



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*
ENVOLVIDAS NA DEFESA DA PLANTA

CLEVERSON DINIZ TEIXEIRA DE FREITAS

FORTALEZA-CE

Abril-2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*
ENVOLVIDAS NA DEFESA DA PLANTA

CLEVERSON DINIZ TEIXEIRA DE FREITAS

Tese de doutorado submetida à
Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica,
da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.

FORTALEZA-CE

Maio-2009

F936i Freitas, Cleverson Diniz Teixeira de
Identificação, purificação, caracterização e atividade biológica de
proteínas do látex de *Calotropis procera* envolvidas na defesa da planta /
Cleverson Diniz Teixeira de Freitas, 2009.
225 f. :il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Área de concentração: Bioquímica
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Depto. de Bioquímica, Fortaleza, 2009.

I. Látex 2. Osmotina 3. Proteômica I. Ramos, Márcio Viana (orient.)
II. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Bioquímica
III. Título

CDD 574.192

Esta tese de doutorado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Tese aprovada em: 22/04/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular-UFC
Orientador

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular-UFC
Examinador

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular-UFC
Examinadora

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini
Instituto de Física de São Carlos-USP
Examinadora

Prof. Dr. Carlos E. Salas
Deptº de Bioquímica e Imunologia-UFGM
Examinador

“Na vida todos nós nascemos com um dom,
O que falta é apenas aprimorá-lo”.
(Artista desconhecido)

Dedico este trabalho aos meus Pais,
que dedicam suas vidas
à mim e aos meus irmãos.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, coordenado pelo Professor Márcio Viana Ramos.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, através do Laboratório de Proteômica do Departamento de Bioquímica, coordenado pelo Professor Gilberto Barbosa Domont.

Universidade de São Paulo, através do laboratório de Biofísica de São Carlos, coordenado pela Professora Leila Maria Beltramini.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP) e International Foundation for Science (IFS).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Márcio Viana Ramos por toda atenção dedicada à minha pessoa durante estes 7 anos de laboratório. Agradeço também seus excelentes conselhos, votos de estima e amizade. Agradeço ainda sua completa confiança na minha capacidade em desenvolver este trabalho e por não medir esforços para disponibilizar todos os meios possíveis e impossíveis para sua finalização.

Ao Professor José Tadeu Abreu de Oliveira por todo o conhecimento adquirido em suas excelentes aulas. Agradeço ainda pelo exemplo de competência e dedicação à educação universitária. Não posso esquecer de agradecer seus constantes votos de incentivo à minha formação.

À Professora Ilka Maria Vasconcelos por todo o conhecimento adquirido em suas excelentes aulas e pelo exemplo de competência, dedicação e honestidade à educação universitária.

À Professora Leila Maria Beltramini por ter me acolhido em seu laboratório e pela orientação e dedicação nos experimentos realizados. Não posso esquecer de agradecer o estudante do doutorado, José Luiz, agora meu novo amigo, pela dedicação nos experimentos e pela amizade.

Ao Professor Carlos Salas pelo interesse em colaborar com este trabalho.

Ao Professor Francisco Paiva, a quem tenho bastante admiração, por todos os conselhos e incentivos dados.

À professora Ana Lúcia Ponte Freitas pela grande oportunidade de aprender todos os dias como ser uma pessoa melhor. Agradeço também todo o conhecimento adquirido durante as aulas práticas de laboratório em Bioquímica.

À Professora Norma Maria Benevides pela confiança e conhecimentos adquiridos durante as aulas de laboratório em Bioquímica.

Ao Professor Gilberto Barbosa Dumont por ter me acolhido em seu laboratório com os braços abertos e pela orientação nos experimentos realizados em seu laboratório.

Ao meu amigo, de todas as horas e assuntos, Jefferson Soares de Oliveira, pelos grandes momentos de companheirismo, além da grande ajuda na correção desta tese.

Ao meu grande amigo Fábio César pela amizade e ajuda nos experimentos realizados com espectrometria de massas.

Aos meus grandes amigos Diego Pereira, Tiago e José Hélio pelo companheirismo e pelos momentos de distração. Especialmente agradeço ao Diego e Tiago pelas correções da parte escrita deste trabalho.

A todos os colegas que fazem parte do laboratório (Fabiano, Mariana, Eliane, Raquel, Mayara, Carol e Júnior) e do programa de pós-graduação em bioquímica (Rafael, Sérgio, Ygor, Luana, Henrique), pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia. Agradeço em especial a Mariana pelas correções desta tese.

Aos meus Pais, Maria Guilhermina e Clóvis Figueira, pelo amor, paciência e apoio incondicional às minhas escolhas.

A meus irmãos, Tiago e Ticiane, ao meu sobrinho Arthurzinho e ao Rômulo pelo amor e carinho dedicados a mim.

À minha esposa Tatiana pela paciência, amor e apoio, essenciais para a realização deste trabalho.

A Deus por ter colocado todas estas pessoas na minha vida.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xiv
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xviii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xix
<u>RESUMO</u>	Xxi
<u>ABSTRACT</u>	xxiii
<u>OBJETIVOS GERAIS</u>	xxv
CAPÍTULO 1 – Proteômica do Látex	
1.Introdução	1
1.1 Os vegetais e suas Defesas Naturais	1
1.2 Látex: Características Gerais	4
1.3 Funções Biológicas dos Laticíferos	6
1.4 Composição Química do Látex	7
1.5 Bioquímica da Borracha	8
1.6 Mecanismos de Coagulação do Látex	9
1.7 Proteômica	11
1.8 Eletroforese Bidimensional	13
1.9 Espectrometria de Massa	15
1.10 Proteômica em Plantas	19
1.11 Proteômica em Fluidos Laticíferos	21
1.12 Descrição e Características da Planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.	23
2.Materiais e Métodos	26
2.1 Reagentes	26
2.2 Coleta e Fracionamento do Látex	27
2.3 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose Fast Flow	28

2.4	Processamento do Material Biológico para Eletroforese Bidimensional	29
2.4.1	Precipitação com Acetona	29
2.4.2	Precipitação com Acetona e Ácido Tricloroacético	30
2.4.3	Solubilização em Tampão Piridina	30
2.5	Dosagem de Proteínas	31
2.6	Eletroforeses Bidimensionais, Revelação e Análise da Imagem	33
2.7	Seleção e Processamento dos <i>Spots</i> para Espectrometria de Massas	34
2.8	Espectrometria de Massas	35
2.9	Pesquisa no Banco de Dados	36
2.10	Revelação de Glicoproteínas	36
2.11	Zimograma para Proteinases	37
2.12	Zimograma para Quitinases	37
2.13	Zimograma para Peroxidases	38
2.14	Zimograma Reverso para Detecção de Inibidores de Proteinases	38
3.	Resultados	39
4.	Discussão	54
5.	Referências	66

CAPÍTULO 2 – Atividade Proteolítica

1. Introdução

1.1	Proteinases: Características Gerais	79
1.2	Ocorrência de Proteinases	80
1.3	Mecanismo de Catálise e Estrutura Tridimensional de Proteinases	81
1.4	Funções das Proteinases nas Plantas	82

2. Materiais e Métodos

2.1	Reagentes	84
-----	-----------	----

2.2 Atividade Proteolítica Total	85
2.3 Ensaio para Proteinases Cisteínicas	85
2.4 Ensaio para Proteinases Serínicas	86
2.5 Avaliação da Atividade Proteolítica em Diferentes Valores de pH	87
2.6 Estabilidade Térmica e Efeito de Inibidores de Proteinases	87
2.7 Detecção de Proteinases por Zimograma	88
2.8 Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sephacryl-100	88
2.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	89
2.10 Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow	89
2.11 Produção de anticorpos policlonais e Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony	90
2.12 Dot Blotting e Western Blotting	92
3.Resultados	94
4.Discussão	105
5.Referências	112

CAPÍTULO 3 – Purificação e Caracterização de uma Osmotina

1.Introdução	127
1.1 Características Gerais	127
1.2 Osmotina e suas funções nas plantas	128
1.3 Mecanismos de ação das osmotinas contra fungos	130
1.4 Características estruturais das osmotinas	131
2.Materiais e Métodos	133

2.1 Reagentes	133
2.2 Fungos	134
2.3 Cultivo dos Fungos	134
2.4 Obtenção da Suspensão de Esporos	134
2.5 Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico em Meio Líquido e Determinação da IC50	135
2.6 Ensaio de Inibição da Germinação de Esporos	136
2.7 Ensaio de Inibição do Crescimento em Meio Sólido	137
2.8 Envolvimento de Proteínas na Atividade Antifúngica	137
2.9 Envolvimento das Proteinases Cisteínicas na Atividade Antifúngica	138
2.10 Atividade Antifúngica de Proteinases Comerciais	139
2.11 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose Fast Flow	139
2.12 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource-S	139
2.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	140
2.14 Detecção de Carboidratos na Proteína Purificada	140
2.15 Determinação da Seqüência de Aminoácidos N-Terminal	140
2.16 Espectrometria de Massas	141
2.17 Eletroforese Bidimensional	142
2.18 Dicroísmo Circular	142
2.19 Espectro de Fluorescência	143
2.20 Avaliação da Interação da Proteína Purificada com Lipossomos	143
2.21 Efeitos sobre a Permeabilidade de Lipossomos	144
2.22 Ensaio de Permeabilização de Membrana de Esporos de <i>F. salani</i>	145
2.23 Avaliação sobre a Lise de Hemácias	145
3. Resultados	146
4. Discussão	181
5. Conclusões Gerais	191
6. Perspectivas	192

7.Referências

193

Anexo

206

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Pág.
Capítulo 1 – Proteômica do Látex		
1.	Os quatro principais tipos de laticíferos	6
2.	Mecanismo de coagulação do látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	11
3.	Aspecto geral da planta <i>Calotropis procera</i>	25
4.	Esquema de coleta e obtenção da fração protéica do látex	28
5.	Esquema de solubilização de proteínas da fração PL e extração das proteínas retidas na fração borracha	32
6.	Eletroforese Bidimensional das Proteínas do Látex utilizando diferentes métodos de solubilização e precipitação de proteínas	40
7.	Eletroforeses bidimensionais das proteínas do látex e das proteínas extraídas da fração borracha com tampão Piridina	42
8.	Perfil cromatográfico das proteínas do látex em coluna de CM-Sepharose Fast Flow	43
9.	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida das proteínas do látex utilizando tira de pH 3-10, 4-7 e 6-11 e do PI-CM.	44
10.	Representação dos resultados obtidos das análises por espectrometria de massas	47
11.	Detecção de glicoproteínas do látex de <i>C. procera</i> em gel de poliacrilamida	50
12.	Revelação de glicoproteínas presentes na fração PI-CM Sepharose em eletroforese bidimensional	51
13.	Zimogramas para detecção de proteinases, quitinases, peroxidases e inibidores de proteinases	53

Capítulo 2 – Atividade Proteolítica

1.	Estrutura tridimensional da papaína, Ervatamina B e Ervatamina C	82
2.	Efeito do pH na atividade proteolítica do látex de <i>C. procera</i> .	95
3.	Efeito de inibidores específicos na atividade proteolítica do látex de <i>C. procera</i>	96
4.	Efeito da temperatura na atividade proteolítica presente no látex de <i>C. procera</i>	97
5.	Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular e eletroforético das proteínas do látex de <i>C. procera</i> .	98
6.	Efeito do pH na atividade gelatinolítica presente no látex de <i>C. procera</i>	100
7.	Perfil cromatográfico das proteínas do látex (PL) de <i>C. procera</i> em coluna de CM-Sepharose Fast Flow e atividade proteolítica das frações obtidas	101
8.	Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony	102
9.	Dot Blotting e Western Blotting	104
10.	Distribuição de genes para proteases de arroz e <i>Arabidopsis thaliana</i>	107

Capítulo 3 – Purificação e caracterização de uma osmotina

1.	Estrutura tridimensional de uma osmotina de tomate	132
2.	Efeito inibitório das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos	147
3.	Ensaio de inibição da germinação de esporos utilizando diferentes amostras da fração proteínas do látex	148
4.	Efeito inibitório de diferentes proteases purificadas sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos	151
5.	Ensaio de inibição da germinação de esporos utilizando	152

	diferentes proteases purificadas	
6.	Cromatografia de Troca Iônica da fração PL em coluna de CM-Sepharose Fast Flow e eletroforese dos picos obtidos	154
7.	Ensaio de inibição da germinação de esporos utilizando os picos obtidos após cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose	156
8.	Cromatografia de Troca Iônica da fração PII-CM-Sepharose em coluna RESOURCE-S e eletroforese dos picos obtidos	157
9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) da osmotina purificada e revelação para glicoproteínas	162
10.	Eletroforese bidimensional da Osmotina e revelação para glicoproteínas	163
11.	Espectro de massas em MALDI-TOF da osmotina purificada	165
12.	Efeito do pH na estrutura secundária da osmotina	167
13.	Comparação do espectro da osmotina com espectros de proteínas com conhecidas estruturas secundárias depositadas no banco de dados de estrutura secundária	168
14.	Espectro de fluorescência da osmotina em diferentes valores de pH	169
15.	Efeito da temperatura na estrutura secundária da osmotina medida por dicroísmo circular	170
16.	Temperatura média de desnaturação da osmotina em pH 7.0	171
17.	Espectro de dicroísmo circular da osmotina após aquecimento a 95 °C e incubada a 25°C por 30 min	172
18.	Interação da osmotina com lipossomos constituídos de DMPC, DSPE e POPG medida de dicroísmo circular	173
19.	Efeito da osmotina sobre a permeabilidade de lipossomos constituídos de POPG	174
20.	Porcentagem de liberação de Calceína de lipossomos constituídos de POPG após incubação com osmotina	175
21.	Efeito da osmotina sobre a permeabilidade da membrana plasmática de esporos de <i>F. solani</i>	176
22.	Avaliação do potencial hemolítico da Osmotina	177

23.	Efeito das pontes dissulfeto na estrutura da osmotina do látex de <i>C.procera</i> avaliado por eletroforese e espectrometria de massas	179
24.	Efeito das pontes dissulfeto na atividade antifúngica da osmotina	180
25.	Análise de possíveis sítios de glicosilação da osmotina de <i>Helianthus annuus</i> .	186

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
Capítulo 1 – Proteômica do látex		
1.	Lista de proteínas identificadas do látex de <i>Calotropis procera</i> por MALDI TOF-TOF	48
Capítulo 2 – Atividade Proteolítica		
1.	Classificação das proteinases e suas características	80
Capítulo 3 – Purificação e caracterização de uma osmotina		
1.	Atividade proteolítica da fração PL do látex de <i>C. procera</i> , da papaína, tripsina e quimotripsina.	153
2.	Alinhamento da seqüência N-terminal da osmotina do látex <i>C. procera</i>	160
3.	Rendimento da osmotina purificada do látex de <i>Calotropis procera</i>	161
4.	Identificação dos 'spots' 1 e 2 referentes da figura 10 por MALDI TOF-TOF	164

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Abs 280	Absorbância a 280 nm
α-ciano-4-hidroxicinâmico	Matriz utilizada em análises de peptídeos em espectrômetro de massas do tipo MALDI
Ácido sinapínico	Matriz utilizada em análises de proteínas em espectrômetro de massas do tipo MALDI
BANA	N-Benzoil-arginina-naftilamida (Substrato para proteinases cisteínicas)
BApNA	Benzoil Arginina p-Nitroanilida (Substrato para proteinases serínicas)
BCIP	5- Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato (Substrato para fosfatase alcalina)
BSA	Albumina Sérica Bovina
CHAPS	3-[(3-Cloamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano sulfonato (detergente não carregado)
DTT	Ditiotreitol (agente redutor)
DMACA	4-(dimetil-amino)cinamaldeído
DMPC	1,2-Diiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (fosfolípideo neutro)
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida (fosfolípideo carregado positivamente)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (agente quelante)
EGTA	Etilenoglicol-bis-aminoetil éter (agente quelante)
E-64	Trans-Epoxisuccinil-Leucilamido-3-Metil-Butano (inibidor de proteinases cisteínicas)
IAA	Iodoacetamida (inibidor de proteinases cisteínicas)
IC₅₀	Concentração capaz de reduzir em 50% o crescimento dos fungos
IPG buffer	Solução de anfólitos
kDA	1000 Da
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (substrato para fosfatase alcalina)
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

PEP	Pepstatina-A (inibidor de proteinases aspárticas)
PI, PII e PIII	Picos obtidos após cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow
PL	Proteínas do látex de <i>C. procera</i>
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluorido (inibidor de proteinases serínicas)
POPG	Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-Fosfo-rac-1-Glicerol (fosfolipídeo carregado negativamente)
Pronase	Mistura de proteases de <i>Streptomyces griseus</i>
PVDF	Polifluoreto de vinilideno (membrana utilizada para transferência de proteínas)
PVPP	Polivinilpirrolidona (precipita compostos fenólicos)
SDA	Sabouraud Dextrose Agar (meio de cultura para fungos)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (detergente aniônico)
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
Triton X-100	Detergente não carregado
YPD	Yeast Peptone Dextrose (meio de cultura para fungos)

RESUMO

Látex é um fluido de aspecto leitoso liberado de plantas que sofreram algum dano mecânico. Aproximadamente 8% de todas as plantas produzem látex. Em contraste, poucas plantas laticíferas são estudadas em detalhes, principalmente aspectos bioquímicos de seu látex. O papel desempenhado pelo látex ainda é pouco entendido. Contudo, a hipótese mais aceita é seu envolvimento na defesa da planta contra insetos e fitopatógenos. Com o objetivo de investigar esta hipótese, proteínas do látex de *Calotropis procera* foram caracterizadas para obter novas informações sobre a ocorrência e atividades biológicas de proteínas laticíferas. Além disto, a caracterização da atividade antifúngica do látex e a purificação de uma osmotina são mostradas neste trabalho. Proteínas do látex de *C. procera* apresentaram forte atividade proteolítica compartilhada por pelo menos quatro proteinases com massas moleculares variando de 28 kDa a 66 kDa. Proteinases cisteínicas foram predominantes, enquanto proteinases aspárticas foram apenas marginalmente detectadas. Proteinases serínica e metaloproteinases não foram detectadas. A atividade proteolítica foi ótima em valores de pH 5,0-6,0 e temperatura 37-60 °C, quando azocaseína ou BANA foram utilizados como substratos. Anticorpos policlonais produzidos contra a papaína reconheceram fracamente as proteínas do látex, mostrando que a papaína e as proteinases cisteínicas do látex de *C. procera* são imunologicamente distintas. Análises proteômicas utilizando eletroforeses bidimensionais e espectrometria de massas permitiram a identificação de várias proteínas relacionadas com a defesa da planta: peroxidase (1), quitinases (2), proteinases cisteínicas (2), inibidor de proteinases (1), proteínas transferidoras de lipídios (3) e osmotinas (3). Em vista desta grande diversidade de proteínas antifúngicas, as proteínas do látex foram testadas quanto à capacidade de inibir o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos. Os valores de IC₅₀ encontrados foram 134,5 ± 8,1, 549,9 ± 14,3 e 455,0 ± 9,3 µg/ml para *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* and *Colletotricum gloeosporioides*, respectivamente. A atividade inibitória foi sempre perdida após tratamento térmico (98 °C por 30 min) ou proteolítico, dando fortes evidências do envolvimento de proteínas na atividade antifúngica. O tratamento do látex com E-64 (inibidor de proteinases cisteínicas) eliminou completamente a atividade inibitória para *F. solani*, mas foi ativa parcialmente para *Neurospora sp* e *C. gloeosporioides*. Resultados similares foram

obtidos quando esporos foram desafiados a germinarem na presença das proteínas do látex tratadas ou não com E-64. Papaína, uma proteinase cisteínica do látex de *Carica papaya*, mas não tripsina e quimotripsina, duas proteinases serínicas, repetiu os resultados obtidos com *C. procera*, sugerindo o envolvimento de proteinases cisteínicas como proteínas antifúngicas. As proteínas do látex foram fracionadas e uma proteína purificada foi obtida. A seqüência N-terminal (40 AA) exibiu alta similaridade com osmotina (87%) e proteínas semelhantes à proteína taumatina (82%). Os procedimentos de isolamento compreenderam de duas cromatografias de troca iônica. A osmotina purificada se apresentou como uma única banda de massa molecular de 20,1 kDa em eletroforese unidimensional e como dois spots em eletroforeses bidimensionais com pI 8,9 e 9,2, identificados por espectrometria de massas como duas osmotinas. As duas isoformas foram glicoproteínas como indicado pelo reagente de Shiff. Ensaio de dicroísmo circular mostraram que a osmotina foi estável em diferentes valores de pH e temperatura. A estrutura secundária foi composta de 35% de α -hélice, 33% de folhas betas, 19% de voltas e 28% de estrutura desordenada. Análises de fluorescência, quando a proteína foi excitada a 280 nm ou 295 nm, mostraram um espectro de emissão de 300 a 420 nm, com máximo em 340 nm. A osmotina causou permeabilidade de membranas de lipossomos artificiais e de esporos de *F. salani*, contudo não foi capaz de lisar eritrócitos de coelho. Na presença de DTT, a osmotina foi fragmentada em três peptídeos com massas moleculares de 14, 11 e 7 kDa e perdeu sua atividade antifúngica, mostrando que as pontes dissulfeto são essenciais para integridade e função da proteína. Esses resultados colaboram com a hipótese do envolvimento de diferentes proteínas laticíferas na defesa da planta contra fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Latex is a fluid with milky aspect remarkably common in plants. Nearly 8 % of all plant species have canal systems from which latex is exuded upon damage. Nonetheless, few laticifer plants are studied in detail, mainly biochemical aspects of their latex. The role played by latex in plants is poorly understood. However, the most accepted hypothesis is its involvement in plant defense against insects and phytopathogens. In an attempt to investigate this hypothesis, a partial biochemical and proteolytic characterization of laticifer proteins were performed to obtain new information on the occurrence and biological activities of proteins from the latex of *Calotropis procera*. Besides, antifungal activity and purification of an osmotin are shown in this study. Laticifer proteins of *C. procera* exhibited strong proteolytic activity shared by at least four distinct proteinases with molecular masses ranging from 28 kDa to 66 kDa. Cysteine proteinase activities were predominant, whilst aspartic proteinase activities were barely visible. Serine and metalloproteinases were not detected. The optima pH and temperature for proteolytic activity were 5.0-6.0 and 37-60 °C, respectively, when azocasein or BANA were used as substrates. Polyclonal antibodies raised against papain cross-reacted weakly with laticifer proteins of *C. procera* showing that papain and cysteine proteinases of this latex were immunologically distinct. Proteomic approaches of 2-D electrophoresis and analysis by MALDI-TOF-TOF allowed identification of several Pathogenesis-Related proteins in latex: peroxidase (1), chitinases (2), cysteine proteinases (2), proteinase inhibitor (1), lipid-transfer proteins (3) and osmotins (3). In view of this high diversity of antifungal proteins, laticifer proteins were tested on different phytopathogen fungi. Laticifer proteins inhibited fungi growth of *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* and *Colletotricum gloeosporioides* with IC₅₀ of 134.5 ± 8.1, 549.9 ± 14.3 and 455.0 ± 9.3

µg/ml, respectively. The inhibitory activity was always lost after heat treatment (98 °C for 30 min) or proteolysis, giving strong evidence for the protein nature of inhibitory molecules. Treatment of this latex with specific inhibitor of cysteine proteinases (E-64) completely eliminated the inhibitory activity to *F. solani* but only partially for *Neurospora sp.* and *C. gloerosporioides*. Similar results were observed when spores were challenged to germinate in the presence of laticifer proteins. Papain, a cysteine protease from the latex of *Carica papaya*, but not trypsin and chymotrypsin, two serine proteases, repeated the results observed with *C. procera*, suggesting the involvement of cysteine proteinase as inhibitors of spore germination and fungal growth. Laticifer proteins were fractionated and a highly purified protein was obtained. The N-terminal sequence (40 AA) exhibited similarity to osmotin (87%) and thaumatin-like (82%) proteins. Its isolation procedures entailed two ion exchange chromatography steps. *C. procera* osmotin appeared as a single band (20.1 kDa) in SDS-PAGE and as two spots in 2-D electrophoresis (pI 8.9 and 9.2) identified by mass spectrometry as two osmotins. The two isoforms were glycoproteins as indicated by Schiff's reagent. Circular dichroism assays showed that osmotin was stable in different pH and temperatures. Secondary structure content was 35% α -helix, 33% β -sheet, 19% turn and 28% unordered. Fluorescence analysis showed emission in the 300–420nm range upon excitation at 280 nm or 295 nm, with maximum at 340 nm. The osmotin caused membrane leakage in *F. solani* spores and artificial membranes, but did not disrupt rabbit erythrocytes. In presence of DTT, osmotin was fragmented in three peptides with molecular masses of 14, 11 and 7 kDa and lost antifungal activity, showing that the disulfide bonds are essential to its activity. These results reinforce the hypothesis of the involvement of different proteins of laticifer fluids in plant defense against phytopathogenic fungi.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

O presente trabalho de tese teve como objetivos caracterizar e identificar proteínas do látex de *Calotropis procera*, através de atividades proteolíticas e análises proteômicas, além de purificar, caracterizar e investigar o mecanismo de ação de uma proteína antifúngica.

Objetivos específicos

- ✓ Fracionar o látex de *Calotropis procera* para obtenção de uma fração rica em proteínas, livre de borracha e pequenos metabólitos;
- ✓ Determinar uma boa metodologia de solubilização e precipitação de proteínas do látex compatíveis para eletroforeses bidimensionais;
- ✓ Obter géis bidimensionais com boa resolução e reprodutibilidade;
- ✓ Fracionar as proteínas do látex através de cromatografia de troca iônica;
- ✓ Identificar o maior número possível de proteínas por espectrometria de massas;
- ✓ Confirmar a presença de algumas proteínas, previamente identificadas por espectrometria de massas, através de zimogramas;
- ✓ Caracterizar a atividade proteolítica presente na fração protéica do látex, através de ensaios colorimétricos e zimogramas;
- ✓ Verificar a similaridade imunogênica entre a papaína, uma proteinase cisteínica do látex de *Carica papaya*, e proteinases cisteínicas do látex de *C. procera*.
- ✓ Avaliar o potencial antifúngico das proteínas do látex de *C. procera*;
- ✓ Correlacionar a atividade antifúngica com as proteinases cisteínicas presentes no látex;

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica de proteinases comerciais como papaína, tripsina e quimotripsina;
- ✓ Purificar, caracterizar e avaliar o mecanismo de ação de uma proteína antifúngica.

CAPÍTULO 1

Proteômica do Látex

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os vegetais e suas Defesas Naturais

As plantas estão constantemente expostas a uma variedade de estresses ambientais. Para compensar a desvantagem de estarem ancoradas no solo e de serem desprovidas de um sistema circulatório imune, as plantas desenvolveram várias estratégias sofisticadas de proteção contra patógenos e predadores, tais como, bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros, assim como contra estresses abióticos (TIFFIN e MOELLER, 2006).

Os mecanismos naturais de proteção contra patógenos e predadores estão baseados em uma variedade de barreiras presentes no vegetal antes do ataque. Os efeitos combinados destas barreiras são referidos como resistência constitutiva. A parede celular, a presença de tricomas, espinhos e cutícula são exemplos deste tipo de defesa (LEQUEU *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2003). Esse tipo de defesa pode ser também constituído de proteínas, tais como: inibidores de proteinases, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos e ureases (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; GOMES *et al.*, 2005; BECKER-RITT *et al.*, 2007; McCAFFERTY *et al.*, 2008; FOLLMER, 2008).

Além da defesa constitutiva, os vegetais podem também ativar mecanismos protetores após o contato com patógenos, sendo este tipo de resistência denominada de resistência induzida ou adquirida (WITTSTOCK e GERSHENZON, 2002; van LOON *et al.*, 2006). Vários patógenos produzem

cutinases e outras enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal, tais como pectinases, celulases, xilanases e galactorunidades. Essas enzimas produzem fragmentos da parede celular da planta, particularmente oligômeros de ácido galacturônico, que podem agir como elicitores, ativando mecanismos de defesa ou amplificando a resposta já existente (van LOON, 1997). A fortificação da parede celular e indução de proteínas são exemplos de respostas induzidas por ataques de patógenos ou insetos (ODJAKOVA e HADJIIVANOVA, 2001; van LOON *et al.*, 2006).

Proteínas induzíveis relacionadas à defesa vegetal foram primeiramente descobertas em tabaco resistente ao vírus do mosaico do tabaco e, posteriormente, detectadas em outras espécies de plantas de, pelo menos, 13 famílias, infectadas por fungos, bactérias, vírus, ou atacadas por nematóides e insetos (van LOON, 1997). Essas proteínas relacionadas à defesa que são induzidas em plantas atacadas por patógenos ou insetos são denominadas de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas), e têm sido alvo de várias revisões e, atualmente, são classificadas em 17 famílias (van LOON *et al.*, 2006). As famílias das PR-proteínas são enumeradas em ordem de descobrimento e compreendem proteínas com estruturas primárias e atividades biológicas similares, tais como, as β -1,3-glucanases, quitinases, proteinases e peroxidases, que pertencem às famílias PR-2, PR-3, PR-7 e PR-9, respectivamente.

As respostas de incompatibilidade entre plantas e microrganismos estão, freqüentemente, associadas com o aparecimento de zonas necróticas nos locais de ataque do patógeno. Essa resposta é referida como resposta de hipersensibilidade. A reação de hipersensibilidade constitui um efetivo

mecanismo de defesa. Nesse caso, uma rápida morte das células da planta no local de infecção restringe a colonização do patógeno. Esse sacrifício previne que o patógeno se espalhe pelos tecidos não infectados (YU *et al.*, 2008). Em interações com patógenos biotróficos obrigatórios, esse tipo de resposta pode restringir o acesso a nutrientes e levar à morte do microrganismo. Em interações envolvendo patógenos hemibiotróficos ou necrotróficos, o papel da resposta de hipersensibilidade é menos entendido, porque esses patógenos podem obter seus nutrientes de células mortas (GOVRIN e LEVINE, 2000). Contudo, a resposta de hipersensibilidade pode ativar outros mecanismos de defesa da planta, podendo ser citados o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, de fitoalexinas e proteinases cisteínicas (D'SILVA *et al.*, 1998; DELLEDONNE *et al.*, 2001; CHICHKOVA *et al.*, 2004; SOYLU, 2006).

