

## PROTEÔMICA: UMA FERRAMENTA ANALÍTICA

Ana Carla Peixoto Guissoni<sup>1</sup>  
Divina das Dores de Paula Cardoso<sup>2</sup>

### RESUMO

A proteômica é uma técnica analítica que permite determinar proteínas em uma amostra biológica. A análise proteômica é considerada uma das técnicas mais utilizadas para estudar proteínas diferencialmente expressas em uma célula, quando infectada por microrganismos. Desta forma, a análise proteômica pode fornecer informações importantes sobre a relação patógeno-célula, patogênese do microrganismo, bem como contribuir para a identificação de moléculas alvos que podem ser úteis tanto para o desenvolvimento de vacinas bem como para marcadores, de diagnósticos e terapêuticos. Este manuscrito apresenta um resumo de diferentes metodologias com abordagem na proteômica as quais têm sido utilizadas para o estudo de proteínas diferencialmente expressas de células infectadas ou não infectadas por microrganismos.

**Palavras-chave:** Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massa, Patogênese, Proteômica.

### ABSTRACT

Proteomics is an analytical technique that allows the determination of proteins in a biological sample. Proteomic analysis is one of the most used techniques to study proteins differentially expressed in a cell when infected by microorganisms. In this way, the proteomic analysis can provide important information on the pathogen-cell relationship, pathogenesis of the microorganism, as well as contribute to the identification of target molecules that may be useful both for the development of vaccines as well as for markers, diagnostics and therapeutics. This manuscript presents a summary of different methodologies with a proteomic approach which have been used for the study of differentially expressed proteins from cells infected or uninfected by microorganisms.

**Keywords:** Liquid Chromatography, Mass spectrometry, Pathogenesis, Proteomic.

## 1 INTRODUÇÃO

<sup>1</sup> Laboratório de Virologia Humana, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. Email: [anaguisoni@gmail.com](mailto:anaguisoni@gmail.com)

<sup>2</sup> Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade de São Paulo, Brasil (1997), Professora da Universidade federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. Membro Conselho Diretor do Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação, Brasil. E-mail: [dcardoso@ufg.br](mailto:dcardoso@ufg.br).

A análise proteômica permite o estudo das proteínas e suas isoformas a partir de amostras biológicas (PANDEY e MANN, 2000). Historicamente, a proteômica surgiu no final da década de 1970, criando as bases de dados de proteínas com o uso de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians em 1994, significando um conjunto de proteínas expressas por um genoma, ou no caso de organismos multicelulares, proteínas expressas por tecido ou células diferenciadas. (WILKINS et al., 1996).

Enquanto o genoma de um organismo individual é essencialmente estático, o proteoma é dinâmico e variável dependendo da fase do ciclo celular. No contexto, a investigação de produtos gênicos é uma estratégia para estudar doenças, bem como problemas biológicos complexos (PANDEY e MANN, 2000; VALLEDOR e JORRIN, 2011). Neste sentido, a análise proteômica permite observar a expressão dos genes e a concentração relativa de seus produtos em condições de células infectadas e não infectadas.

Resumidamente, a análise proteômica permite a identificação: (1) das vias metabólicas da célula, contribuindo para o conhecimento da bioquímica; (2) novas moléculas de extratos biológicos naturais, que podem levar ao desenvolvimento de novas drogas; (3) marcadores biológicos específicos de determinado estado patológico que podem ser úteis no diagnóstico de doenças e no monitoramento de sua evolução e também no tratamento (MANCONE et al., 2012; ZHANG et al., 2005; ZHAO et al., 2003).

Também, na área da agronomia, a proteômica tem sido utilizada para identificar proteínas de plantas com atividade inseticida (BERNAL et al., 2006; AGAPITO-TENFEN et al., 2014), assim como proteínas relacionadas ao mecanismo de resistência de plantas a pragas ou microrganismos patogênicos (ROCHA et al., 2007; WU et al., 2013).

