partir de géis de eletroforese bidimensional. Então seguiu-se com a caracterização do perfil de proteínas da esponja marinha *Aaptos sp.* quanto ao pI e massa através de dados obtidos por 2DE. As proteínas foram identificadas contra banco de dados *UniProt* quanto à função, composição

química e localização celular com os dados de pI e massa através da ferramenta de identificação TagIdent disponível no Portal de Bioinformática *ExPaSy*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Esponja marinha**

Espécimes de esponjas marinhas foram coletadas em maré baixa na Praia de Icará de Amontada, Ceará, Brasil. Após a coleta, as esponjas foram armazenadas e transportadas ao Laboratório de Proteômica do BioMol-Lab, em recipientes isotérmicos contendo gelo. No laboratório, as esponjas foram separadas de fauna e flora acompanhante, lavadas em água corrente e destilada, maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo até um fino pó e armazenadas em freezer a -20 °C até posterior utilização.

### **2.2 Extração das proteínas totais**

A extração das proteínas totais foi feita de acordo com Vasconcelos e colaboradores (2005) com algumas modificações. Para a extração de proteínas totais foram adicionados a 400 mg do fino pó da esponja marinha, 3 mL de solução de extração proteica constituída de ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato (CHAPS) 4%, Ditiotreitól (DTT) 20 mM, uréia 7 M, tiouréia 2 M e PMSF - Inibidor de Protease (Protease Inibidor Mix (GE Healtcari™) 1 mM. As células foram lisadas por sonicação (5 pulsos de 10 segundos com intervalo de 30 segundos entre cada pulso – com 50% de potência) utilizando o equipamento Sonicador SONOPULS HD 2070 - LABOLAN e incubadas em banho de gelo por 2 horas sob agitação. Em seguida, o extrato proteico foi centrifugado a 5.000 x g por 5 minutos a 4 °C para remoção dos restos celulares. Posteriormente, o sobrenadante foi recolhido, a ele foi acrescentado solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% com acetona absoluta (1:10) e a mistura foi incubada por 16 horas a -20 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com acetona gelada 100% (1:1) e centrifugado a 9.000 x g por 20 minutos a 4 °C. Após a lavagem, o sedimento final foi seco a temperatura ambiente e acrescentado a ele 1 mL solução de uréia 7 M com tiouréia 2 M. As proteínas totais extraídas foram dialisadas em amicon afim de remover algum contaminantes como por exemplos sais, que pudessem atrapalha a eletroforese bidimensional.



### 2.3 Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como curva padrão para o cálculo da concentração de Albumina de Soro Bovino (BSA). Para a quantificação de proteínas totais da amostra em estudo, 5  $\mu\text{L}$  da amostra foi diluída em 2,5 mL do reagente de Bradford. O experimento foi feito em triplicata e para o branco foi utilizado 5  $\mu\text{L}$  de uréia 7 M e tiouréia 2 M diluído em 2,5 mL de reagente de Bradford. Após 30 minutos foi realizada a medida de absorvância de cada amostra com densidade óptica de 595 nm utilizando espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro. Para mensurar a concentração foi feito uma média da absorvância da triplicata da amostra em estudo. A média da absorvância foi utilizada para calcular a concentração das proteínas totais, sendo atribuída  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , a unidade de concentração final.

### 2.4 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma técnica bastante utilizada para separação de uma mistura complexa de proteínas baseada na massa molecular aparente dessas moléculas e é geralmente realizada em condição desnaturante, uma vez na presença de SDS. As proteínas presentes no gel migram do pólo negativo ao positivo por influencia de um campo elétrico (KRAJ; SILBERRING, 2008). O gel de poliacrilamida utilizado é formado por duas partes: *stacking* gel (gel de empilhamento) e *main* gel (gel de separação). O gel de empilhamento apresenta poros grandes permitindo que as proteínas possam migrar igualmente sem restrição de tamanho, assim servindo apenas para empilhar tais moléculas. Quando as proteínas entram no gel de separação elas passam a migrar com velocidade menor devido a esse gel apresentar poros menores, assim são separadas nesse momento pelas suas massas moleculares. Os reagentes utilizados nos géis de empilhamento e separação estão descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Composição do Gel de empilhamento.

<i>Componente</i>	<i>Quantidade*</i>
Acrilamida/Bis (22,2 %)	0,5 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	312,5 uL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	1,65 mL
SDS 10%	25 µL
PSA 2,5%	12,5 µL
TEMED	1,5 µL

Tabela 2 - Composição do Gel de separação

<i>Componente</i>	<i>Quantidade*</i>
Acrilamida/Bis (22,2 %)	2,7 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	1,75 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	345 uL
SDS 10%	50 µL
PSA 2,5%	25µL
TEMED	2,5 µL

Após a corrida os géis foram corados com solução de Coomassie G-250 (*Blue Silver*) overnight sob agitação, em seguida foram descorados com água Milli-Q a 100 °C.

A qualidade das proteínas extraídas foi analisada através da obtenção de uma ampla faixa de bandas proteicas bem como a ausência de “background”. Para isso, foi realizada SDS-PAGE baseado no método descrito por LAEMMLI, 1970. O sistema de eletroforese utilizado foi o Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad.

## 2.5 Eletroforese bidimensional

### 2.5.1 Reidratação das strips

Para dar início à reidratação foi preparado triplicadas de alíquotas das proteínas extraídas da esponja marinha que apresentou melhor integridade e pureza pela verificação do padrão de bandas em SDS-PAGE, onde no final cada amostra apresentava concentração final de 125 µg/µL.

Ao tampão de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M; CHAPS 1%; DTT 1%; *anfólitos* 0,5% [v/v], [pH de 4-7] e traços de azul de bromofenol) foi adicionado 125 µg de proteínas totais da esponja marinha em um volume final de 125 µL e homogeneizado. Cada mistura de tampão com proteínas totais foi então transferida para um *slop* do IPG Box (GE Healthcare) ou Immobiline DryStrip Reswelling Tray (GE Healthcare), devidamente nivelado, em seguida foi adicionado em cada *slop* com a mistura as *strips* de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 7 cm de comprimento linear e pH de 4-7 com o gel voltado para baixo. Essa faixa de pH foi escolhida por as proteínas totais da esponja marinha *Aaptos* sp. se apresentaram em maior abundância entre faixa de pH de 4-7. As *strips* foram cubertas com *cover fluid* começando das extremidades e indo em direção ao centro. A reidratação ocorreu em temperatura ambiente por 16 horas (*overnight*).

### 2.5.2 Focalização isoelétrica

Após a reidratação, as *strips* foram lavadas com água Milli-Q, para a retirada do excesso de *cover fluid* e solução de reidratação. A focalização isoelétrica (IEF) ou primeira dimensão foi realizada no sistema de focalização *Ettan™ IPGphor III™* da GE Healthcare. As *strips* foram encaixadas nas raias do *manifold* presente na plataforma do *IPGphor III*. Nas extremidades das *strips* foram posicionado os *eletrode pads* úmidos com água Milli-Q. O *eletrode assembly* foi encaixado no *manifold* de modo que tocasse o *eletrode pad*, sendo iniciada a focalização. Os parâmetros utilizados no programa IPGphor III para a realização da focalização estão descritos na Tabela 3. Após a focalização, as *strips* foram acondicionadas em tubos de vidro com tampa rosqueada e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior corrida de segunda dimensão.

Tabela 3 - Parâmetros do programa IPGphor III usado para a focalização

<b>Etapa</b>	<b>Voltagem</b>	<b>Tempo</b>
Step 1	300 V	0:30 HH:mm
Grad 2	10.000 V	1:00 HH:mm
Grad 3	5.000 V	1:30 HH:mm
Grad 4	8.000 V	1:30 HH:mm
Step 4	8.000 V	1:00 HH:mm

Fonte: GE Healthcare

### 2.5.3 Equilíbrio das strips

Antes da realização da segunda dimensão, as *strips* passaram por um tratamento para desnaturação, redução e alquilação das proteínas previamente separadas na primeira dimensão. Para tanto, as *strips* foram retiradas do freezer -80 °C, descongeladas e, em seguida em tubo de ensaio com tampa foram equilibradas com 3 mL de solução de equilíbrio I (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol, e 57,8 mg de DTT ) por 15 minutos sob agitação. Após esse tempo a *strip* foi transferida para outro tubo de ensaio com tampa com 3 mL de solução de equilíbrio II (Uréia 6 M, Tris 50 mM, Glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol e 69,3 mg de iodoacetamida) também por 15 minutos e sob agitação. A *strip* foi lavada rapidamente com água Milli-Q e utilizada para correr na segunda dimensão.

### 2.5.4 Segunda dimensão

Na etapa da segunda dimensão as proteínas foram separadas com base no seu peso molecular aparente utilizando o aparato eletroforético Mini-PROTEAN Tetra Cell, Biorad. As *strips* equilibradas foram colocadas em contato com o gel de poliacrilamida 12% cuja composição encontra-se descrita na Tabela 4. Um pedaço quadrado de papel filtro embebido com 3 µL de marcador molecular, com peso correspondente a 14, 21, 30, 45, 66, e 97 KDa, foi colocado próximo a região ácida de cada *strip*. Uma solução de agarose contendo traços de azul de bromofenol foi utilizado para selar a *strip* no gel. A separação da segunda dimensão teve duração de aproximadamente 1 hora.

Tabela 4- Composição do Gel de Poliacrilamida

<i>Componente</i>	<i>Quantidade*</i>
Acrilamida/Bis (22,5%)	5,6 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	3,5 mL
H <sub>2</sub> O Milli-Q	4,66 mL
SDS 10%	140 µL
PSA 2,5%	90 µL
TEMED	20 µL

\*Quantidade para preparo de três géis

Após a corrida, os géis de poliacrilamida foram submersos em solução fixadora constituída de uma mistura de etanol, ácido acético e água (4:1:5, v/v/v) durante 30 minutos. Posteriormente, os géis foram corados com solução de Coomassie G-250 (*Blue Silver*) por pelos menos 24 horas sob agitação, em seguida foram descorados em solução descorante composta de água, metanol e ácido acético (6:3:1) e estocados em solução de ácido acético 5% (CANDIANO *et al.*, 2004).

### 2.5.5 Obtenção das imagens do géis 2DE

Os géis obtidos através da eletroforese bidimensional (2DE) foram digitalizados em *scanner* do modelo *ImageScanner III*, através do programa *LabScan 6.0* ambos desenvolvidos pela *GE Healthcare* e as imagens armazenadas em formato TIFF. O ajuste das imagens, a detecção dos *spots* e a avaliação dos dados para determinar massa e ponto isoelétrico dos *spots* foi feito pelo programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). Os valores de pI foram obtidos com auxílio da marcação da posição das *strips* (identificação do pH 4,0 e 7,0) no gel de poliacrilamida e a massa molecular foi atribuída com a identificação dos marcadores de peso molecular padrão utilizados na segunda dimensão. Esses dados foram de fundamental importância para a atribuição do pI e massa de cada *spot* proteico presente no gel. O programa *Image Master 2D Platinum 7.0* foi utilizado para caracterizar o percentual de proteínas ácidas, neutras e básicas da esponja marinha bem como o percentual de proteínas de baixo, médio e alto peso molecular.

### 2.5.6 Identificação das proteínas

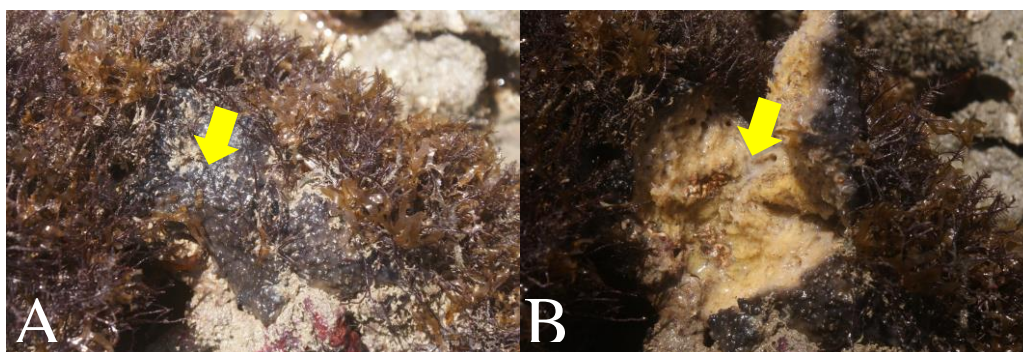
Os parâmetros de pI e massa molecular aparente de cada *spot* proteico foram utilizados pela ferramenta TagIdent disponível no Portal de Bioinformática *ExPASy* para identificar a função de cada proteína presente no gel (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>). O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para confecção dos gráficos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Extração das proteínas totais

A esponja marinha escolhida para o referido estudo foi a *Aaptos* sp. (Figura 2A e 2B), pois as proteínas dela extraídas apresentaram melhores perfis qualitativos bem como quantitativos, por SDS-PAGE e método de Bradford respectivamente, quando comparados com as proteínas totais extraídas das demais esponjas marinhas catalogadas.