A liberação de moléculas voláteis de plantas atacadas por insetos é considerada como um mecanismo de defesa indireta, pois elas podem agir como mensageiras de alerta para plantas vizinhas não atacadas (ARIMURA *et al.*, 2005). Terpenóides voláteis que podem ser produzidos em resposta à herbivoria incluem os monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e homoterpenos (C_{11} ou C_{16}). Esses compostos podem ativar respostas de defesa mediadas pelo ácido jasmônico e etileno em plantas vizinhas, levando a uma maior resistência destas plantas. As vias de sinalização envolvidas nessas respostas de defesa nas plantas são mediadas pelo influxo de íons cálcio e fosforilação/desfosforilação de proteínas (ARIMURA *et al.*, 2005).

1.2 Látex: Características Gerais

Outra possível forma de defesa contra a invasão de patógenos e insetos encontrada pelas plantas é a produção de látex (FARREL *et al.*, 1991; HAGEL *et al.*, 2008). Este fluido aglutina progressivamente após a planta sofrer algum dano mecânico, impedindo que a área injuriada seja penetrada por patógenos. O látex também tem uma ação colante que pode imobilizar desde pequenos insetos até lagartas (DUSSOURD, 1995). Entretanto, além deste efeito mecânico, alguns compostos químicos do látex parecem ter, também, papel de defesa, agindo no combate a fungos e insetos (GIORDANI *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 2007).

Látex é um termo geralmente usado para descrever um líquido com aspecto leitoso liberado de plantas que sofreram algum dano mecânico. Ele é composto por uma mistura que contém em solução ou suspensão uma variedade de substâncias e componentes celulares, entre os quais núcleos, mitocôndrias, ribossomos, bem como ácidos nucleicos (HANGEL *et al.*, 2008). A capacidade para formar látex é encontrada em plantas crescidas em diferentes habitats e incluem ervas, arbustos e árvores. Cerca de 20.000 espécies, pertencentes a 900 gêneros, sendo a maioria dicotiledôneas, produzem látex (LEWINSOHN, 1991). Embora o látex tenha na maioria das vezes um aspecto esbranquiçado, como em *Hevea* e *Calotropis*, ele pode ser amarelo, marrom-amarelado, laranja ou límpido (KEKWICK, 2001).

O látex é o conteúdo citoplasmático de células especializadas, denominadas de laticíferos, os quais podem ser classificados em duas principais classes: articulados e não articulados (Figura 1). Os laticíferos não

articulados se originam de uma única célula que cresce ao longo dos espaços intercelulares, eventualmente ramificando-se nos tecidos das plantas de modo similar às hifas dos fungos. Já os laticíferos articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células, cujas paredes celulares que as separam individualmente são parcialmente perfuradas ou completamente intactas. Em algumas espécies, os laticíferos são formados por discretas cadeias de células (não anastomizadas), ou são conectados lateralmente para formar uma estrutura similar a uma rede (anastomizado) (HANGEL *et al.*, 2008). Os laticíferos da planta *Calotropis procera* foram caracterizados como sendo do tipo não articulado (SURI e RAMAWAT, 1995).

Os laticíferos estão presentes em espécies de, aproximadamente, 40 famílias (LEWINSOHN, 1991), muitas vezes sem relação taxonômica, sugerindo que eles surgiram mais de uma vez ao longo da história evolutiva destes grupos (METCALFE, 1967). A provável origem polifilética dos laticíferos articulados e não articulados confere uma potencial aplicação de suas características morfológicas e químicas como caráter taxonômico (HAGEL *et al.*, 2008). Provavelmente, o maior sucesso das plantas lactescentes nos diversos ambientes em relação às não lactescentes seja devido às funções comumente atribuídas ao látex de proteger contra herbivoria e selar ferimentos (FARRELL *et al.*, 1991).

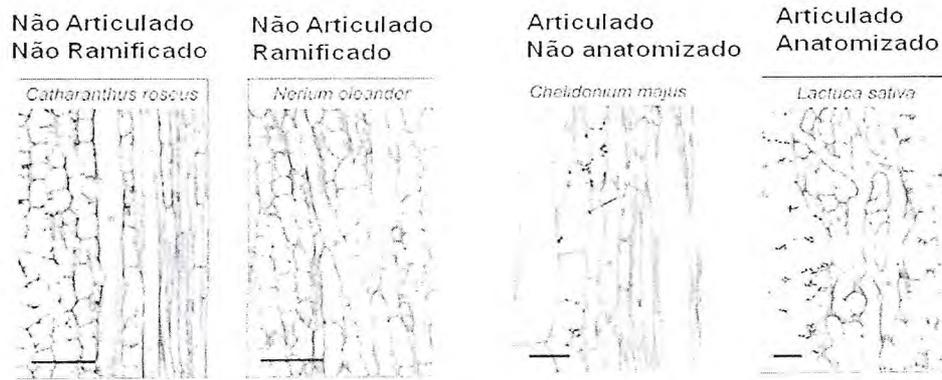


Figura 1: Os quatro principais tipos laticíferos, exemplificados pelas espécies, *Catharanthus roseus*, *Nerium oleander*, *Chelidonium majus* e *Lactuca sativa*. Figura retirada de Hagel *et al.* (2008) com algumas adaptações.

1.3 Funções Biológicas dos Laticíferos

Várias funções têm sido atribuídas aos laticíferos. Foi sugerido há mais de 100 anos, quando o látex foi encontrado em plantas do semi-árido, que os laticíferos podem funcionar como uma reserva de água. Entretanto nem todas as plantas que contêm látex estão restritas às regiões secas (KEKWICK, 2001). Por outro lado, acredita-se que o látex tem papel de defesa visto que: (1) o látex contém, muitas vezes, componentes tóxicos para insetos e fungos (MONTIL *et al.*, 2004; TAIRA *et al.*, 2005; SRITANYARAT *et al.*, 2006); (2) uma grande quantidade de fluido é exsudado para o local de ataque ou injúria, em relação à pequena quantidade de látex existente em toda a planta (DUSSOURD e DENNO, 1991; KONNO *et al.*, 2004, RAMOS *et al.*, 2007); (3) insetos que se alimentam de plantas laticíferas normalmente cortam os canais contendo látex no local de herbivoria, podendo diminuir em 90% a ingestão de componentes tóxicos presentes no látex (DUSSOURD e EISNER, 1987).

1.4 Composição Química do Látex

Látex é o citoplasma de células especializadas. Dessa forma, esse fluido é constituído de componentes comuns às células vegetais. Além de organelas como ribossomos, mitocôndrias, vacúolos, que neste caso são denominados de lutóides, esse fluido é composto por uma grande variedade de proteínas com várias funções, além de terpenos, carbonatos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios, aminoácidos e borracha (JACOB *et al.*, 1989; KEKWICK, 2001; EVERT, 2006; HAGEL *et al.*, 2008).

O látex de *Carica papaya* é constituído de 15% de matéria seca. Quarenta por cento dessa matéria seca é constituída de enzimas, das quais aproximadamente 80% são proteinases cisteínicas (AZARKAN *et al.*, 2003). São constituintes, também, do látex de *C. papaya*, quitinases (AZARKAN *et al.*, 1997), inibidores de proteinases (AZARKAN *et al.*, 2006), lipases (CHENG e TSAI, 2007), inibidores de α -amilase (FARIAS *et al.*, 2007) e enzimas antioxidativas (OSATO *et al.*, 1993).

O látex possui grande diversidade de proteínas com variadas funções. Aproximadamente 200 distintas proteínas, com massas moleculares variando de 100 a 6,5 kDa, foram visualizadas no látex de *H. brasiliensis*. Algumas proteínas identificadas foram relacionadas com a defesa da planta contra fungos e insetos, com a biossíntese e coagulação do látex e proteção contra espécies reativas de oxigênio (POSCH *et al.*, 1996).

Eletroforeses bidimensionais das proteínas contidas na fração solúvel do látex de *Papaver somniferum* mostraram a presença de, aproximadamente, 300-400 proteínas. Foram identificadas proteínas com várias funções

biológicas, entre elas: enzimas com funções de proteção contra espécies reativas de oxigênio, chaperonas e enzimas envolvidas na síntese de alcalóides (DECKER *et al.*, 2000). O látex de *Manihot glaziovii* é também uma fonte rica em proteínas, constituído de proteínas com massas moleculares variando de 80 a 14 kDa, entre elas: quitinases, β -1,3-glucanases e inibidores de tripsina (PEREIRA *et al.*, 1999). John e colaboradores (2003) mostraram que o látex de diferentes variedades de manga (*Mangifera indica* L.) é rico em enzimas como polifenol oxidases e peroxidases, além de proteinases serínicas e cisteínas.

1.5 Bioquímica da Borracha

Embora mais de 2.500 espécies de plantas produzam borracha, toda borracha natural utilizada comercialmente no mundo é originada de uma única espécie, *Hevea brasiliensis* (seringueira). Devido sua estrutura molecular (polímero de cis-1,4-poliisopreno) e alta massa molecular (> 1 MDa), a borracha originada desta planta tem ótimas propriedades de elasticidade e resistência, que não são facilmente obtidas por polímeros sintéticos (CORNISH, 2001).

A borracha é sintetizada, principalmente, a partir da rota do mevalonato, no qual o isopentenil pirofosfato é utilizado como precursor (TAIZ e ZEIGER, 2006). A transferase da borracha, utilizando como co-fator o magnésio, adiciona seqüencialmente monômeros de isopentenil pirofosfato na configuração cis-1,4, com a liberação de pirofosfato em cada reação de condensação. Embora pouco seja conhecido sobre o processo de terminação

da síntese da borracha, a fosforilação de proteínas, esterificação, ciclização e hidrólise parecem estar envolvidas neste processo (CORNISH, 2001).

O tamanho das partículas de borracha pode variar entre as espécies, como é o caso de *Ficus elastica* (3,8 μm) e *Euphorbia lactiflua* (0,2 μm), ou na mesma espécie como é o caso de *H. brasiliensis* (1,0 e 0,2 μm) (CORNISH *et al.*, 2000). O tamanho parece ser um fator dependente da concentração de isopentenil pirofosfato e afinidade da transferase da borracha pelo seu substrato (CORNISH, 2001).

1.6 Mecanismos de Coagulação do Látex

Após sofrer algum dano mecânico, o látex é exsudado e progressivamente sofre coagulação. Esse processo envolve a agregação de partículas de borracha e é vital para a defesa da planta contra a possível invasão de patógenos, por bloquear locais de infecção (DUSSOURD, 1995).

Uma das proteínas mais abundantes do látex de *H. brasiliensis* é a heveína. Esta proteína é compartimentalizada nos lutóides, que são estruturas vacuolares dos laticíferos. Heveína é uma proteína de apenas uma cadeia, constituída de 43 aminoácidos, rica em cisteína e glicina (GIDROL *et al.*, 1994). Gidrol e colaboradores (1994) mostraram *in vitro* que o mecanismo de coagulação do látex de *H. brasiliensis* envolve a heveína e uma proteína glicosilada de 22 kDa, localizada na superfície das partículas de borracha. Quando os laticíferos e lutóides são rompidos, a heveína entra em contato com as proteínas glicosiladas de 22 kDa aderidas à borracha, funcionando como uma lectina com afinidade a resíduos de N-acetilglicosamina, aglutinando desta

forma as partículas de borracha. Por outro lado, foi proposto que quitinases presentes no látex apresentavam papel de prevenir a coagulação do látex por liberar moléculas de N-acetilglicosamina da proteína glicosilada de 22 kDa, retirando desta forma o sítio de ligação da heveína.

Wititsuwannakul e colaboradores (2008a, b e c) mostraram o envolvimento de uma lectina de 17 kDa na coagulação do látex de *H. brasiliensis*, distinta da heveína (Figura 2). Essa lectina agiria como uma ponte entre as partículas de borracha. No entanto a coagulação do látex é dependente de duas outras proteínas, uma aderida às partículas de borracha e outra livre no látex.

Como previamente mencionado, o látex de *Carica papaya* é uma fonte rica em enzimas proteolíticas. Essas enzimas são sintetizadas como zimogênios, mas são rapidamente ativadas e alcançam um máximo de atividade em menos de dois minutos após os laticíferos terem sido rompidos. Enzimas proteolíticas do tipo cisteínicas podem, de alguma forma, levar à coagulação do látex, embora o mecanismo de ação não seja conhecido (AZARKAN *et al.*, 2003). Silva e colaboradores (1997) propuseram que enzimas proteolíticas do tipo cisteínica são responsáveis pela coagulação do látex de *C. papaya*, evento similar à coagulação sanguínea que ocorre nos mamíferos.

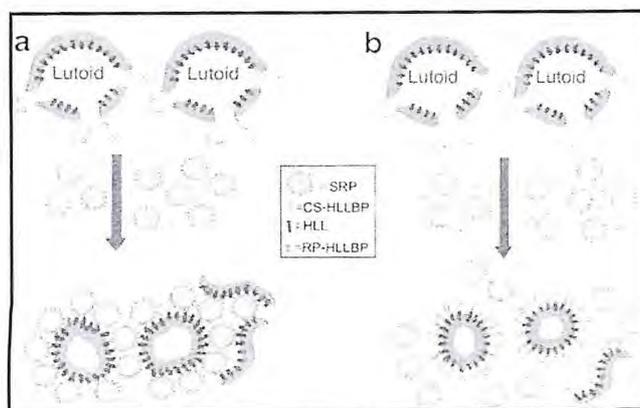


Figura 2: Mecanismo de coagulação do látex de *Hevea brasiliensis* proposto por Wititsuwannakul *et al.* (2008b). Após a planta sofrer um dano mecânico, os laticíferos e os lutóides são rompidos e uma lectina de 17 kDa (HLL) presente na membrana dos lutóides é exposta. (A) Se essa lectina reconhecer outra proteína (RP-HLLBP) aderida às partículas de borracha (SRP) o látex coagula ou (B) se reconhecer outra proteína solúvel no látex (CS-HLLBP) não ocorre a coagulação. A coagulação ocorrerá quando o processo A exceder o B.

1.7 Proteômica

Após o projeto genoma humano ter sido oficialmente completado, em 2003, em que três bilhões de bases do DNA foram seqüenciadas, surgiu a necessidade de se entender a enorme quantidade de dados gerados, iniciando assim, a “era pós-genômica”. Sozinha, a seqüência de DNA é incapaz de prever: se, quando ou onde os produtos gênicos são transcritos e traduzidos; as concentrações relativas desses produtos e a extensão das modificações pós-traducionais que ocorrem nas proteínas (LANDER *et al.*, 2001). Para solucionar essas questões, um novo campo tem ganhado destaque na ciência

das proteínas, a proteômica. Com o avanço de novas tecnologias como a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas, agora é possível identificar uma grande quantidade de proteínas de um organismo ou tecido sob condições específicas.

Proteômica é uma ciência que estuda as proteínas expressas em um dado organismo, órgão, tecido, célula ou mesmo organelas, sob diferentes condições fisiológicas e patológicas. Atualmente, o termo proteômica não se refere apenas à identificação de proteínas, mas também inclui o estudo da estrutura, função, interação e modificações pós-traducionais (FINNIE, 2006).

Proteoma refere-se ao estudo de todas as proteínas expressas por um genoma. Enquanto o genoma é único para cada organismo, o padrão de proteínas muda de tecido para tecido e em resposta a diferentes condições fisiológicas e ambientais. Com o reflexo da natureza dinâmica do proteoma, alguns cientistas usam o termo proteoma funcional para descrever todas as proteínas expressas por uma célula em uma determinada condição.

Com o seqüenciamento do genoma humano, foram estimados aproximadamente 30.000-40.000 genes potencialmente codificantes, contudo modificações pós-traducionais e 'splicing' alternativo do RNAm podem aumentar o número de proteínas potencialmente expressas para 10 ou 100 vezes (RAPPSILBER e MANN, 2002). As modificações pós-traducionais podem refletir no estado de ativação, localização celular e/ou função das proteínas. Mais de 200 diferentes tipos de modificações pós-traducionais foram caracterizadas, entre elas, as mais comuns são: eliminação do peptídeo sinal; proteólise; glicosilação; fosforilação; acetilação; metilação e desaminação (KRISHNA e WOLD, 1993).

Embora a identificação de todas as proteínas expressas em um organismo pareça uma tarefa bastante difícil de ser realizada, mesmo em organismos unicelulares, são cada vez mais completas as informações obtidas através de estudos proteômicos (MISHRA *et al.*, 2006). Atualmente, as técnicas mais utilizadas em estudos proteômicos são a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas.

1.8 Eletroforese Bidimensional

O proteoma de uma simples célula é extremamente complexo, consistindo de várias centenas ou milhares de proteínas. Com isso, novas tecnologias capazes de resolver e identificar milhares de proteínas, em tempo hábil, tiveram que ser desenvolvidas. Primeiramente, foi preciso melhorar as técnicas de separação de proteínas, já que a eletroforese em uma dimensão pode resolver no máximo entre 80 e 100 proteínas, separação esta baseada apenas na massa molecular. Contudo, em amostras muito complexas, proteínas diferentes podem possuir a mesma massa molecular. Em vista disso, O'Farrell (1975) e Klose (1975) utilizaram a combinação de duas propriedades químicas das proteínas (ponto isoelétrico e massa molecular) para obtenção uma maior resolução na separação destas em misturas complexas. Em seu trabalho, O'Farrell descreveu a separação de aproximadamente 1100 proteínas diferentes de lisado de *Escherichia coli* em um único gel bidimensional.

A eletroforese bidimensional separa as proteínas de acordo com dois parâmetros físico-químicos independentes (ponto isoelétrico e massa

molecular); na primeira dimensão, as proteínas são separadas através de um campo elétrico, ou seja, são separadas pelas cargas ou pontos isoelétricos; e na segunda dimensão, a separação ocorre em géis de poliacrilamida na presença de SDS, sendo as proteínas separadas pela massa molecular (ROCHA *et al.*, 2005). As proteínas podem ser visualizadas por coramento com Coomassie Brilliant Blue, ou reveladas com prata ou, ainda, com corantes fluorescentes.

Apesar de engenhosa, a metodologia descrita por O'Farrell e Klose (1975) era bastante trabalhosa, demorada e difícil de ser reproduzida, pois dependia muito da habilidade de cada pesquisador (PANDEY e MANN, 2000). Esses problemas foram resolvidos com o desenvolvimento de géis com gradientes de pH imobilizado (GORG *et al.*, 1985).

Nas últimas décadas, a alta resolução e reprodutividade das eletroforeses bidimensionais têm possibilitado a separação de centenas ou milhares de proteínas baseada na massa molecular e ponto isoelétrico. Eletroforeses bidimensionais de alta resolução podem separar até 10.000 proteínas por gel e quantidades tão pequenas como 1 ng por "spot" podem ser detectadas (KLOSE e KOBALZ, 1995). A substituição de tubos com géis contendo gradiente de pH por tiras de géis de poliacrilamida contendo gradiente imobilizado de pH tem proporcionado essa grande resolução e reprodutividade. Em adição, métodos mais poderosos e baratos para detecção de proteínas e o menor custo de computadores e programas permitem o uso rotineiro da eletroforese bidimensional. Isso faz com que esta técnica seja largamente utilizada como um método padrão de separação de proteínas.

Usualmente múltiplas amostras são produzidas em diferentes condições fisiológicas ou ambientais e separadas em vários géis bidimensionais. Apesar da grande capacidade de separação de proteínas através da eletroforese bidimensional, há um consenso de que não é possível a visualização, em um único gel de eletroforese, de todas as proteínas expressas em um tecido complexo como de organismos pluricelulares (HERBERT *et al.*, 2001). Uma das limitações desta técnica seria a resolução de proteínas com massas moleculares muito altas ou muito baixas, que não são bem separadas nas eletroforeses. Além destas, proteínas hidrofóbicas, altamente alcalinas ou em pequeno número de cópias dentro das células, como as proteínas sinalizadoras, não são facilmente obtidas em eletroforeses bidimensionais (ROCHA *et al.*, 2005). Com base nestas dificuldades, algumas estratégias necessitam ser empregadas, como o pré-fracionamento das amostras por meio de extrações seqüenciais, isolamento de sub-frações celulares, como organelas, utilização de tiras com faixas estreitas de pH, além de técnicas de coloração específica usando reagentes imunoquímicos (GORG *et al.*, 2000; HERBERT *et al.*, 2001).

1.9 Espectrometria de Massas

A posição de proteínas em géis bidimensionais não fornece informação suficiente para sua identificação. No entanto, em estudos rotineiros de proteômica, os 'spots' (proteínas) de interesse são retirados dos géis bidimensionais, digeridos por enzimas específicas e os peptídeos produzidos são identificados por espectrometria de massas (LIM *et al.*, 2003).

A espectrometria de massas é um método de determinação precisa de massas moleculares. Há várias décadas, esse método vem se consolidando como ferramenta insubstituível para a determinação de estruturas químicas, principalmente de compostos orgânicos e voláteis de pequenas massas moleculares. No final da década de 1980, foram desenvolvidos novos mecanismos de ionização mais suaves que permitiram o estudo de moléculas biológicas grandes, como as proteínas, por espectrômetros de massas (SIUZDARK, 1996).

Um espectrômetro de massas é constituído de três partes: um sistema de ionização, responsável pela introdução de cargas e vaporização da amostra; o analisador de massas, que determina a relação massa/carga (m/z) das moléculas, e o detector, que registra o número de íons de cada valor m/z .

O espectrômetro de massas determina a razão precisa de massa/carga (m/z) de proteínas ou outras moléculas em fase gasosa. Primeiramente, a molécula é ionizada e volatilizada, permitindo que o íon entre no analisador de massas que se encontra sob forte vácuo. Posteriormente o detector amplifica e transfere as informações geradas para um computador.

Em estudos proteômicos, os métodos de ionização mais utilizados para ionizar e volatilizar proteínas são o “electrospray” e a ionização por dessorção a laser auxiliado por matriz (MALDI), pelo fato de que essas duas técnicas causam pouca ou nenhuma fragmentação nas proteínas durante os processos de ionização (SIUZDARK, 1996).

A ionização por “electrospray” envolve a produção de íons por aplicação de um grande potencial elétrico em solução, resultando na ionização do analito. Após a ionização, um spray contendo o solvente e o analito é formado. As

gotas diminuem progressivamente ao passarem pelo espectrômetro de massas, chegando a um ponto em que elas se tornam instáveis e explodem em gotas ainda menores. Finalmente, a repulsão eletrostática é suficientemente alta para causar a dessorção dos analitos, que entram no analisador de massas. Os íons gerados por essa técnica são geralmente multicarregados (+1, +2, etc), contudo, matematicamente, eles podem ser transformados em um simples espectro de massas que revela a massa molecular dos analitos (AEBERSOLD e MANN, 2003).

A ionização por MALDI envolve a volatilização de proteínas auxiliada por uma matriz, que geralmente são pequenas moléculas orgânicas ácidas que absorvem luz no ultravioleta. A amostra, geralmente peptídeos, é diluída em uma matriz, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, que contém um grupo cromóforo que absorve luz no comprimento de onda do ultravioleta ou infravermelho. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam ocorre uma co-cristalização de ambos em uma placa de aço inoxidável contendo micro-fissuras para aplicação da mistura. Este cristal, submetido a pulsos de laser na faixa de absorção do cromóforo, provoca uma fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra e posterior dessorção, fazendo que entrem na fase gasosa. Os principais íons gerados por essa técnica são monocarregados (+1) (AEBERSOLD e MANN, 2003).

O analisador de massas mais utilizado no MALDI é o que utiliza o tempo de voo (TOF) na determinação da razão m/z do analito. Ele é baseado no princípio de que o analito carregado é acelerado devido uma aplicação de uma voltagem constante. Como a voltagem de aceleração é a mesma, os íons de

m/z diferentes separam-se no espaço e chegam a tempos diferentes proporcionais a relação massa/carga (m/z). Assim, os componentes individuais em uma mistura de íons são separados de acordo com suas relações m/z, tornando possível a determinação da massa de cada proteína ou peptídeo, submetido à análise, através da geração dos espectros de massas (MANN *et al.*, 2001; ASHCROFT, 2003). Depois de determinar os valores m/z e a intensidade de todos os picos do espectro, podem ser obtidas informações sobre a estrutura primária (seqüência) dos peptídeos após digestão com enzimas específicas. Esta estratégia é chamada MS em tandem, MS/MS ou MS², já que acopla dois estágios de MS e utiliza equipamentos do tipo MS/MS. Nesta técnica um íon-pai (ou precursor) é selecionado no primeiro MS e, no segundo, sofre uma fragmentação, geralmente com um gás inerte, denominada de dissociação induzida por colisão ("Collision-Induced Dissociation, CID"). Os novos picos produzidos pelos produtos gerados (íons-filhos) têm suas relações massa/carga determinadas em um segundo analisador. De modo geral, cerca de seis séries de íons aparecem nos espectros de MS/MS sob baixa energia de colisão. Ocorrem as séries a, b, c, quando a carga permanece na porção N-terminal da molécula e as séries x, y, z quando a carga permanece na porção C-terminal (STEEN e MANN, 2004). Em altas energias de colisão ocorrem as séries d, v, w, que correspondem às fragmentações de cadeias laterais dos aminoácidos. Os íons mais comuns e informativos são os íons b e y, gerados pela fragmentação, em baixa energia, da ligação peptídica existente entre os aminoácidos.

Em um espectro originado da fragmentação de um íon escolhido (precursor), a diferença entre dois picos subseqüentes de uma mesma série

tem como resultado a massa de um resíduo de aminoácido. Então, desta maneira, pode-se determinar a seqüência de aminoácidos considerando a diferença de massa entre picos vizinhos (STEEN e MANN, 2004).

Existem vários algoritmos que são usados para a busca de seqüências em bancos de dados com espectros provenientes de análises de MS/MS não processados, como por exemplo, "PeptideSearch", "Sequest", "Mascot", "Sonar MS/MS" e "ProteinProspector". Na maioria destes programas é ainda possível submeter os dados de MS junto com os dados de MS/MS, gerando um único valor de significância na identificação ("score"). Uma limitação da busca em banco de dados usando somente os dados de MS e MS/MS sem processamento é a necessidade da disponibilidade de seqüências de proteínas similares às das proteínas de análise no banco de dados, para uma identificação cruzada por homologia (MANN *et al.*, 2001).

1.10 Proteômica em Plantas

Vários trabalhos de proteômica vegetal estão disponíveis na literatura. Tais como, proteômica de organelas como cloroplasto, mitocôndrias e vacúolo, bem como de proteínas de membrana plasmática (WIJK, 2004; LILLEY e DUPREE, 2007). Além destes, há estudos de proteômica de órgãos como sementes, folhas e raízes (WONG e ABUBAKAR, 2005; HOCHHOLDINGER *et al.*, 2006). Trabalhos que envolvem proteômica são importantes, pois a identificação de proteínas em diferentes condições fisiológicas e ambientais dá um melhor entendimento da função destas no metabolismo do tecido ou órgão.

Contudo, esses estudos são limitados pela dificuldade de purificação e pequena quantidade de proteínas disponíveis (LILLEY e DUPREE, 2007).

O estudo de proteômica vegetal apresenta várias dificuldades, tal como, a pequena quantidade de proteínas, que é devido, principalmente, ao fato de que o volume celular, aproximadamente 70%, é ocupado por um grande vacúolo (TAIZ e ZEIGER, 2006). Além disso, a parede celular dificulta a lise e extração de proteínas e as células vegetais são ricas em vários componentes como: polissacarídeos, lipídeos, compostos fenólicos e metabólitos secundários, que interferem com os métodos de extração, separação e, conseqüentemente, com os processos de identificação de proteínas (NEWTON *et al.*, 2004). Esses fatores tipicamente fazem com que o estudo de proteômica em tecidos vegetais seja limitado, tendo sido apenas poucas centenas de proteínas identificadas (HOCHHOLDINGER *et al.*, 2006). Alguns trabalhos relatam que, em condições ótimas, apenas 25% de todas as proteínas presentes em um tecido vegetal podem ser identificadas em um estudo proteômico pelos métodos de análise atualmente disponíveis (HOCHHOLDINGER *et al.*, 2006).

O principal pré-requisito para o sucesso na identificação de proteínas via espectrometria de massas é a disponibilidade de dados de seqüência do organismo de estudo ou de espécies altamente relacionadas (SHEVECHENKO *et al.*, 1996). Atualmente, existem 7 projetos genômicos de plantas completos, incluindo da *Arabidopsis thaliana* (tabaco), *Glycine max* (soja), *Oryza sativa* (arroz) e *Zea mays* (milho), e em progresso existem mais cinco projetos: *Brachypodium distachyon*, *Lotus japonicus*, *Manihot esculenta* (mandioca),

Solanum lycopersicum (tomate) e *S. tuberosum* (batata) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>, acesso em 20 de março de 2009). Em adição a esses estudos de seqüenciamento genômico, estão em progresso 280 projetos de seqüenciamento de ESTs, que correspondem aos mRNAs transcritos. Por isso não é surpreendente que o estudo de proteômica tem sido possível para uma grande variedade de espécies vegetais sem genomas seqüenciados, sendo as plantas de interesse agrônômico como o arroz, milho, trigo, café, tomate e soja as mais estudadas (HOCHHOLDINGER *et al.*, 2006).

1.11 Proteômica em Fluidos Laticíferos

Embora as plantas laticíferas sejam um atraente modelo biológico para estudo, apresentando diversas propriedades farmacológicas importantes, investigações sobre as propriedades bioquímicas e fisiológicas de látex são ainda limitadas em bases de dados bibliográficos, principalmente, em se tratando de estudos proteômicos. Em particular, a purificação de proteínas, bem como de outros compostos presentes neste fluido, não são amplamente descritos na literatura.

Estudos proteômicos de fluidos laticíferos foram realizados apenas nas espécies de *Hevea brasiliensis* e *Papaver somniferum* (POSCH *et al.*, 1996; DECKER *et al.*, 2000). A primeira, popularmente conhecida como seringueira (pertencente à família Euphorbiaceae), é a planta laticífera mais conhecida no mundo. Isso se deve ao fato de seu látex ser utilizado como fonte de borracha na indústria. A borracha desta planta é utilizada na produção de vários objetos,

desde a chupeta até o pneu. Essa árvore é cultivada em larga escala mundial em vários países, perfazendo, aproximadamente, 9.485 milhões de hectares (Cornish, 2001).

A maioria dos trabalhos que estudam o látex de *H. brasiliensis* tem como foco a identificação de proteínas relacionadas à indução de respostas alergênicas. Isso porque mesmo após todo o processo de industrialização da borracha, alguns resquícios de proteínas estão presentes no produto final, que são as principais causadoras de alergias mediadas por IgE (SUSSMAN *et al.*, 2002). Posch e colaboradores (1996) caracterizaram e identificaram 20 proteínas que reagiram com soros de pessoas que possuíam alergia a luvas de látex através de eletroforese bidimensional e seqüência N-terminal.