Para a microbiologia, a proteômica permitiu estudar a relação patógeno-hospedeiro de diferentes microrganismos incluindo bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* (CALDER et al., 2015) e *Helicobacter pylori* (JUNGBLUT et al., 2010) além de parasitas, como o *Plasmodium falciparum* (BERTIN et al., 2016). Ainda, em termos dos vírus, alguns tipos tem sido estudados através desta ferramenta como HAdV-2 (BADR et al., 2019), HAdV-40 (GUISSONI et al., 2018), Hepatitis C (YE et al.,

2015), Hepatitis E (SHEN et al., 2014), Hepatitis D (MENDES et al., 2013), Influenza H1N1(COOMBS et al., 2010), H5N1 (Wang et al., 2016) e Dengue (CARUSO et al., 2017).

70

Dois plataformas são utilizadas na análise proteômica. A primeira, fundamental para a segunda plataforma, consiste na separação dos componentes a serem analisados. As técnicas comumente utilizadas na primeira plataforma são a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) além de técnicas de Cromatografia Líquida (CL) de Fase Reversa (FR-CLAE) e Ultra Eficiência (CLUE). A segunda plataforma visa caracterizar os compostos separados, sendo a espectrometria de massas *in tandem* (MS / MS) considerada a metodologia mais adequada (MAXWELL e FRAPPIER, 2007; WALTHER e MANN, 2010).

O objetivo deste manuscrito é apresentar de forma resumida as técnicas proteômicas aplicáveis à pesquisa biológica.

## 2 Metodologias Proteômicas

### 2.1 Eletroforese bi-dimensional (2-D)

A técnica foi inicialmente desenvolvida por O'Farrell e Klose em 1975. É uma técnica que permite a separação de moléculas, com base em sua migração por um campo elétrico. Em termos práticos, a taxa de migração de uma determinada proteína depende da força do campo, sua carga elétrica e o coeficiente de atrito. No processo, a separação é feita em gel, geralmente poliacrilamida, devido ao fato de seus componentes serem quimicamente inertes e formarem poros de tamanho homogêneo (GÖRG et al., 1985; RABILLOUD et al., 1997) sendo a proteína visualizada como mancha após a coloração adequada. O procedimento permite identificar isoformas da mesma proteína tendo como base seus diferentes pontos isoelétricos (pI) e peso molecular (PM). Por esta metodologia pode-se obter perfis bidimensionais completos de uma amostra, além de comparação entre diferentes amostras. Neste sentido, a

aparência ou desaparecimento dos pontos podem fornecer informações sobre proteínas específicas de um determinado estágio, enquanto a intensidade destes fornece informações quantitativas sobre a expressão diferencial de polipeptídeos (O'FARRELL, 1975, RABILLOUD et al., 1997).

Para separação de proteínas por eletroforese 2-D, as moléculas devem ser adequadamente extraídas do material biológico, passo crítico para obtenção de bons resultados. Devido à variedade de tipos e origens de amostras biológicas, o procedimento de extração requer otimização individual, e, na maioria dos casos, as proteínas precisam ser solubilizadas, desnaturadas e tratadas com agentes redutores (BARBOSA et al., 2012).

No procedimento, as proteínas são separadas em duas dimensões: na primeira, a separação ocorre em função do pI e na segunda, de acordo com o PM (O'FARRELL, 1975). Nesta etapa, denominada de focalização isoeletrica (IEF), as moléculas migram na faixa de gel que possua gradiente de pH imobilizado (IPG-immobilized pH gel) onde as cargas são iguais a zero (BJELLQVIST et al., 1982 ; O'FARRELL, 1975). As tiras de géis são feitas pela polimerização de acrilamida com substância contendo tampões ácidos e básicos. Na segunda dimensão, o material é analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) onde as proteínas são separadas de acordo com o seu PM. Para visualização das bandas de proteínas, os géis são corados com nitrato de prata ou azul coomassie brilhante (GÖRG et al., 2000) sendo que as imagens dos géis podem ser digitalizadas com a ajuda de scanner específico, possibilitando posterior análise por software (ROCHA et al., 2005)(Figura 1).