Figura 2 – Esponja marinha *Aaptos* sp. utilizada no trabalho



A e B – Imagem mostrando o aspecto externo e interno (setas amarelas) da *Aaptos* sp., respectivamente. Fonte: Biomol

Para finalizar o processo de extração de proteínas totais, a partir da esponja marinha em estudo, a quantidade total de proteínas extraída foi mensurada através do método de Bradford (1976), Tabela 5, e o valor da concentração foi calculada de acordo com a equação do Bradford disponível no laboratório (BioMol-Lab):  $y = 0,0621x + 0,1055$ , onde  $y$  e  $x$  correspondem ao valor da absorbância e concentração, respectivamente.

Tabela 5 - Perfil quantitativo das proteínas totais extraídas da esponja marinha *Aaptos* sp.

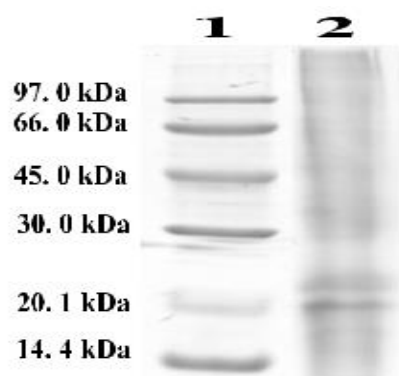
Amostra	ABS <sup>1</sup> <sub>595</sub>	C <sup>2</sup> (µg/ µL)
<i>Aaptos</i> sp.	0,612	1,63

<sup>1</sup>ABS: Absorbância; <sup>2</sup>C: Concentração.

Na Figura 3, pode-se observar o resultado da separação das proteínas totais extraídas após corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE 12%. A primeira raia corresponde ao marcador de peso molecular, o qual permite estimar o peso molecular nas proteínas percorrida no gel, a raia 2, correspondendo as proteínas totais da esponja marinha *Aaptos* sp. A pureza e a integridade das proteínas intracelulares extraídas podem ser verificadas pelo padrão de bandas em SDS-PAGE (WEBER; OSBORN, 1969; LAEMMLI, 1970), dessa forma podemos observar na Figura 2 que as proteínas totais extraídas apresentam-se de boa qualidade com bandas bem definidas e livres de possíveis contaminates.

De acordo com análise do perfil quantitativo (Tabela 5) e qualitativo (Figura 3), métodos de Bradford (1976) e SDS-PAGE, respectivamente foi observado que as proteínas totais extraídas estavam em quantidade e qualidade ideal para análise em géis bidimensionais.

Figura 3 – Eletroforese em poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% de proteínas totais obtidas de esponja marinha *Aaptos* sp. corado com PhastGel Blue G-250.



A raia 1 corresponde ao marcador de peso molecular – MM, em quilodaltons - kDa; Raia 2 corresponde proteína total extraída de *Aaptos* sp.

### 3.2 Eletroforese bidimensional

Em 1975, O'Farrel e Klose (1975) desenvolveram a eletroforese bidimensional (2DE) que é a técnica mais direta para mapear o proteoma de um indivíduo (CAHILL *et al.*, 2001). Essa técnica possibilita fazer análises de expressão gênica comparando os padrões protéicos, proporcionando uma idéia relativa de cada proteína na amostra, através de métodos de coloração (ONG; MANN, 2005). Dessa forma reflete o estado atual de funcionamento do sistema em condições fisiológicas e metabólicas específicas que é determinado pela expressão funcional do genoma (ANDERSON; SEILHAMER, 1997). A caracterização do proteoma a



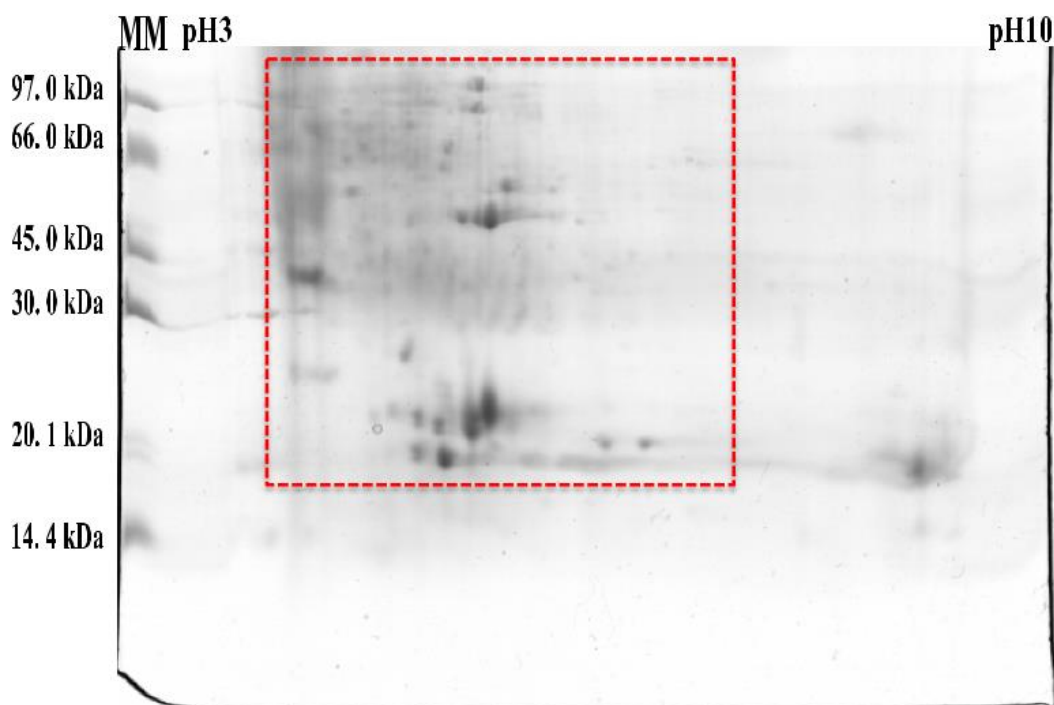
partir de análise de proteínas utilizando eletroforese bidimensional tem sido aplicada por varias áreas de investigações específicas (CASH, 1998, TAM *et al.*, 2006).

A proteômica é o estudo mais apropriado para se entender o produto final dos genes (PANDEY; MANN, 2000), isto é, refere-se à coleção de proteínas derivadas da tradução do genoma de um organismo ou tipo celular (HAYNES; YATES, 2000). Muitos pesquisadores têm observado através da eletroforese bidimensional modificações nos padrões de expressão gênica em resposta a diferentes condições de estresse ambientais submetidas em função do tempo, possibilitando assim a construção de catálogo proteômico de referência para determinadas condições de perturbações do ambiente. Adicionalmente, o ambiente celular é refletido por mudanças contrastando com o genoma de um organismo, que bem mais estável, dessa forma um indivíduo tem um genoma, mas muitos proteomas (CASH, 2002, CHAVES, 2008).

### 3.2.1 Pré-análise do proteoma de esponja marinha *Aaptos sp.*

Após a verificação do bom padrão de bandas por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) das proteínas extraídas de *Aaptos sp.* foi realizada eletroforese bidimensional (2DE), a fim de determinar o mapa protéico do organismo em estudo. Como ponto de partida para se estabelecer protocolo de 2DE para esse estudo foi realizada eletroforese usando *strips* com pH imobilizado de 3 até 10 com comprimento de 7 cm e foi observado que as proteínas encontravam-se em maior abundância na faixa de pH 4-7, mostrado na área marcada em vermelho na Figura 4, que corresponde a um gel de esponja marinha *Aaptos sp.* Com isso foram empregadas *strips* com faixa de pH imobilizado de 4 até 7 para todos os géis bidimensionais em estudo, com o proposito de haver uma melhor separação dos *spots* nessa faixa de pH.

Figura 4 – Mapa de eletroforese bidimensional parcial de proteínas totais obtidas de esponja marinha *Aaptos sp.*



A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 3-10 (*strip* de 7 cm) e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12 %. O gel foi corado com *Comassie G-250 (Blue Silver)* e analisado com auxílio do programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare)*. MM corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa).

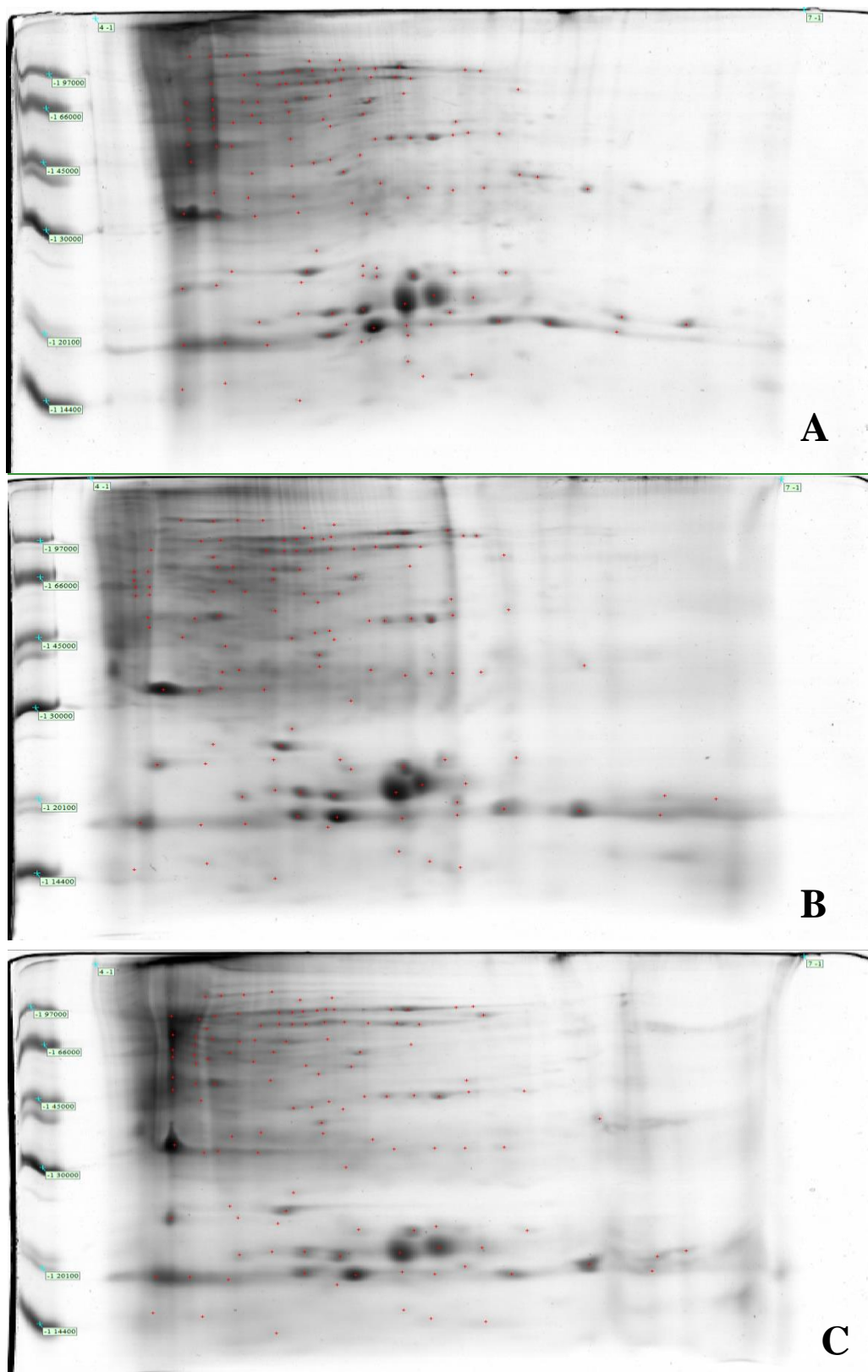
### 3.2.2 Análise do proteoma da esponja marinha *Aaptos sp.*

A técnica de eletroforese bidimensional de proteínas é uma técnica sensível, podendo ter grandes variações de resultados, para que possa ser validado os resultados obtidos é importante fazer replicas de géis do organismo em estudo. Depois de obter géis de qualidade foi feita digitalização das replicas para ser analisada no programa *ImageMaster 7*, o qual fornece dados importantes para o estudo do proteoma, como por exemplo, a quantidade, a massa aparente e bem como o ponto isoelétrico das possíveis proteínas existentes nos géis.