A planta *P. somniferum* é conhecida popularmente como papoula dormideira (papoula), pertencente à família Papaveraceae. É uma espécie existente nas zonas do Médio e Extremo Oriente e, também, em algumas zonas do território americano. Esta planta apresenta um grande interesse econômico e farmacológico. Isso devido seu látex ser fonte de diversos compostos farmacêuticos importantes, tais como: compostos analgésicos (morfina) e relaxantes (papaverina). Decker e colaboradores (2000) caracterizaram e identificaram proteínas presentes no látex dessa planta através de eletroforeses bidimensionais, microsequência e espectrometria de massas. Foram identificadas 93 proteínas com atividades biológicas diversificadas, entre elas: enzimas envolvidas na glicólise (frutose-bifosfato, aldolase, triose fosfato isomerase, fosfoglicerato quinase e enolase), na

proteção (glutathione S-transferase e peroxidase), chaperonas e enzimas envolvidas na síntese de alcalóides (codeína redutase).

1.12 Descrição e Características da Planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

C. procera (Ait.) R. Br., pertencente à família Apocynaceae, é um arbusto perene, ereto, pouco ramificado, podendo alcançar 6 m de altura. As folhas são grandes, subcoriáceas, cobertas, muitas vezes, por uma camada de cera. As flores são arroxeadas e dispostas em inflorescências terminais. Os frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes envolvidas em painas sedosas brancas sendo disseminadas pelo vento (Figura 3) (LORENZI e MATOS, 2002).

Seu nome é derivado do grego “kalos” = belo, “tropis” = barco e *procera* do latim “procerus” = alto, esbelto. Ela é provavelmente nativa da Índia, mas é encontrada em quase todas as regiões tropicais e semi-áridas da América, inclusive no Brasil, desde o Nordeste até o norte de Minas Gerais. Esta planta possui vários nomes populares, de acordo com a região onde se encontra no Brasil: algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortêncica (CE), paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG).

Na medicina tradicional da Índia, a planta *C. procera* tem sido usada para combater uma variedade de doenças, incluindo úlceras e tumores. Também tem sido usada como purgativo e anti-helmíntico. Suas folhas e raízes são utilizadas para aliviar a dor em diferentes condições (KIRTIKAR e BASU, 2006). Seu látex demonstrou diversas atividades biológicas como: hemolítica e antiplasmodial

(SHARMA *et al.*, 2001); antidiarréica (KUMAR *et al.*, 2001); antifertilidade em ratos (KAMATH e RANA, 2002); analgésica (DEWAN *et al.*, 2000); antiinflamatória (KUMAR e BASU, 1994); pró-inflamatória (SINGH *et al.*, 2000) e antibacteriana (LARHSINI *et al.*, 1999). Todos os trabalhos citados foram feitos apenas com o látex íntegro e nenhum descreve os possíveis princípios ativos.

Posteriormente, algumas atividades biológicas previamente encontradas no látex íntegro foram associadas a proteínas: antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2004) e analgésica (SOARES *et al.*, 2005), além de anti-câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Esta mesma fração protéica do látex de *C. procera* não causou alergia, nem toxicidade em ratos (RAMOS *et al.*, 2006a; RAMOS *et al.*, 2007b) e mostrou atividade inseticida contra o mosquito da dengue e contra diferentes pragas agrícolas (RAMOS *et al.*, 2006b, 2007a).

A caracterização de proteínas no látex de *C. procera* para um maior entendimento da sua função na planta foi o principal fator que estimulou a pesquisa desenvolvida nesta tese de doutorado. Primeiramente, estudos proteômicos foram realizados para uma compreensão mais ampla das proteínas presentes no látex. Posteriormente, a fração protéica do látex foi caracterizada quanto à presença de proteinases. O trabalho finaliza com a caracterização da atividade antifúngica da fração protéica do látex, com o isolamento, caracterização, atividade biológica e mecanismo de ação de uma osmotina.

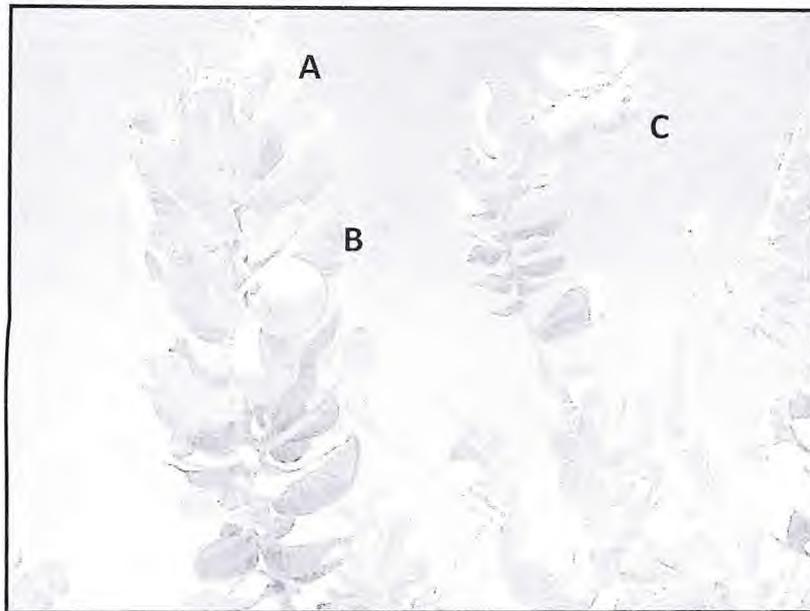


Figura 3: Aspecto geral da planta *Calotropis procera*, crescida na região metropolitana de Fortaleza-Ce. A: Inflorescência; B: Folha; C: Fruto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Piridina, guaiacol, 3-amino-9-etil carbazole, acrilamida, bis-acrilamida e polivinilpirrolidona (PVPP) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil.

Ditiotreitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), iodoacetamida, 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), IPG buffer 3-10, phastgel blue R, uréia, tiouréia e a resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow foram obtidos da Amersham Bioscience, USA.

Tripsina grau seqüenciamento, modificada, foi obtida da Promega, Brasil.

Albumina sérica bovina, fração V, foi obtida de INLAB, Brasil.

Ácido periódico, ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA) e metabissulfito de potássio foram obtidos da Synth ou VETC, Brasil.

Os demais reagentes foram de grau analítico e de diferentes fornecedores.

2.2 Coleta e Fracionamento do Látex

Através de incisões no ápice caulinar de espécimes, o látex foi coletado sempre pelo período da manhã (7-8 h) em tubos tipo Falcon, contendo 20 ml de água destilada, sendo o látex misturado na proporção de 1:1 (v/v). A coleta de 20 ml pode ser obtida de um único exemplar da planta e levou, em média, 10-15 min. O procedimento de coleta do látex sobre água foi mostrado diminuir o efeito tipo coagulação que ocorre logo após sua coleta. Ao contrário, se coletado na ausência de água, o látex tende a sofrer reações de oxidação, evitando a formação de pedaços (flocos) de borracha, característica comum de látex de plantas. Este fenômeno leva a grandes perdas de moléculas solúveis, que são aprisionadas nas partículas de coagulação.

Após a coleta do látex em água, o material foi centrifugado em centrífuga de bancada (Sigma 4K15) a $5.000 \times g$ por 10 min a 4°C . O precipitado obtido era constituído de uma densa massa com aspecto de borracha. Entretanto, o sobrenadante mantinha o aspecto original do látex, isto é, leitoso, embora desprovido de floculação. O sobrenadante obtido após a primeira centrifugação foi submetido à diálise, contra água destilada a 8°C por 60 h, com constantes trocas. Após diálise, uma nova centrifugação foi realizada, nas mesmas condições descritas acima, e um sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha foi obtido. Esta fração do látex foi alvo de análise neste trabalho e designada como **Proteínas do Látex (LP)**, já que foi demonstrado anteriormente ser uma fração rica em proteínas. Importante frisar neste ponto, que a membrana de diálise utilizada tinha capacidade para retenção de moléculas com massas moleculares superiores a 8.000 Da. A seqüência de eventos realizados para a obtenção das proteínas do látex está sumarizada no esquema abaixo (Figura 4).

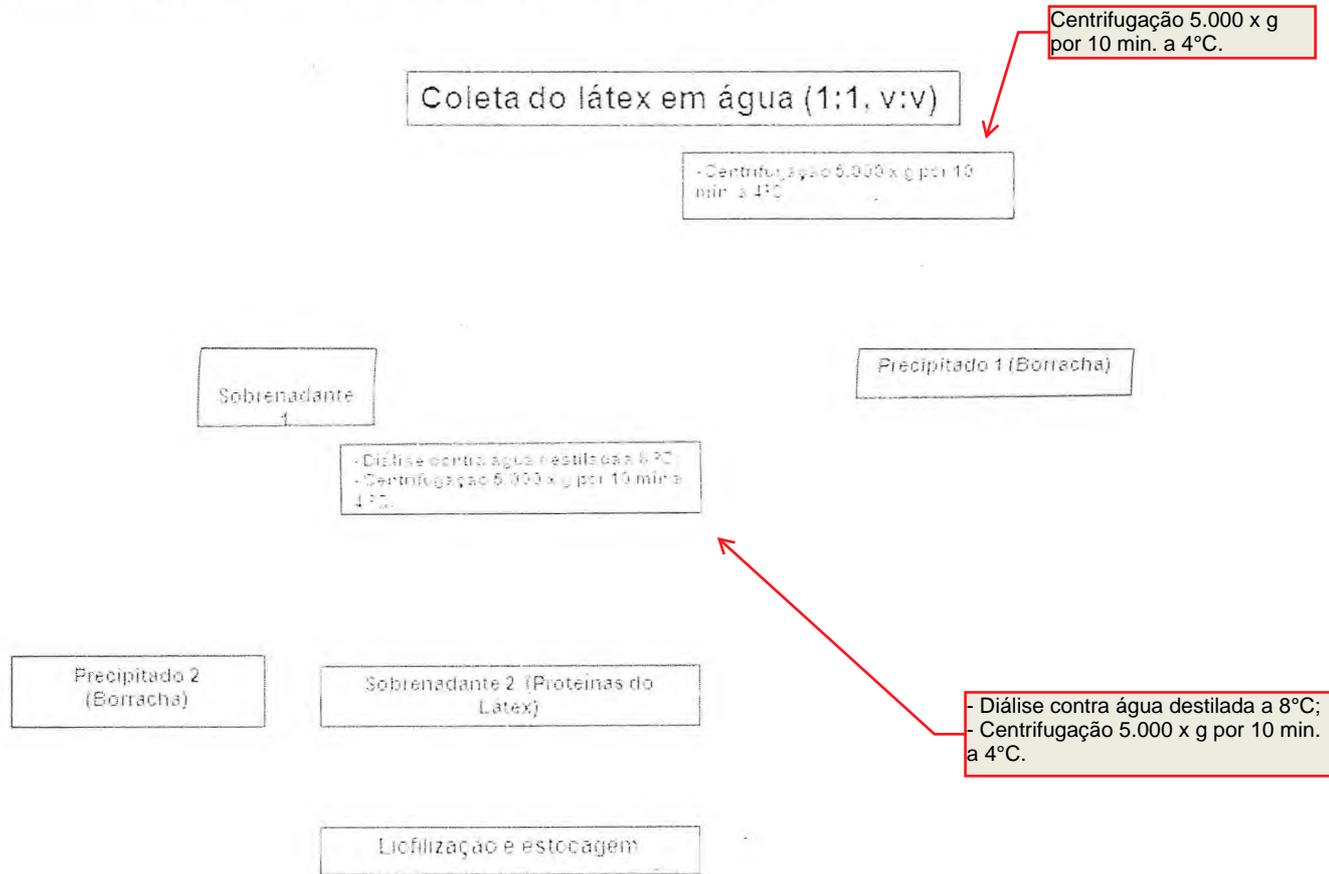


Figura 4: Esquema de coleta e obtenção da fração protéica do látex de *C. procerca*.

2.3 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose Fast Flow

Cromatografias de troca iônica foram realizadas com o objetivo de diminuir a complexidade da amostra, para posteriores análises por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. As proteínas do látex (50 mg) foram dissolvidas em 5 ml de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 20 min e o sobrenadante aplicado em uma coluna de CM-Sepharose Fast Flow (14 x 2,5 cm) previamente equilibrada com o tampão da amostra. Os picos retidos foram eluídos com diferentes concentrações de NaCl. Foi usado um fluxo de 0,5 ml/min e frações de 3 ml foram coletadas. Os tubos referentes a cada pico foram reunidos e dialisados contra água destilada e posteriormente liofilizados.

2.4 Processamento do Material Biológico para Eletroforese Bidimensional

A precipitação de proteínas, seguida pela re-suspensão na solução de hidratação, é geralmente empregada para seletivamente separar proteínas de contaminantes, tais como sais, lipídios, ácidos nucleicos, metabólitos secundários (no caso das plantas), que podem de alguma forma interferir com os resultados das eletroforeses bidimensionais, principalmente no passo de focalização isoelétrica.

Em vista disso, as metodologias a seguir foram empregadas com o objetivo de retirar tais contaminantes da fração proteínas do látex, para obtenção de eletroforeses bidimensionais reproduzíveis, de boa visualização e definição.

2.4.1 Precipitação com Acetona

As proteínas do látex (10 mg) foram dissolvidas em 1 ml de água destilada e centrifugadas (Eppendorf centrifuge 5417R) a 20.000 x *g* por 30 min a 4 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados 4 ml de acetona gelada. Após 12 h a -20 °C, a mistura foi novamente centrifugada como citado acima. O precipitado final foi secado em liofilizador (Labconco Freezone 6). Dessa forma, um pó branco foi obtido e armazenado a -20 °C.

2.4.2 Precipitação com Acetona e Ácido Tricloroacético (TCA)

As proteínas do látex (10 mg) foram dissolvidas em 1 ml de água destilada e centrifugadas a 20.000 x *g* por 30 min a 4 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados 4 ml de acetona gelada contendo TCA 10 % , e após 12 h a -20 °C, a mistura foi novamente centrifugada como citado acima. O precipitado foi lavado com 1 ml de acetona gelada e novamente centrifugado. Esse passo foi repetido mais duas vezes para remover todo o TCA. O precipitado final foi secado em liofilizador e armazenado a -20 °C.

2.4.3 Solubilização em Tampão Piridina

A solubilização das proteínas totais do látex foi realizada utilizando o tampão piridina 50 mM pH 5,0, como descrito por Vasconcelos e colaboradores (2005). Para tanto, as proteínas do látex (10 mg) foram dissolvidas em 400 µl de tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiouréia 10 mM e SDS 1% (1:40 m/v) e polivinilpolipirrolidona (PVPP), em quantidade igual a duas vezes a massa da amostra. A mistura ficou sob agitação constante a 4 °C. Passadas duas horas, o material foi centrifugado a 20.000 x *g* por 30 min a 4 °C. Ao sobrenadante, foram adicionados 4 ml de acetona gelada contendo TCA 10%, e após 12 h a -20 °C, a mistura foi novamente centrifugada como citado acima. O precipitado foi lavado com 1 ml de acetona gelada e novamente centrifugado. Esse passo foi repetido mais duas vezes para remover todo o TCA. O precipitado final foi secado em liofilizador e armazenado a -20 °C.

Em paralelo, a fração borracha foi submetida à extração de proteínas utilizando tampão piridina. A fração borracha (10 mg) foi extraída em 400 µl de tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiouréia 10 mM, SDS 1% (1:40 m/v) e polivinilpolipirrolidona (PVPP), em quantidade igual a duas vezes a massa da amostra. Passados 30 min em sonificador, a mistura ficou sob agitação constante a 4 °C por duas horas. Após esse período, o material foi centrifugado e o sobrenadante precipitado com acetona contendo TCA como descrito acima. O esquema de solubilização e extração de proteínas com tampão piridina está sumarizado na Figura 5.

2.5 Dosagem de Proteínas

O método de Bradford (1976) foi empregado para avaliar a quantidade de proteínas obtida em cada processo de extração e estimar a quantidade de proteínas a ser utilizada nos subseqüentes experimentos. Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração.

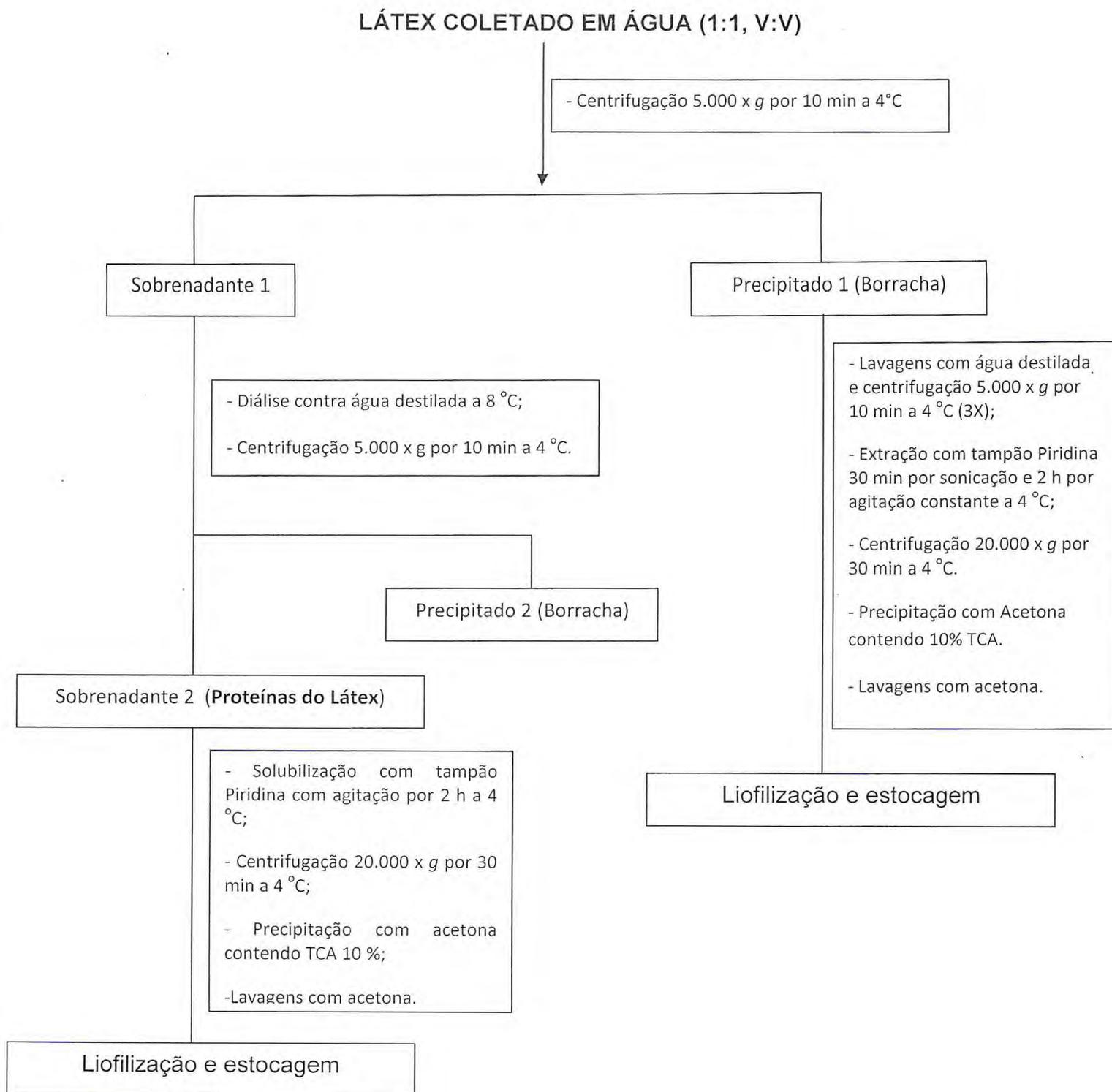


Figura 5: Esquema de solubilização de proteínas da fração proteínas do látex e extração de proteínas retidas na fração borracha.

2.6 Eletroforeses Bidimensionais, Revelação e Análises das Imagens

As amostras obtidas das diferentes metodologias de solubilização e precipitação foram dissolvidas em 50-100 μ l de uréia 7 M, tiouréia 2 M. Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). A partir dos resultados das dosagens, foi possível encontrar o volume de amostra contendo a massa de proteínas desejada a ser diluída em solução de hidratação [uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 1%, CHAPS 1%, IPG buffer 3-10 2% (v/v) e azul de bromofenol 0,02% (m/v)] para um volume final de 200 μ l (JUNQUEIRA, 2005). Utilizou-se o sistema de hidratação passiva, visto que os 200 μ l da solução de hidratação, com a quantidade de amostra desejada, foram aplicados no Reswelling Tray (Pharmacia Biotech) e deixadas em contato com os géis de gradiente de pH imobilizado (tiras de IPG), por, aproximadamente, 14 h. As tiras de IPG tinham 11 cm de comprimento e as faixas de pH variaram de 3-10, 4-7 e 6-11. A focalização isoeletrica foi realizada no equipamento EttanTM IPGPhor IITM (GE-Healthcare), utilizando o seguinte programa: 1^o passo, 200 V por 1 h; 2^o passo, 500 V por 1 h; 3^o passo, 5000 V por 2:30 h; e 4^o passo, 8000 V até atingir 18.000 Volts horas totais. A focalização foi mantida à temperatura constante de 20 °C.

Após a focalização, as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em solução de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, contendo glicerol 30%, uréia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol) contendo DTT 1% por 20 min para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com iodoacetamida 2,5%, por 20 min. Terminado o equilíbrio, as tiras foram mergulhadas em tampão de corrida por 10 segundos para livrá-las do excesso de solução de equilíbrio. As

tiras equilibradas foram postas no topo de géis de poliacrilamida (14 x 14 cm) e fixadas com agarose 0,5% em tampão de corrida. A segunda dimensão foi realizada em sistema vertical em géis 12,5 ou 15%. O sistema foi alimentado por uma fonte Power-Pac 3000 (Bio-Rad). A corrida transcorreu em duas etapas: na primeira, foi aplicada corrente de 15 mA/gel, durante 15 min, e, na segunda, 20 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (aproximadamente 4:30 h). Terminada a corrida, os géis foram revelados com prata ou corados com Coomassie R 250 (PhastGel Blue R).

Os géis foram escaneados utilizando o programa LabScan v. 5.0 (GEHealthcare), no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência. As imagens foram analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare) por uma combinação de detecção automática dos “spots”, feita pelo programa, e detecção manual. Pelo programa foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada “spot”.

2.7 Seleção e Processamento dos *Spots* para Espectrometria de Massas

Todas as proteínas coradas com Coomassie Brilhante Blue foram retiradas dos géis bidimensionais com auxílio de um bisturi e transferidas para tubos eppendorfs de 1 ml, onde foi realizada a digestão com tripsina, de acordo com o método de Hellman e colaboradores (1995), com algumas alterações. Os “spots” foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM/ acetoneitrila 50%, em pelo menos 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com acetoneitrila 100% por 5 min. O solvente remanescente foi removido

dos pedaços dos géis em concentrador de amostra Speed Vac (Savant). Os spots foram reidratados com 15 µl de solução de bicarbonato de amônio 50 mM, contendo 0,2 µg de tripsina grau seqüenciamento. Após 1 h a 4 °C, 20 µl do tampão bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados em cada tubo e a digestão realizada em banho a 37 °C, por 16 h. Em seguida, os peptídeos trípticos foram extraídos dos géis com solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 5%, com auxílio de um sonicador, por 30 min (JUNQUEIRA, 2005).

2.8 Espectrometria de Massas

A mistura de peptídeos da digestão tríptica foi dissolvida em 2 µl de TFA 0,5%. Meio microlitro desta solução foi aplicada na placa de MALDI e misturada com 0,5 µl de uma solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3%. A mistura foi deixada a 25 °C por 1 h, para completa cristalização da matriz, antes da análise no espectrômetro de massas.

Os espectros de massa foram obtidos utilizando o equipamento ABI 4700 TOF/TOF (Applied Biosystems). O modo usado foi o modo interativo, onde todas as amostras eram analisadas, automaticamente, no modo refletor MS, sendo, posteriormente, os 10 picos mais intensos submetidos às análises posteriores por MS/MS. A intensidade do laser utilizada foi 4800 para o modo MS e 5200 para o modo MS/MS e a célula de colisão configurada para 1 kV em pressão de 10^{-6} torr em presença de gás atmosférico.

2.9 Pesquisa no Banco de Dados

Os dados obtidos do MALDI-TOF-TOF, utilizando o programa GPS Explorer™ (Applied Biosystems), onde os dados de MS e MS/MS eram processados, foram submetidos, conjuntamente, ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. – www.matrixscience.com). Os dados obtidos nos espectros foram filtrados pela relação sinal/ruído dos picos que foi de 20 para os dados de MS e 10 para MS/MS. A busca foi feita utilizando NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) como banco de dados restringido para Viridiplantae (Green Plants) e, posteriormente, para todas as entradas. Os critérios de busca foram todas as massas moleculares e pontos isoeletrônicos, cisteínas modificadas por carboxi-amido-metilação e possíveis modificações, como a oxidação de metionina. Foi tolerada, no máximo, uma perda de clivagem para peptídeos semi-trípticos e uma variação de massa dos peptídeos de 100 ppm. Quando algumas proteínas não foram identificadas pela metodologia citada acima, elas foram submetidas à sequência “de novo” utilizando o programa DATA EXPLORE Software. As seqüências obtidas foram submetidas ao programa proteinBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Além disto, a identificação de algumas proteínas pôde ser confirmada por zimogramas, como descrito posteriormente.

2.10 Revelação de Glicoproteínas

Eletroforeses unidimensionais e bidimensionais foram realizadas e glicoproteínas foram detectadas utilizando a reação de Schiff, como descrito por Alfenas (1998). Após a corrida eletroforética, os géis foram imersos em

TCA 10 % por 30 min e, posteriormente, em solução de periodato 1 % e ácido acético 3 % por uma hora a 25 °C. Os géis foram deixados em contato com a solução de Schiff, no escuro, por 50 min, e depois descorados com bissulfito 0,5 %. Como controle negativo foi utilizado a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA) e como controle positivo a lactotransferina bovina (LTB).

2.11 Detecção de Proteinases por Zimograma

As eletroforeses foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Laemmili (1970), com modificações. As proteínas do látex foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 65 mM, pH 6,8), contendo SDS 1%, glicerol 10%, na presença ou ausência de 2-mercaptoetanol 5%. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo 0,1% de gelatina a 8 °C, submetidas a 20 mA por placa (MACEDO *et al.*, 2004). Após eletroforese, os géis foram incubados em Triton X-100 2,5% por 40 min a 25 °C, sob agitação constante. Em seguida, os géis foram incubados em diferentes tampões nas concentrações de 50 mM [acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0, 9,0) e glicina (pH 10,0)] contendo DTT 3 mM por 3 h a 37 °C. Após este período, os géis foram corados com solução de coomassie brilliant blue R-250 0,2% e, posteriormente, descorados com solução de 30% metanol e 10% de ácido acético. A atividade enzimática foi detectada como bandas transparentes nos géis.

2.12 Zimograma para Quitinases

A detecção de quitinases em gel foi realizada como descrito por Trudel e Asselin (1989). Após realizadas as eletroforeses, os géis de poliacrilamida (12,5% contendo 0,1% de etilenoglicol quitina) foram incubados em 100 ml de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, contendo Triton X-100 1%. Após 12 h

a 37 °C, os géis foram incubados com 0,01% de calcoflur MR 28 por 1 h a 37 °C e a visualização da atividade quitinolítica foi feita sob a luz ultravioleta em sistema de vídeo (UV ITF LABORTECHNIK, Wasserburg, Germany).

2.13 Zimogramas para Peroxidases

Após as eletroforeses, os géis foram incubados em solução de Triton X-100 2,5% em água a 25 °C sob agitação, por 40 min e, a seguir em solução de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo peróxido de hidrogênio 0,06%, guaiacol 0,2% e 3-amino-9-etil carbazole 0,1%. A atividade enzimática foi detectada como bandas marrons nos géis (JOHRI *et al.*, 2005).

2.14 Zimogramas Reversos para Detecção de Inibidores de Proteinases

Após eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina 0,1 %, os géis foram incubados em 100 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo 1 mg de papaína e DTT 3 mM, por 10 h a 37 °C. Após esse período, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados com solução de metanol:ácido acético: água (4:1:5 v:v:v). Inibidores de proteinases foram detectados como bandas azuis nos géis (OHASHI *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS

O conteúdo de proteínas solúveis no látex íntegro de *Calotropis procera* foi estimado ser de 18,59 mg/ml. Após a primeira centrifugação a 5.000 x g por 10 min, o teor de proteína no sobrenadante, com o mesmo aspecto do látex íntegro, foi de 11,20 mg/ml. Após diálise e nova centrifugação, o teor de proteínas no sobrenadante, límpido e livre de borracha, foi de 8,35 mg/ml. Esses resultados mostram que há uma perda considerável de proteínas durante o processamento do látex e que, provavelmente, são aprisionadas nas partículas de borracha, já que não foram detectadas proteínas solúveis na água de diálise. É importante lembrar que as membranas de diálise utilizadas possuíam a capacidade de reter proteínas com massas moleculares maiores que 8.000 Da.

Diferentes métodos de solubilização e precipitação de proteínas foram realizados com o objetivo de obter géis bidimensionais reproduzíveis, com boa definição e que representassem as proteínas mais abundantes no látex. Quando as proteínas do látex foram solubilizadas em água e precipitadas com acetona, 36 "spots" foram detectados, sendo a maioria com massas moleculares de 11 kDa a 45 kDa e pI 9 a 10 (Figura 6A). A precipitação das proteínas do látex dissolvidas em água com acetona contendo TCA 10% foi mais eficiente que a precipitação apenas com acetona, sendo visualizados 88 "spots", compreendendo proteínas com massas moleculares variando de 12 kDa a 27 kDa e pI de 4,6 a 10,0 (Figura 6B).