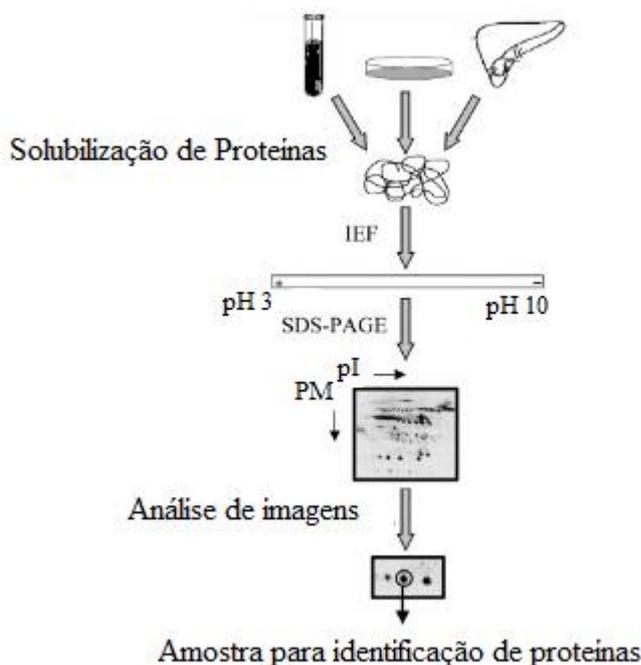


Figura 1: Separação de proteínas por eletroforese 2-D. Fonte: Fonte: Barbosa et. al 2012 modificado.

## 2.2 Cromatografia Líquida (CL)

A Cromatografia Líquida é uma técnica de separação físico-química amplamente utilizada para o estudo de diferentes moléculas, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e outras substâncias, como fármacos e pesticidas.

O sistema é composto pelos seguintes componentes: reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento, sistema de injeção de amostra, colunas cromatográficas e detectores (SKOOG et al., 2002) (Figura 2). No procedimento, a amostra é transportada através de uma coluna que contém uma fase móvel (líquida), que é ancorada por uma fase estacionária imiscível fixa. Os componentes da amostra que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto aqueles que se ligam mais fracamente se movem mais rapidamente. Assim, conseqüente às diferentes mobilidades, dá-se a separação dos componentes em bandas ou zonas (RIVIER e MCCLINTOCK, 1983).

Existem dois métodos cromatográficos de CL principalmente usados na proteômica: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (AZARKAN et al., 2007).

A RP-CLAE é o tipo mais comum e conta com uma diversidade de fases móveis e estacionárias. Duas colunas de tamanhos diferentes são usadas na fase estacionária, enquanto na fase móvel é usado solvente orgânico e aquoso (ANDRE et al., 2006; AZARKAN et al., 2007).

Por outro lado, a CLUE oferece vantagens em termos de resolução, velocidade e sensibilidade (NOVÁKOVÁ et al., 2006). Baseia-se nos mesmos princípios da RP-CLAE, mas usa nas partículas estacionárias fases menores que 2  $\mu\text{m}$ , o que aumenta a resolução e reduz o tempo de análise. A fase móvel possui um sistema de solventes binários com duas bombas individuais em série que fornecem gradientes de alta pressão (SWARTZ, 2005; NOVÁKOVÁ et al., 2006).

Ambas as técnicas podem ser integradas com espectrometria de massa (EM) facilitando o estudo de diferentes organismos.