A comparação entre as triplicatas (Figura 5) dos géis de *Aaptos sp.* fornece fortes indícios sobre a boa qualidade dos dados obtidos. Com isso foi feita a primeira análise no *ImageMaster 7* que seria a detecção e marcação dos *spots*, os quais correspondem as proteínas presentes em cada gel. As análises dos géis R1, R2 e R3 possibilitaram a identificação de 129, 122 e 121 *spots*, respectivamente, sendo a média dos *spots* das replicas de 124. O gel R2 (Figura 5B) foi escolhido como gel de referência, pois apresentou uma melhor visualização dos *spots* e melhor perfil proteico ou seja teve melhor focalização isoelétrica.

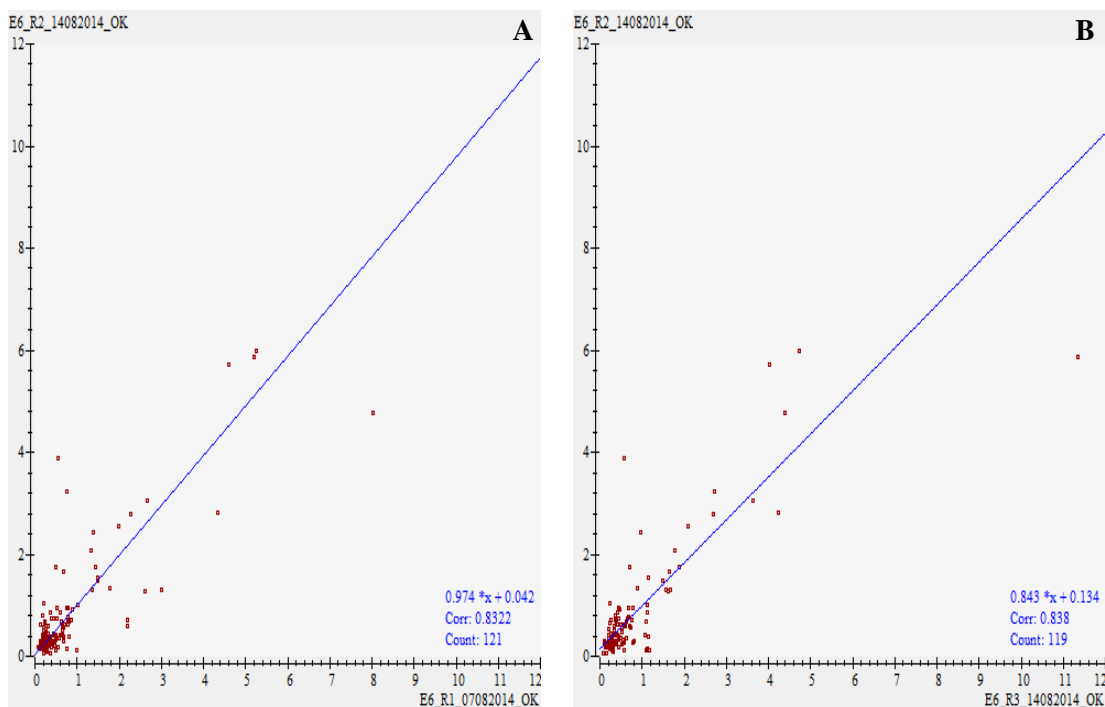
Nem sempre a quantidade de *spots* no gel 2DE correspondem ao mesmo número de proteínas, pois pode haver em um mesmo gel mais de um *spot* que corresponde a mesma proteína, isso é devido a modificações pós-traducionais, assim podendo mudar o pI e a massa molecular de uma dada proteína fazendo com que a mesma possa aparecer em diferentes regiões do gel bem como numa mesma coordenada do gel (HANCOCK *et al.*, 2002; HESKETH *et al.*, 2002). Para ser realizado um reconhecimento detalhado o ideal é fazer uma identificação de proteínas e se possível uma análise por espectrometria de massas.

Figura 5 - Géis 2DE de proteínas obtidas de *Aaptos sp.* Triplicatas: R1, R2 e R3



A, B e C correspondem as replicas dos géis R1, R2 e R3, respectivamente. Os números alinhado a esquerda na vertical e na parte superior horizontal dos géis correspondem ao marcador de peso molecular e faixa de pH, respectivamente. Foram identificados nos géis A, B e C um total de 129, 122 e 121 *spots*, respectivamente.

Após a identificação e marcação das proteínas presentes em cada gel foi feita análise de *matching*, que corresponde a uma sobreposição virtual de replicas de géis pelo programa *ImageMaster 7* com o proposito de identificar quais os *spots* eram coincidentes nas replicas. O *matching* é feito usando o gel de referência (escolhido entre as replicas) e um outro gel das replicas em análise. Após a sobreposição dos géis foi observado 119 *spots* coincidentes. Os géis de esponja marinha *Aaptos* sp., R1 e R3, apresentaram um coeficiente de correlação linear de 0,8322 e 0,838, respectivamente, em comparação com o gel de referência R2 (Gráfico 1). Chen e Popovic (2002) relataram que para descrever o padrão de relacionamento entre variáveis são escolhidos em 95% dos casos a correlação de Pearson. Essa correlação mensura a direção e o grau de relacionamento linear entre duas variáveis quantitativas (MOORE, 2007). A correlação de Pearson é utilizada para análise de confiabilidade e atribui um valor limite para que sejam confiáveis tais resultados. Quanto mais próximo de 1 for o valor da correlação linear ( $r$ ) indica que existe um maior grau de relação entre as variáveis em estudo, indicando nesse caso uma direção positiva do relacionamento (VIEIRA, 1980). Jacques (2003) relata que o coeficiente de correlação linear quando avaliado qualitativamente pode ser interpretado da seguinte forma: Fraca correlação linear ( $0,00 < r < 0,30$ ); Moderada correlação linear ( $0,30 \leq r < 0,60$ ); Forte correlação linear ( $0,60 \leq r < 0,90$ ); Correlação linear muito forte ( $0,90 \leq r < 1,00$ ). Dessa forma pode ser afirmado que os resultados das correlações lineares obtidos nesse trabalho são validos e que as técnicas utilizadas não impactaram negativamente nos resultados obtidos.

Gráfico 1- Gráfico de dispersão das replicas dos géis de *Aptos sp.*

**A** – Gel 2DE R1 comparado com gel de referência R2 apresentando coeficiente de correlação linear de 0,8322 e 121 *spots* coincidentes. **B** – Gel 2DE R3 comparada com gel de referência R2 apresentando coeficiente de correlação linear de 0,838 e 119 *spots* coincidentes. Corr.: correlação e Count.: *spots* coincidentes.

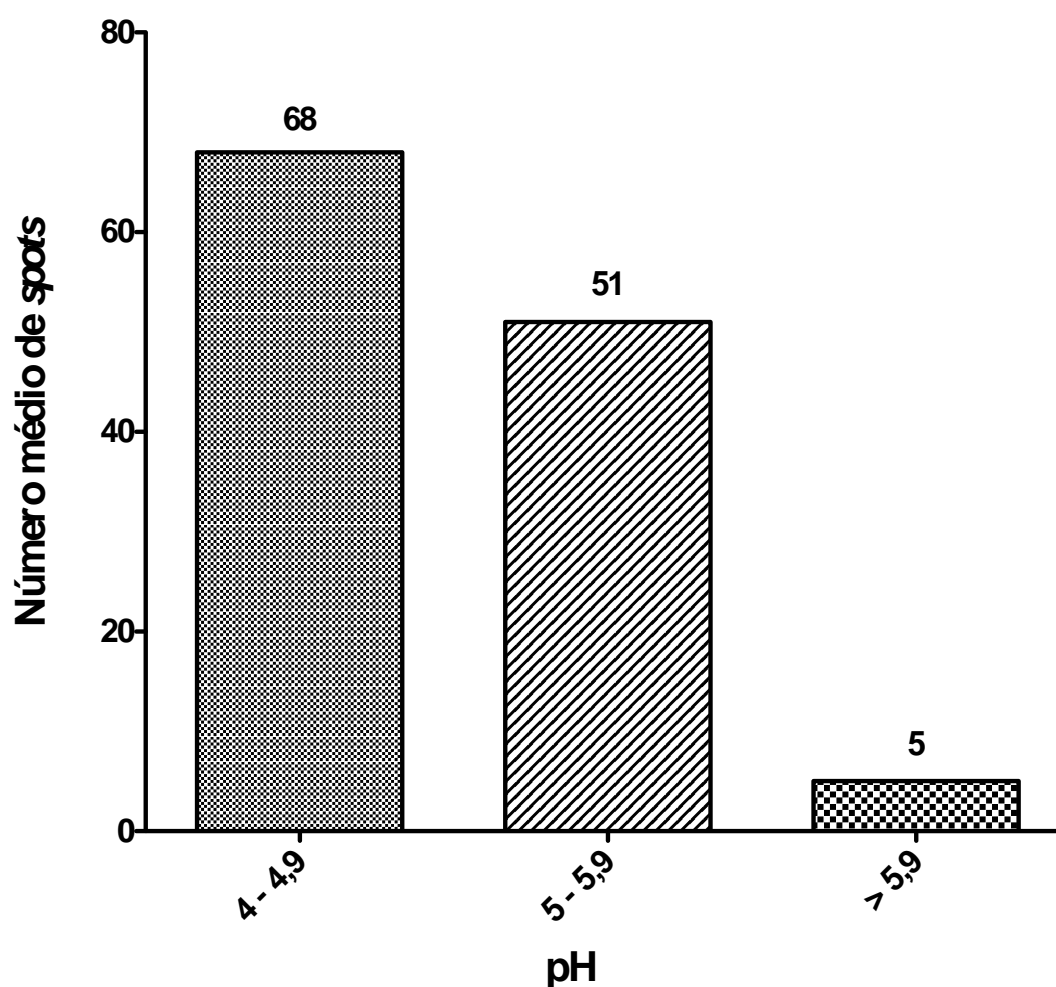
A análise do perfil proteico obtido da esponja marinha *Aptos sp.* possibilita a identificação de possíveis proteínas no que diz respeito à função, composição química e localização celular dessas moléculas. Uma vez adquirindo conhecimentos acerca dessas proteínas as mesmas podem ser usadas como potentes ferramentas de potencial biotecnológico, assim trazendo implicações práticas como por exemplo a detecção e controle de doenças como o câncer.

### 3.2.3 Distribuição dos spots por ponto isoelétrico e massa molecular

Após a detecção dos *spots* é possível identificar parâmetros de separação das proteínas: ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM) aparente de cada proteína. Os valores de pI e MM aparente obtidos das proteínas pela análise no programa *ImageMaster* apresentou variação de pH de 4 a 6,7 e massa molecular aparente variando de 13 a 119,67 Quilodalton (kDa).