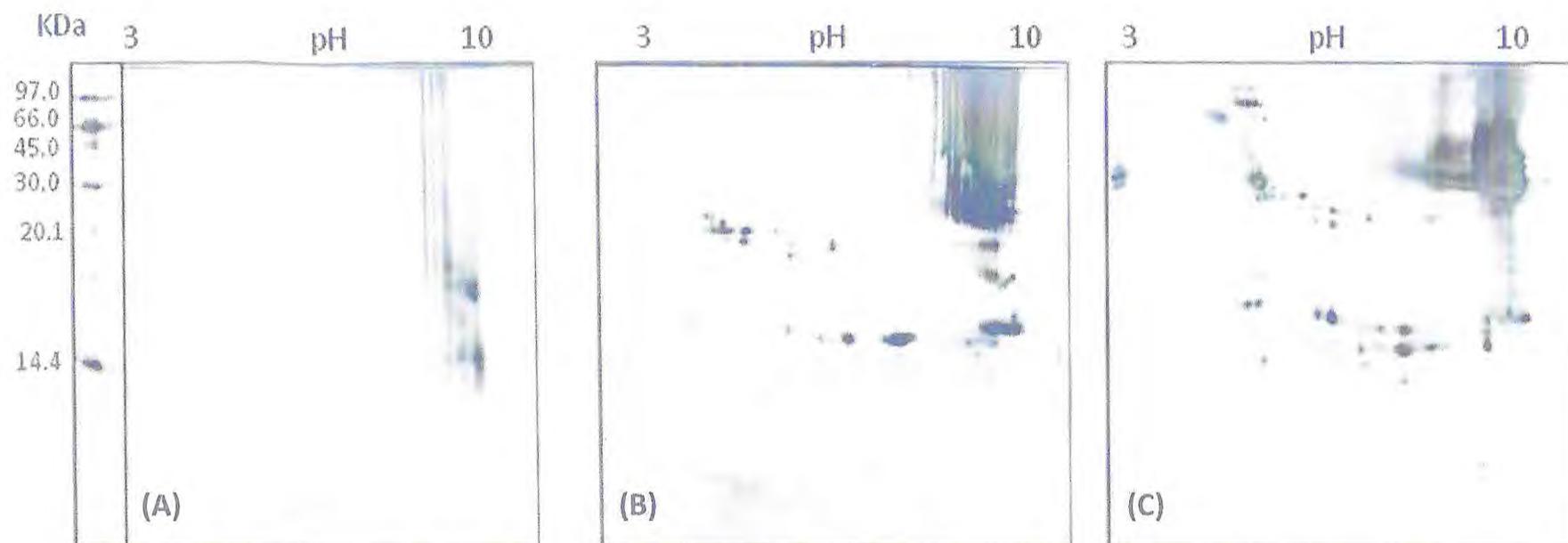


Figura 6: Eletroforeses bidimensionais das proteínas do látex de *C. procera* utilizando diferentes métodos de solubilização e precipitação de proteínas. **(A)** Proteínas do látex (PL) dissolvidas em água e precipitadas com acetona; **(B)** PL dissolvidas em água e precipitadas com acetona contendo TCA 10%; e **(C)** PL solubilizadas com tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiuréia 10 mM e SDS 1%, e precipitadas com acetona contendo TCA 10%. Géis de 12,5% revelados com prata. Foram aplicados 50 µg de proteína por gel.

A solubilização com tampão piridina 50 mM pH 5,0 e posterior precipitação utilizando acetona contendo TCA 10% foi a mais eficiente das metodologias utilizadas. Foram detectados 108 "spots" com massas moleculares variando de 13 a 110 kDa e pI 3,5 a 9,7 (Figura 6C). Interessante que nas figuras 6B e 6C foram observadas um grande número de proteínas com massas moleculares na faixa de 45 kDa e muito básicas. Nessas análises, a separação das proteínas por focalização isoelétrica foi realizada com tiras de 11 cm de pH 3-10. Posteriormente, uma segunda análise foi realizada utilizando o método de solubilização de proteínas com tampão piridina e tiras de pH variando de 4-7, para uma maior separação das proteínas nesta faixa de pH. No gel de 4-7, foram detectadas 199 proteínas com massas moleculares variando 13,4 a 111,2 kDa e pI 4 a 7 (Figura 7B).

Adicionalmente, o tampão piridina foi utilizado para extração de proteínas que ficaram retidas nas partículas de borracha (primeiro precipitado), sabendo que uma considerável quantidade de proteína é perdida após as etapas de centrifugação. Através da utilização de tiras de pH na faixa de 3-10 e 4-7 foram detectadas 56 proteínas com massas moleculares entre 9,2 kDa e 80,3 kDa e pI 4,5 a 10,0 (Figura 7C e 7D). Contudo, foi predominante a presença de proteínas com massas moleculares de, aproximadamente, 16 kDa.

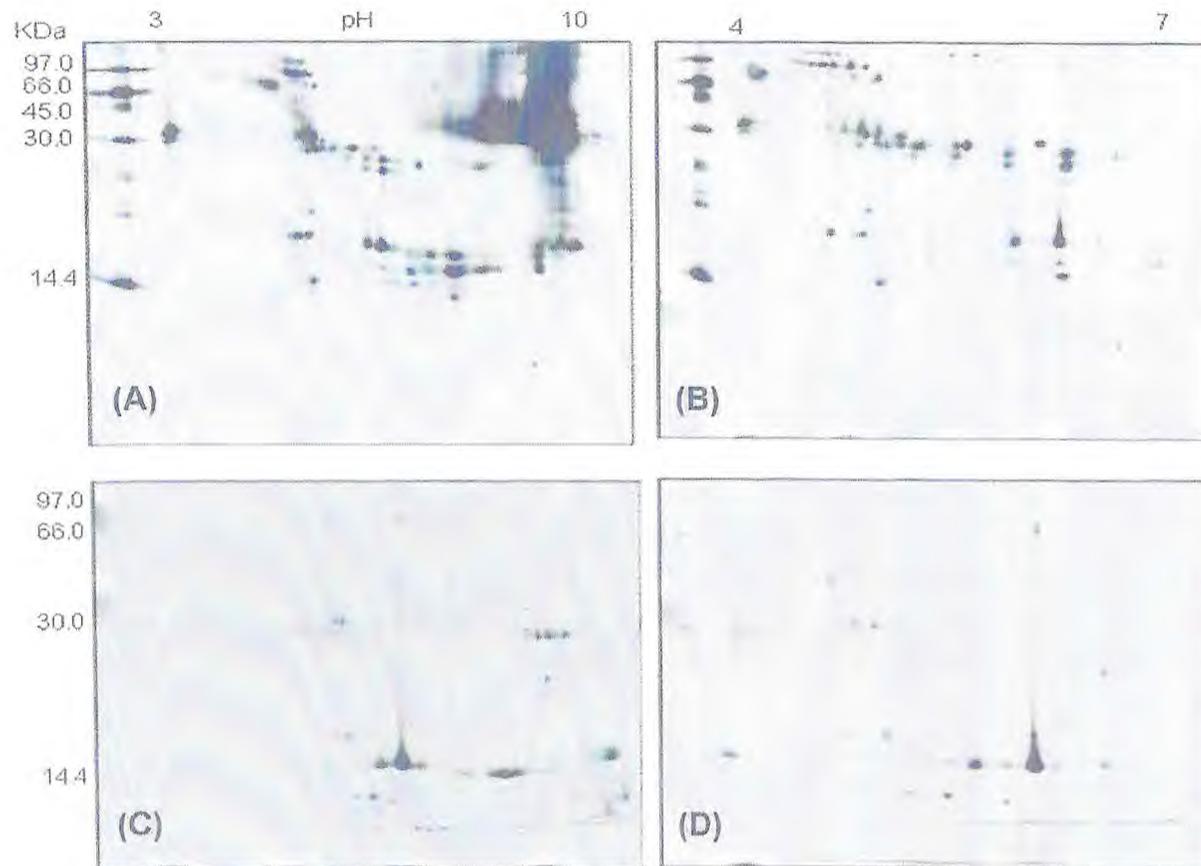


Figura 7: Eletroforeses bidimensionais das proteínas do látex e das proteínas extraídas da fração borracha em tampão piridina 50 mM, pH 5,0. **(A e B)** Proteínas do látex de *C. procera* utilizando intervalos de pH de 3-10 e 4-7, respectivamente. **(C e D)** Proteínas extraídas da fração borracha utilizando faixas de pH de 3-10 e 4-7, respectivamente. Géis poliacrilamida de 12,5% revelados com prata. Foram aplicados 50 µg de proteína em cada gel.

Após determinação de uma boa estratégia de solubilização e precipitação de proteínas, novas eletroforeses foram realizadas para posterior identificação por espectrometria de massas. Para diminuir a complexidade da amostra, cromatografias de troca iônica em coluna de CM-Sepharose Fast Flow foram realizadas. As proteínas do látex foram separadas em três frações: PI, pico não retido, eluído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0; PII e PIII, picos retidos, eluídos da coluna com tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,0 contendo 0,2 M e 0,3 M de NaCl, respectivamente (Figura 8). Cada fração foi submetida à eletroforese bidimensional para posterior seleção de "spots" e identificação por espectrometria de massas (Figura 9).

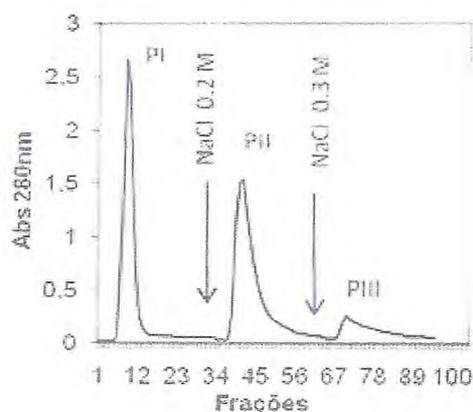


Figura 8: Perfil cromatográfico das proteínas do látex (PL) de *C. procerca* em coluna de CM-Sepharose Fast Flow. PI, pico não retido, eluído com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; PII e PIII, picos retidos, eluídos com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 0,2 e 0,3 M de NaCl, respectivamente. Fluxo 0,5 ml/min. Frações de 3 ml.

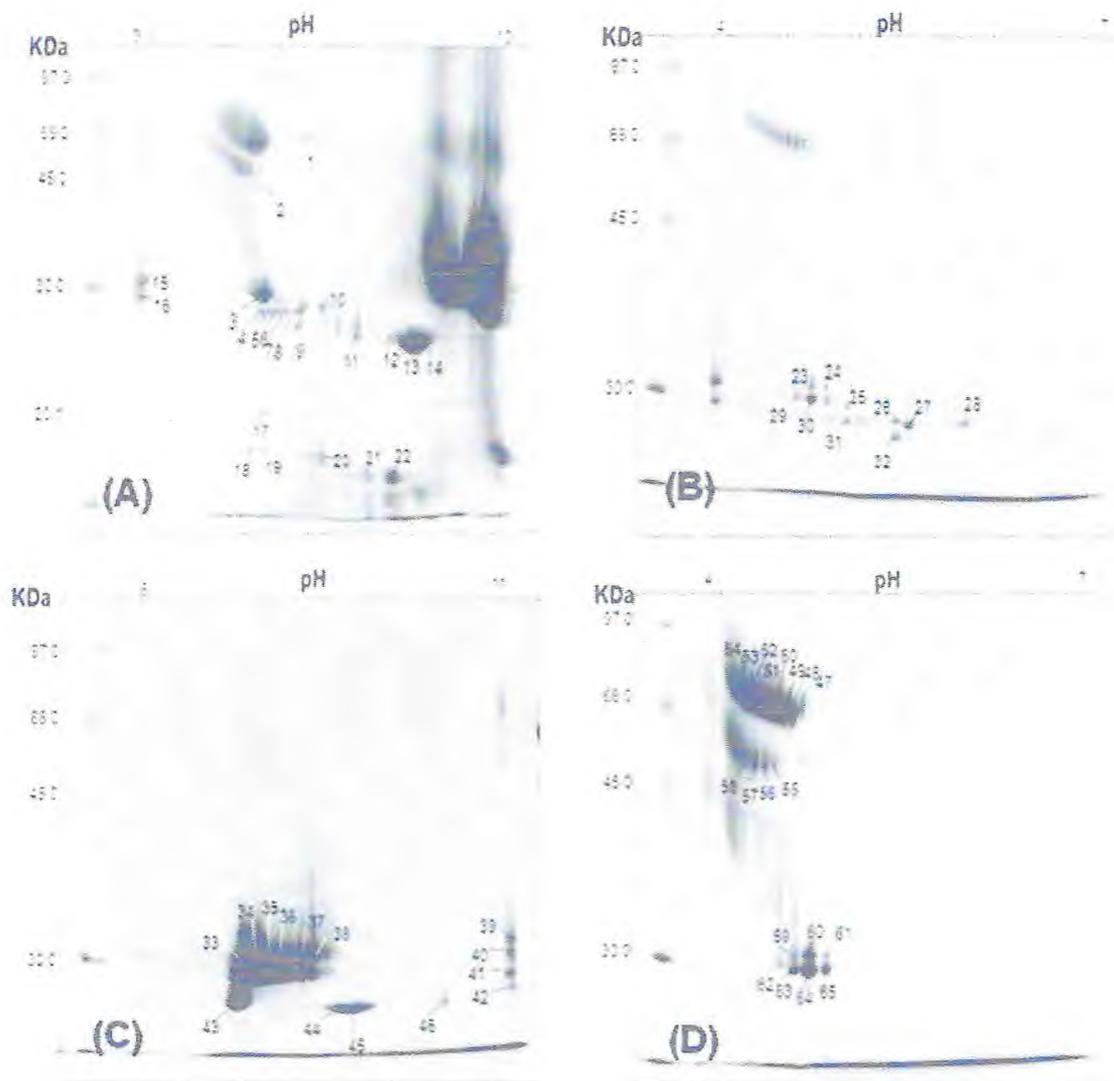


Figura 9: Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (12,5%) das proteínas do látex de *C. procera* utilizando tiras de pH 3-10, 4-7 e 6-11, figuras A, B e C, respectivamente. (D) Eletroforese do pico PI-CM Sepharose utilizando tiras de pH 4-7. Foram aplicados 400 µg de proteínas. Géis corados com Coomassie Brilliant Blue R-250. Números são referentes aos "spots" analisados por espectrometria de massas.

Depois da separação das proteínas do látex por eletroforeses bidimensionais utilizando faixas de pH variando de 3-10, 4-7 e 6-11, e do pico não retido (PI) na coluna de CM-Sepharose Fast Flow utilizando tiras de pH de 4-7, 65 "spots" indicados na figura 9 foram selecionados para análise por espectrometria de massas. Estes "spots" foram retirados dos géis, digeridos com tripsina e analisados em um espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF. Os dados obtidos após o processamento de todos os "spots" foram pesquisados no banco de dados NCBI, preferencialmente para Viridiplantae ("Green Plants").

As eletroforeses bidimensionais dos picos PII e PIII-CM Sepharose foram de péssima qualidade, mesmo após diversas tentativas. As proteínas destas frações, por serem bastante básicas, não focalizavam de forma uniforme, semelhante ao verificado com as proteínas do látex separadas em tiras de pH 6-11 (Figura 9C). Por esse motivo, as eletroforeses bidimensionais destes picos não foram utilizadas para identificação de proteínas por espectrometria de massas.

Na figura 10, estão representadas as etapas de identificação das proteínas analisadas; A- análise por espectrometria de massa dos peptídeos trípticos; B-espectro de fragmentação dos 10 peptídeos mais intensos; C-análise das seqüências obtidas por MS/MS utilizando o programa MASCOT e banco de dados NCBI. Dessa forma, 28 proteínas foram identificadas. Entre elas, uma peroxidase com massa molecular de 43 kDa e pI 5,5; duas quitinases com massas moleculares de 27,3 e 26,2 kDa e, ambas com, pI 5,4; um inibidor de proteinase com massa molecular 27 kDa e pI 5,5; três osmotinas com massas moleculares de 24 kDa e pI 7,9, 8,1 e 8,3; uma proteinase

cisteínica com massa molecular de 29 kDa e pI 7,7; um precursor de proteinase cisteínica de massa molecular de 25,4 kDa e pI 7,4; e duas proteínas transferidoras de lipídeos com massas moleculares de 14 kDa e pI 7,4 e 7,9, além de várias isoformas de uma glicosilase com massas moleculares na faixa de 65 kDa e pI 4,5 (Tabela 1).

Na Tabela 1 estão listadas as proteínas identificadas com as massas moleculares e pI experimentais e teóricos, "protein score" de cada identificação, as seqüências dos peptídeos determinadas por MS/MS, o número de entrada no NCBI, a função e origem das proteínas. As proteínas não identificadas por MS/MS foram submetidas a seqüência manual utilizando como auxílio os programas Data Explore e AminoCalc. As seqüências obtidas foram submetidas ao programa de busca MS BLAST e ao banco de dados SWISS PROT (<http://www.dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>).

As massas moleculares e pI teóricos das proteínas identificadas, que possuem a seqüência completa depositada nos bancos de dados, coincidiram, com alguns desvios, com a localização das proteínas do látex de *C. procera* nos géis bidimensionais. Os desvios encontrados podem ser explicados por erros inerentes à técnica de eletroforese bidimensional ou por modificações pós-traducionais, que não são consideradas para o cálculo teórico das massas e pI.

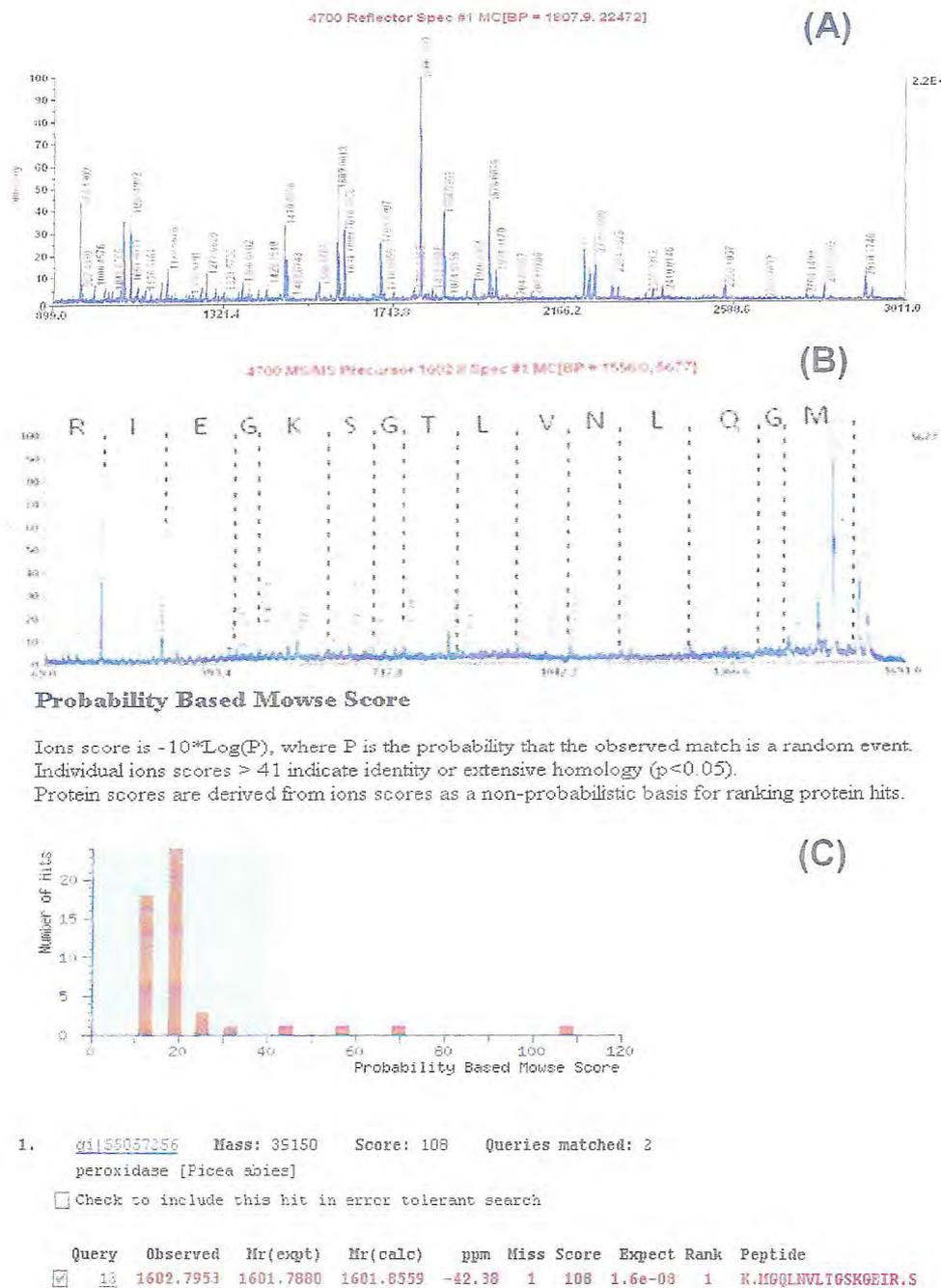


Figura 10: Análise por espectrometria de massas dos peptídeos tripticos do “spot” 2. (A) Espectro de massa dos peptídeos gerados pela digestão do “spot” 2 com tripsina. (B) O íon em evidência (1602.80) foi escolhido para fragmentação e análise de MS/MS. Uma seqüência (MGQLNVLTGSKGEIR) foi obtida a partir desse espectro de fragmentação, pela série “y”. (C) Resultado de busca utilizando o programa Mascot e o banco de dados NCBI.

Tabela 1: Lista de proteínas identificadas do látex de *Calotropis procera* por MALDI TOF-TOF

Spot N°	Teórico/Experimental		Método (PMF e/ou MS/MS)	Protein Score/ Ion Score	Íons Parietais	Seqüência de todos os Peptídeos Identificados	ID (NCBI)	Descrição e Origem das proteínas identificadas
	Massa molecular	pI						
2	39,1/43,2	8,42/5,5	PMF e MS/MS	108/96	1602,86	MGQLNVLTGSKGEIR	gi 55057256	Peroxidase (<i>Picea abies</i>)
3 e 30	68,2/28,8	5,33/5,4	MS/MS	71/71	1153,56	ELFEEMLSR	gi 148556511	Glicosilase (<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1)
12	25,6/24,9	8,1/7,9	MS/MS	137/137	1421,60 e 1788,72	APGGCNPCTVFK e DDPTSTFTCPGGTNYR	gi 161375756	Osmotina (<i>Piper colubrinum</i>)
13	25,6/24,5	8,1/8,1	MS/MS	137/137	1421,60 e 1788,72	APGGCNPCTVFK e DDPTSTFTCPGGTNYR	gi 161375756	Osmotina (<i>Piper colubrinum</i>)
14	25,6/24,1	8,1/8,3	MS/MS	137/137	1421,60 e 1788,72	APGGCNPCTVFK e DDPTSTFTCPGGTNYR	gi 161375756	Osmotina (<i>Piper colubrinum</i>)
	26,0/24,1	6,1/8,3	MS/MS	71/71	1111,44	TNCNFDGAGR	gi 19315	Proteína Relacionada à Patogênese (<i>Solanum lycopersicum</i>)
	13,2/24,1	8,2/8,3	MS/MS	95/87	1111,45	TNCNFDGAGR	gi 28864872	Proteína semelhante à Osmotina (<i>Solanum tuberosum</i>)
21	20,4/14,6	4,9/7,4	MS/MS	80/80	978,49	GNLDIFSGR	gi 15236014	Proteína transferidora de Lipídeos (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

Freitas C.D.T. (2009) Identificação, Purificação, Caracterização...

22	20,4/14,6	4,9/7,9	MS/MS	80/80	978,49	GNLDIFSGR	gi 15236014	Proteína transferidora de Lipídeos (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
26	34,1/27,3	6,0/5,4	MS/MS	65/65	1830,84	TTGDL DTR	gi 75304720	Quitinase (<i>Triticum aestivum</i>)
27	22,1/27,0	9,0/5,5	MS/MS	60/60	1036,60	YYILPVIR	gi 75264047	Inibidor de Proteinase (Miraculina) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
32	34,1/26,2	6,0/5,4	MS/MS	65/65	1808,69	TTGDL DTR	gi 75304720	Quitinase (<i>Triticum aestivum</i>)
34	39,8/29,0	6,6/7,7	MS/MS	65/65	1199,62	VPPSVDWR	gi 75295919	Proteinase cisteínica (<i>Glycine Max</i>)
41	20,4/28,6	4,9/11,0	MS/MS	65/65	978,49	GNLDIFSGR	gi 15236014	Proteína transferidora de Lipídeos (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
43	51,2/25,4	6,7/7,4	MS/MS	105/105	1659,71	NSWGSDWGEDGYMR	gi 85000505	Precursor de uma proteinase cisteínica (<i>Theileria annulata</i> strain Ankara)
44 e 45	25,6/24,9	8,1/7,9	MS/MS	131/131	1421,60 e 1788,72	APGGCNPCTVFK e DDPTSTFTCPGGTNYR	gi 161375756	Osmotina (<i>Piper colubrinum</i>)
47-58 e 60, 64	68,2/64,9	5,3/4,6	MS/MS	68/68	1153,55	ELFEEMLSR	gi 148556511	Glicosilase (<i>Sphingomonas wittichii</i>)

Interessante notar a presença de pelo menos 12 isoformas, com massas moleculares variando de 64,9 kDa a 70,1 kDa e pI 4,6 a 4,2, de uma proteína identificada como uma glicosilase. Esses resultados evidenciam que esta proteína pode apresentar diferentes modificações pós-traducionais. Em vista disso, novas eletroforeses foram realizadas para identificação de glicoproteínas em géis de uma e duas dimensões. As proteínas presentes nas frações LP, PI, PII e PIII-CM-Sepharose foram coradas, mostrando a abundância de glicoproteínas no látex de *C. procera* (Figura 11).

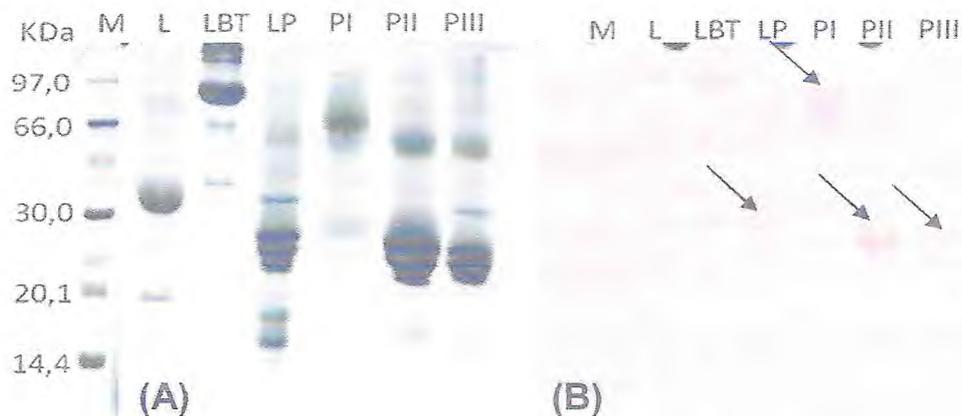


Figura 11: Revelação de glicoproteínas do látex de *C. procera* em gel de poliacrilamida (12,5%) utilizando o reagente de Schiff. **(A)** Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e **(B)** Gel corado com o reagente de Schiff. M: Marcadores de massa molecular; L: Lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (controle negativo); LBT: Lactotransferina bovina (controle positivo); LP: Proteínas do látex; PI, PII e PIII: Picos obtidos após cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose das proteínas do látex. Foi adicionado em cada poço 20-30 μ g de proteína.

A lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* não foi corada, confirmando a confiabilidade do método, já que essa lectina não é glicosilada. Como esperado, a glicoproteína lactotransferina bovina foi corada fortemente (Figura 11).

A figura 12 mostra que os “spots” 47 a 54 são glicoproteínas e que a variação de massas e pI destas proteínas pode ser devido à presença de diferentes formas glicosiladas das mesmas.

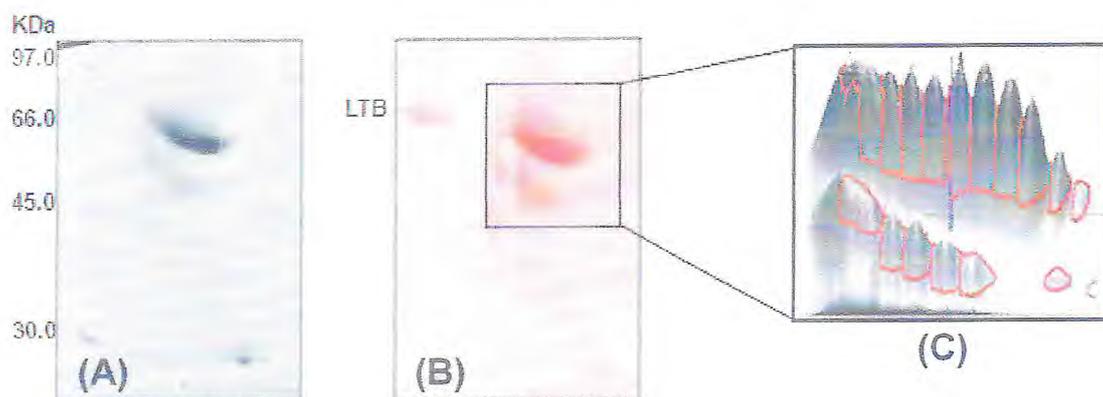


Figura 12: Revelação de glicoproteínas presentes na fração PI-CM Sepharose em eletroforese bidimensional (12,5%) utilizando o reagente de Schiff. **(A)** Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e **(B)** Gel corado com o reagente de Schiff. LTB: Lactotransferina bovina (20 µg). **(C)** Imagem tridimensional dos spots referentes à figura (B) obtida pelo software ImageMaster 6.0. Foi adicionado em cada gel 100 µg de proteína.

Zimogramas para detecção de quitinases, proteinases, inibidores de proteinases e peroxidases foram realizados com o objetivo de confirmar as

identificações feitas por espectrometria de massas. A figura 13 mostra a presença de pelo menos três isoformas de quitinases com massas moleculares na faixa 26 kDa, duas proteinases com massas moleculares na faixa de 30 kDa e uma com massa molecular na faixa de 66 kDa, dois inibidores de proteinases cisteínicas com massas moleculares na faixa de 26 kDa e uma peroxidase com alta massa molecular, 97 kDa.

Os resultados dos zimogramas comprovam as identificações de algumas proteínas feitas por espectrometria de massas, uma vez que as massas moleculares foram similares. Quando os zimogramas foram realizados na presença de 2-mercaptoetanol, a atividade peroxidásica foi perdida, enquanto as quitinases apresentaram bandas com massas moleculares na faixa de 14,4 kDa. A massa molecular das bandas referentes às proteinases e inibidores de proteinases não foram alteradas na presença de agente redutor.