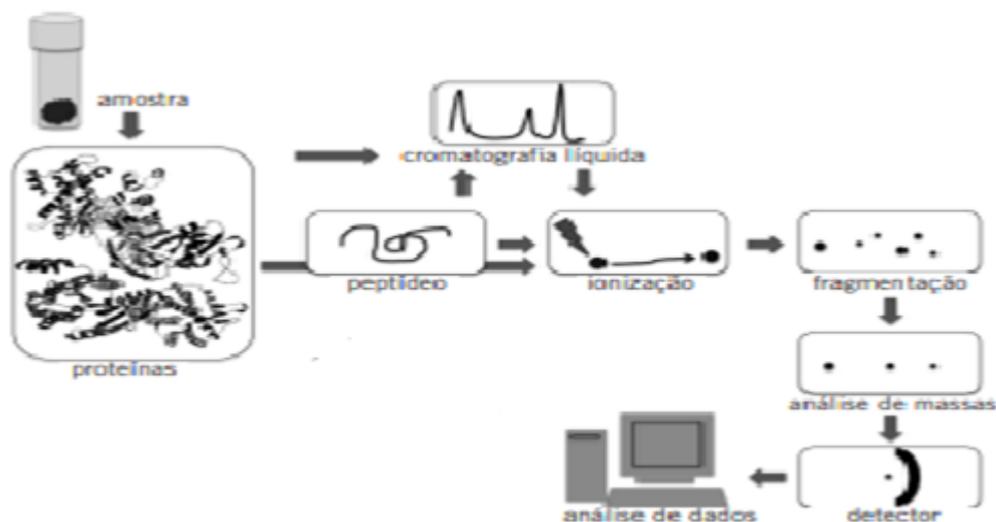


Figura 2: Separação de proteínas por cromatografia líquida, ionização, fragmentação, análise e detecção de peptídeos e análise de dados. Fonte: Barbosa et. al 2012 modificado.

### 2.3 Espectrometria de massa (EM)

A espectrometria de massa surgiu no início do século XX e tornou-se uma importante ferramenta analítica, permitindo a identificação e / ou a quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos. Além disso, com o desenvolvimento de técnicas de EM voltadas para a análise de biomoléculas, tornou-se importante em pesquisas biológicas, como a investigação de proteoma. A metodologia fornece uma massa rápida, precisa e sensível de compostos como proteínas e peptídeos (FENN et al., 1989; AEBERSOLD e MANN, 2003).

A EM é um instrumento que separa os íons móveis com base em sua relação entre massa e carga ( $m / z$ ) (FENN et al., 1989). O equipamento compreende uma fonte de ionização com um ou mais analisadores de massas e com um detector. O primeiro componente é usado para gerar íons peptídeos ou proteínas, geralmente transferindo prótons ( $H^+$ ) para moléculas sem alterar sua estrutura química. Os íons são acelerados por um campo elétrico e separados por  $m / z$  no analisador de massas ou selecionados de acordo com um sistema  $m / z$  previamente determinado e fragmentado *in tandem* (MS / MS). Os íons cruzam o detector, que é conectado a um computador dotado de programas para análise de dados (FENN et al., 1989; AEBERSOLD e MANN, 2003).

Átomos e moléculas neutras precisam ser ionizados para que possam ser analisados por espectrometria de massa. Dois métodos de ionização são principalmente usados: (1) Espectrometria de massa baseada na dessorção e ionização das proteínas através do laser, auxiliado por uma matriz (MALDI - Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz); e (2) Espectrometria de massa baseada em ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI - ionização por eletrospray) (ROCHA et al., 2005).

Na ionização do tipo MALDI, a solução contendo a amostra é misturada com uma solução de matriz orgânica supersaturada, que absorve forte radiação eletromagnética a um determinado comprimento de onda. A solução resultante da mistura é então aplicada a uma placa de metal onde a evaporação do solvente ocorre com cristalização. A placa é então transferida para o espectrômetro, onde o cristal formado é bombardeado por um feixe de laser de alta potência, com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da matriz. Essa energia é adsorvida

pela matriz e transferida para a amostra, resultando em íons da fase gasosa que seguem para o analisador de massas (ZENOBI e KNOCHENMUSS, 1998).

Considerando o sistema ESI, o processo de ionização ocorre em função da pressão atmosférica e da temperatura. No procedimento, uma solução levemente ácida ou básica contendo a amostra é bombeada a uma taxa de fluxo de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico submetido a uma alta diferença de potencial (3-5 kV) em relação ao eletrodo cilíndrico que circunda a saída capilar. Assim, é formada uma dispersão de gotículas carregadas que passam através de um gás de secagem que permite que o solvente evapore tornando essas gotículas cada vez menores, de modo que a densidade de carga se torna tão alta que as moléculas retidas nas gotículas sejam ejetadas da fase gasosa para o analisador de íons (ARDREY, 2003).