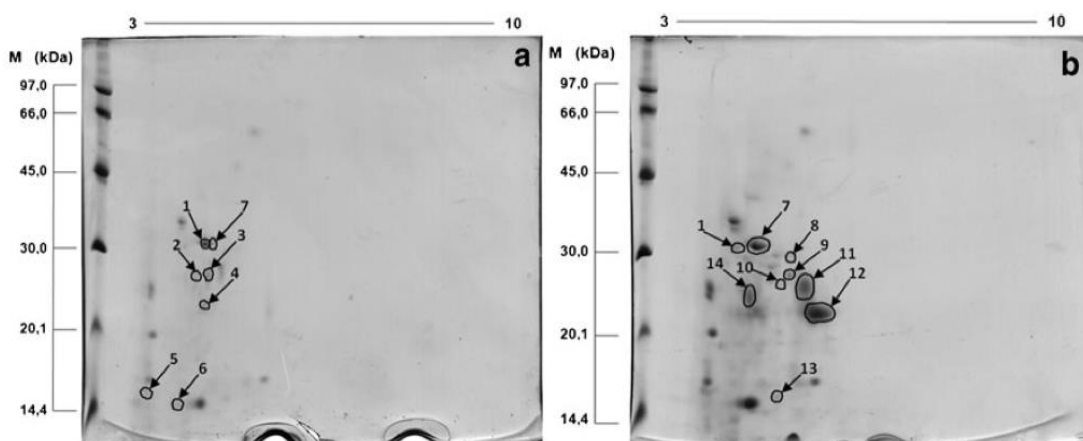
As análises dos mapas protéicos demonstraram que as proteínas se distribuem num gradiente de pH de 4 a 6,7, como mostra a Figura 4. A maioria das proteínas apresenta caráter ácido, pois encontra-se em maior abundância em pH de 4 a 4,9 totalizando 68 *spots*, 54,84% e seguido por pH de 5 a 5,9 correspondendo a 51 *spots*, 41,13%. A menor distribuição de proteínas nos géis apresenta na faixa de pH > 5,9 compreendendo apenas 5 *spots*, 4,03% (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Número médio de *Spots* das replicas (R1, R2 e R3) dos géis bidimensionais de *Aaptos* sp. distribuídos por ponto isoelétrico (pI).



Esses achados de ponto isoelétrico das proteínas de *Aaptos* sp. presente em géis 2DE corroboram com Wanick e colaboradores (2013) ao estudarem o proteoma de *Haliclona aquarius* na presença e ausência de cádmio verificaram que em ambas as situações a quais as esponjas eram expostas as proteínas apareciam em maior abundância na faixa de pH de 4 a 5 (Figura 6).

Figura 6 – Géis 2DE de *Haliclona aquarius* na presença e ausência de cádmio.

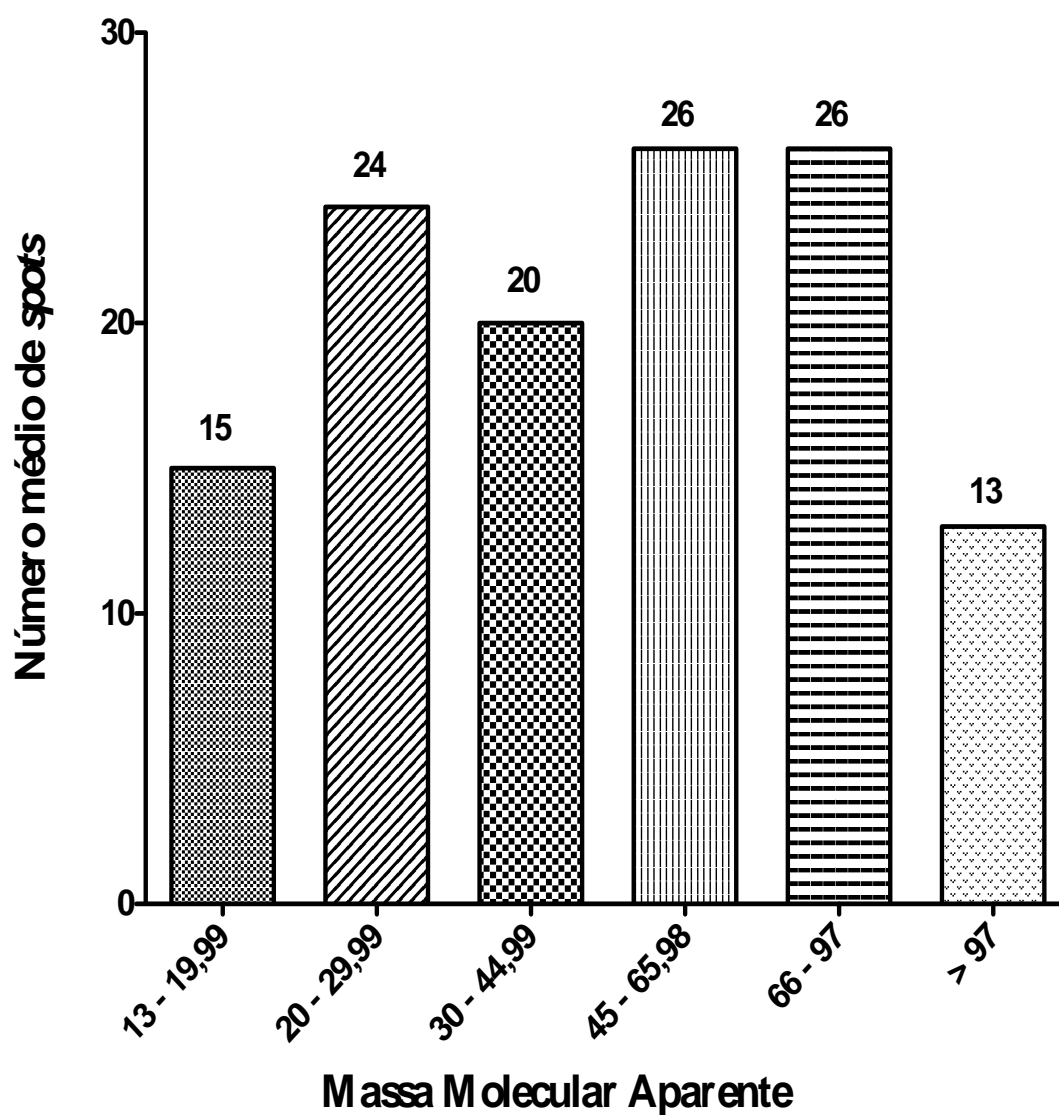


*Haliclona aquarius* na presença (a) e ausência (b) de cádmio. **M** corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa). Os números na parte horinzontal superior dos géis correspondem ao gradiente de pH das tiras utilizadas. Fonte: Adaptado de Wanick e colaboradores (2013).

O Gráfico 3 corresponde à distribuição média das proteínas por massa molecular aparente das amostras de *Aaptos* sp. em géis 2DE. Foi observado que a maior abundância das proteínas está presente em regiões do gel correspondente uma faixa de massa molecular aparente de 45 a 65,98 e 66 a 97 kDa, com 26 spots (32,24%). Em relação ainda a massa molecular aparente a região dos géis que apresentou uma menor abundância de proteínas foi aquela que corresponde acima de 97 kDa. Seguida em ordem crescente em kDa de: 13 a 19,99; 30 a 44,99; 20 a 29,99; 45 a 97 (Gráfico 3).



Gráfico 3 – Número médio de *Spots* das réplicas de géis bidimensionais de *Aptos* sp. distribuídos por massa molecular (MM).

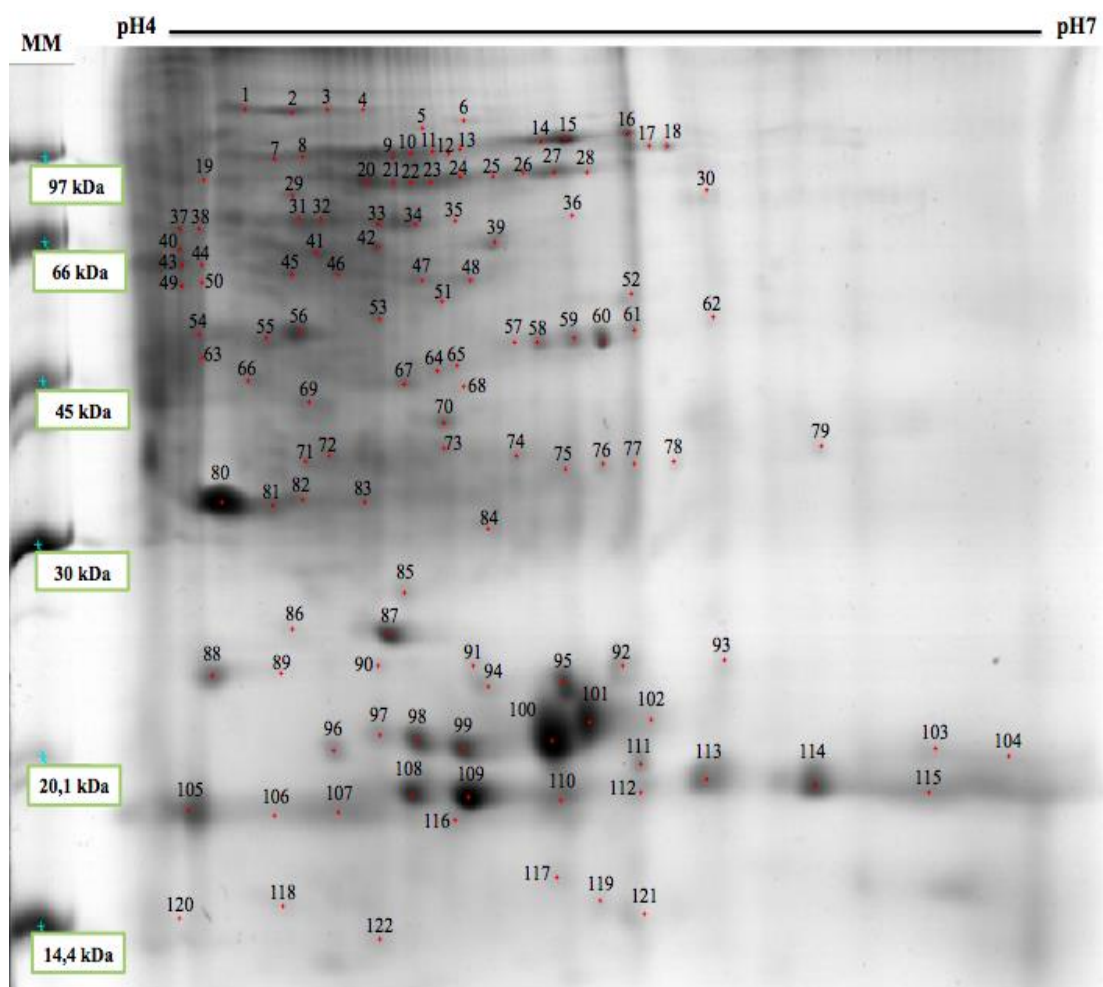


A construção do gráfico foi feita a partir do GrphPad Prism 5.0a.

### 3.2.4 Proteínas identificadas utilizando ponto isoelétrico e massa molecular contra banco de dados de proteína, UniProt

A partir da análise da eletroforese bidimensional das possíveis proteínas de *Aaptos* sp., foi possível identificar um total de 122 proteínas presentes no gel de referência, Figura 7.

Figura 7 – Gel 2DE de referência (R2) de *Aaptos* sp. mostrando spots marcados que correspondem a proteínas.

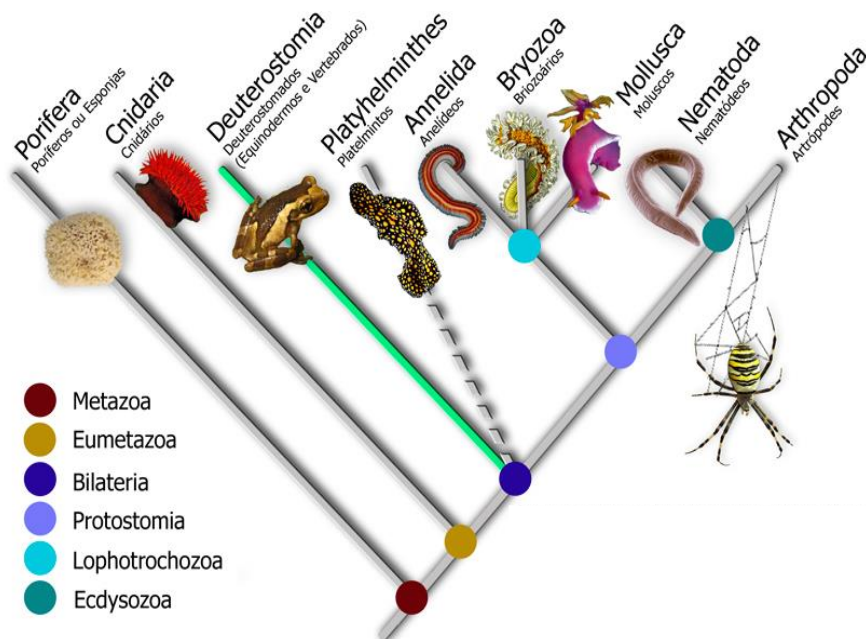


A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 4-7 (*strip* de 7 cm) e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com *Comassie blue* G-250 e analisado com auxílio do programa *ImageMaster* 7.0 (GE Healthcare). MM corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa).