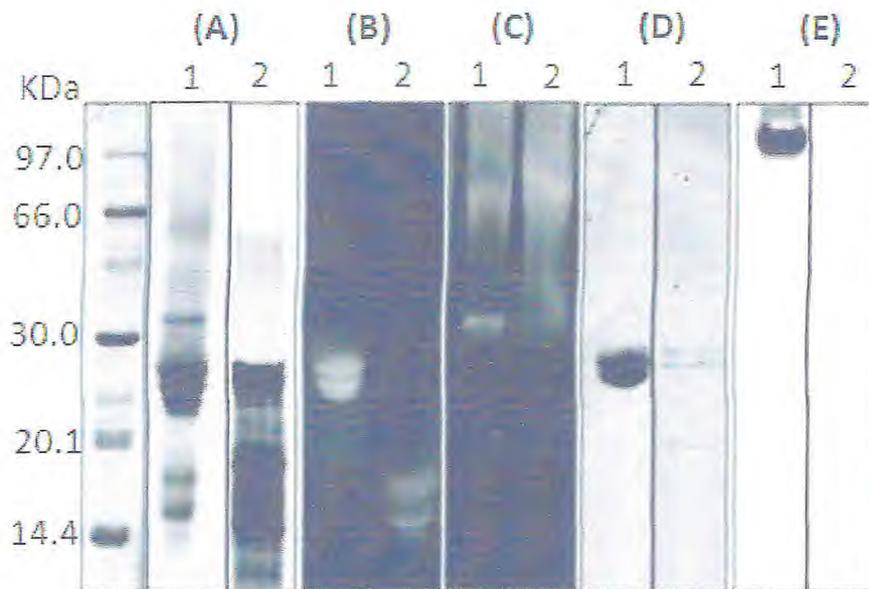


Figura 13: Zimogramas para detecção de diferentes atividades enzimáticas na fração protéica do látex de *Calotropis procera*. (1) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) sem agente redutor e (2) com 2-mercaptoetanol 5%. (A) Proteínas do látex de *C. procera*. (B) Zimograma para detecção de quitinases; (C) Zimograma para detecção de proteinases; (D) Zimograma reverso para detecção de inibidores de proteinases; (E) Zimograma para detecção de peroxidases. Os géis foram incubados em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 de acordo com a metodologia. Eletroforeses em condições desnaturantes, na presença de SDS.

4. DISCUSSÃO

A preparação da amostra, para análises em eletroforeses bidimensionais é um ponto crítico em estudos proteômicos. Logo, procedimentos de extração e precipitação de proteínas são cruciais na obtenção de bons padrões eletroforéticos, especialmente em materiais de origem vegetal, que são descritos por serem ricos em componentes que interferem na focalização isoelétrica, tais como: sais, polissacarídeos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, pigmentos, terpenos, além da pequena quantidade relativa de proteínas (NEWTON *et al.*, 2004). Com isso, vários métodos para extração de proteínas têm sido descritos (HURKAMAN e TANAKA, 1986; GRANIER, 1988; GIAVALISCO *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2005). Dentre os métodos de precipitação de proteínas mais utilizados incluem-se a precipitação com acetona, ácido tricloroacético (TCA) ou acetona e TCA (FINNIE, 2006).

Em vista das dificuldades de extração e obtenção de bons padrões eletroforéticos de materiais vegetais, os primeiros experimentos realizados neste capítulo tiveram como objetivo estabelecer uma boa metodologia de solubilização e precipitação de proteínas do látex de *Calotropis procera* para posterior análise em eletroforeses bidimensionais e espectrometria de massas.

A solubilização das proteínas do látex em água e precipitação com acetona foi a menos efetiva das utilizadas, sendo detectados apenas 36 "spots", concentrados na faixa de pH básico e baixa massa molecular. A

precipitação das proteínas do látex dissolvidas em água com acetona contendo TCA 10% foi mais efetiva que a precipitação apenas com acetona, sendo visualizados 88 "spots", com pontos isoelétricos distribuídos entre 4-10 e massas moleculares 12 kDa a 27 kDa. O método de solubilização com tampão piridina 50 mM, pH 5,0, contendo tiouréia 10 mM e SDS 1%, e posterior precipitação com acetona contendo TCA 10%, foi o mais eficiente dos utilizados. Foram detectados 108 "spots" em géis de pH 3-10 e 199 "spots" em géis de pH 4-7. Essa metodologia foi a mesma utilizada por Vasconcelos e colaboradores (2005) na extração de proteínas de sementes de *Vigna unguiculata*, em que foram detectados, aproximadamente, 570 e 520 "spots", utilizando tiras de pH de 3-10 e 4-7, respectivamente.

Aproximadamente 200 proteínas distintas, com massas moleculares variando de 6 a 100 kDa, foram visualizadas na fração solúvel do látex de *H. brasiliensis*. As proteínas majoritárias apresentaram pontos isoelétricos variando de 4-8, com exceção de uma proteína de 30 kDa com pI maior que 8,7 e duas proteínas acídicas (pI < 4,0) de 14 kDa e 20 kDa. Em contraste com a complexidade de proteínas visualizadas na fração solúvel do látex, a fração de proteínas retidas na borracha do látex de *H. brasiliensis* apresentou massas moleculares predominantes entre 10 kDa e 25 kDa e pI variando de 4,5-5,0 (POSCH *et al.*, 1996).

Eletroforeses bidimensionais das proteínas solúveis do látex de *P. somniferum* mostraram a presença de, aproximadamente, 300-400 proteínas, sendo a maioria com pI variando de 4,5 a 7,0 e massas moleculares de 20 a 66 kDa. As proteínas com massas moleculares de 20 kDa já foram bem

caracterizadas e citadas como as principais proteínas deste látex, representando, aproximadamente, 50% de todas as proteínas desta fração. Proteínas também foram extraídas da fração borracha de *P. somniferum*. Neste caso, foram detectadas, aproximadamente, 280 proteínas similares à fração solúvel do látex, com exceção de poucas proteínas com pI 7,0-8,5 que foram detectadas apenas na fração retida na borracha (DECKER *et al.*, 2000).

Assim como observado nos látices de *H. brasiliensis* e *P. somniferum*, também foram detectadas proteínas retidas na borracha de *C. procera*. Os 56 “spots” detectados apresentaram massas moleculares entre 9 a 80 kDa e pI 4,5 a 10. Nestes géis, foi predominante a presença de duas proteínas com massas moleculares de, aproximadamente, 16 kDa e pontos isoelétricos próximos de 6,0. Esses resultados mostram que há perda considerável de proteínas durante os processos de centrifugação, que são aprisionadas nas partículas de borracha, pois os mesmos spots foram detectados na fração protéica do látex. Ramos e colaboradores (2007) extraíram proteínas da fração borracha do látex de *C. procera* com diferentes soluções: água destilada, HCl 0,1 M, NaOH 0,1 N e NaCl 1 M. Em todos os casos, o perfil protéico foi parecido com da fração solúvel do látex. Provavelmente essas proteínas co-precipitaram com as partículas de borracha durante o processo de coagulação do látex.

No presente trabalho, 65 proteínas, dos géis bidimensionais de pH variando de 3-10, 4-7 e 6-11, foram submetidas a digestão com tripsina e identificação por espectrometria de massas. Proteínas do pico não retido na coluna de CM-Sepharose também foram avaliadas. Após análise por espectrometria de massas, 28 proteínas foram identificadas, perfazendo 43%

das proteínas analisadas. Considerando que os dados de seqüência de proteínas (6), nucleotídeos (13) e ESTs (0) para a espécie estudada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) são escassos, 44% de identificação representa um número notável. A maioria das proteínas identificadas é conhecida por participar na defesa da planta contra insetos e patógenos (PR-proteínas) (van LOON *et al.*, 2006). Entre as proteínas identificadas estão: uma peroxidase (PR-9), três isoformas de osmotina (PR-5), duas quitinases (PR-3 e PR-4), um inibidor de proteinase (PR-6), três proteínas de transferência de lipídeos (PR-14), uma proteinase cisteínica e um precursor de proteinase cisteínica (PR-7), além de várias isoformas de uma glicosilase.

A presença da peroxidase identificada por espectrometria de massas, com massa molecular experimental de 43,2 kDa, foi confirmada por zimograma. Contudo, no zimograma, a peroxidase apresentou alta massa molecular (>97 kDa). Na presença de um agente redutor (2-mercaptoetanol), não foi observada atividade peroxidásica em gel. Isso pode ser devido ao fato desta enzima ser composta de subunidades unidas por pontes dissulfeto, as quais conferem uma conformação tridimensional essencial para sua atividade. Logo, a proteína identificada por espectrometria de massas como uma peroxidase (43 kDa), pode ser uma das subunidades da enzima detectada por zimograma.

Peroxidases foram anteriormente detectadas em fluidos laticíferos. Uma peroxidase de 50 kDa e pI 5,0 foi purificada e caracterizada no látex de *H. brasiliensis* (WITITSUWANNAK *et al.*, 1997). Similarmente, uma peroxidase do

látex de *Euphorbia characias* foi purificada e caracterizada (PINTUS e MURA, 2007).

Em plantas, estresses bióticos e abióticos podem ser acompanhados pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido e peróxido de hidrogênio (SEONG *et al.*, 2007). Esses componentes podem causar desnaturação protéica, mutações no DNA e/ou peroxidação de lipídeos de membrana (BECKERS e SPOEL, 2006). Os danos oxidativos causados pelas ROS são minimizados em grande parte pela ação de enzimas antioxidativas. As mais comuns são as catalases, presentes principalmente nos peroxissomos, glioxissomos e mitocôndria, e as peroxidases e glutathionas redutases, localizadas nos cloroplastos e citoplasma (DURNEI e KLESSIG, 1995).

Por outro lado, em baixos níveis, as ROS podem também funcionar como moléculas sinalizadoras. O peróxido de hidrogênio, produzido por NADPH oxidase citosólicas ou de membrana, parece ser um sinalizador nas respostas de defesa em plantas contra herbívoros e patógenos, abertura estomática, regulação da expansão celular e no desenvolvimento da planta (KAWANO, 2003).

As peroxidases estão presentes em quase todos os organismos vivos (HIRAGA *et al.*, 2001). Nas plantas, elas estão envolvidas em diferentes papéis fisiológicos: lignificação da parede celular, suberização, ligação cruzada entre proteínas de parede celular, tolerância à salinidade, senescência e defesa contra patógenos (HIRAGA *et al.*, 2001). As peroxidases são classificadas como pertencente à família 9 de proteínas relacionadas à patogênese (van

LOON *et al.*, 2006). Em látex, a função das peroxidases ainda é pouco conhecida. Contudo, Joët e colaboradores (2002) sugeriram o envolvimento destas enzimas na detoxicação de espécies reativas de oxigênio, assim como na defesa de *H. brasiliensis* contra patógenos.

Ramos e colaboradores (2007) identificaram no látex de *C. procera*, através de zimograma, a presença de pelo menos duas isoformas de quitinases, com massas moleculares de, aproximadamente, 28 kDa. Esse resultado foi similar às massas moleculares das quitinases identificadas por espectrometria de massas e zimogramas deste trabalho, que foram de, aproximadamente, 27 kDa. As quitinases identificadas no látex de *C. procera* possuem massas moleculares similares a quitinases de outras plantas laticíferas. No látex de *Carica papaya*, foi isolada uma quitinase com massa molecular de, aproximadamente, 28 kDa (Azarkan *et al.*, 1997). Também foram caracterizadas quitinases no látex de *Ficus microcarpa* (Taira *et al.*, 2005), de *H. brasiliensis* (Subroto *et al.*, 1996) e de *Manihot glaziovii* (Pereira *et al.*, 1999), com massas moleculares de, aproximadamente, 27 kDa.

A quitina é o principal constituinte da matriz peritrófica de muitos insetos. A matriz peritrófica é uma estrutura semipermeável e acelular que separa o lúmen intestinal das células epiteliais. O intestino é a única região que o inseto tem em contato com o meio ambiente que não é coberta pela cutícula, logo o intestino apresenta uma porta aberta para infecções. Por isso, tem sido proposto que a matriz peritrófica possui papel de defesa contra infecções e parasitas. Além desta função de defesa, a matriz peritrófica funciona como uma proteção das células epiteliais contra as moléculas abrasivas do bolo alimentar (TELLAM *et al.*, 1999). Em vista disto, qualquer molécula que seja capaz de

destruir a membrana peritrófica poderá ter ação inseticida (WANG e GRANADOS, 2001). A quitina está presente, também, na parede celular de muitos fungos, incluindo Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos, perfazendo de 3 a 60 % da parede celular (WESSELS e SIETSMA, 1981).

Quitinases estão presentes em muitas espécies vegetais. Contudo, nenhum substrato endógeno para estas enzimas foi detectado até o momento. Logo, acredita-se que o papel desempenhado por estas enzimas nas plantas esteja relacionado com a defesa contra fungos e insetos (COLLINGE *et al.*, 1993). As quitinases têm sido classificadas em sete classes (Classel-VII), baseado em propriedades como similaridade de seqüência primária e mecanismos catalíticos (SING *et al.*, 2007). Elas são classificadas como PR-proteínas (van LOON *et al.*, 2006).

Três isoformas de osmotinas, com massas moleculares de, aproximadamente, 24 kDa e pI 8,0, foram identificadas neste trabalho. A literatura relata apenas um trabalho de identificação desta proteína em látex. Neste caso, a osmotina de 25 kDa foi identificada no látex de *H. brasiliensis* por seqüência N-terminal, embora nenhuma caracterização tenha sido realizada (SUBROTO *et al.*, 2001). Osmotinas ou proteínas similares à proteína taumatina têm sido purificadas e caracterizadas. Na maioria dos trabalhos, estas proteínas possuem massas moleculares por volta de 20 kDa a 30 kDa e possuem pI > 8 (WANG e NG, 2002; CHU e NG, 2003, HO *et al.*, 2007)

Osmotinas ou proteínas similares à proteína taumatina pertencem à família 5 das proteínas relacionadas à patogênese (van LOON *et al.*, 2006). Essas proteínas foram originalmente identificadas em culturas celulares de tabaco adaptadas à salinidade (SING *et al.*, 1985). Contudo, outros trabalhos

mostram o papel desta proteína na proteção da planta contra patógenos, por inibir o crescimento de fungos através da formação de poros na membrana plasmática (ABAD *et al.*, 1996; NARASIMHAN *et al.*, 2003).

O presente trabalho parece ser o segundo relato da presença deste tipo de proteína em fluidos laticíferos e o seu papel no látex ainda não foi discutido. Contudo, baseando-se em estudos com osmotinas de outras espécies de plantas, esta proteína pode está relacionada com a defesa da planta contra fungos.

Uma proteinase cisteínica e um precursor de proteinase cisteínica foram identificados, com massas moleculares de 27 kDa e 25 kDa, respectivamente. O zimograma revelou a presença de quatro proteinases com massas moleculares variando de 30 kDa a 66 kDa. Além do zimograma, atividade proteolítica foi confirmada em ensaios colorimétricos (Capítulo 1). As proteinases identificadas possuem massas moleculares parecidas com a proceraina, uma proteinase cisteínica com massa molecular de 28,8 kDa purificada e caracterizada no látex de *C. procera* (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003).

Proteinases cisteínicas isoladas e caracterizadas em látex apresentam massas moleculares na faixa de 23 kDa a 30 KDa (PEREIRA *et al.*, 2001; KYNDT *et al.*, 2007; DOMSALLA e MELZIG, 2008). As proteinases cisteínicas apresentam diversas funções nas plantas, participando no: desenvolvimento e amadurecimento de frutos, degradação de proteínas de reserva, ativação de zimogênios e degradação de proteínas defeituosas, morte celular programada, reconhecimento de patógenos e indução de respostas de defesa (SCHALLER, 2004; van der HOON e JONES, 2004). Em plantas laticíferas, as proteinases

podem estar relacionadas com a coagulação do látex, agindo, dessa forma, como um mecanismo indireto de defesa (AZARKAN *et al.*, 2003) ou podem, também, atuar diretamente sobre insetos (KONNO *et al.*, 2004).

Um inibidor de proteinase com massa molecular 27 kDa e pI 5,5 foi identificado no látex de *C. procera*. A presença deste inibidor foi confirmada pelo zimograma reverso, que revelou a presença de duas bandas com massas moleculares aparente de 28 kDa, resistentes à proteólise pela papaína. Inibidores de proteinases foram isolados e caracterizados no látex de *C. papaya* e *H. brasiliensis*. Em látex de *C. papaya* foi caracterizado um inibidor de proteinase do tipo serínico de 24 kDa (AZARKAN *et al.*, 2006) e inibidores de papaína (MONTIL *et al.*, 2004). Três iso-inibidores com massas moleculares 14,8, 7,7 e 7,5 kDa foram purificados do látex de *H. brasiliensis* (SRITANYARAT *et al.*, 2006).

Inibidores de proteinases são proteínas de ocorrência ubíqua na natureza, desde vírus a mamíferos (HAQ *et al.*, 2004). Em plantas, são proteínas relacionadas à defesa contra insetos, vírus, nematóides, bactérias e fungos (MOSOLOV e VALUEVA, 2005; GOMES *et al.*, 2005; ROY *et al.*, 2009). Os inibidores de proteinases são classificados como PR-proteínas (PR-6). Foi sugerido que inibidores de proteinases estão relacionados com a defesa de plantas laticíferas, pois foi observado que há aumento na quantidade de inibidores de proteinases no látex de *H. brasiliensis*, após a planta sofrer constantes danos mecânicos (SRITANYARAT *et al.*, 2006).

Duas proteínas com massas moleculares em torno de 14,6 kDa e uma com massa molecular de 28 kDa e pI 7,4, 7,9 e 11,0, respectivamente, foram identificadas como proteínas transferidoras de lipídios. Estas proteínas estão

relacionadas com a defesa de plantas e pertencem à classe das PR-14 (van LOON *et al.*, 2006). Estas proteínas também foram detectadas no látex de *H. brasiliensis*. Neste caso, a proteína transferidora de lipídeos apresentou massa molecular de 9,3 kDa e ponto isoelétrico de 10,8 (BEEZHOLD *et al.*, 2003).

Proteínas transferidoras de lipídeos (PTL) são assim denominadas devido a sua habilidade de transferir fosfolipídios entre membranas *in vitro*. As proteínas transferidoras de lipídeos estão divididas em dois grupos com base na massa molecular. As que pertencem ao primeiro grupo têm massas moleculares de aproximadamente 10 kDa e são básicas, apresentando pontos isoelétricos entre 9 e 10. As PTL, do segundo grupo, têm massas moleculares de aproximadamente 7 kDa e possuem também altos pontos isoelétricos (CARVALHO e GOMES, 2007).

A atividade antimicrobiana de proteínas transferidoras de lipídeos foi descoberta a partir de estudos de atividade antimicrobiana de extratos de diferentes plantas. Diferentes fungos estão entre os patógenos que tiveram seus crescimentos inibidos (MOLINA *et al.*, 1993). Outros trabalhos mostraram que estas proteínas interagem com fosfolipídios e possuem a capacidade de destruir a integridade da membrana plasmática de fungos (KADER, 1996; DIZ *et al.*, 2006).

Entre todas as proteínas identificadas, as mais interessantes foram várias isoformas de uma glicosilase de massas moleculares e pontos isoelétricos muito próximos. Todas as isoformas são glicoproteínas, pois todos os spots referentes a esta proteína foram corados com o reagente de Schiff. Essa pequena variação na massa molecular e no ponto isoelétrico pode ser devido a diferentes modos de glicosilação desta proteína. Essa proteína foi

identificada por similaridade com uma proteína da bactéria *Sphingomonas wittichii*. Quando a busca foi restringida apenas para plantas, essas proteínas não foram identificadas. Similarmente, uma proteína com massa molecular de 52 kDa e pI 4,8 foi identificada no látex de *P. somniferum* como sendo uma glicosilase da bactéria *Thermotoga marítima* (DECKER *et al.*, 2000). Esses resultados mostram que estas proteínas presentes no látex de *C. procera* e *P. somniferum* são proteínas que ainda não foram bem estudadas em plantas.

Glicosilases são enzimas largamente distribuídas na natureza que hidrolisam ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma molécula não relacionada (MINIC, 2007). Baseado nas similaridades de estrutura primária, essas enzimas são classificadas em 114 famílias (http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html, acesso 20 de março de 2009).

A grande diversidade de estruturas e funções que os carboidratos possuem implica em uma grande variedade de enzimas envolvidas na sua síntese (glicosiltransferases), modificação (carboidrato esterases) e quebra (glicosilases) (MINIC, 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 730 genes envolvidos no metabolismo de carboidratos, sendo 379 genes de glicosilases (HENRISSAT *et al.*, 2001). Esses resultados obtidos com *A. thaliana* indicam que os sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de carboidratos possuem papéis importantes em vários processos fisiológicos das plantas, entre eles montagem, degradação e rearranjo da parede celular, defesa vegetal, sinalização e hidrólise do amido (HENRISSAT *et al.*, 2001).

Foi mostrado que o látex de *C. procera* é rico em glicoproteínas e as glicosilases possuem um papel muito importante na montagem e desmontagem da parte glicídica de glicoproteínas. Este tipo de modificação pós-traducional é

bastante comum entre os organismos eucariontes e possui várias funções, entre elas: aumento da estabilidade e solubilidade das proteínas e da proteção contra proteólise. Além disso, a glicosilação é importante em vários processos de interação entre proteínas (SPIRO, 2002).

O presente capítulo mostrou que as proteínas mais abundantes no látex de *C. procera* são proteínas com funções atribuídas à defesa da planta contra insetos ou patógenos ou contra espécies reativas de oxigênio. Logo, esses resultados reforçam a hipótese que o látex funciona como um mecanismo de defesa da planta.

5. REFERÊNCIAS

- ABAD, L.R., D'URZO, M.P., LIU, D., NARASIMHAN, M.L., REUVENI, M., ZHU, J.K., NIU, X., SINGH, N.K., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science.**, 118: 11-23. 1996
- AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature.**, 422:198-207. 2003.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins. Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.** Ed. Universidade Federal de Viçosa (UFV)., 199p. 1998.
- ASHCROFT, A. E. Protein and Peptide Identification: the role of mass spectrometry in proteomics. **Natural Product Reports.**, 20, 202-215. 2003.
- AZARKAN, M., AMRANI, A., NIJS, M., VANDERMEERS, A., ZERHOUNI, S., SMOLDERS, N., LOOZE, Y. *Carica Papaya* Latex Is A Rich Source Of A Class II Chitinase. **Phytochemistry.**, 46: 1319-1325. 1997.
- AZARKAN, M., EL MOUSSAOUI, A., VAN WUYTSWINKEL, D., DEHON, G., LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B.**, 790: 229-238. 2003.
- AZARKAN, M., DIBIANI, R., GOORMAGHTIGH, E., RAUSSENS, V., BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly

- stable β -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1764: 1063–1072. 2006.
- BECKERS, G.J.M., SPOEL, S.R. Fine-tuning plant defence signaling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology.**, 8: 1-10. 2006.
- BEEZHOLD, D.H., HICKEY, V.L., KOSTYAL, D.A., PUHL, H., ZUIDMEER, L., VAN REE, R., SUSSMAN, G.L. Lipid transfer protein from *Hevea brasiliensis* (Hev b 12), a cross-reactive latex protein. **Annals of Allergy Asthma and Immunology.**, 90(4): 439-45. 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.**, 72: 248-254. 1976.
- CARVALHO, A.O., GOMES, V.M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. **Peptides.**, 28: 1144–1153. 2007.
- CHU, K.T., NG, T.B. Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the Kweilin chestnut *Castanopsis chinensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, 301: 364–370. 2003
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., VAD, K. Plant chitinases. **The plant journal.**, 3: 31-40. 1993.
- CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry.**, 57: 1123–1134. 2001.
- DECKER, G., WANNER, G., ZENK, M.H., LOTTSPREICH, F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-

- dimensional gel electrophoresis and microsequencing. **Electrophoresis.**, 21: 3500-3516. 2000.
- DIZ, M.S.S., CARVALHO, A.O., RODRIGUES, R., NEVES-FERREIRA, A.G.C., DA CUNHA, M., ALVES, E.W. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica Biophysica Acta.**, 1760:1323–1332. 2006.
- DOMSALLA, A., MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. **Planta Medica.**, 74: 699-711. 2008.
- DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry.**, 62:1057-1071. 2003.
- DURNER, J., KLESSIG, D.F. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. **Proc Proceedings of the National Academy of Sciences USA.**, 92: 11312-11316. 1995.
- FINNIE, C. **Plant Proteomics.** Annual plant reviews. Blackwell Publishing, vol 28. pp 275. 2006.
- FREITAS, C.D.T., OLIVEIRA, J.S., MIRANDA, M.R.A., MACEDO, N.M.R., SALES, M.P., VILLAS-BOAS, L.A., RAMOS, M.V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry.**, 45:781-789. 2007.

- GIAVALISCO, P., NORDHOFF, E., LEHRACH, H., GOBOM, J. AND KLOSE, J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. **Electrophoresis**, 24: 207–216. 2003.
- GOMES, C.E.M., BARBOSA, A.E.A.D., MACEDO, I.I.P., PITANGA, J.C.M., MOURA, F.T., OLIVEIRA, A.S. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 1095-1102. 2005.
- GORG, A., POSTEL, W., GUNTHER, S. WESER, J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. **Electrophoresis**, 6: 599-604. 1985.
- GORG, A., OBERMAIER, C. BOGUTH, G., HARDER, A., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, 21: 1037-1053. 2000..
- GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 9: 712–718. 1988.
- HAQ, S.K., ATIF, S.M., KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 431: 145–159. 2004.
- HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., GONEZ, J., HELDIN, C. H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein

fragments for amino acid sequencing. **Analytical Biochemistry**, 224(1): 451-455. 1995.

HENRISSAT, B., COUTINHO, P.M., DAVIES, G.J. A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, 47:55–72. 2001.

HERBERT, B.R., HARRY, J.L., PACKER, N.H., GOOLEY, A.A., PENDERSEN, S.K., WILLIAMS, K.L. What place for polyacrylamide in proteomics? **Trends in Biotechnology**, 19: 3-9. 2001.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, K., OHASHI, Y., MATSUI H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, 42: 62-468. 2001.

HO, V.S.M., WONG, J.H., NG, T.B. a thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides**, 28: 760–766. 2007.

HOCHHOLDINGER, F., SAUER, M., DEMBINSKY, D., HOECKER, N., MUTHREICH, N., SALEEM, M., LIU, Y. Proteomic dissection of plant development. **Proteomics**, 6: 4076-4083. 2006.

HURKMAN, W. J., TANAKA, C. K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, 81, 802-806. 1986.

JOËT, T., DUBOIS, V., PRÉVÔT, J.C., JACOB, J.L., CLÉMENT-VIDAL, A. Both ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase are active in removal of H₂O₂ from the cytosol of *Hevea brasiliensis* latex. **Journal of Rubber Research**, 5: 226-243. 2002.

- JOHI, S., JAMWAL, U., RASOOL, S., KUMAR, A., VERMA, V., QAZI, G.N. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. **Plant Science.**, 169: 1014-1021. 2005.
- JUNQUEIRA, M. R. **Aplicação de Técnicas Proteômicas na Caracterização do Veneno da Serpente *Bothrops insularis* (Viperidae)**. Dissertação de mestrado, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 63p. 2005.
- KADER, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology.**, 47:627–54. 1996.
- KAWANO, T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. **Plant Cell Reports.**, 21: 829-837. 2003.
- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focussing and electrophoresis of mouse tissues, a novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Human Genetik.**, 26: 231-243. 1975.
- KLOSE, J., KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis.**, 16: 1034-1059. 1995.
- KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal.**, 37:370–378. 2004.

KRISHNA, R.G., WOLD, F. Post-translational modification of proteins. **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology.**, 67, 265–298. 1993.

KYNDT, T., VAN DAMME, J.M., VAN BEEUMEN, J., GHEYSEN, G. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. **Federation of European Biochemical Societies Journal.**, 274: 451–462. 2007.

LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature.**, 409:860-921. 2001.

LILLEY, K.S., DUPREE, P. Plant organelle proteomics. **Current Opinion in Plant Biology.**, 10, 594–599. 2007.

LIM, H., ENG, J., YATES, J.R., TOLLAKSEN, S.L., GIOMETTI, C.S., HOLDEN J.F. ADAMS, M.W.W., REICH, C.I., OLSEN G.J., HAYS, L.G. Identification of 2D-gel proteins: A comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to μ LC-ESI tandem mass spectrometry. **American Society for Mass Spectrometry.**, 14: 957-970. 2003.

MANN, M., HENDRICKSON, R. C., PANDEY, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, 70: 437-473. 2001.

MINIC, Z. Physiological roles of plant glycoside hydrolases. **Planta**, DOI 10.1007/s00425-007-0668-y.

MISHRA, GR; SURESH, M; KUMARAN, K. Human protein reference database- 2006 update. **Nucleic Acids Research.**, 34. doi:10.1093/nar/gkj141

MOLINA, A., SEGURA, A., GARCÍA-OLMEDO, F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. **Federation of European Biochemical Societies Journal.**, 316:119–122. 1993.

MONTIL, R., CONTIERO, J., GOULART, A.J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, 47: 747-754. 2004.

MOSOLOV, V.V., VALUEVA, T.A. Proteinase Inhibitors and Their Function in Plants: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology.**, 41: 227–246. 2005.

NARASIMHAN, M.L., DAMSZ, B., COCA, M.A., IBEAS, J.I., YUN, D.J., PARDO, J.M., HASEGAWA, P.M. BRESSAN, R.A. A Plant Defense Response Effector Induces Microbial Apoptosis. **Molecular Cell.**, 8: 921–930. 2001.

NEWTON, R.P., BRENTON, A.G., SMITH, C.J., DUDLEY, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry.**, 65: 1449–1485. 2004.

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

OHASHI, A., MURATA, E., YAMAMOTO, K., MAJIMA, E., SANO, E., LE, Q.T., KATUNUMA, N. New functions of lactoferrin and casein in mammalian milk as cysteine protease inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, 306: 98-103. 2003.

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

PEREIRA, L.S., GOMES, M.V., FERNANDES, K.V.S., SALES, M.P., XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Revista **Brasileira de Botânica.**, 22(1): 1-8. 1999.