Os diferentes analisadores divergem em relação ao modo de aceleração dos íons e os separam de acordo com a relação  $m/z$  e não somente de acordo com a massa. As três principais características de um analisador são limite de massa, transmissão iônica e potência de resolução de massa. O limite de massa é o maior valor de massa que pode ser medido e é expresso em daltons (Da) para um íon de carga unitária, ou seja,  $z = 1$ . A transmissão é a razão entre o número de íons chegando ao detector e os íons produzidos na fonte (DE HOFFMANN et al., 1996; WATSON, 1997).

Três analisadores têm sido amplamente utilizados: TOF (*Time of Flight* - Tempo de voo), Quadrupolo (Qs) e o *ion trap* (Armadilha de íons) (MAY et al., 2011). Na TOF, os íons são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e passam por um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional à sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é usado para gerar o valor  $m/z$ . O detector converte sinal da passagem do íon para o sinal analógico e o resultado final é expresso como um gráfico de  $m/z$  versus intensidade (contagem de íons), referido como o espectro MS (FENN et al., 1989). Os espectros gerados são comparados com a informação disponível em bases de dados específicas como por exemplo a MASCOT (PERKINS et al., 1999) e SEQUEST (ENG et al., 1994), permitindo a identificação da proteína de interesse.

Os analisadores quadrupolo apresentam um conjunto de quatro eletrodos de haste que funcionam como filtros de massa. Entre esses eletrodos, um campo elétrico garante que apenas os íons de uma dada razão  $m/z$  sigam o caminho do detector enquanto os outros são desviados (CHERNUSHEVICH et al., 2001).

Os analisadores do tipo armadilha de íons filtram e interceptam os íons dos campos elétricos tridimensionais de interesse, que são liberados gradualmente em ordem crescente de  $m/z$  (WANG et al., 1993). Uma variante do analisador de armadilhas de íons é o denominado *orbitrap* no qual os íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional à raiz quadrada da razão  $m/z$  que pode ser determinada com alta precisão (WALTHER e MANN, 2010).

Os espectros de massa obtidos a partir do espectrômetro de massa são processados e comparados com um banco de dados para a identificação das proteínas. Entre os softwares disponíveis para identificar proteínas, baseados em bancos de dados, destacam-se: MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>), ProLuCID/SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/prolucid/>), X tandem (<http://www.thegpm.org/tandem/>), Comet (<http://cometms.sourceforge.net/>).

### 3 CONCLUSÃO

A análise proteômica pode ser considerada uma técnica importante para o estudo de diferentes organismos, incluindo microrganismos, uma vez que permite a identificação e quantificação sistemática de um proteoma a partir de amostras biológicas. Desta forma, contribui para a compreensão da relação patógeno-célula e para a descoberta de moléculas alvos no sentido de prevenção e terapêutica específicas.

## REFERÊNCIAS

AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 422: 13-20, 2003.

AGAPITO-TENFEN SZ, VINICIUS VILPERTE, RAFAEL FONSECA BENEVENUTO, CARINA MACAGNAN ROVER, TERJE INGEMAR TRAAVIK2 AND RUBENS ONOFRE NODAR. Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsp transgenes on transgenic maize proteome. **BMC Plant Biology** 14:346, 2014.

ANDRE M, LE CAER JP, GRECO C, PLANCHON S, NEMER W, BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E, CHAMOT- ROOKE J, LE NAOUR F. Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/ MS and MALDI-FTICR-MS. **Proteomics** 6: 1437-1449, 2006.

Ardrey RE. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley. Chapter 2: **Liquid Chromatography** (p. 7-31). Huddersfiel, 2003

AZARKAN M, HUET J, BAEYENS-VOLANT D, LOOZE Y, VANDENBUSSCHE G. Affinity chromatography: a useful tool in proteomic studies. **Journal of Chromatography. A** 849:81-90, 2007.