Para tanto foram utilizados os valores de pI e MM aparente calculados pelo programa *ImageMaster* 7.0 de cada *spot* contra banco de dados de proteínas *UniProt* disponível no servidor *ExPASy* utilizando a ferramenta de bioinformática *TagIdent*. Antes de ser realizada a busca contra esse banco de dados foi feita restrições ao táxon porífera, para a busca ser mais direcionada, uma vez que o organismo, esponja marinha, em estudo pertence ao filo porífera.

Quando não era encontrado nenhuma proteína correlacionada com tal filo antes citado então era feito análise usando como restrição de táxon cnidária, seguido de deuterostomia, assim seguindo a ordem de filogenia simplificada do Reino animal, Metazoários (Figura 8).

Figura 8– Filogenia simplificada do Reino Animal (Metazoários)



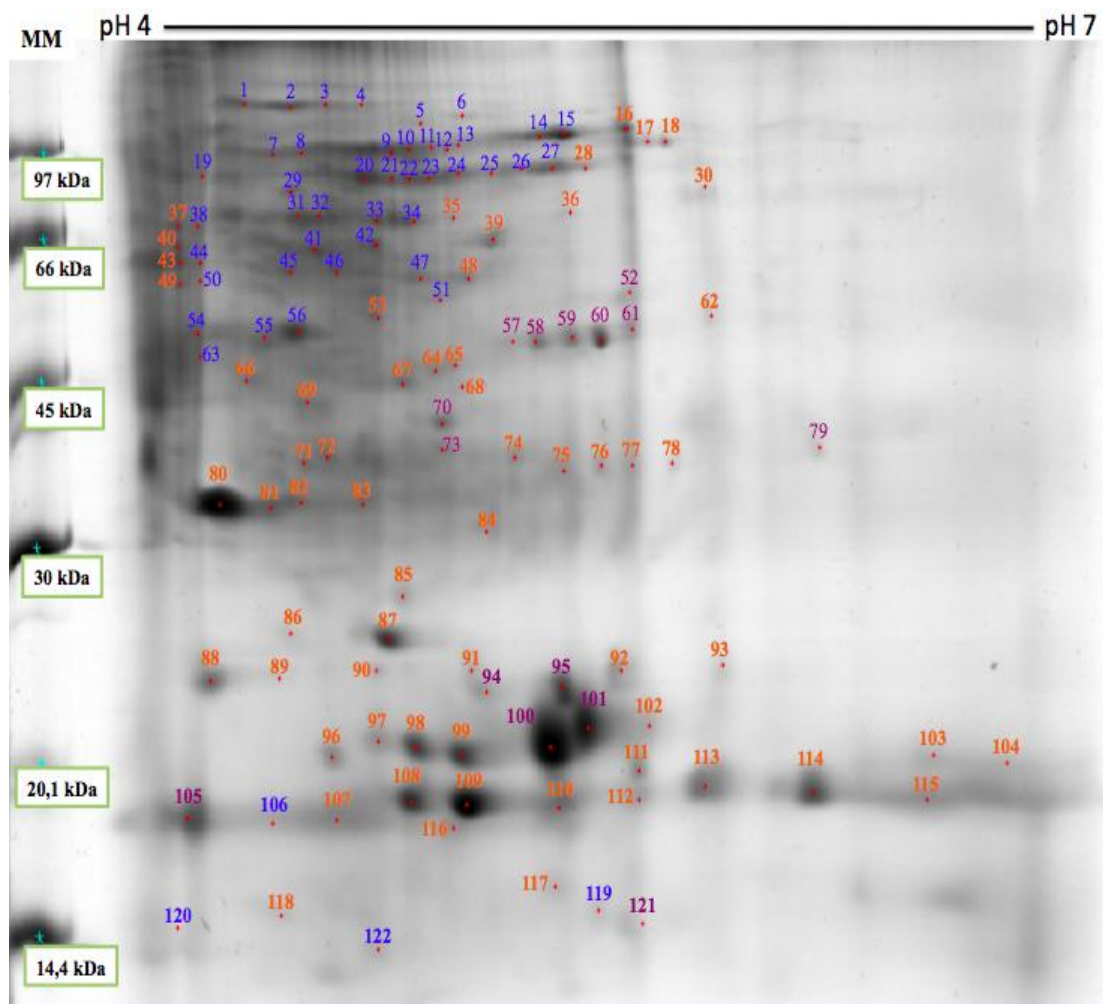
Fonte: Museu de Zoologia UFBA (2009).

Das 122 proteínas identificadas de *Aaptos* sp. Usando valores de pI e MM aparente contra banco de dados *UniProt* a maioria pertenceu a cnidária com 61 *spots* (50%), seguido de deuterostomia com 46 *spots* (37,7%) e em menor quantidade foi para porífera com 15 *spots* (12,3%), Figura 9 e Gráfico 4. A maioria das proteínas encontradas não corresponderam ao táxon do organismo em estudo supostamente porque tem sido pouco os trabalhos científicos para análise do perfil gênico e protéico do filo porífera, logo, os bancos de dados de gene e proteínas para tal táxon são escassos. As proteínas identificadas que correspondem a cnidária ou deuterostomia, provavelmente apresentam regiões conservadas nas proteínas que não corresponde apenas ao táxon porífera, mas também a outros como os cnidária e deuterostomia. Na Figura 9 os *spots* encontram-se numerados em laranja, azul e roxo a fim de separar quais proteínas correspondem a cnidária, deuterostomia e porífera, respectivamente.

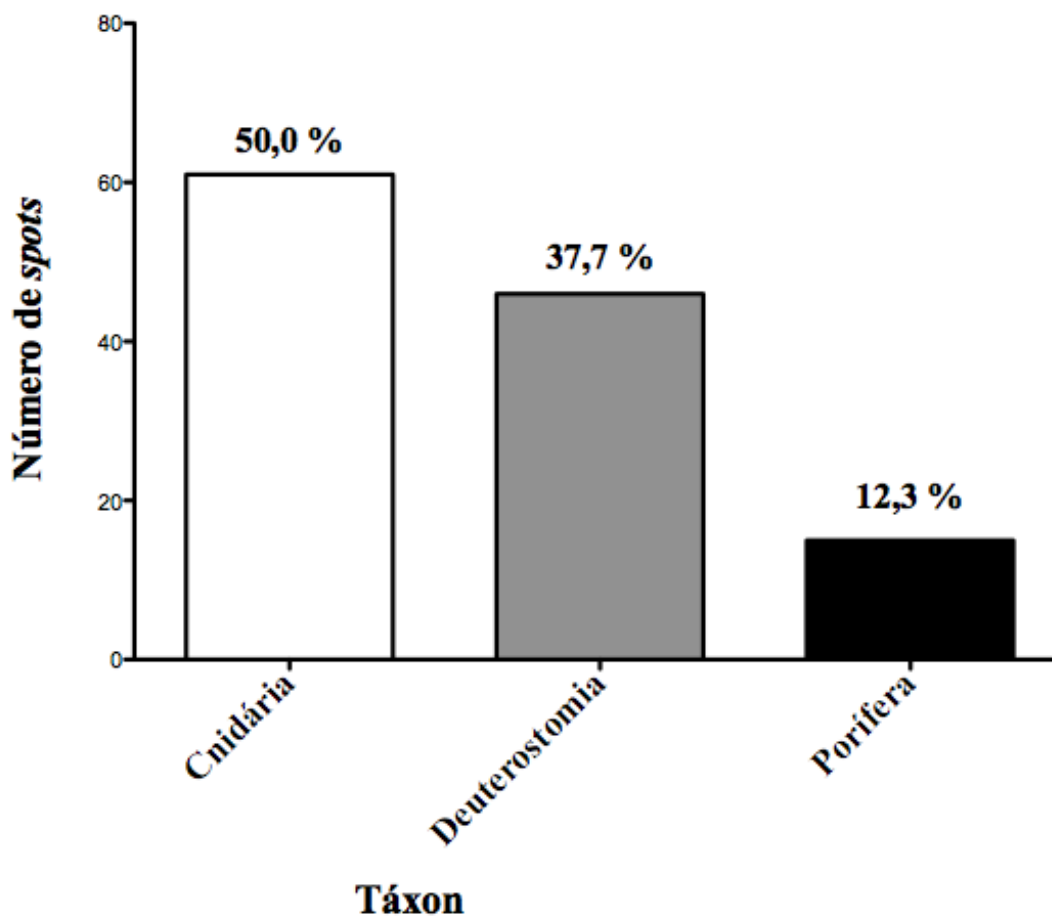
Foi observado que as proteínas que pertencem à porífera estão restritas as regiões do gel que apresentam massa molecular aparente de 14,77 a 57,27 kDa e ponto isoelétrico de 4,2 a

6.1. Tanto as proteínas identificadas de cnidária como de deuterostomia apresentam-se distribuídas por todo o gel.

Figura 9 – Gel 2DE de referência (R2) de *Aaptos* sp. mostrando *spots* marcados que correspondem a proteínas.



Os números em roxo, laranja e azul correspondem a proteínas de porífero (esponja marinha), cnidário e deuterostômio, respectivamente, identificadas contra banco de dados Uniprot utilizando pI (ponto isoelétrico) e MM. A primeira dimensão foi realizada em gradiente de pH 4-7 (*strip* de 7 cm) e a segunda dimensão em SDS-PAGE 12%. O gel foi corado com *Comassie blue* G-250 e analisado com auxílio do programa *ImageMaster* 7.0 (GE Healthcare). MM corresponde ao marcador molecular utilizado com unidade em Quilodalton (kDa).

Gráfico 4 – Proteínas identificadas por pI e MM contra banco de dados *UniProt*

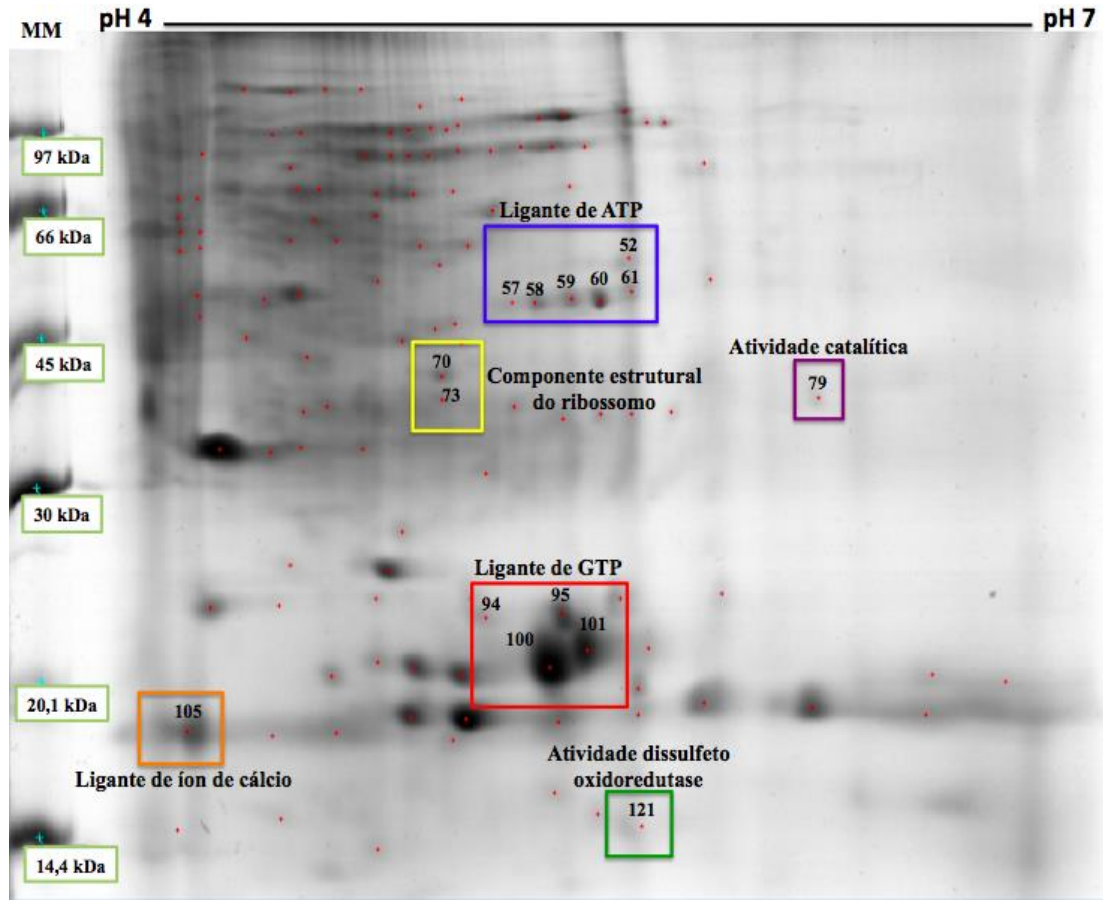
A construção do gráfico foi feita a partir do GrphPad Prism 5.0a.