PEREIRA, M.T., LOPES, M.T.P., MEIRA, W.O., SALAS, C.E. Purification of a Cysteine Proteinase from *Carica candamarcensis* L. and Cloning of a Genomic Putative Fragment Coding for This Enzyme. **Protein Expression and Purification.**, 22: 249–257. 2001.

PINTUS, F., MURA, A. Purification of *Euphorbia characias* latex peroxidase by calmodulin-affinity chromatography. Italian **Journal Biochemistry.**, 56:1-5. 2007.

POSCH, A., CHEN, Z., WHEELER, C., DUNN, M.J., RAULF-HEIMSOTH, M., BAUR, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, 99: 385-395. 1996.

RAMOS, M.V., FREITAS, C.D.T., STANISÇUASKI, F., MACEDO, L.L.P., SALES, M.P., SOUSA, D.P., CARLINI, C.R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *C. procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science.**, 173: 349-357. 2007.

RAPPSILBER, J., MANN, M. What does it mean to identify a protein in proteomics? **Trends Biochemistry Science.**, 27: 74–78. 2002.

ROCHA, T.L., COSTA, P.H.A., MAGALHÃES, J.C.C., EVARISTO, R.G.S., VASCONCELOS, E.A.R., COUTINHO, M.V., PAES, N.S., SILVA, M.C.M., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. **Comunicado Técnico Embrapa.**, 136: 1-12. 2005.

ROY, S., ARAVIND, P., MADHURANTAKAM, C. GHOSH, A.K. SANKARANARAYANAN, R., DAS, A.K. Crystal structure of a fungal protease inhibitor from *Antheraea mylitta*. **Journal of Structural Biology.**, In press. 2009.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta.**, 220:183-197. 2004.

SEONG, E.S., CHO, H.S., CHOI, D., JOUNG, Y.H., LIM, C.K., HUR, J.H., WANG, M.H. Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, 363: 983-988. 2007.

SHEVCHENKO, A., JENSEN, O.N., PODTELEJNIKOV, A.V., SAGLIOCCO, F., WILM, M., VORM, O., MORTENSEN, P., SHEVCHENKO, A., BOUCHERIE, H., MANN M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, 93: 14440-14445. 1996.

SINGH, N.K., HANDA, A.K., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. Protein associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. **Plant Physiology.**, 79: 126- 137.1985.

- SINGH, A., KIRUBAKARAN, S.I., SAKTHIVEL, N. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. **Protein Expression and Purification.**, 56: 100–109. 2007.
- SIUZDARK, G. **Mass spectrometry for biotechnology.** American press, pp161. 1996.
- SPIRO, R.G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology.**, 12: 43-56. 2002.
- SRITANYARAT, W., PEARCE, G., SIEMS, W.F., RYAN, C.A., WITITSUWANNAKUL R., WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry.**, 67(15),1644-1650. 2006.
- STEEN, H., MANN, M. The ABC'S(and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature.**, 5: 699-711. 2004.
- SUBROTO, T., VAN KONINGSVELD, G.A., SCHREUDER, H.A., SOEDJANAATMADJA, U.M.S., BEINTEM, J.J. Chitinase and beta-1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of Hevea latex. **Phytochemistry.**, 43: 29-37. 1996.
- SUBROTO, T., VRIES, H., SCHURINGA, J.J., SOEDJANAATMADJA, U.M.S., HOFSTEENGED, J., JEKEL, P.A. BEINTEMA, J.J. Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (lutoid-body) fraction of

latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology and Biochemistry.**, 39: 1047-1055. 2001.

SUBROTO, T., VAN KONINGSVELD, G.A., SCHREUDER, H.A., SOEDJANAATMADJA, U.M.S., BEINTEM, J.J. Chitinase and beta-1,3-glucanase in the luteoid-body fraction of *Hevea* latex. **Phytochemistry.**, 43: 29-37. 1996.

SUSSMAN, G.L., BEEZHOLD, D.H., KURUP, V.P. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, 110: 33-30. 2002.

TAIRA, T., OHDOMARI, A., NAKAMA, N., SHIMOJI, M., ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of Gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex Chitinases: Both the chitin-binding and the antifungal activities of class I Chitinases are reinforced with increasing ionic strength. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.**, 69: 811-818. 2005.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3^o Ed. Artmed press. pp 719. 2006.

TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.**, 29: 87-101. 1999.

TRUDEL, J., ASSELIN, A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry.**, 178: 362-366. 1989.

VAN DER HOORN R.A.L., JONES, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Current opinion in plant biology.**, 7: 400-407. 2004.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERCE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopatology.**, 44: 135-162. 2006.

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.**, 62: 447-450. 2005.

WANG, P., GRANADOS, R.R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology.**, 47:110-118. 2001.

WANG, H., NG, T.B. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruit. **Phytochemistry.**, 61:1-7. 2002.

WESSELS, J.G.H., SIETSMA, J.H. Fungal cell walls: A survey. In **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series, Volume 138, Plant Carbohydrates /I (Tanner, W. and Loewus, F.A., eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 352-394. 1981.

WIJK, K.J. Plastid proteomics. **Plant Physiology and Biochemistry.**, 42: 963-977. 2004.

WITITSUWANNAKUL, R., WITITSUWANNAKUL, D., SATTAYSEVANA, B., PASITKUL, P. Peroxidase from *Hevea brasiliensis* bark: Purification and properties. **Phytochemistry.**, 44: 237-241. 1997.

WONG, P.F., ABUBAKAR, S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. **Plant Science.**, 169: 303-311. 2005.

CAPÍTULO 2

Caracterização da atividade proteolítica

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteinases: Características Gerais

Proteases (EC 3.4) são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas. Elas são classificadas como endopeptidases (EC 3.4.21 - 99), quando hidrolisam ligações internas, e exopeptidases (EC 3.4.11 - 19) quando hidrolisam unicamente ligações C- e N- terminais. As endopeptidases são também conhecidas como proteinases e classificadas de acordo com o aminoácido presente em seu sítio ativo envolvido na atividade enzimática ou no seu mecanismo de ação. As proteinases são classificadas em serínicas (EC 3.4.21), cisteínicas (EC 3.4.22), aspárticas (EC 3.4.23) e metaloproteinases (EC 3.4.24) (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997), como exemplificado na Tabela 1.

De acordo com a classificação usada no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>, acesso em 20/03/2009), as proteinases pertencentes a cada tipo catalítico são incluídas em famílias, com base na similaridade de estrutura primária. Algumas proteinases classificadas na mesma família podem ainda ser incluídas em clãs, se apresentarem estruturas tridimensionais similares. Em 20 de março de 2009, o banco de dados MEROPS era composto de 14 famílias de proteinases aspárticas, 72 de proteinases cisteínicas, 56 de metaloproteinases e 45 de proteinases serínicas. Proceraina, uma proteinase cisteínica isolada e parcialmente caracterizada do

látex de *C. procera*, é classificada na mesma família (C1) e Clã (CA) da papaína, uma proteinase cisteínica isolada do látex da planta *C. papaya* (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003)

Tabela 1: Classificação das proteinases e suas características

Tipo de Proteinase	Aminoácido do sítio ativo	pH ótimo	Exemplos
Serínica	Serina e Histidina	7-9	Tripsina; Quimotripsina; Elastase
Cisteínica	Cisteína	4-7	Papaína; Ficina; Bromelaína
Aspártica	Aspartato e tirosina	<5	Pepsina; Renina
Metalo	Íon metálico	7-9	Carboxipeptidases A e B; Aminopeptidases

*Tabela retirada de Oliveira *et al.* (2003) com algumas adaptações.

1.2 Ocorrência de Proteinases

Proteinases cisteínicas estão distribuídas em todos os seres vivos, desde bactérias até mamíferos (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997). Em plantas, essas proteínas são encontradas em todos os tecidos e órgãos, apresentando uma grande variedade de funções fisiológicas (SCHALLER, 2004).

Proteinases, principalmente do tipo cisteínica, são também relatadas em látex, no qual a papaína, presente em *C. papaya*, é a mais conhecida. Além da papaína, o látex de *C. papaya* possui outras três proteinases cisteínicas (MEZHLUMYAN *et al.*, 2003). Do mesmo modo, o látex de *Ficus glabrata* e *F. carica* (SGARBIERI *et al.*, 1964), *Calotropis gigantea* (ABRAHAM e JOSHI,

1979), *Ervatamia coronaria* (NALLAMSETTY *et al.*, 2003), *Morrenia brachystephana* (CAVALLI *et al.*, 2003) e *Carica candamarcensis* (TEIXEIRA *et al.*, 2008) apresentam múltiplas proteinases cisteínicas.

Diferentes proteinases serínicas foram caracterizadas no látex de diferentes espécies do gênero *Euphorbia*, denominadas de euphorbainas. (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1987). No látex de *H. brasiliensis*, relata-se, também, a ocorrência desta mesma classe de proteinases (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1986). O mesmo foi constatado no látex de *Euphorbia supina* (ARIMA *et al.*, 2000), *E. milli* (YADAV *et al.*, 2006) e *Wrightia tinctoria* (TOMAR *et al.*, 2008).

Látices são, reconhecidamente, ricos em proteinases dos tipos cisteínicas e serínicas. Contudo poucos trabalhos relatam a presença de proteinases aspárticas (DEVARAJ *et al.*, 2008) e nenhum descreve a presença de metaloproteinases.

1.3 Mecanismo de Catálise e Estrutura Tridimensional de Proteinases

Apesar do mecanismo de proteólise de proteinases cisteínicas não ser amplamente conhecido, sabe-se que os resíduos de Cys 25 e His159 fazem parte do sítio ativo da papaína, mas ainda é questionável se esses dois aminoácidos são suficientes para a completa catálise (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997).

O grupo imidazol da histidina polariza o grupo SH da cisteína e habilita a desprotonação, ainda em pH neutro ou levemente ácido. Os íons tiolato/imidazol são formados e altamente nucleofílicos. O ânion tiolato ataca o

carbono carbonil da ligação peptídica a ser clivada e um intermediário tetraédrico é produzido e estabilizado. Posteriormente, há um ataque nucleofílico da água, clivagem do substrato e, finalmente, regeneração da enzima (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997).

A estrutura tridimensional da papaína foi elucidada, assim como de outras proteinases cisteínicas, e todas apresentam apenas uma cadeia polipeptídica (monômeros) e são bilobadas (Figura 1). O sítio ativo está presente entre esses dois lóbulos (DUBEY *et al.*, 2007).

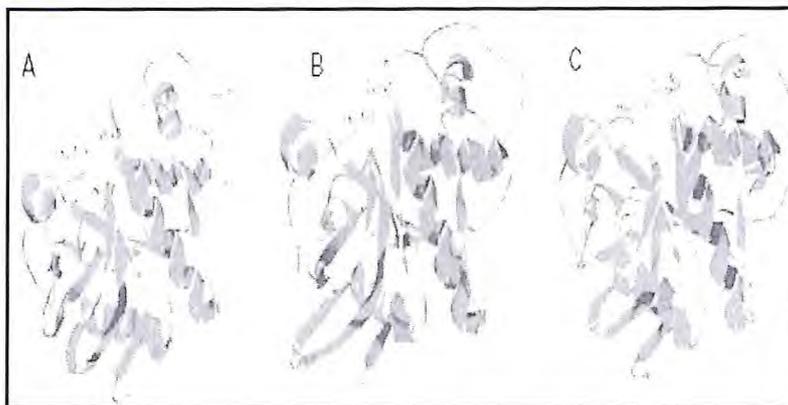


Figura 1: Estrutura tridimensional da papaína (A), Ervatamina B (B) e Ervatamina C (C), mostrando os resíduos de cisteína e histidina, do sítio ativo, presentes na fenda entre os lóbulos das proteinases. Figura retirada de Dubey e colaboradores (2007).

1.4 Funções das Proteinases nas Plantas

Muitas proteinases de plantas têm sido isoladas de diferentes tecidos e órgãos e a maioria delas pertencem à classe de proteinase serínicas e

cisteínicas. Em plantas, as proteinases cisteínicas possuem importantes papéis em processos intra e extracelulares, tais como no desenvolvimento e amadurecimento de frutos, na degradação de proteínas de reserva, ativação de zimogênios e degradação de proteínas defeituosas, senescência e morte celular programada, e no reconhecimento de patógenos e na indução de respostas de defesa (SCHALLER, 2004; van der HOORN, 2008).

Alguns trabalhos mostram que as proteinases cisteínicas estão envolvidas na interação de incompatibilidade planta-patógeno. Entre elas, a proteinase cisteínica de tomate (RCR3) é requerida na resistência contra o fungo *Cladosporium fluvum* (KRUGER *et al.*, 2002), e Mir1 (proteinase cisteínica de milho), que mostrou se acumular diretamente no local de ataque dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea grandiosella*, em plantas resistentes (PECHAN *et al.*, 2000).

Em látex, as proteinases são sintetizadas nas suas formas inativas e ativadas após a planta sofrer injúria mecânica. No látex de *C. papaya*, essas enzimas podem alcançar concentrações tão altas quanto 1 mM. Essas enzimas podem estar relacionadas com a coagulação do látex, dessa forma possuindo papel indireto de defesa (SILVA *et al.*, 1997; AZARKAN *et al.*, 2003). Essas enzimas podem, também, atuar diretamente sobre insetos. Konno e colaboradores (2004) mostraram que a papaína protege plantas de *C. papaya* contra o ataque de diferentes espécies de insetos da ordem Lepdoptera.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Azocaseína, *N*-Benzoil-arginina-naftilamida (BANA), benzoil arginina *p*-nitroanilida (BApNA), trans-epoxisuccinil-leucilamido-3-metil-butano (E-64), fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF), pepstatina, papaína cristalizada (E.C. 3.4.22.2), 4-(dimetil-amino)cinamaldeído (DMACA), anti-IgG de coelho produzido em cabra e marcado com fosfatase alcalina, 5- bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitro blue tetrazolium (NBT), acrilamida, bis-acrilamida, 2-mercaptoetanol, adjuvante completo de Freud, membrana de nitrocelulose e membrana de diálise "cut off" 8.000 foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. USA.

Ditiotreitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), etilenoglicol-bis-aminoetil éter (EGTA), iodoacetamida (IAA) e resinas de exclusão molecular Sephacryl S-100 e troca iônica CM-Sepharose Fast Flow foram obtidos da GE Healthcare, Brasil.

Albumina sérica bovina (BSA) fração V foi obtida de INLAB, Brasil.

Triton X-100 foi obtido da USB Corporation, Cleveland, OH USA.

Os demais reagentes foram de grau analítico e provenientes de outros fornecedores.

2.2 Atividade Proteolítica Total

Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para investigar a atividade proteolítica total presente no látex. A reação consistiu de 50 µl (1 mg/ml em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) das proteínas do látex (pré-incubadas ou não com 40 µl de DTT 3 mM por 10 min a 37 °C), 200 µl de azocaseína 1% e o volume ajustado para 500 µl com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após 60 min a 37 °C, a reação foi parada com adição de 300 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Os tubos foram centrifugados (5.000 x *g* por 10 min a 25 °C) e 400 µl do sobrenadante foram misturados com 400 µl de NaOH 2 N. O desenvolvimento de cor foi medido por espectrofotômetro (Ultrospec 1000 Amersham Pharmacia) a 420 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorbância em 0,01 em uma hora (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Os brancos consistiram da incubação das amostras por 1 h a 37 °C em tampão acetato de sódio 50 M, pH 5,0, logo após esse período foi adicionado TCA 10% e, posteriormente, azocaseína 1%.

2.3 Ensaio para Proteinases Cisteínicas

Os ensaios específicos para proteinases cisteínicas foram realizados utilizando BANA como substrato (ABE *et al.*, 1992). A reação consistiu de 50 µl (1 mg/ml em acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) das proteínas do látex (pré-incubadas ou não por 10 min a 37 °C com 40 µl de uma solução contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM), 200 µl de BANA 1 mM e o volume ajustado para 500 µl

com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após 30 min a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 500 µl de HCl 2%, em etanol, e 500 µl de DMCA 0,06%. Após 40 min, o desenvolvimento de cor foi medido a 540 nm (ABE *et al.*, 1992). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorbância em 0,01 em 30 min de reação. Os brancos consistiram da incubação das amostras por 30 min a 37 °C, logo após esse período foi adicionado HCl 2%, em etano,l e, posteriormente, DMCA 0,06%.

2.4 Ensaio para Proteinases Serínicas

Os ensaios específicos para proteinases serínicas foram realizados utilizando BApNA como substrato (GOMES *et al.*, 2005). A reação consistiu de 50 µl (1 mg/ml em acetato de sódio 50 mM pH 5,0) das proteínas do látex, 200 µl de BApNA 1,25 mM e o volume ajustado para 500 µl com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após 30 min a 37 °C, a reação foi interrompida com a adição de 150 µl de ácido acético 30%. O desenvolvimento de cor foi medido a 405 nm, após 30 min de ensaio (GOMES *et al.*, 2005). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorbância em 0,01 em 30 min. Os brancos consistiram da incubação das amostras por 30 min a 37 °C, logo após esse período foi adicionado ácido acético 30% e as leituras realizadas a 405 nm.

2.5 Avaliação da Atividade Proteolítica em Diferentes Valores de pH

O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado dissolvendo as proteínas do látex nos seguintes tampões nas concentrações de 50 mM: glicina (pH 3,0 e 10,0), acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0 e 9,0). As atividades proteolíticas foram determinadas a 37 °C utilizando azocaseína 1%, BANA 1 mM e BApNA 1,25 mM como substratos, a 37 °C, como descrito anteriormente.

2.6 Estabilidade Térmica e Efeito de Inibidores de Proteinases

Para testar a estabilidade térmica das proteinases, as proteínas do látex foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 (1 mg/ml), e incubadas a diferentes temperaturas (37 a 90 °C), por 15 ou 30 min. Após esses períodos, a atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína ou BANA como substratos, a 37 °C, como descrito anteriormente.

Para elucidar a natureza mecanicista das proteinases presentes no látex de *C. procera*, diferentes inibidores para tipos específicos de proteases foram testados. Alíquotas de 50 µl (1 mg/ml em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0) das proteínas do látex foram pré incubadas separadamente por 30 min a 37 °C na presença de 20 µl dos seguintes inibidores: iodoacetamida 0,1 M e E-64 0,18 mM (inibidores de proteinases cisteínicas); PMSF 5 mM (inibidor de proteinases serínicas); pepstatina 10 µM (inibidor de proteinases aspárticas); EGTA e EDTA 10 mM (inibidores de metaloproteinases). A atividade

remanescente foi determinada utilizando azocaseína ou BANA como substratos, a 37 °C, como descrito anteriormente.

2.7 Detecção de Proteinases por Zimograma

As eletroforeses foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações. As proteínas do látex foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 65 mM, pH 6,8), contendo SDS 1%, glicerol 10%, na presença ou ausência de 2-mercaptoetanol 5%. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo 0,1% de gelatina a 8 °C, submetidas a 20 mA por placa (MACEDO *et al.*, 2004). Após eletroforese, os géis foram incubados em Triton X-100 2,5% por 40 min a 25 °C, sob agitação constante. Em seguida, os géis foram incubados em diferentes tampões nas concentrações de 50 mM [acetato de sódio (pH 4,0 e 5,0), fosfato de sódio (pH 6,0 e 7,0) e Tris-HCl (pH 8,0, 9,0) e glicina (pH 10,0)] contendo DTT 3 mM por 3 h a 37 °C. Após este período, os géis foram corados com solução de coomassie brilliant blue R-250 0,2% e, posteriormente, descorados com solução de 30% metanol e 10% de ácido acético. A atividade enzimática foi detectada como bandas transparentes nos géis.

2.8 Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sephacryl-100

As proteínas do látex foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl-100 com o objetivo de avaliar a distribuição de proteínas e proteinases presentes da fração PL. Para isso, as proteínas do látex (PL) foram dissolvidas em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,9

(30 mg em 3 ml), centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5417 R) a 20.000 x g a 4°C por 20 min, e o sobrenadante aplicado em uma coluna (100 x 2,5 cm) previamente equilibrada com o tampão da amostra. O fluxo foi ajustado para 0,5 ml/min e um volume de 2 ml por tubo foi coletado. Uma alíquota de 100 µl de alguns tubos foi retirada para a realização da atividade proteolítica utilizando BANA como substrato, pH 6,0. Os tubos onde foram detectados atividade proteolítica foram liofilizados para posterior análise em gel de poliacrilamida.

2.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas para visualizar o perfil de proteínas ao longo da cromatografia de exclusão molecular.

Os experimentos de eletroforese em géis de poliacrilamida em presença de SDS foram conduzidos de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptadas para o uso de géis de separação em placas.

2.10 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose Fast Flow

Cromatografias de troca iônica foram realizadas com o objetivo de diminuir a complexidade da amostra, para posteriores análises de imunodifusão e Western Blotting. Cromatografia realizada como descrito no Capítulo I.

2.11 Produção de Anticorpos Policlonais e Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony

Anticorpos policlonais contra papaína foram produzidos em coelho macho, da raça Nova Zelândia, de 4 meses de idade, obtido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, com o objetivo de avaliar a similaridade entre proteínas presentes no látex de *C. procera* a papaína e a papaína. A sensibilização foi induzida por uma dose inicial (dia 0) com papaína (1 mg em 0,5 ml de salina estéril) e adjuvante completo de Freud (0,5 ml), administrada por via intramuscular, na pata traseira do animal.

Doses reforço de 1 mg de papaína em 1 ml de solução salina, sem o adjuvante, foram posteriormente aplicadas por via subcutânea no dorso do animal nos dias 21, 35 e 42. Cortes nas extremidades das orelhas do coelho foram feitos e aproximadamente 10 ml de sangue foram coletados antes da primeira sensibilização (dia 0) e das doses de reforço (dia 35 e 42). O sangue foi deixado em repouso em estufa a 37 °C por 5 h, para retração do coágulo. Posteriormente, o soro foi obtido após centrifugação a 2.000 x *g* por 5 min a 25 °C. O sobrenadante resultante foi precipitado com sulfato de amônio na faixa de saturação de 0-30%, deixado em repouso por 24 h, centrifugado a 20.000 x *g* por 20 min a 4 °C, dialisado exaustivamente contra água destilada e armazenado em alíquotas de 1 ml em tubos a -20 °C.

A produção de anticorpos contra papaína foi avaliada através de ensaios de imunodifusão, como descrito por Moreira e Cavada (1984). Os ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony foram realizados em gel de ágar 1,5% em salina contendo 0,02% de azida sódica, segundo a metodologia de

Ouchterlony (1962). O ágar aquecido (aproximadamente 5,5 ml) foi adicionado sobre lâminas para microscopia com dimensões de 7,5 x 2,5 x 0,25 cm e deixado esfriar a 25 °C. Após esse período, os géis foram perfurados com auxílio de um perfurador para placas de imunodifusão, produzindo furos esféricos com diâmetros de 2 mm e capacidades de 10 µl. Os furos foram feitos em posições eqüidistantes e em distribuição radial, havendo um furo central.

Dois ensaios de imunodifusão foram realizados. O primeiro ensaio teve como objetivo verificar se houve produção de anticorpos policlonais contra papaína. O segundo ensaio teve a finalidade de avaliar se anticorpos antipapaína eram capazes de reconhecer proteínas do látex de *C. procera*.

No primeiro experimento, soluções de antígenos (papaína) e anticorpos (anti-soros dos dias 35 e 42 contra papaína) foram preparadas em salina contendo 0,02% de azida sódica. Os anti-soros e o soro não imune (dia 0) foram sempre adicionados nos poços centrais e o antígenos foram preparados a 10 mg/ml (PL), 5 mg/ml (PI, PII e PIII CM) e 1 mg/ml (papaína) e , a partir destas soluções, diluições de 1:2, 1:4 e 1:8 foram feitas. A dupla difusão de antígenos e anticorpos foi realizada durante 48 h a 25 °C, em ambiente de câmara umedecida com salina. Ao final do período de difusão, as placas contendo os géis foram coradas com uma solução de coomassie brilhante blue R-250 a 0,1% em ácido acético 7% e metanol 5%. Os géis foram descorados com a mesma solução que continha o corante.

2.12 Dot Blotting e Western Blotting

Uma segunda metodologia foi realizada com o objetivo de avaliar a similaridade de proteínas presentes no látex com a papaína. Para isso, as proteínas do látex foram submetidas à análise em “Dot Blotting” e “Western Blotting”.

Nos ensaios de Dot Blotting, foram adicionados 10 µl de cada amostra (nas mesmas concentrações dos ensaios de imunodifusão) na membrana de nitrocelulose e deixados secar por 10 min a 25 °C.

Para os ensaios de Western Blotting, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e, posteriormente, transferidas para membranas de nitrocelulose, de acordo com o método originalmente descrito por Towbin e colaboradores (1979). Para cada ensaio, foram realizadas duas eletroforeses, uma para visualização após coramento com coomassie brilhante blue R-250 e outra para a transferência. As membranas de nitrocelulose foram incubadas por 10 min com tampão de corrida, contendo 20% de metanol. As proteínas foram transferidas em uma unidade de transferência Transphor (TE 42 – Hoefer Scientific Instruments), de 1 litro, a 100 mA a 4 °C e sob agitação por 2 h. Após esse período, as membranas foram incubadas com solução bloqueadora composta de PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, NaHPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado, sob agitação a 25 °C por 2 horas. Decorrido esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana lavada três vezes consecutivas com PBS contendo 5% de leite desnatado. Os anticorpos primários foram adicionados na diluição de 1:5.000 (v:v) na solução bloqueadora e a incubação feita à temperatura

ambiente, sob agitação por 2 h. Após três lavagens, com tampão PBS, cada uma por 2 min e sob agitação, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo na diluição de 1:20.000 (v:v, anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina), por 2 h, à temperatura de 25 °C. Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), que constituiu de uma solução de Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/ml e BCIP 25 mg/ml. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato, até o aparecimento das bandas arroxeadas. A reação foi parada com água destilada.

3. RESULTADOS

A habilidade das proteínas do látex (PL) de *C. procera* em digerir substratos para proteinases tais como azocaseína, BANA e BApNA foi avaliada em diferentes valores de pH, na presença ou ausência de DTT (Figura 2). A atividade proteolítica utilizando azocaseína foi mais intensa em pH 5,0. Contudo, quando as proteínas do látex foram previamente incubadas com DTT, a atividade específica foi aumentada em, aproximadamente, quatro vezes e a atividade proteolítica ótima foi deslocada para o valor de pH 6,0. Esses resultados evidenciam a presença de uma forte atividade proteolítica do tipo cisteínica ativada com DTT.

A atividade proteolítica utilizando BANA, um substrato específico para proteinases cisteínicas, foi máxima em pH 6,0. Contudo, tal atividade só foi observada quando as PL foram previamente incubadas com DTT. PL não foram capazes de hidrolisar o substrato BApNA, específico para proteinases serínicas, mesmo em concentrações de 3 mg/ml e em diferentes valores de pH (Figura 2).

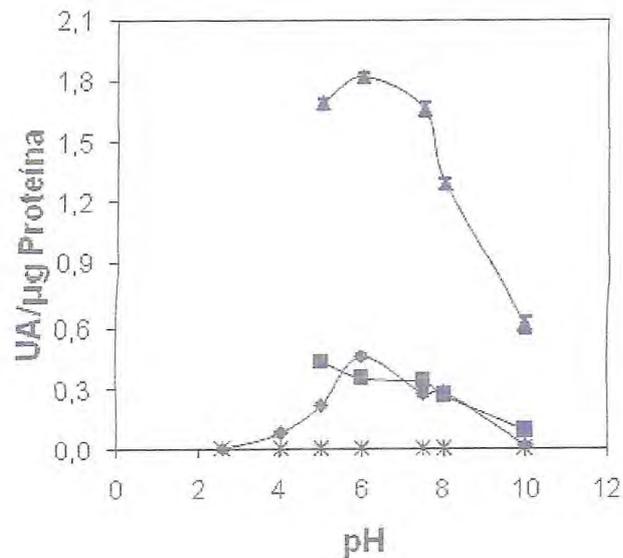


Figura 2: Efeito do pH na atividade proteolítica presente na fração protéica do látex de *C. procera*, utilizando azocaseína (■), azocaseína + DTT (▲), BANA + DTT(◆) e BApNA (×) como substratos. Cada ponto é referente a média de três experimentos com respectivos desvios padrões.

Uma posterior caracterização da atividade proteolítica foi realizada utilizando inibidores específicos de proteinases (Figura 3). Os ensaios foram conduzidos incubando as PL por 30 min com diferentes inibidores e utilizando azocaseína e BANA como substratos. O inibidor PMSF não alterou a atividade proteolítica de PL, quando utilizado azocaseína como substrato. Na presença dos inibidores EDTA e EGTA, a atividade proteolítica foi aumentada em mais de 50%, mostrando a possível presença de proteinases cisteínicas, já que além de serem inibidores de metaloproteinases, são também ativadores de proteinases cisteínicas. E-64, um inibidor de proteinases cisteínicas, e pepstatina (PEP), um inibidor de proteinases

aspárticas, foram capazes de inibir a atividade proteolítica em, aproximadamente, 50% (Figura 3A).

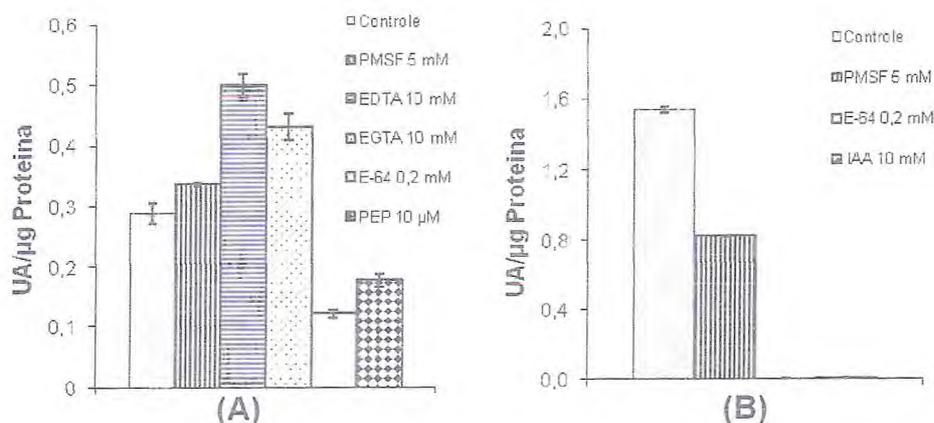


Figura 3: Efeito de inibidores de proteinases na atividade proteolítica presente na fração protéica do látex de *C. procera*, utilizando **(A)** azocaseína (PL sem DTT) ou **(B)** BANA (PL com DTT) como substratos em pH 6,0 a 37 °C. PEP: Pepstatina. IAA: Iodoacetamida.