BARBOSA EB, VIDOTTO A, POLACHINI GM, HENRIQUE T, MARQUI ABT, ELOIZA HELENA TAJARA V. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 58(3):366-375, 2012.

BADR KR, PARENTE-ROCHA J, BAEZA LC, FICCADORI FS, SOUZA M, SOARES CM, GUISSONI ACP, ALMEIDA TN, CARDOSO DD. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human adenovirus type 2. **Journal of Medical Virology**.;1-11, 2019.

BERNAL C, GALINDO I, PÉREZ D, DIEZ N. Aplicación de la proteómica comparativa para la identificación de proteínas en phaseolus vulgaris asociadas a resistencia a plagas. **Agronomía Trop** 56(4): 555-559, 2006.

BERTIN GI, SABBAGH A, ARGY N, SALNOT V, EZINMEGNON S, AGBOTA G, LADIPO Y, ALAO JM, SAGBO G, GUILLONNEAU F, DELORON F. Proteomic analysis of Plasmodium falciparum parasites from patients with cerebral and uncomplicated malaria. **Nature** 6:26773, 2016.

BJELLQVIST B, EK K, RIGHETTI PG, GIANAZZA E, GÖRG A, WESTERMEIER R, POSTEL W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 6: 317-339, 1982.

CALDER B, SOARES NC, DE KOCK E, BLACKBURN JM. Mycobacterial proteomics: analysis of expressed proteomes and post-translational modifications to identify candidate virulence factors. **Expert Rev Proteomics** 12(1):21-35, 2015.

CARUSO MB, TRUGILHO MRO, HIGA LM, TEIXEIRA-FERREIRA AS, ZINGALI RB. Proteomic analysis of the secretome of HepG2 cells indicates differential proteolytic processing after infection with dengue. **Journal of Proteomics** 151(16): 106-113, 2017.

CHERNUSHEVICH IV, LOBODA AV, THOMSON BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry** 36(8): 849-65, 2001.

COOMBS KM, BERARD A, XU X, KROKHIN O, MENG X, CORTENS JP, KOBASA D, WILKINS J, BROWN EG Quantitative Proteomic Analyses of Influenza Virus-Infected Cultured Human Lung Cells. **Journal of Virology** 84(20):10888–10906, 2010.

DE HOFFMANN E, CHARETTE J, STROOBANT V. **Mass spectrometry: principles and applications**. Paris: Masson éditeur, (p. 300-320), 1996.

ENG JK, MCCORMACK AL, YATES JRI. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **J. Am. Soc. Mass Spectrom** 5: 976-989, 1994.

FENN JB, MANN M, MENG CK, WONG SF, WHITEHOUSE CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science** 246: 64–71,1989.

GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S, WESER J. Improved horizontal twodimensional electrophoresis with hybridisoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis** 6:599-604, 1985.

GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, HARDER A, WILDGRUBER R, WEISS W. The current state of twodimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis** 21:1037-1053, 2000.

GUISSONI, ACP, SOARES, CMA, BADR, KR, ET AL. CARDOSO CARDOSO DDDP. Proteomic analysis of A-549 cells infected with human adenovirus 40 by LC-MS. **Virus Genes**, 55: 1- 10, 2018

JUNGBLUT PR, SCHIELE F, ZIMNY-ARNDT U, ACKERMANN R, SCHMID M, LANGE S, STEIN R, PLEISSNER KP. Helicobacter pylori proteomics by 2-DE/MS, 1-DE-LC/MS and functional data mining. **Proteomics** 10(2): 182-93, 2010.

KLOSE J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humagenetik** 26: 231- 243, 1975.

79

MANCONE C, CICCOSANTI F, MONTALDO C, PERDOMO AB., PIACENTINI M, ALONZI T, FIMIA GM, TRIPODI M. Applying proteomic technology to clinical virology. **Clin Microbiol Infect** 19(1): 23–28, 2013.