As quinze proteínas de porífera identificadas usando a ferramenta TagIdent contra o banco de dados *UniProt* estão listadas na Tabela 6 bem como seus números: de *spot* correspondentes no gel 2DE de referência; de acesso do servidor *ExPASy*. Tais proteínas pertencem a categoria funcional ligante de ATP, componente estrutural do ribossomo, atividade catalítica, ligante de GTP, ligante de íon de cálcio e Atividade dissulfeto oxidoreductase, Figura 10. A categoria funcional que apresentou maior número de proteínas foi ligante de ATP, seguida por ligante de GTP.

Tabela 6 - Proteínas de *Aaptos* sp. com base no banco de dados *UniProt*.

<b>Nº spot</b>	<b>Proteína</b>	<b>Função Molecular</b>	<b>Nº de acesso</b>
52	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
57	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
58	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
59	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
60	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
61	Tirosina quinase (Isoforma SRK1)	Ligante de ATP	SRK1_SPOLA (P42686)
70	Ribossomal 40S	Componente estrutural do ribossomo	RSSA_SUBDO (Q4KTE2)
73	Ribossomal 40S	Componente estrutural do ribossomo	RSSA_SUBDO (Q4KTE2)
79	Proteína de resposta a etileno	Atividade catalítica	PDX1_SUBDO (Q8WPW2)
94	Ras-like	Ligante de GTP	RAS_GEOCY (P24498)
95	Ras-like	Ligante de GTP	RAS_GEOCY (P24498)
100	Ras-like	Ligante de GTP	RAS_GEOCY (P24498)
101	Ras-like	Ligante de GTP	RAS_GEOCY (P24498)
105	Calmodulina (CaM)	Ligante de íon de cálcio	CALM_SUBDO (O97341)
121	Tioredoxina (Trx)	Atividade dissulfeto oxidoreductase	THIO_GEOCY (O96952)

Figura 10 – Gel 2DE de referência (R2) de *Aaptos* sp. mostrando proteínas que corresponderam ao táxon porífera separadas em quadrantes de acordo com sus funções moleculares.



Para melhor ilustração os *spots* que pertencem ao táxon porífera foram separados dos de mais por quadrantes.

De acordo com as análises contra banco de dados *UniProt* os *spots* de número 52, 57, 58, 59, 60 e 61 (Figura 10) correspondem a proteína tirosina quinase (Isoforma SRK1) presentes no citoplasma da esponja de água doce *Spongilla lacustris* (OTTILIE *et al.*, 1992). A enzima Tirosina quinase pertence a família das proteínas quinase (PKs), as quais que têm como função catalisar a fosforilação reversível de proteínas transferindo o grupo fosfato (P) do ATP, em alguns casos GTP, para aminoácidos como serina, treonina ou resíduos de tirosina. Uma vez o grupo fosfato ligando-se a proteína alvo muda a conformação da mesma, assim causando modificações na sua atividade, então dizemos que a proteína fosforilada saiu do estado basal ou inativo e passou para o estado ativo (MANNING *et al.*, 2002a). As PKs estão entre as maiores famílias de genes de eucariontes e participam de inúmeras funções biológicas nos eucariontes como apoptose, transcrição gênica, replicação, metabolismo energético, controle do ciclo celular, comunicação entre células, transdução de sinal, diferenciação e dentre outras (HUNTER; PLOWMAN, 1997; MANNING *et al.*, 2002b). As PKs são classificadas

principalmente de acordo com seus domínios catalíticos conservados e podem ser divididas em duas superfamílias as serinas/treoninas quinases ou tirosinas quinases, a primeira recebe fosforilação nas serinas e nas treoninas e a segunda é fosforilada nas tirosinas. As PKs estão presentes em todas as células dos eucariontes e podem ser encontradas ancoradas à membrana plasmática (proteínas quinases receptoras – RTKs) desempenhando função de receptor (ROBINSON *et al.*, 2000); no citoplasma (proteínas quinases não-receptoras – NRTKs), atuando na sinalização celular (BENNASROUNE *et al.*, 2004). Em 1992 Otilie e colaboradores (1992) isolaram proteína tirosina quinase da esponja *Spongilla lacustres*, até aquele momento era o organismo mais simples o qual teria sido isolado este tipo de enzima, e eles observaram que a atividade enzimática quinase estava relacionada com a de vertebrados, isso devido aos genes das proteínas quinases apresentarem regiões conservadas (domínio quinase) quando era feito o alinhamento de genes similares de organismo distintos, assim esses autores sugerem que os genes da tirosina-quinase surgiram com os metazoários e que sua atividade pode ser relacionada a agregação e reconhecimento celular. As proteínas quinase não estão envolvidas apenas em processos normais das células, mas também no desenvolvimento de doenças humanas, como o câncer, asma, diabetes, doenças do sistema nervoso e dentre outras, isso devido a mutações nos genes dessas proteínas ou então por sua superexpressão (NARAYANA *et al.*, 1999; BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; VLAHOVIC; CRAWFORD, 2003). A compreensão das vias de sinalização pelas PTKs têm sido alvo de estudo para o desenvolvimento de novas drogas que possam interferir nessas vias de sinalização como por exemplo inibidores de tirosinas quinases patogênicas, especialmente em modelos de câncer (BASELGA, 2006). Desregulação na sinalização das enzimas tirosinas quinases, apresentam um estado ativo permanente, contribuem no processo de desenvolvimento de tumores que pode resultar numa forma maligna, mas essas proteínas quinase podem ser inibidas por drogas, revertendo assim a progressão maligna (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001; PRENZEL *et al.*, 2001; SLICHENMYER; FRY, 2001 ). Dessa forma a esponja marinha *Aiptos* sp. utilizada nesse trabalho pode ser empregada em estudos que possam elucidar as vias de transdução de sinais das PKs bem como ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de fármacos contra possíveis patologias como o câncer.

Os *spots* 70 e 73 (Figura 10) correspondem a proteína ribossomal 40S, componente estrutural da subunidade ribossomal 40S dos eucariontes. Os ribossomos dos eucariontes quando maduros apresentam duas regiões uma denominada 40S (pequena) e a outra 60S



(grande). A subunidade 40S é constituída por aproximadamente 33 proteínas distintas e uma molécula de RNA, 18S. A subunidade 60S é formada por aproximadamente 49 proteínas distintas e 3 moléculas de RNA, 5S, 5,8S e 28S (HENRAS *et al.*, 2008). A proteína ribossomal 40S correspondente aos *spots* 70 e 73, é importante para a formação e / ou estabilidade da subunidade pequena 40S do ribossomo de eucariontes bem como para o processamento do rRNA 20S para uma molécula de rRNA matura, 18S (*UniProt*, 2014). A pequena subunidade ribossomal é bastante utilizada em estudos de taxonomia e sistemática de espécies (WOESE *et al.*, 1990). Muitos estudos a partir das subunidades ribossomais têm demonstrado que o processo de síntese de proteínas é conservado, desde procariontes a eucariontes (HARMS *et al.*, 2001). A comparação de genes e proteínas de vertebrados com de invertebrados do táxon porífera e cnidária têm apresentado sequências altamente conservadas tanto de genes como de proteínas. Estudos comparativos de mamíferos com outros animais têm demonstrado que esponjas apresentam genes incomuns com mamíferos, onde outros animais mais evoluídos são ausentes de tais genes (KORTSCHAK *et al.*, 2003). Em 2006, Perina e colaboradores (2006) demonstraram que a maioria das proteínas ribossomais da esponja marinha *Suberites domuncula* apresentam uma maior similaridade com as proteínas ribossomais de animais vertebrados do que com outros invertebrados. A comparação das sequências conservadas das proteínas ribossomais de *S. domuncula* com a de rato demonstraram que esses animais compartilham 80 % ou mais sequências conservadas para as proteínas ribossomais (PERINA *et al.*, 2006). Esse alto grau de conservação das sequências de proteínas compartilhadas de mamíferos e esponjas também foi demonstrado em 2000 por Gamulin e colaboradores (2000) e nesse mesmo trabalho foi relatado que algumas proteínas não estão presentes em *Caenorhabditis elegans*, mas são encontradas em seres humanos e também a maioria das proteínas da esponja marinha *S. domuncula* é mais semelhante em relação às proteínas humanas do que as de *C. elegans*. Com isso as esponjas são a fonte de informações mais antiga para o estudo de proteínas de animais e suas proteínas podem ser usadas como marcadores moleculares para entender a sistemática dos metazoários bem como pode se fazer uso das proteínas conservadas, como por exemplo as proteínas ribossômicas, para avaliar taxas evolutivas entre diferentes animais (GAMULIN *et al.*, 2000). Dessa forma a proteína ribossomal 40S da esponja marinha em estudo *Aaptos* sp. pode ser utilizadas em estudos de taxonomia e sistemática de espécies.

De acordo com *UniProt* o *spot* de número 79 (Figura 10) corresponde a uma proteína que pode ter duas denominações: Proteína de resposta a etileno e Provável biossíntese de piridoxina (vitamina B6). Em 1999, Krasko e colaboradores (1999) demonstraram que a

esponja marinha *Suberites domuncula* quando exposta ao etileno reduz a apoptose induzida pela inanição bem como aumenta a regulação da concentração de cálcio intracelular. Isso devido ao aumento significativo da expressão de dois genes SDERR e CaMcinase II que codifica para a proteína de potencial responsivo a etileno e a proteína quinase II cálcio/calmodulina-dependente. A proteína de potencial responsivo a etileno da *S. domuncula* quando comparada com sequências em banco de dados revela que essa proteína apresenta 82% de similaridade de seus aminoácidos com a proteína de resposta a etileno de planta (gene hever) *Hevea brasiliensis* e não havendo até o momento outras proteínas responsiva a etileno encontrada em outros metazoários, assim é sugerido que a esponja *S. domuncula* pode ser usada como modelo para estudos que envolvam a ativação do metabolismo celular bem como no estudo de transdução de sinal e apoptose em resposta ao etileno (KRASKO *et al.*, 1999). Em 2001 Seack e colaboradores (2001) demonstraram pela primeira vez que células de mamífero respondem à etileno. Tem sido relatado que as proteínas chaves dos metazoários apresentam sequências de aminoácidos conservadas e isso pode ser observado comparando sequências de proteínas de esponjas com as de deuterostômios (MÜLLER, 1995). De acordo com o exposto a *Aaptos* sp. também pode ser usada como modelo no estudo da compreensão do metabolismo celular, transdução de sinal e apoptose.