Quando foi utilizado BANA como substrato, os inibidores E-64 e Iodoacetamida foram capazes de inibir a atividade proteolítica em 100%, enquanto PMSF inibiu a atividade proteolítica em 50% (Figura 3B).

A termoestabilidade das proteinases presentes no látex foi avaliada utilizando azocaseína ou BANA como substratos (Figura 4). A atividade proteolítica da fração PL não foi afetada após incubação a 60 °C durante 30 min, quando

azocaseína foi utilizada. Contudo, a atividade foi perdida em 70 e 100% após incubação a 75 °C e 90 °C, por 15 min, respectivamente. Esse perfil não foi observado utilizando BANA como substrato. Neste caso, a atividade foi afetada após incubação da fração PL a 45 °C por 30 min e diminuição de 90% da atividade foi observada quando incubada a 90 °C por 30 min. Não foram observadas diferenças quando as amostras foram incubadas durante 15 ou 30 min (Figura 4).

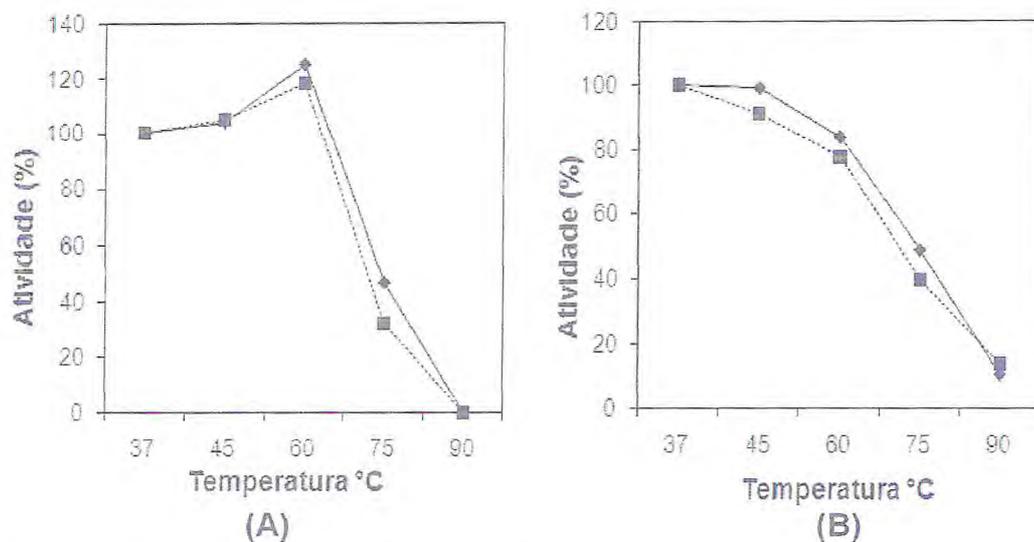


Figura 4: Efeito da temperatura na atividade proteolítica presente na fração protéica do látex de *C. procera* utilizando (A) azocaseína (PL sem DTT) ou (B) BANA (PL com DTT) como substratos em pH 6,0. (◆) 15 min e (■) 30 min de pré-incubação em diferentes temperaturas.

As proteínas do látex foram fracionadas por tamanho utilizando coluna de Sephacryl S-100 (Figura 5A). As frações protéicas obtidas foram recuperadas e o perfil eletroforético e a atividade proteolítica avaliados. Apenas um pico

cromatográfico majoritário foi observado, mostrando que a etapa cromatográfica utilizada não foi eficiente em separar as proteínas da fração PL. As eletroforeses das frações obtidas da cromatografia mostram que a fração PL contém proteínas com massas moleculares variando de 97 a 12 kDa. O pico majoritário obtido da cromatografia foi constituído principalmente por proteínas com massas moleculares de, aproximadamente, 26 kDa (Figura 5). Interessante notar que a banda referente a 97 kDa somente foi evidente após o fracionamento das proteínas do látex na coluna de filtração em gel. A atividade proteolítica do tipo cisteínica foi observada nos tubos 42 a 69, referentes a proteínas com massas moleculares de 66 kDa a 22 kDa (Figura 5B).

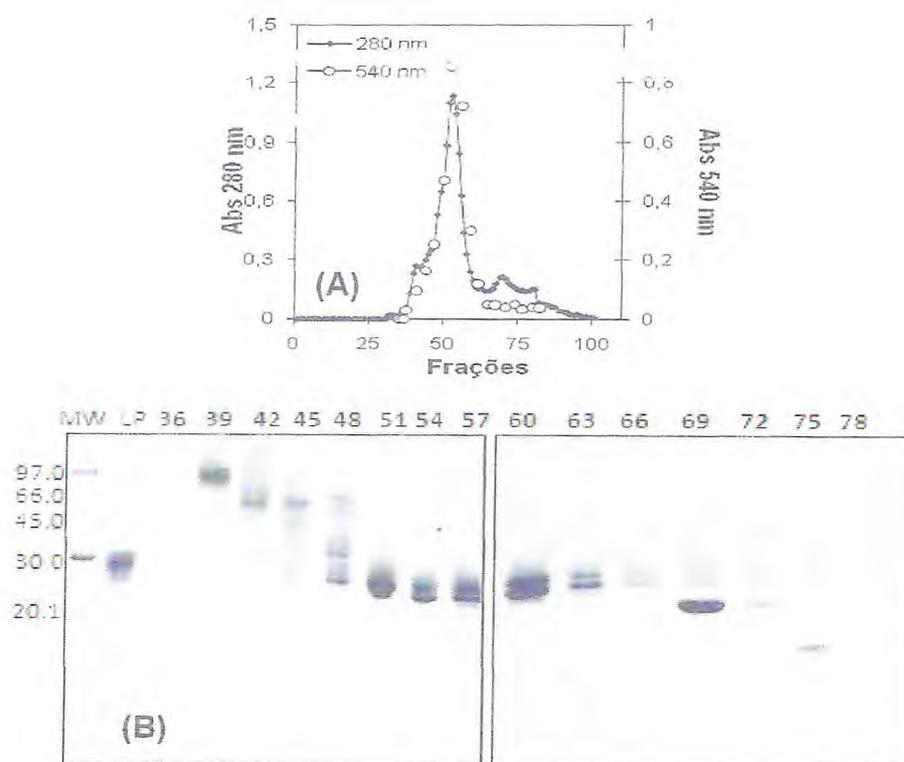


Figura 5: (A) Perfil cromatográfico das proteínas do látex de *C. procera* em coluna de Sephacryl S-100 [Abs 280 nm (●)] e atividade proteolítica utilizando BANA, na presença de DTT [Abs 540 nm (○)], como substrato em pH 6,0 a 37 °C. (B) Perfil

eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações coletadas após cromatografia em coluna de Sephacryl S-100. Atividade proteolítica foi detectada nos tubos 42 a 69 utilizando alíquotas de 100 μ l. Géis corados com Coomassie Brilliant Blue. Foram aplicados 10 μ g de proteína.

Atividade proteolítica em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina foi avaliada com o objetivo de visualizar a massa molecular das proteinases (Figura 6). Os zimogramas revelaram a presença de pelo menos quatro proteinases com massas moleculares variando de 66-30 kDa. A atividade gelatinolítica foi máxima em valores de pH 5,0 e 6,0, similar aos resultados encontrados para atividade proteolítica *in vitro*, utilizando azocaseína como substrato (Figura 2). Uma banda de, aproximadamente, 66 kDa com atividade proteolítica foi presente em todos os géis e no gel controle (gel corado logo após a corrida eletroforética). Isso demonstra que essa proteinase (66 kDa) foi ativa durante a corrida eletroforética mesmo na presença de SDS, que é um agente desnaturante.

Cromatografias de troca iônica foram realizadas com o objetivo de diminuir a complexidade da amostra e evidenciar proteínas pouco abundantes no látex, para facilitar as análises posteriores de imunodifusão e Western Blotting. As proteínas do látex foram fracionadas em três picos cromatográficos em coluna de CM-Sephacryl S-100, previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Após eluição das proteínas não retidas com tampão de equilíbrio, as proteínas retidas foram eluídas em tampão acetato de sódio contendo 0,2 e 0,3 M de NaCl, respectivamente (Figura 7).

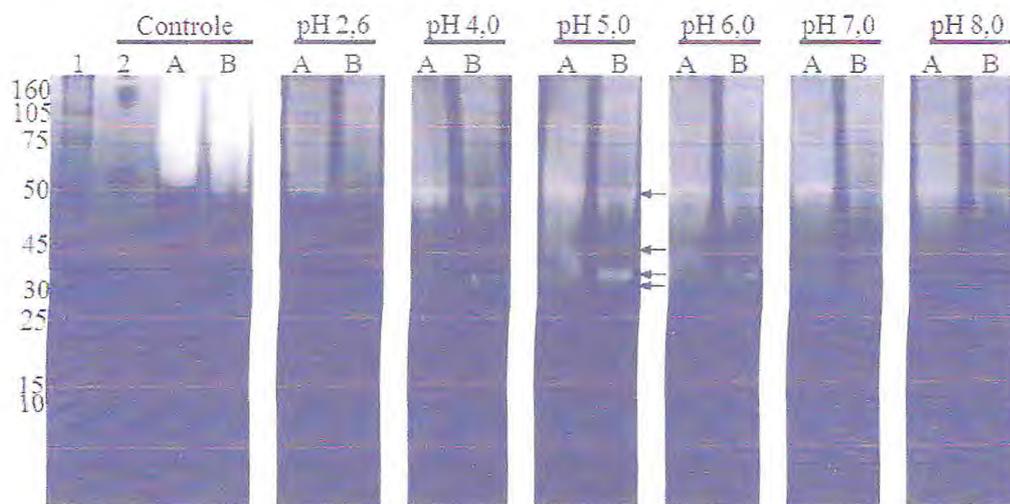


Figura 6: Efeito do pH na atividade gelatinolítica presente na fração protéica do látex de *C. procera*. Foram adicionados em cada poço 2 μ l de PL (0,1 mg/ml). Géis foram incubados por 3 h a 37 °C nas respectivas soluções tampões e corados com “Coomassie Brilliant Blue” R-250 0,2%. Legenda: **C**, BSA (controle negativo); **A** e **B**, PL na ausência e presença de 2-mercaptoetanol, respectivamente. **MW** (Marcadores de Massa Molecular).

A atividade proteolítica do tipo cisteínica, utilizando BANA como substrato, ficou restrita aos picos PII e PIII. As atividades proteolíticas foram totalmente inibidas na presença de E-64, confirmando a presença destas enzimas. O zimograma dos picos obtidos da cromatografia confirma os resultados obtidos, mostrando que apenas os picos retidos apresentaram atividade proteolítica (Figura 7).

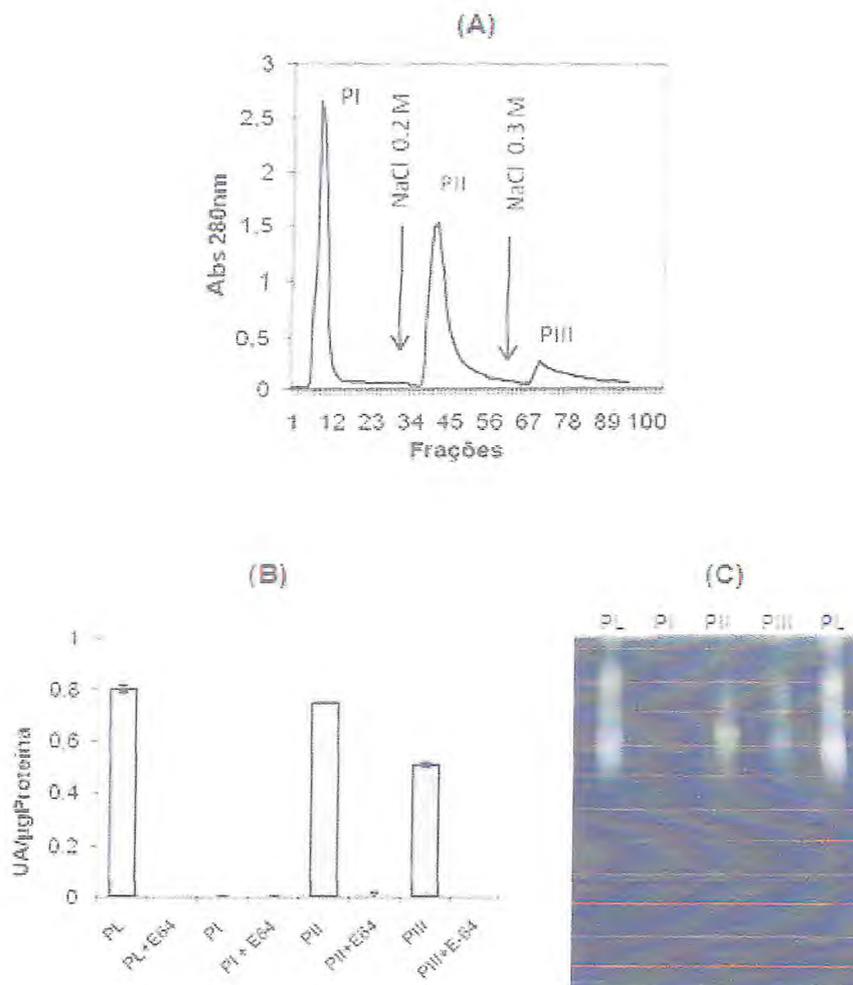


Figura 7: (A) Perfil cromatográfico das proteínas do látex (PL) de *C. procerca* em coluna de CM-Sepharose Fast Flow. PI, pico não retido, eluído com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; PII e PIII, picos retidos, eluídos com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo 0,2 e 0,3 M de NaCl, respectivamente. (B) Atividade proteolítica do tipo cisteínica das proteínas do látex e das frações obtidas após cromatografia em coluna de CM-Sepharose, utilizando BANA (PL+DTT) em pH 6,0, a 37 °C. (C) Zimograma. Gel incubado por 3 h a 37 °C em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo 3 mM de DTT.

Anticorpos policlonais contra papaína foram produzidos em coelho com o objetivo de avaliar a similaridade estrutural entre esta proteinase cisteínica e as proteinases cisteínicas presentes no látex de *C. procera*. Após a produção dos anticorpos, ensaios de imunodifusão radial dupla de Ouchterlony foram realizados. Como mostrado na figura 8, o soro não imune (dia 0) não reconheceu papaína, proteínas do látex, nem as proteínas dos picos obtidos da coluna de CM-Sepharose. Contudo o anti-soro antipapaína produziu reação cruzada apenas com a papaína (Figura 8).

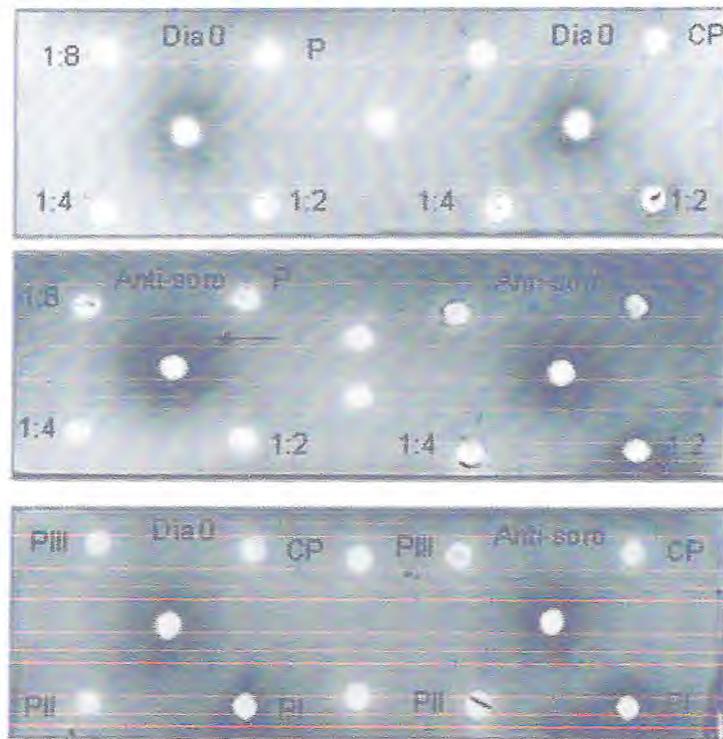


Figura 8: Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony. Legenda: CP, Proteínas do látex de *C. procera* (10 mg/ml); P, Papaína (1 mg/ml); PI, PII e PIII, picos obtidos após cromatografia em coluna de CM-Sepharose (5 mg/ml). Dia 0 (soro não imune) e anti-soro contra papaína (30 mg/ml). Foram adicionados em todos os poços 10 μ l das respectivas soluções. A seta indica a formação de halo de precipitação, mostrando a reação cruzada apenas entre a papaína e o seu anti-soro.

Apesar de ensaios de imunodifusão serem bastante utilizados para verificação de similaridade estrutural entre diferentes proteínas, ele apresenta a desvantagem de ser pouco sensível, já que o halo de precipitação é visualizado a partir do coramento com "Coomassie Brilliant Blue". Para uma avaliação mais acurada, ensaios de *Dot Blotting* e *Western Blotting* foram realizados.

Ensaio de "Dot Blotting" foram realizados com o objetivo de determinar a diluição ideal do anticorpo primário produzido contra a papaína para os ensaios de *Western Blotting*. A diluição em que houve uma boa reação cruzada contra a papaína foi de 1:5.000 (v/v) (Figura 9A). Nesta diluição, uma fraca reação foi observada contra as proteínas do látex e picos PI e PII obtidos após cromatografia em coluna de CM-Sepharose Fast Flow, quando comparado com a reação contra papaína. Esses resultados podem explicar, em parte, porque não foi observado halo de precipitação nos ensaios de imunodifusão, pois há um baixo reconhecimento entre os anticorpos policlonais produzidos contra a papaína e as proteínas do látex de *C. procera*.

Os ensaios de *Western Blotting* foram realizados com o objeto de visualizar as bandas protéicas do látex de *C. procera* que poderiam apresentar similaridade com a papaína e relacionar estas com as bandas com atividade proteolítica visualizadas nos zimogramas (Figura 6). Anticorpos antipapaína não reagiram com proteínas da fração PL, nem proteínas do PIII. Contudo, bandas referentes a massas moleculares de aproximadamente 97 kDa no PI, 45 e 60 kDa no PII da CM-Sepharose foram observadas (Figura 9C). Esses resultados colaboram em parte com os resultados obtidos dos zimogramas. Entretanto, o fato de anticorpos antipapaína terem reconhecido uma proteína presente no PI e esta fração não

possuir atividade proteolítica pode ser explicado pelo fato que muitas proteinases podem ser produzidas como pró-enzimas, que pode ser o caso desta proteína, ou simplesmente houve um reconhecimento inespecífico.

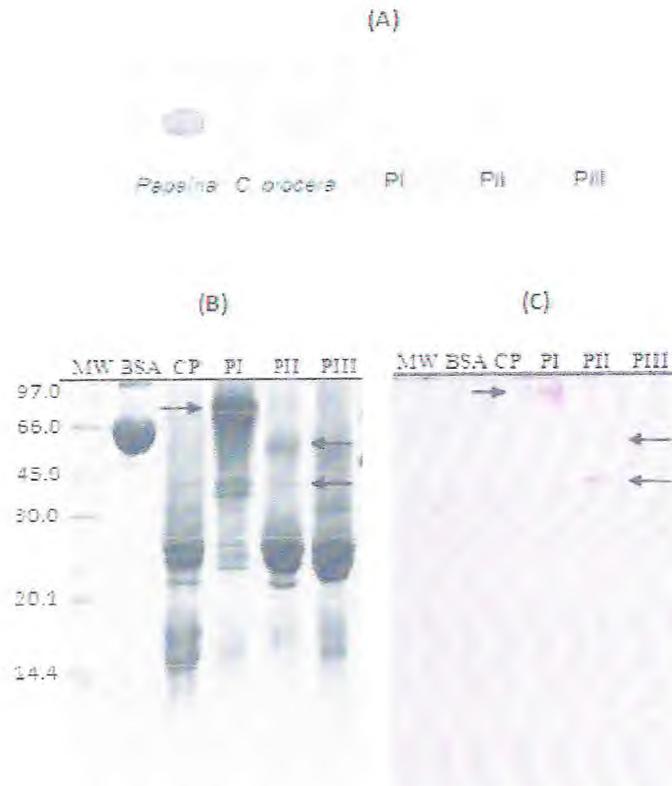


Figura 9: (A) Dot Blotting da papaína e das proteínas do látex de *C. procera* utilizando anticorpos policlonais antipapaína. Foram adicionados 10 μ l: das proteínas do látex (5 mg/ml), papaína (1 mg/ml), PI, PII e PIII-CM (2 mg/ml). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) e (C) Blotting das proteínas do látex e dos picos obtidos após cromatografia de troca iônica. Foram adicionados 40 μ g de proteína em cada poço. Anticorpo primário (1:5.000; v/v) e anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina (1:20.000; v/v). Reação revelada com solução de BCIP/NBT. Setas indicam bandas protéicas reconhecidas pelos anticorpos contra papaína. BSA: Albumina Sérica Bovina.

4. DISCUSSÃO

O látex de *C. procera* possui, pelo menos, quatro proteinases com massas moleculares variando de 66-30 kDa, como observado pelos zimogramas, confirmando que fluidos laticíferos são constituídos por múltiplas proteinases. Esses resultados foram confirmados quando atividade proteolítica foi detectada nas frações correspondentes às proteínas com massas moleculares variando de 66-20 kDa, obtidas após cromatografia de exclusão molecular. Os zimogramas revelaram a presença de três proteinases com massas moleculares na faixa de 35-29 kDa e uma na faixa de 66 kDa.

A presença de múltiplas proteinases em látex é vastamente descrita na literatura e a maioria apresenta massas moleculares na faixa de 30-20 kDa, como no látex de *Carica papaya*, onde foram identificadas, purificadas e caracterizadas quatro proteinases cisteínicas estrutural e imunologicamente distintas: papaína, quimopapaina, proteinase III e proteinase IV, com massas moleculares de 23,4, 25,0, 26,0 e 24,5 kDa, respectivamente (BUTTLE *et al.*, 1989). Da mesma forma, três proteinases cisteínicas denominadas de ervatamina A, ervatamina B e ervatamina C com massas moleculares de 27,6, 26,0 e 25,0 kDa, respectivamente, e com atividades específicas distintas foram caracterizadas no látex de *Ervatamia coronaria* (NALLAMSETTY *et al.*, 2003). No látex de *Araujia angustifolia* três proteinases cisteínicas com massas moleculares de, aproximadamente, 23 kDa foram purificadas (OBREGÓN *et*

al., 2006). Recentemente, Teixeira e colaboradores (2008) caracterizaram 12 isoformas de proteinases cisteínicas no látex de *Carica candamarcensis*, com massas moleculares de, aproximadamente, 23 kDa e sequências N-terminais similares.

Apesar da maioria das proteases purificadas e caracterizadas em látex possuírem massas moleculares na faixa de 30-20 kDa, proteases com massas moleculares maiores que 60 kDa também são relatadas. É o caso da protease de 76 kDa de *Synadenium grantii* e outra de 80 kDa de *Euphorbia supina* (ARIMA *et al.*, 2000; MENON *et al.*, 2002).

A presença de diferentes proteinases em fluidos laticíferos não está relacionada a produtos da auto-hidrólise de uma enzima ou modificações pós-traducionais, já que essas proteinases possuem diferenças claras nas suas estabilidades, massas moleculares, pontos isoelétricos, seqüências N-terminais e especificidades (NALLAMSETTY *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Algumas destas diferenças foram observadas no látex de *C. procera* quando utilizados diferentes substratos em diferentes condições de pH, temperatura e presença distintos inibidores.

A presença de múltiplas proteases é comum ocorrer nas plantas. O genoma de *Arabidopsis thaliana* possui, pelo menos, 826 genes potencialmente codificantes para proteases, que foram distribuídas em 60 famílias e 30 diferentes clãs, incluído proteinases cisteínicas, serínicas, aspárticas e metaloproteinases (Figura 10). Essa grande quantidade de genes para proteinases também foi encontrada para o arroz e papoula (van der HOORN, 2008). Em vista desta grande quantidade de genes encontrados para

estas espécies, não é surpreendente a presença de várias proteinases em fluidos laticíferos.

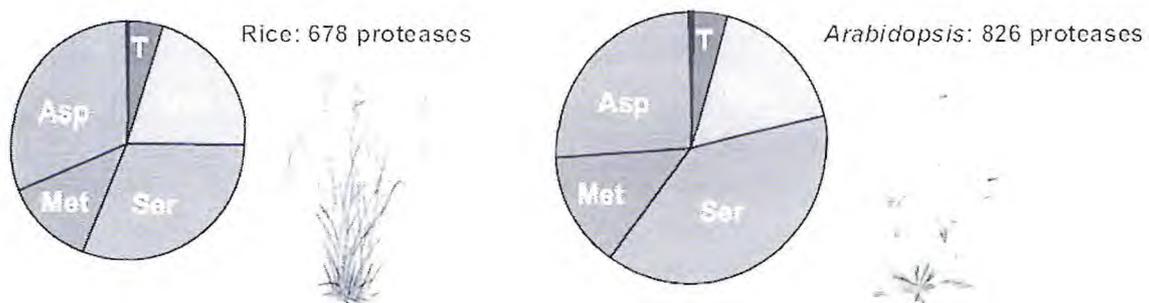


Figura 10: Distribuição de genes para proteases de arroz (*Oryza sativa*) e para *Arabidopsis thaliana*. Legenda: Cys, genes codificantes para proteinases cisteínicas; Ser, genes codificantes para proteases serínicas; Met, genes codificantes para metaloproteases; Asp, genes codificantes para proteases aspárticas.

O pH ótimo de atividade proteolítica da fração PL de *C. procera* variou de 5,0 a 6,0, dependendo do substrato utilizado. Utilizando azocaseína o pH ótimo foi de 5,0. Contudo, na presença de agente redutor (DTT) a atividade ótima foi em pH 6,0 e a atividade específica foi aumentada em, aproximadamente, quatro vezes. O pH ótimo de atividade utilizando BANA foi 6,0. Entretanto essa atividade só foi encontrada quando a amostra foi pré-incubada com DTT. O aumento da atividade proteolítica na presença de agentes redutores como DTT, cisteína ou 2-mercaptoetanol são indícios da presença de proteinases cisteínicas (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003). Além disso, a atividade proteolítica sobre um substrato específico para proteinases cisteínicas (BANA) aliado a 100% de inibição da atividade utilizando inibidores

E-64 e iodoacetamida confirmam a presença de proteinases cisteínicas no látex de *C. procera*.

Uma proteinase cisteínica nomeada de proceraína foi purificada no látex de *C. procera* (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003). Esta proteinase possui massa molecular de 28,8 kDa, atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 55-60 °C. No zimograma, uma banda com massa molecular de, aproximadamente, 30 kDa foi detectada no presente trabalho, confirmando a presença desta proteína no látex de *C. procera*.

Proteinases cisteínicas são abundantes em látices (AZARKAN *et al.*, 2003). Contudo, a presença de proteinases aspárticas ainda é pouco conhecida. Recentemente, uma protease aspártica do látex de *Ficus racemosa*, de 44 kDa, foi purificada e caracterizada. Esta proteinase apresentou atividade máxima em valores de pH 4,5-6,5 e temperatura ótima de atividade a 60 °C (DEVARAJ *et al.*, 2008). A atividade proteolítica do látex de *C. procera* foi máxima a 60 °C, quando azocaseína na ausência de DTT foi utilizada. Além disto, a atividade proteolítica foi inibida em 50% quando utilizado o inibidor pepstatina. Esses resultados são similares aos encontrados por Devaraj e colaboradores (2008) e mostram a possível presença de proteinases aspárticas no látex de *C. procera*.

Parte da atividade proteolítica do látex de *C. procera* foi inibida por PMSF, apenas quando BANA foi utilizado como substrato. PMSF é reconhecidamente um inibidor de proteinases serínicas, contudo ele também pode inibir proteinases cisteínicas (FERNANDEZ *et al.*, 1996). Além disto, as proteínas do látex não foram capazes de degradar o substrato BApNA, um substrato específico para proteinases serínicas. Apesar da não detecção de

proteínases serínicas no látex de *C. procera*, fluidos laticíferos são citados por conterem proteínases serínicas. Menon e colaboradores (2002) purificaram uma proteinase serínica de 76 kDa do látex de *Synadenium grantii* e recentemente uma proteinase serínica de 58 kDa foi purificada do látex de *Wrightia tinctoria* (TOMAR *et al.*, 2008).

A falta de inibição da atividade proteolítica de *C. procera* com EDTA e EGTA descarta a presença de metaloproteínases no látex. Apesar de metaloproteínases serem distribuídas largamente nas plantas (SCHALLER, 2004), elas ainda não foram detectadas em fluidos laticíferos.

Anticorpos produzidos em coelho contra papaína não foram capazes de reconhecer proteínas do látex de *C. procera* através de ensaios de imunodifusão dupla de Ouchterlony. A mesma metodologia foi utilizada por diferentes autores para verificar similaridades estruturais entre a papaína e proteínases cisteínicas isoladas de diferentes látices (KUNDU *et al.*, 2000; DUBEY e JAGANNADHAM, 2003; NALLAMSETTY *et al.*, 2003). Nestes trabalhos, os anticorpos produzidos contra as proteínases cisteínicas isoladas não foram capazes de reconhecer a papaína, assim como outras proteínases cisteínicas do mesmo látex, mesmo utilizando métodos imunológicos mais sensíveis como ELISA.

Anticorpos policlonais produzidos contra proceraina não foram capazes de reconhecer a papaína, ervatamina B e ervatamina C em ensaios de imunodifusão dupla de Ouchterlony ou ensaios de ELISA (DUBEY e JAGANNADHAM, 2003). Interessante é o fato que anticorpos policlonais contra ervatamina A, isolada de *E. coronaria*, não foram capazes de reconhecer ervatamina B e ervatamina C isoladas do mesmo látex (NALLAMSETTY *et al.*,

2003). A falta de reconhecimento de anticorpos produzidos contra a ervatamina A para as proteínas ervatamina B, ervatamina C e papaína é muito interessante, pois estas proteínas possuem sequências primárias similares (NALLAMSETTY *et al.*, 2003). Esses resultados mostram que essas proteínas são imunologicamente distintas e possuem poucos determinantes antigênicos em comum, apesar de apresentarem estruturas primárias e tridimensionais similares (NALLAMSETTY *et al.*, 2003; DUBEY *et al.*, 2007).