MAXWELL KL, FRAPPIER L. Viral Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 71(2): 398–411, 2007.

MAY C, BROSSERON F, CHARTOWSKI P, SCHUMBRUTZKI C, SCHOENEBECK B, MARCUS K. *Instruments and methods in proteomics*. Springer Protocols. Volume 696 of the series **Methods in Molecular Biology**, (p. 3-26), 2011.

MENDES M, PÉREZ-HERNANDEZ D, VÁZQUEZ J, COELHO AV, CUNHA C. Proteomic changes in HEK-293 cells induced by hepatitis delta virus replication, **Journal of Proteomics**, 89: 24 – 38, 2013.

NOVÁKOVÁ L, SOLICHOVÁ D, SOLICH PJ. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Sep Sci** 29:2433, 2006.

O'FARRELL, PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry** 250: 4007–4021, 1975.

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

PERKINS DN, PAPPIN DJ, CREASY DM, COTTRELL JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis** 20(18): 3551-67, 1999.

RABILLOUD T, ADESSI C, GIRAUDEL A, LUNARDI J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis** 18: 307-316, 1997.

RIVIER J, MCCLINTOCK R. Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Insulins from Different Species. **J Chromatogr** 268: 112–119, 1983.

ROCHA TL, COSTA PHA, MAGALHÃES JCC, EVARISTO RGS, VASCONCELOS EAR, COUTINHO MVC, PAES NS. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 136: 1- 12, 2005.

SHEN Q, PU Y, FU X, XIE Y, BIAN X, YANG S, YANG Y, CUI L, WANG X, WANG H, ZHANG W. Changes in the cellular proteins of A549 infected with Hepatitis E virus by proteomics analysis. **BMC Veterinary Research**, 10:188, 2014.

SWARTZ ME. UPLC™: An Introduction and Review. **J Liq Chromatogr Relat Technol** 28: 1253-1263, 2005.

SKOOG DA, HOLLER, FJ, NIEMAN TA. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, ( p.752-800), 2002.

VALLEDOR L, JORRIN J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of Proteomics** 74:1-18, 2011.

WALTHER TC, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. **Journal of Cell Biology** 190(4): 491-500, 2010.

WANG Q, LI Q, LIU R, ZHENG M, ZHAO G. Host cell interactome of PA protein of H5N1 influenza A virus in chicken cells. **Journal of Proteomics**, 136(16): 48-54, 2016.

WANG Y, FRANZEN J, WANCZEK KP. The non-linear resonance ion trap. Part 2. A general theoretical analysis. **Int J Mass Spectrom Ion Processes** 124(1): 125-44, 1993.

WATSON JT. *Introduction to mass spectrometry*, United States, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1997.

WILKINS MR, SANCHEZ JC, GOOLEY AA, APPEL RD, HUMPHERY-SMITH I, HOCHSTRASSER DF, WILLIAMS KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet. Eng. Rev.** 13:19-50, 1996.

WU L, HAN Z, WANG S, WANG X, SUN A, ZU X, CHEN Y. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. **Journal of Proteomics** 89:124-40, 2013.

YE F, XIN Z, HAN W, FAN J, YIN B, WU S, YANG W, YUAN J, QIANG B, SUN W, PENG X. Quantitative Proteomics Analysis of the Hepatitis C Virus Replicon High-Permissive and Low-Permissive Cell Lines. **PLoS One**. 10(11):e0142082, 2015.

ZHANG CG, CHROMY BA, MCCUTCHEN-MALONEY SL. Host-pathogen interactions: a proteomic view. **Expert. Rev. Proteomics** 2:187–202, 2005.

ZHAO H, GRANBERG F, ELFINEH L, PETTERSSON U, SVENSSON C. Strategic Attack on Host Cell Gene Expression during Adenovirus Infection **Journal of Virology** 77(20): 11006–11015, 2003.

ZENOBI R, KNOCHENMUSS R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev** 17: 337-366, 1998.