Os *spots* 94, 95, 100 e 101 (Figura 10) correspondem a proteína Ras-like. A proteína Ras esta envolvida no processo de transdução de sinal ou seja envia sinais moleculares da membrana celular para o núcleo. Tem sido demonstrado que a proteína Ras incubada com insulina sofre fosforilação, isso ocorre através de um sistema receptor de membrana insulina-like da proteína Ras (GAWLER; HOUSLAY, 1987). A Ras está ativa quando ligada a GTP e inativa quando combinada a GDP, isso ocorre pela hidrólise do GTP em resposta a estímulos bioquímicos (FUJITA-YAMAGUCHI, 1989). Uma vez a proteína Ras ativada ela passa a interagir com um complexo receptor de lectina / lectina ou seja ela se liga a outras proteínas levando a iniciação de uma cascata de transdução de sinal intracelular, assim enviando estímulos ao núcleo para que possa ocorrer vários processos biológicos. A proteína Ras está envolvida em vários processos biológicos como proliferação celular, adesão, migração, diferenciação e apoptose celular. Quando a proteína Ras não pode voltar a seu estado inativo ou seja permanecendo na forma ativa, devido a mutações pontuais no seu gene (oncogene), isso leva a consequências ruins para o organismo como a proliferação desordenada de células cancerígenas, mesmo sem haver estímulos bioquímicos, assim o aumento da concentração de proteína Ras por ela não ser desativada costuma ser associado à formações de tumores

(ALBERTS *et al.*, 1997; MALUMBRES; PELLICER, 1998). Vários cientistas tem feito pesquisas voltadas as mutações pontuais dos genes da proteína Ras, afim de adquirir conhecimentos sobre a Ras com o intuito de desenvolver potentes ferramentas biotecnológicas para a detecção e / ou controle dos carcinomas. Gstaiger e colaboradores (2001) têm demonstrado que a Ras oriunda de genes mutados está diretamente ligada com o desenvolvimento de células tumorais. Em 1990, Robitzki e colaboradores (1990) isolaram de uma esponja marinha *Geodia cydonium* uma proteína Ras-like e verificaram que essa proteína sofre fosforilação quando incubada com insulina, assim sugerem que na *G. cydonium* a Ras-like é ativada por sistema receptor insulina / insulina e está envolvida numa cascata de sinalização podendo haver cadeia de transdução de sinal intracelular. A partir de análise da sequência de nucleotídeo do gene Ras revelou que a proteína Ras-like de *G. cydonium* apresenta elevado grau de semelhança (41%) com o gene da proteínas Ras de humanos (c-Ha-ras-1) e demonstrou também uma grande semelhança (70%) para o gene Ras de *D. discoideum*, isso demonstra que a Ras tem sido bastante conservada ao longo da evolução (ROBITZKI *et al.*, 1990). As esponjas marinhas têm sido usadas como sistema de células modelo para estudos a nível molecular (MÜLLER, 1982). De acordo com o exposto a esponja marinha usada nesse estudo *Aaptos* sp. pode ser usada em estudos como modelo de sistema de células a nível molecular para melhor compreensão do oncogene Ras bem como a via de transdução de sinal intracelular a qual a proteína Ras-like está envolvida, assim podendo desenvolver diagnósticos e potentes ferramentas biotecnológicas para a detectar e / ou controlar os carcinomas a qual a proteína Ras-like está envolvida.

Os *spot* 105 (Figura 10) correspondem a proteína calmodulina (CaM) de *Suberites documuncula*, uma proteína ubíqua em eucariontes. A CaM é uma proteína ligante, não covalente, de íons de cálcio (uma molécula liga-se a quatro íons de cálcio) encarregada de regular a concentração de cálcio no meio intracelular e está envolvida em várias vias de sinalização intracelular bem como em diversos processos no controle de enzimas (como por exemplo quinases e fosfatases), canais iônicos e outros processos biológicos (BABU *et al.*, 1985; IKURA *et al.*, 1992; BROSTROM; WOLF, 1981). A sequência de aminoácidos da CaM da esponja marinha *Geodia cydonium* foi utilizada por Schüetze e colaboradores (1999) para avaliar a relação filogenética dos eucariontes unicelulares e multicelulares e revelar a partir de dados moleculares que todos os metazoários são de origem monofilética e que os metazoários estão mais estreitamente relacionados a eucariontes multicelulares do que a eucariontes unicelulares bem como os eucariontes unicelulares apareceram em um estágio anterior à

evolução quando comparados aos eucariontes multicelulares. Dessa forma, a proteína CaM da *Aaptos* sp. pode ser utilizada como modelo em estudo de análises de filogenética comparando seres eucariontes unicelulares com multicelulares.

O *spot* 121 (Figura 10) corresponde à proteína tioredoxina (Trx). A Trx faz parte da constituição do sistema Tioredoxina, esse sistema é constituído também por Tioredoxina redutase (TrxR) e nicotinamida adenina dicucleotido fosfato – NADPH (NAKAMURA; NAKAMURA, 1997). A Trx juntamente com seu sistema tioredoxina assume importante função no estado redox do meio intracelular celular ou seja está envolvida na regulação dos níveis de oxigênio reativo, assim atuando na defesa antioxidante da célula uma vez que as proteínas intracelulares são susceptíveis ao estresse oxidativo. O sistema tioredoxina tem sido relatado como regulador da apoptose, pois ele é responsável pelo reparo de proteínas que sofreram algum dano em sua estrutura, dessa forma a Trx está relacionada com a sobrevivência das células e morte celular (HOLMGREN; BJ ÖRNSTEDT, 1995). O elevado nível de oxigênio reativo no meio intracelular juntamente com a baixa atividade oxidante pelas enzimas, como por exemplo a Trx, têm sido relatada como fatores envolvidos no desenvolvimento de carcinomas e ao analisar o nível de expressão dessas enzimas em vários tipos de cânceres tem-se observado uma redução na expressão delas (ALMONDES *et al.*, 2010; CUTLER, 2005; RUBARTELLI *et al.*, 1992). Diante do achado da proteína Trx na *Aaptos* sp. usada nesse trabalho essa esponja marinha pode ser empregada como modelo em estudos que envolvam o estresse oxidativo pelas células devido a presença de oxigênio reativo no meio intracelular e tendo como consequência o proliferação celular desordenada resultado na aparecimento de células cancerígenas.

## 4 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi possível extrair proteínas viáveis de *Aaptos* sp., oriunda do Icaraizinho de amontada, Ceará, para estudos proteômicos bem como possível identificar proteínas que apresentam funções moleculares importantes, dessa forma podendo ter potencial biotecnológico .

Foi obtido um mapa de referência do perfil protéico da esponja marinha *Aaptos* sp. através da eletroforese bidimensional (2DE). As proteínas presentes no mapa de referência protéico corresponderam a 122 proteínas as quais tiveram seu perfil caracterizado quanto ao pI e massa molecular aparente através de dados obtidos por 2DE. As proteínas foram identificadas contra banco de dados *UniProt* através da ferramenta de identificação TagIdent disponível no Portal de Bioinformática *ExPaSy*.

Das 122 proteínas identificadas 61, 46 e 15 pertencem aos táxon cnidária, deuterostomia e porífera, respectivamente. As proteínas identificadas de porífera pertencem a categoria funcional: ligante de ATP, componente estrutural do ribossomo, atividade catalítica, ligante de GTP, ligante de íon de cálcio e atividade dissulfeto oxidoreductase. Sendo a categoria funcional ligante de ATP e de GTP com maior número de *spots*. Adicionalmente, houve proteínas expressas com importantes funções moleculares já relatadas na literatura, porém não em *Aaptos* sp., assim indicando a importância desta esponja marinha como fontes de informação proteicas que poderão ser estudadas no futuro quanto ao seu potencial uso como ferramentas biotecnológicas em diversas áreas, e podendo ser empregadas com modelos em estudos que possa elucidar as vias metabólicas e desenvolvimento de diagnósticos e fármacos contra possíveis patologias como por exemplo o câncer bem como também em estudos de relações filogenéticas e apoptose celular.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAAF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997.
- ALMONDES, K. G. S.; LEAL, G. V. S. L.; COZZOLINO, S. M. F.; PHILIPPI, S. T.; RONDÓ, P. H. C. O papel das selenoproteínas no câncer. **Rev Assoc Med Bras**, v. 4, p. 484-8, 2010.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W., *et al.* Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, Oct 5, p.403-410. 1990.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, n. 3-4, p. 353-357, 1997.
- BABU, Y. S.; SACK, J. S.; GREENHOUGH, T. J.; BUGG, C. E.; MEANS, A. R.; COOK, W. J. Three-dimensional structure of calmodulin. **Nature**, v. 315, p. 37-40, 1985.
- BAIROCH, A.; APWEILER, R.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE, D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acid Reserach**, v. 33, p. 154-159, 2005.
- BAPTISTA, J. P. Os Princípios fundamentais ao longo da história da Física. **Revista Brasileira do Ensino de Física**. v. 28. n.4. p. 541-553, 2006.
- BASELGA, J. Targeting tyrosine kinases in câncer: the second wawe. **Science**, v. 312, p. 1175-8, 2006.
- BENNASROUNE, A.; GARDIN, A.; AUNIS, D.; CREMEL, G.; HUBERT, P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v. 50, p. 23-38, 2004.
- BIRON, D. G.; BRUN, C.; LEFEVRE, T.; LEBARBENCHON, C.; LOXDALE, H. D.; CHEVENET, F.; BRIZARD, J. P.; THOMAS, F. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. **Proteomics**, v. 6, p. 5577-5596, 2006.
- BLUEGGEL, M.; CHAMRAD, D.; MEYER, H. E.; Bioinformatics in proteomics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 79-88, 2004.
- BLUME-JENSEN, P.; HUNTER T.; Oncogenic kinase signaling. **Nature**, v. 411, p. 355-65, 2001
- BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). **FEBS Letters** v. 14. p. 1-6, 1997.
- BOWLING, J. J.; PENNAKA, H. K.; IVEY, K.; WAHYUONO, S.; KELLY, M.; SCHINAZI, R. F.; VALERIOTE, F. A.; GRAVES, D. E.; HAMANN, M. T. Antiviral and anticancer optimization studies of the DNA-binding marine natural product aptamine. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 71, n. 3, p. 205-215, 2008.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRETER, H. J.; GREBENJUK, V. A.; SKOROKHOD, A.; MÜLLER, W. E. G. Approaches for a Sustainable Use of the Bioactive Potential in Sponges: Analysis of Gene Clusters, Differential Display of mRNA and DNA Chips. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**. v. 37. p. 198-230, 2003.

BROSTROM; C. O.; WOLF, D. Properties and function of calmodulin. **Biochem. Pharm.** v. 30, p. 1395-1405, 1981.

BROWN, S. M. Bioinformatics: A Biologist's guide to biocomputing and the internet. [S.l.]: **Bio Techniques Books Division**, 2000.

BURNS, E.; IFRACH, I.; CARMELI, S.; PAWLIK, J. R.; ILAN, M. Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. I. **Chemical defese. Marine Ecology Progress Series.** v. 252. p. 105-114, 2003.

CAHILL, D. J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p.1-22, 2001.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.

CASH, P. Proteomics in medical microbiology. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1187 – 1201, 2000.

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

CHAVES, D. F. S. **Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por *Herbaspirillum seropedicae***. 2008. 156f. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

CHEN, P. Y.; POPOVIC, P. M. **Correlation: Parametric and Nonparametric**. London: Sage, 2002.

CUTLER, R. G. Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. **Ann NY Acad Sci.** v. 1055, p. 93-135, 2005.

DRESCH, R. R.; ZANETTI, G. D.; LERNER, C. B.; MOTHESE, B.; TRINDADE, V. M. T.; HENRIQUES, A. T.; HAMPE, M. M. V. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugate*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Elsevier**. v. 148. p. 23-30, 2008.

DYSHLOVOY, S. A.; NAETH, i.; VENZ, S.; PREUKSCHAS, M.; SIEVERT, H.; JACOBSEN, C.; SHUBINA, L. K.; SALAZAR, M. G.; SCHARF, C.; WALTHER, R.; KREPSTAKIES, M.; PRIYADARSHINI, P.; HAUBER, J.; FEDOROV, S. N.; BOKEMEYER, C.; STONIK, V. A.; BALABANOV, S.; HONECKER, F. Proteomic Profiling of Germ Cell Cancer Cells Treated with Aaptamine, a Marine Alkaloid with Antiproliferative Activity. **J. Proteome Res.**, v. 11, p. 2316-2330, 2012.

DYSHLOVOY, S. A.; FEDOROV, S. N.; SHUBINA, L. K.; KUZMICH, A. S.; BOKEMEYER, C.; AMSBERG, G. K.; HONECKER, F. Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1-, NF-kB-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

ERPENBECK, D.; VAN SOEST, R. W. M. Status and perspective of sponge chemosystematics. **Mar Biotechnol**, v. 9, p. 2–19, 2007.

- FUJITA-YAMAGUCHI, Y.; KATHURIA, S.; XU, Q. Y.; MCDONALD, J. M.; NAKANO, H.; KAMATA, T. In vitro tyrosine phosphorylation studies on RAS proteins and calmodulin suggest that polylysine-like basic peptides or domains may be involved in interactions between insulin receptor kinase and its substrate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 19, p.7306-10, 1989.
- FULTON, M. H.; KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environ Toxicol Chem**. v. 20. n. 1. p. 37- 45, 2001.
- GAMULIN, V.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. Sponge proteins are more similar to those of Homo sapiens than to Caenorhabditis elegans. **Biol. J. Linn. Soc.** v. 71, p.821–828, 2000.
- GASTEIGER, E. GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, p. 3784-3788, 2003.
- GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A.; Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: **The proteomics protocols handbook**, p. 571-607, 2005.
- GAWLER, D.; HOUSLAY, M. D. Insulin stimulates a novel GTPase activity in human platelets. **FEBS Lett**. v. 216, p.94-98, 1987.
- GE HEALTHCARE. **2-D Electrophoresis – Principles and Methods**. Sweden: GE Healthcare, 2007. Genome Online DataBase. Disponível em: <<https://gold.jgi-psf.org/index>> Acessado em: 04 de jan.
- GERET, F.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in Ruditapes decussates? **Ecotoxicology**, v. 12, p. 17-26, 2003.
- GLEISER, M. **A dança do universo**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.
- GÖRK, A.; KLAUS, A.; LUCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. **Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis**. Munich: Technical University of Munich, 2007.
- GOULD, S. J. The Evolution of Life on Earth. **Scientific American**. p. 59-67, 1994.
- GSTAIGER, M.; JORDAN, R.; LIM, M.; CATZAVELOS, C.; MESTAN, J.; SLINGERLAND, J.; KREK, W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. **Oncogene**, v. 98, p. 5043-5048, 2001.
- HANCOCK, W.S.; WU, S.L.; STANLEY, R.; GOMBOCZ, E.A. Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. **Trends Biotech.**, v.20, p.S39-S44, 2002.
- HARMS, J. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. **Cell**, v.107, p.679–688, 2001.
- HAYNES, P.; YATES, J, R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**, v.17, p.81-87, 2000.
- HENRAS, A. K.; SOUDET, J.; GERUS, M.; LEBARON, S.; CAIZERGUES- FERRER, M.; MOUGIN, A.; HENRY, Y. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. **Cell Mol Life Sci**, 65: 2334-2359, 2008.



- HESKETH, A.R.; CHANDRA, G.; SHAW, A.D.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B.; BIBB, M.J.; CHATER, K.F. Primary and secondary metabolism, and post translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. **Molecular Microbiology**, v.46, p.917-932, 2002.
- HICKMAN, C. P.; ROBERTS L. S. A. **Princípios integrados de zoologia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.
- HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M.; Thioredoxin and thioredoxin Reductase. **Methods in Enzymology**. v. 252, p. 199-208, 1995.
- HOOVER, J. N. A.; VAN SOEST, R. W. M. **Systema porifera: A guide to the classification of sponges**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
- HUNTER, PLOWMAN, T. G. D. The protein kinases of budding yeast: six score and more. **Trends Biochem Sci**. v. 22, p. 18-22, 1997.
- IKURA, M.; CLORE, G. M.; GRONENBORN, A. M.; ZHU, G.; KLEE, C. B.; BAX, A. Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. **Science**, v. 256, p. 632-638, 1992.
- ImageMaster 2D platinum: **User Manual**. GE Healthcare. [S.l.]. 2008.
- JACQUES, S. M. C. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255p.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.
- KORTSCHAK, R. D.; SAMUEL, G.; SAINT, R.; MILLER, D. J. EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. **Curr. Biol**. v.13, p.2190–2195, 2003.
- KRAJ, A.; SILBERRING, J. **Proteomics: introduction to methods and applications**. New Jersey: Wiley, 2008.
- KRASKO, A.; SCHRÖDER, H. C.; PEROVIC, S.; STEFFEN, R.; KRUSE, M.; REICHERT, W.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. Ethylene Modulates Gene Expression in Cells of the Marine Sponge *Suberites domuncula* and Reduces the Degree of Apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 31524-31530, 1999.
- KUTSCHERA, U.; NIKLAS, K. J. The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. **Naturwissenschaften** . v. 91. n. 6. p. 255-276, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, p. 680-685, 1970.
- LARGHI, E. L.; BOHN, M. L.; KAUFMAN, T. S. Aaptamine and related products. Their isolation, chemical syntheses, and biological activity. **Tetrahedron**, v. 65, n. 22, p. 4257–82, 2009.
- LEYS, S. P., ROHKSAR, D. S., DEGNAN, B. M. SPONGES. **Current Biology**, v. 15. n. 4. p. 114-115, 2005.
- LIEBLER, D. C.; Proteomics and the Proteome. Introduction to Proteomics, **Humana Press**, p 1- 24, 2002.

- LOPEZ, M. F. Proteome analysis: I Gene products are where the biological action is. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1, p. 191-202, 1999.
- MALUMBRES, M.; PELLICER, A. Ras Pathways to Cell Cycle Control and Cell Transformation, **Front. Biosci.** v. 3, p. 887-912, 1998.
- MANNING, G.; PLOWMAN, G. D.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends Biochem. Sci.** v. 27, p.514-20, 2002. b.
- MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM S.; The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, p. 1912-34 , 2002 a.
- MARQUES, D.; ALMEIDA, M.; XAVIER, J.; HUMANES, M. Biomarkers in marine sponges: acetylcholinesterase in the sponge *Cliona celata*. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**. p. 427-432, 2007.
- MARQUES, D.; ALMEIDA, M.; XAVIER, J.; HUMANES, M. **Biomarkers in marine sponges: acetylcholinesterase in the sponge *Cliona celata***. Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Série Livros, v. 28, p. 427-432, 2007.
- MOORE, D. S. **The Basic Practice of Statistics**. New York: Freeman, 2007.
- MÜLLER, W. E. G. Molecular phylogeny of metazoan [animals]: monophyletic origin. **Naturwissenschaften**. v. 82, p. 321-329, 1995.
- MÜLLER, W. E. G.; WIENS, M.; MÜLLER, I. M.; BRÜMMER, F. From cells to primmorphs and adult sponges: an approach to understand the bauplan of demospongiae. **Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova**. v.68, p. 39-54, 2004.
- MÜLLER, W.E.G. Cell membranes in sponges. **Int. Rev. Cytol.** v. 77, p. 129-181, 1982.
- MUSEU DE ZOOLOGIA VIRTUAL. Disponível em:  
<[http://www.mzufba.ufba.br/WEB/MZV\\_arquivos/animais.html](http://www.mzufba.ufba.br/WEB/MZV_arquivos/animais.html)> Acessado em 03 de jan de 2015.
- NAKAMURA, N.; NAKAMURA, Y. Redox regulation of cellular activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 51-369, 1997.
- NARAYANA, N.; DILLER, T. C.; KOIDE, K.; BUNNAGE, M. E.; NICOLAOU, K. C.; BRUNTON, L. L.; XUONG, N.; EYCK, T.; TAYLOR, S. S.; Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Biochemistry**, v. 38, p. 2367-2376, 1999.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4041, maio. 1975.
- ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 252-62, 2005.
- OTTILIE S., RAULF F., BARNEKOW A., HANNIG G., SCHARTL M. Multiple src-related kinase genes, srk1-4, in the fresh water sponge *Spongilla lacustris*. **Oncogene**, v.7, p.1625-1630, 1992.
- PALZKILL, T.; Protein Identification and Analysis. Proteomics, **Kluwer Academic Publishers**, p 5 – 22, 2002.

- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.
- PATERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature**. v. 33, p. 311-323, 2003.
- PERINA, D.; CETKOVIC, H.; HARCET, M.; PREMZL, M.; LUKIC-BILELA, L.; MÜLLER, W. E. G.; GAMULIN, V. The complete set of ribosomal proteins from the marine sponge *Suberites domuncula*. **Gene**, v. 366, p. 275-284, 2006.
- PRENZEL, N.; FISCHER, O. M; STREIT, S.; HART, S.; ULLRICH, A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 8, p. 11-31, 2001.
- PRODOCIMI, F. **Curso On Line: Introdução à Bioinformática**. [S.I.]: Portal Biotecnologia, 2007. Disponível em: <[http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07\\_CursoBioinfo.pdf](http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf)>. Acesso em: 09 jan. 2015, 10:00.
- RAINBOW, P. S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 183-192, 1995.
- RAINBOW, P. S.; KRIEFMAN, S.; SMITH, B. D.; LUOMA, S. N. Have the bioavailabilities of trace metals to a suite of biomonitors changed over three decades in SW England estuaries historically affected by mining? **The Science of The Total Environment**, v. 409, p. 1589-1602, 2011.
- RAINBOW, P. S.; PHILLIPS, D. J. H. "Cosmopolitan Biomonitors of Trace-Metals". **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, p. 593-601, 1993.
- ROBINSON, D. R.; WU, Y. M.; LIN, S. F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene**, v. 19, p. 5548-57, 2000 .
- ROBITZKI, A.; SCHRÖDER, H. C. UGARKOVIC, D.; KUCHINO, Y.; KURELEC, B.; GAMULIN, V.; MÜLLER, W. E. G. Regulated expression and phosphorylation of the 23 - 26-kDa rus protein in the sponge *Geodiu cydonium*. **J. Biochem.**, v. 192, p. 499-506, 1990.
- RUBARTELLI, A.; BAJETTO, A.; ALLAVENA, G.; WOLLMAN, E.; SITIA, R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 24161-4, 1992.
- RÜTZLER, K. SPONGES ON CORAL REEFS: A COMMUNITY SHAPED BY COMPETITIVE COOPERATION. **Bdl. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova**. v. 68. p. 85-148, 2004.
- SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. **Lisboa: Boletim de Biotecnologia**, p 6 – 17, 2004.
- SARA, M.; BAVESTRELLO, G.; VIETTI, R. C.; CERRANO, C. Endosymbiosis in sponges: relevance for epigenesis and evolution. **Symbiosis**. v. 25. p. 57-70, 1998.
- SCHÜTZE, J.; KRASKO, A.; CUSTODIO, M. R.; EFREMOVA, S. M.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. Evolutionary relationships of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 266, p. 63-73, 1999.

SEACK, J.; PEROVIC, S.; GAMULIN, V.; SCHRÖDER, H. C.; BEUTELMANN, P.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W.E.G. Identification of highly conserved genes: SNZ and SNO in the marine sponge *Suberites domuncula*: their gene structure and promoter activity in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1520, p. 21-34, 2001.

SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A., *et al.* Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time of flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, v.73, n.9, p.1917-1926. 2001.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**. v. 1. n. 6. p. 2856-2860, 2006.

SLICHENMYER, W. J; FRY, D. W. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. **Semin. Oncol.**,v. 28, p. 67-79, 2001.

STEINER, J. E. Origem do universo e do homem. **Estudos Avançados**. v. 20. n. 58. p.232-248, 2006.

TAM, L. T.; ANTELMANN, H.; EYMANN, C.; ALBRECHT, D.;BERNHARDT, J.; HECKER, M. Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.4565-4585, 2006.

TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71. n. 2. p. 295-347, 2007.

TSANGARIS, C.; PAPATHANASIOU, E.; COTOU, E. Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. **Ecotoxicol Environ Saf.** v.66, n.2, p. 232-43, 2006.

TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics, **Nature**, v. 422, p. 193-197, 2003.

VASCONCELOS, E. A. R.; NOGUEIRA, F. C. S.; ABREU, E. F. M.; GONÇALVES, E. F.; SOUZA, P. A. S.; CAMPOS, F. A. P. Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia**, v. 62, p. 447-450, 2005.

VIEIRA, S. **Introdução a bioestatística**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Campus, 1980.

VLAHOVIC, G.; CRAWFORD, J. Activation of tyrosine kinases in cancer. **Oncologist**, v. 8, p. 531-38, 2003.

VOGEL, S. Current-induced flow through living sponges in nature. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.74. p. 2069-2071, 1977.

WANICK, R. C.; BARBOSA, H. S.; FRAZÃO, L. R.; SANTELLI, R. E.; ARRUDA, M. A. Z.; COUTINHO, C. C. Evaluation of differential protein expression in *Haliclona aquarius* and sponge-associated microorganisms under cadmium stress. **Anal Bioanal Chem**. v. 405. p. 7661-7670, 2013.

WEBER, K.; OSBORN. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **M. J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**, Spronger, p 1-12, 1997.

WILKINS, M. R. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotech. Gen. Eng. Rev.**, v. 13, p. 19-50, 1995.

WILKINSON, C. R. Symbiotic interactions between marine sponges and algae. **Biopress Limited, Bristol, United Kingdom**, p. 111-151, 1992.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.87, p.4576-4579, 1990.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSK, M. X.; Untangling the ErbB signaling network. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 127-37, 2001.