Embora não detectado halo de precipitação nos ensaios de imunodifusão neste trabalho, ensaios de Dot Blotting revelaram pequeno reconhecimento de anticorpos antipapaína para proteínas do látex e proteínas dos picos PI, PII obtidos após cromatografia em coluna de CM-Sepharose. Nos ensaios de Western Blotting, quando utilizado as proteínas do látex, nenhuma banda apresentou reação cruzada. Contudo, três bandas referentes às massas moleculares de, aproximadamente, 97 kDa no PI, 60 e 45 kDa no PII da CM-Sepharose foram observadas.

Proteinases com bandas referentes a 66-30 kDa foram detectadas por zimograma e os picos PII e PIII da CM-Sepharose mantiveram toda a atividade proteolítica do tipo cisteínica. Logo, uma banda de alta massa molecular no PI ter sido reconhecida por anticorpos antipapaína e essa fração ser ausente de atividade proteolítica pode ser explicado pelo fato que proteinases presentes em fluidos laticíferos são produzidas na forma de zimogênios, sofrendo clivagem proteolítica após o látex ser liberado da planta, e, dessa forma, os anticorpos reconheceram uma proenzima (AZARKAN *et al.*, 2003). Outra explicação seria o fato desta proteína de alta massa molecular e ausente de atividade proteolítica apresentar epítomos antigênicos comuns com a papaína.

Como descrito na introdução, proteinases cisteínicas possuem diversas funções nas plantas, incluindo degradação de proteínas de reserva durante a germinação das sementes, degradação de proteínas defeituosas, senescência e morte celular programada, além de serem importantes na defesa da planta contra patógenos e insetos. Essa grande diversidade de funções das proteinases no desenvolvimento das plantas pode explicar por que existem centenas de genes codificantes para proteases em *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*. Em látex, a função desempenhada pelas múltiplas proteinases ainda é pobremente entendido. Contudo, existem algumas evidências experimentais de que elas podem estar envolvidas com o mecanismo de defesa da planta contra insetos.

5. REFERÊNCIAS

- ABE, M., ABE, K., KURODA, M., ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry.**, 209: 933-937. 1992.
- ABRAHAM, K.I., JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 568: 111–119. 1979.
- ALENCAR, N.M.N., FIGUEIREDO, I.S.T., VALE, M.R., BITENCOURT, F.S., OLIVEIRA J.S., RIBEIRO, R.A., RAMOS M.V. Anti-inflammatory effect of the latex from *Calotropis procera* in three different experimental models: Peritonitis, Paw Edema and Hemorrhagic Cystitis. **Planta Medica.**, 70: 1144-1149. 2004.
- ARIMA, K., UCHIKOBA, T., YONEZAWA, H., SHIMADA, M., KANEDA, M. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. **Phytochemistry.**, 53: 639-644. 2000.
- ARIMURA, G., KOST, C., BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1734: 91–111. 2005.

AZARKAN, M., AMRANI, A., NIJS, M., VANDERMEERS, A., ZERHOUNI, S., SMOLDERS, N., LOOZE, Y. *Carica Papaya* Latex Is A Rich Source Of A Class II Chitinase. **Phytochemistry.**, 46: 1319-1325. 1997.

AZARKAN, M., EL MOUSSAOUI, A., VAN WUYTSWINKEL, D., DEHON, G., LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography B.**, 790: 229-238. 2003.

AZARKAN, M., DIBIANI, R., GOORMAGHTIGH, E., RAUSSENS, V., BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1764: 1063–1072. 2006.

BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A.H.S., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G.E., SANTI, L., VAINSTEINA, M.H., OLIVEIRA, J.T.A., FIUZAE, L.M., PASQUALI, G., CARLINI, C.R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon.**, 50: 971–983. 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry.**, 72: 248-254. 1976.

BUTTLE, D.J., KEMHAVI, A.A., SHARP, S.L., SHUTE, R.E., RICH, D.H., BARRETT, A.J. Affinity purification of the novel cysteine proteinase papaya proteinase IV, and papain from papaya latex. **Biochemical Journal.**, 261: 469-476. 1989.

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon.**, 40: 1515-1539. 2002.

CAVALLI, S.E.V., ARRIBÉRE, M.C., CORTADI, A., CAFFINI, N.O., PRIOLO, N.S. Morrenain bl, a papain-like endopeptidase from the látex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). **Journal of Protein Chemistry.**, 22: 15-21. 2003.

CHENG, Y.C., TSAI, S.W. Carica papaya lipase: An effective biocatalyst for esterification resolution of (RS)-2-(chlorophenoxy)propionic acid. **Biochemical Engineering Journal.**, 35: 318–324. 2007.

CHICHKOVA, N.V., KIM, S.H., TITOVA, E.S., KALKUM, M., MOROZOV, V.S., RUBTSOV, Y.P., KALININA, N.O., TALIANSKY, M.E., VARTAPETIAN, A.B. A Plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. **The Plant Cell.**, 16: 157-171. 2004.

CORNISH, K., CASTILLO N, J., SCOTT, D.J. Substrate-dependent rubber molecular weight regulation, *in vitro*, in plant species that produce high and low molecular weights *in vivo*. **Biomacromolecules.**, 1:632–641. 2000.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry.**, 57: 1123–1134. 2001.

DECKER, G., WANNER, G., ZENK, M.H., LOTTSPEICH, F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-

dimensional gel electroforesis and microsequencing. **Electrophoresis.**, 21, 3500-3516. 2000.

DELLEDONNE, M., ZEIER, J., MAROCCO, A., LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, 1-6. 2001.

DEVARAJ,K.B., GOWDA,L.R., PRAKASH, V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). **Phytochemistry.**, 69: 647–655. 2008

DEWAN, S., SANGRAULA, H., KUMAR, V.L. Preliminary studies on the anagelsic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology.**, 73: 307-311. 2000.

D'SILVA, I., POIRIER, G.G., HEATH, M.C. Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response - A form of programmed cell death. **Experimental Cell Research.**, 245: 389–399. 1998.

DUBEY, V.K., JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry.**, 62: 1057-1071. 2003.

DUBEY, V.K., PANDE, M., SINGH, B.K., JAGANNADHAM, M.V. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology.**, 6 (9): 1077-1086. 2007.

DUSSOURD, D.E. Entrapment of aphids and whiteflies in lettuce latex. **Annals of the Entomological Society of America.**, 88: 163-172. 1995.

DUSSOURD, D.E., DENNO R.E. Deactivation of plant defense: Correspondence between insect behavior and secretory canal architecture. **Ecology.**, 72: 1383-1396. 1991

DUSSOURD, D.E., EISNER, T. Vein-cutting behavior: Insect counterploy to the latex defense of plants. **Science.**, 237, 898-901. 1987

EVERT, R.F. Internal secretory structures. In **Esau's Plant Anatomy** (3rd edn) (Evert, R.F., ed.), John Wiley & Sons, Inc. pp. 473–501. 2006

FARIAS, L.R., COSTA,F.T., SOUZA,L.A., PELEGRINI,P.B., GROSSI-DE-SÁ, M.F., NETO, S.M., BLOCH JR. C., LAUMANN, R.A., NORONHA, E.F., FRANCO, O.L. Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology.**, 87: 255–260. 2007.

FARREL, B. D., DUSSOURD, D.E., MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur pant diversification? **The American Naturalist.**, 138 (4): 881-900. 1991.

FERNANDEZ, J., MOHEDANO, A.F., POLANCO, M.J., MEDINA, M., NUNEZ, M. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. **Journal of Applied Microbiology.**, 81 (1): 27-34. 1996.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry.**, 69: 18–28. 2008.

- GIDROL, S.,X., CHRESTING, H., TAN, A.L., KUSH, A. Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. **The Journal of Biological Chemistry.**, 269:9278-9283. 1994.
- GIORDANI, R., REGLI, P., BUC, J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. **Mycoses.**, 45, 476–481. 2002.
- GOMES, C.E.M., A. BARBOSA, E.A.D., MACEDO, L.L.P., PITANGA, J.C.M., MOURA, F.T., OLIVEIRA, A. S., MOURA, R. M., QUEIROZ, A.F.S., MACEDO, F. P., ANDRADE, L. B.S., VIDAL, M.S., SALES, M.P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry.**, 43: 1095–1102. 2005.
- GOVRIN, E.M., LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*.1: **Current Biology.**, 10(13): 751-757. 2000.
- HAGEL, J.M., YEUNG, E.C., FACCHINI, P.J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Science.**, 13(12): 631-639. 2008.
- JACOB, J.L., PREVOT, J.C., KEKWICK, R.G.O. General metabolism of *Hevea brasiliensis* latex. In: **Physiology of Rubber Tree Latex**. CRC, Boca Raton. pp 145-178. 1989.
- JOHN, K.S., BHAT, S.G., RAO, U.J.S. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. **Phytochemistry.**, 62: 13–19. 2003.

KAMATH, J.V., RANA, A.C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia.**, 73: 111-115. 2002.

KEKWICK, R.G.O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science.** Nature Publishing Group, pp. 1-6. 2001.

KIRTIKAR, K.R., BASU, B.D. **Indian Medicinal Plants.** Lalit Mohan Basu, Allahabad, India. pp 1606. 2006.

KONNO, K., HIRAYAMA, C., NAKAMURA, M., TATEISHI, K., TAMURA, Y., HATTORI, M., KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal.**, 37, 370–378. 2004.

KRUGER, J., THOMAS, C.M., GOLSTEIN, C., DIXON, M.S., SMOKER, M., TANG, S., MULDER, L., JONES, J.D.G. A tomato cysteine proteinase required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. **Science.**, 296: 744-747. 2002.

KUMAR, H.S., BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology.**, 44(2): 123-125. 1994.

KUMAR, H.S., DEWAN, S., SANGRAULA, H., KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology.**, 76: 115-118. 2001.

KUNDU, S., SUNDD, M., JAGANNADHAM, M.V. Purification and characterization of a stable cysteine protease ervatamin B, with two disulfide bridges, from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 48: 171-179. 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature.**, 227: 680-685. 1970.

LARHSINI, M., OUMOULID, L., LAZREK, H.B., WATALEB, C.S., BOUSAID, M., BEKKOUCHE, K., MARKOUK, M., JANA, M. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie.**, 54(6): 763-765. 1999.

LEQUEU, J., FAUCONNIER, M.L., CHAMMAI, A., BRONNER, R., BLEE, E. Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. **The Plant Journal.**, 36: 155-164. 2003.

LEWINSOHN, T.M. The geographical distribution of plant latex. **Chemoecology.**, 2, 64–68. 1991.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512 p. 2002.

LYNN, K.R., CLEVETTE-RADFORD, N.A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry.**, 26: 939-944. 1987.

LYNN, K.R., CLEVETTE-RADFORD, N.A. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry.**, 25(10): 2279-2282. 1986.

MACEDO, M.L., FREIRE, M.D., PARRA JR., A. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 52: 2533-2540. 2004.

- MCCAFFERTY, H. R.K., MOORE, P.H., ZHU, Y.J. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene biologically active lectin with spider mite control activity. **Plant Science.**, 175: 385-393. 2008.
- MEDEIROS, R.B., FERREIRA, M.A.S.V., DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno.** Editora Universidade de Brasília. pp 290. 2003.
- MENON, M., VITHAYATHIL, J.P., RAJU, S.M., RAMADOSS, C.S. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook. **Plant Science.**, 163: 131-139. 2002.
- METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany.**, 21, 115-127. 1967
- MEZHLUMYAN, L.G., KASYMOVA, T.D., YULDASHEV, P.K. Proteinases from *Carica papaya* latex. **Chemistry of Natural Compounds.**, 39: 223-228. 2003.
- MONTIL, R., CONTIERO, J., GOULART, A.J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, 47(5), 747-754. 2004.
- NALLAMSETTY, S., KUNDU, S., JAGANNADHAM, M.V. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease Ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. **Journal of Protein Chemistry.**, 22: 1-13. 2003.
- OBREGÓN, W.D., CURCIARELLO, R., CAFFINI, N.O., PRIOLO, N.S. Hidrolytic Profile and isolation of the Proteolytic Components of Latex from *Araujia*

angustifolia Fruits. **Acta Farmacéutica Bonaerense.**, 25 (2): 206-12.
2006.

ODJAKOVA, M., HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in
Plants. **Bulgarian Journal of Plant Physiology.**, 27(1-2), 101-109.
2001.

OLIVEIRA, J.S., PEREIRA, D.B., FREITAS, C.D.T., MARINHO-FILHO, J.D.B.,
MORAES, M.O., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L.V., RAMOS, M.V. In
vitro cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer
proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro.**, 21: 1563-
1573. 2007.

OLIVEIRA, A.S., XAVIER-FILHO, J., SALES, M.P. Cysteine proteinases and
cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, 46: 91-104.
2003.

OSATO, J.A., SANTIAGO, L.A., REMO, G.M., CUADRA, M.S., MORI, A.
Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya. **Life Science.**,
53: 1383-1389. 1993.

OTTO, H.H., SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors.
Chemical Reviews., 97: 133-171. 1997.

PECHAN, T., YE, L., CHANG, Y., MITRA, A., LIN, L., DAVIS, F.M., WILLIAMS,
W.P., LUTHE, D.S. A unique 33-KD cysteine proteinase accumulates in
response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm
and other Lepidoptera. **The Plant Cell.**, 12: 1031-1040. 2000.

PEREIRA, L. S., GOMES, M. V., FERNANDES, K.V.S., SALES, M.P., XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. **Revista brasileira de Botânica.**, 22(1): 1-8. 1999.

POSCH, A., CHEN, Z., WHEELER, C., DUNN, M.J., RAULF-HEIMSOTH, M., BAUR, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology.**, 99: 385-395. 1996.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., SILVA-XAVIER, A.A., LIMA, M.W., BANDEIRA, G.P., ETCHELLS, J.P., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia.**, 77: 251-256. 2006a.

RAMOS, M.V., BANDEIRA, G.P., FREITAS, C.D.T., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, N.M.N., SOUSA, P.A.S., CARVALHO, A.F.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, 101(5), 503-510. 2006b.

RAMOS, M.V., FREITAS, C.D.T., STANISÇUASKI, F., MACEDO, L.L.P., SALES, M.P., SOUSA, D.P., CARLINI, C.R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *C. procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science.**, 173: 349-357. 2007a.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., MELO, V.M.M., MESQUITA, R.O., SILVESTRE, P.P., OLIVEIRA, J.S., OLIVEIRA, R.S., MACEDO, N.M.R., ALENCAR, N.M.N. Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Journal of Ethnopharmacology.**, 111: 115-122. 2007b.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta.**, 220: 183-197. 2004.

SGARBIERI, V.C., GUPTA, S.M., KRAMER, D.E., WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata*. **Journal of Biological Chemistry.** 239: 2170–2177. 1964.

SHARMA, P., DEVI, J., SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal Ethnopharmacology**, 74: 239-243. 2001.

SILVA, L.G., GARCIA, O., LOPES, M.T.P., SALAS, C.E. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, 30: 615-619. 1997.

SINGH, H., KUMAR, S., DEWAN, S., KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **Journal Pharmacology and Toxicology Methods.**, 43: 219-224. 2000.

SOARES, P.M., LIMA, S.R., MATOS, S.G., ANDRADE, M.M., PATROCÍNIO, M.C.A., FREITAS, C.D.T., RAMOS, M.V., CRIDDLE, D.N., CARDI, B.A., CARVALHO, K.M., ASSREUY, M.A.S., VASCONCELOS, S.M.M. Anti-

nociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Ethnopharmacology.**, 99: 125-129. 2005.

SOYLU, S. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Plant Science.**, 170: 942–952. 2006.

SRITANYARAT, W., PEARCE, G., SIEMS, W.F., RYAN, C.A., WITITSUWANNAKUL R., WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry.**, 67(15): 1644-1650. 2006.

SURI, S.S., RAMAWAT, K.G. In vitro hormonal regulation of laticifer differentiation in *Calotropis procera*. **Annals of Botany.**, 75: 477-480. 1995.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3º Ed. Artmed press, pp 719. 2006.

TEIXEIRA, R.D., RIBEIRO, H.A.L., GOMES, M.T., LOPES, M.T.P., SALAS, C.E. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry.**, 46: 956–96. 2008

TIFFIN, P., MOELLER, D. Molecular evolution of plant immune system genes. **Trends in Genetics.**, 22: 662-670. 2006.

TOMAR, R., KUMAR, R., JAGANNADHAM, M.V. A Stable Serine Protease, Wrightin, from the Latex of the Plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R.

Br.:Purification and Biochemical Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., 56: 1479–1487. 2008.

VAN DER HOORN, R.A.L. Plant Proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**., 59: 191-223. 2008.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**., 103: 753–765. 1997.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Plant Physiology**., 44,135–162. 2006.

WITITSUWANNAKUL, R., RUKSEREE, K., KANOKWIROON, K., WITITSUWANNAKUL, D. A rubber particle protein specific for Hevea latex lectin binding involved in latex coagulation. **Phytochemistry**., 69: 1111–1118. 2008a.

WITITSUWANNAKUL, R., PASITKUL, P., JEWTRAGOON, P., WITITSUWANNAKUL, D. Hevea latex lectin binding protein in C-serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. **Phytochemistry**., 69: 656–662. 2008b.

WITITSUWANNAKUL, R., PASITKUL, P., KANOKWIROON, K., WITITSUWANNAKUL, D. A role for a Hevea latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. **Phytochemistry**., 69: 339–347. 2008c.

WITTSTOCK, U., GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology.**, 1-8. 2002.

XAVIER-FILHO, J., CAMPOS, F., MARIA, A.P., ARY, B., SILVA, C.P., *CARVALHO, M.M.M.* Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, 37: 1139-1143. 1989.

YADAV, S.C., PANDE, M., JAGANNADHAM, M.V. Highly stable glycosylated serine proteinase from the medicinal plant *Euphorbia milli*. **Phytochemistry.**, 67: 1414-1426. 2006.

YU, X.M., YU, X.D., QU, Z.P., HUANG, X.J., GUO, J., HAN, Q.M., ZHAO, J., HUANG, L.L., KANG, Z.S. Cloning of a putative hypersensitive induced reaction gene from wheat infected by stripe rust fungus. **Gene.**, 407: 193–198. 2008.

CAPÍTULO 3

**Purificação e caracterização de
uma osmotina**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais

Vários patógenos como fungos e bactérias podem causar doenças em plantas (MONTESINOS, 2003). Os fungos são amplamente distribuídos na natureza e são patógenos freqüentes de várias espécies de plantas, representando um dos principais fatores responsáveis por perdas na produção de várias cultivares (AGRIOS, 1997; CHANG *et al.*, 2008). Apesar das plantas serem constantemente expostas a diferentes tipos de patógenos, o estabelecimento da doença e, conseqüentemente, a morte da planta pode ser considerado uma exceção. Isso se deve ao fato de que as plantas desenvolveram vários mecanismos de defesa, que são classificados como constitutivos ou induzidos e podem ser de natureza protéica ou não. Algumas proteínas são sintetizadas ou têm suas atividades aumentadas através de interações de incompatibilidade entre plantas e patógenos (van LOON *et al.*, 2006). Estas proteínas são classificadas como PR-proteínas (proteínas relacionadas à patogênese).

O termo PR-proteínas foi originalmente dado a proteínas cujas atividades aumentavam em condições patológicas. Por outro lado, as proteínas relacionadas à defesa presentes na ausência de infecção, ou seja, constitutivas, eram referidas como proteínas similares às PR-proteínas (PR-like ou PRL). Com o passar dos anos, muitos trabalhos mostraram que as proteínas classificadas como PR-proteínas também estavam presentes em

tecidos sadios (sem infecção) e que as PRL eram expressas na presença de patógenos. Atualmente, o termo PR-proteína é mais amplo e refere-se a proteínas que têm suas atividades ou síntese *de novo* aumentada e estão relacionadas com a defesa da planta contra patógenos (van LOON *et al.*, 2006). As PR-proteínas que possuem características bioquímicas e biológicas similares são classificadas em famílias, que são enumeradas pela ordem de descobrimento. Muitas destas proteínas têm atividade antimicrobiana *in vitro* e sua expressão em plantas susceptíveis leva a um maior grau de proteção contra doenças (JAYARA e PUNJA, 2007; SRIDEVI *et al.*, 2008).

Diferentes tipos de proteínas antimicrobianas ou PR-proteínas foram purificadas e caracterizadas, incluindo quitinases, β -1,3-glucanases (ZAREIE *et al.*, 2002; TAIRA *et al.*, 2005), defensinas (WONG *et al.*, 2005), toxinas (VASCONCELOS *et al.*, 2008), peptídeos antimicrobianos (NG, 2004), inibidores de proteinases (HERMOSA *et al.*, 2006), 2S-albuminas (AGIZZIO *et al.*, 2003), peroxidases (CARUSO *et al.*, 2001), ureases (BECKER-RITT *et al.*, 2007), lectinas (FREIRE *et al.*, 2002), proteínas inativadoras de ribossomos (LEAH *et al.*, 1991) e osmotinas (VINCENT *et al.*, 2007).

1.2 Osmotina e suas Funções nas Plantas

As osmotinas são proteínas que possuem estruturas primárias semelhantes à proteína taumatina. Tanto as osmotinas como a taumatina pertencem à família 5 das proteínas relacionadas à patogênese (PR-5). Osmotina foi primeiramente identificada em culturas celulares de plantas de tabaco adaptadas às condições de salinidade (SINGH *et al.*, 1987). Desde

então, osmotinas têm sido caracterizadas em diferentes espécies de plantas em resposta ao estresse osmótico. Onishi e colaboradores (2006) mostraram que a expressão do RNAm de uma osmotina foi induzida em raízes de *Glycine max* na presença de ácido abscísico, escassez de água ou sob altas concentrações salinas (300 mM de NaCl). Recentemente, foi observado que plantas de morangueiro expressando um gene codificante para osmotina de fumo (*Nicotiana tabacum*) foi resistente às altas concentrações de salinidade. Neste estudo, as plantas transgênicas submetidas a tratamento com 200 mM NaCl, por duas semanas, apresentaram melhor crescimento da parte aérea, da raiz e da biomassa quando comparado às plantas selvagens. Essa resistência à salinidade foi conferida pelo aumento no acúmulo de prolina nas células (HUSAINI e ABDIN, 2008). O acúmulo de prolina é citado como um mecanismo de proteção da planta, pois esse aminoácido pode funcionar como um reservatório de energia e nitrogênio (CHANDRASHEKAR e SANDHYARANI, 1996); pode contribuir para o ajuste osmótico na célula (PEREZ-ALFOCEA *et al.*, 1993), e pode proteger proteínas estabilizando suas estruturas, atuando como chaperonas (SAMUEL *et al.*, 2000). Além destas funções, foi mostrado que a prolina pode proteger a planta contra espécies reativas de oxigênio (ALIA *et al.*, 1997).

Além deste papel na defesa da planta contra estresse hídrico ou salino, as osmotinas também foram referidas como proteínas crioprotetoras, ou seja, elas conferem proteção a baixas temperaturas, como demonstrado para a osmotina de 25 kDa purificada do caule de *Solanum dulcamara* (NEWTON e DUMAN, 2000). Neste trabalho, os autores mostraram que protoplastos de *Brassica oleracea* tratados com a osmotina de *S. dulcamara* tiveram uma razão

de sobrevivência 24% maior que plantas não tratadas ou tratadas com BSA. Um aumento na expressão do gene para osmotina foi observado quando plantas da espécie *S. commersonii* foram submetidas ao congelamento ou condições de baixo potencial hídrico (ZHU *et al.*, 1993,1995). Em outro trabalho, Hong e colaboradores (2004) mostraram que a expressão de um gene para osmotina foi ativado em folhas de pimenteiro, quando as plantas foram submetidas ao frio (4 °C). Além disto, este gene foi expresso em condições de alta salinidade (200 mM de NaCl por 18 h), após tratamento com etileno, jasmonato ou quando foram submetidas ao dano mecânico.

Além de desempenharem funções de ajuste osmótico ou de crioproteção, as osmotinas são bastante conhecidas como proteínas relacionadas com a defesa da planta contra a infecção. Foi descrito que a osmotina de tabaco causa lise de esporos e inibição de crescimento de *Phytophthora infestans* (ABAD *et al.*, 1996). Outros trabalhos demonstram atividade similar sobre outros fungos (CHU e NG, 2003; HO *et al.*, 2007). Além disso, há relatos que a superexpressão desta proteína em plantas susceptíveis confere resistência a patógenos (HONG *et al.*, 2004; RAJAM *et al.*, 2007).

1.3 Mecanismos de Ação das Osmotinas contra Fungos

O mecanismo de ação das osmotinas sobre fungos é pouco compreendido. Contudo, alguns trabalhos mostraram que esta classe de proteínas age sobre a membrana plasmática, destruindo-a. Isso foi observado para osmotina purificada de milho (zeamatina) e de tabaco que causaram rápida liberação do conteúdo citoplasmático dos fungos *Neurospora crassa* e

Candida albicans (ABAD *et al.*, 1996; KOIWA *et al.*, 1997). Apesar desta observação, estudos de estrutura tridimensional da zeamatina e da osmotina de tabaco não revelaram nenhum domínio formador de poros (BATALIA *et al.*, 1996; KOIWA *et al.*, 1999).

Outros trabalhos mostraram que as osmotinas podem interagir com proteínas específicas de membrana plasmática de fungos e, através de transdução de sinais, levar à morte celular programada por induzir acúmulo de espécies reativas de oxigênio (NARASIMHAN *et al.*, 2001; 2005).

Alguns trabalhos também mostram que as osmotinas podem se ligar a β -1,3-glucanos (OSMOND *et al.*, 2001) e hidrolisá-los (GRENIER *et al.*, 1999; LAURENCE *et al.*, 2003). Essas observações indicam que os componentes presentes na parede celular dos fungos podem ser também alvos das osmotinas.

1.4 Características Estruturais das Osmotinas

As osmotinas possuem alta similaridade de seqüência de aminoácidos com a proteína de sabor adocicado taumatina, que foi primeiramente purificada da planta *Thaumatococcus danielli* (VANDER e LOEVE, 1972). Apesar da grande similaridade estrutural entre as osmotinas e a taumatina, as primeiras não possuem sabor adocicado e a última não exibe atividade antifúngica (VANDER e LOEVE, 1972; YE *et al.*, 1999).

As osmotinas são caracterizadas como resistentes à proteólise e à desnaturação sobre diferentes valores de pHs e temperaturas. Essa característica é possivelmente conferida pela presença de 16 resíduos de

cisteína envolvidos na formação de 8 pontes dissulfeto (VELAZHAHAN *et al.*, 1999).

As proteínas pertencentes à classe PR-5 possuem estruturas primárias, secundárias e terciárias bastante conservadas na natureza (REISS *et al.*, 2006). A estrutura tridimensional das osmotinas é composta principalmente por três domínios (Figura 1). O domínio I forma a estrutura principal destas proteínas. Ele é composto por 11 folhas beta formando uma estrutura similar a um sanduíche onde seis folhas betas antiparalelas interagem com outras cinco folhas betas. Este domínio é estabilizado por três pontes dissulfeto. O domínio II é constituído basicamente por uma α -hélice estabilizado por três pontes dissulfeto. O domínio III é compreendido por um longo *loop* e uma folha beta antiparalela, sendo estabilizado por duas pontes dissulfeto (GHOSH e CHAKRABARTI, 2008).

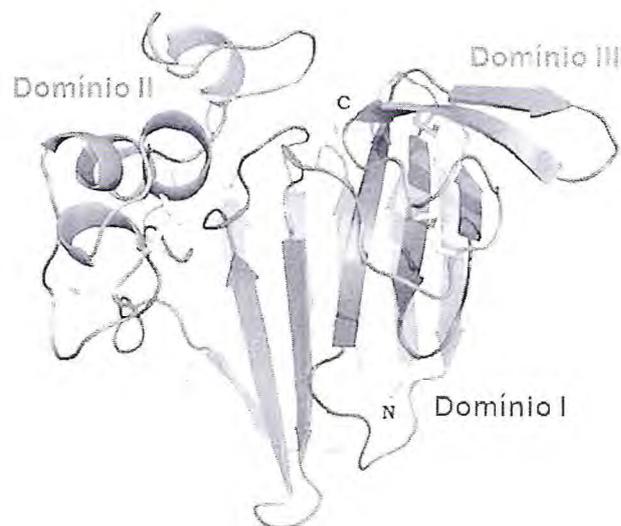


Figura 1: Estrutura tridimensional de uma osmotina ou “taumatin-like protein” de tomate (GHOSH e CHAKRABARTI, 2008). Em amarelo estão representadas as pontes dissulfeto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram obtidos da DIFCO e Himedia, respectivamente. Papaína (EC 3.4.22.2) do látex de *Carica papaya*, tripsina (EC 3.4.21.4) e quimotripsina (EC 3.4.21.1) pancreática bovina, proteases de *Streptomyces griseus* (pronase), inibidor de proteinases cisteínicas (E-64), azocaseína, membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF), calceína e todos os reagentes para eletroforese foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. Todas as amostras utilizadas nos ensaios antifúngicos foram esterilizadas utilizando filtros para seringa de 0,22 µm da Millipore.

As colunas de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow e RESOURCE-S, ácido sinapínico (matriz) e ditioneitol (DTT) foram obtidos da GE HealthCare, Brasil.

Os fosfolípidos palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (POPG), 1,2-diiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida (DSPE) foram obtidos da Avanti Polar Lipids.

Os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 Fungos

Os fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*, foram obtidos da micoteca mantida pelos Laboratórios de Proteínas Vegetais de Defesa e de Toxinas Vegetais, ambos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

2.3 Cultivo dos Fungos

O cultivo dos fungos foi realizado em placas de Petri (100 x 15 mm), contendo 25 ml do meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril. As placas inoculadas foram mantidas em câmara de germinação do tipo B.O.D. a 27 ± 2 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 h (claro/escuro). Os fungos foram renovados mensalmente através da transferência de *pellets* de uma placa contendo os fungos para outra placa contendo apenas meio de cultura SDA. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os meios de cultura foram constituídos de 65 g de SDA dissolvido em 1 litro de água destilada e autoclavados por 20 minutos, a 120 °C, 1,5 kgf.

2.4 Obtenção da Suspensão de Esporos

A obtenção das suspensões de esporos foi realizada segundo Melo e colaboradores (1997), com algumas modificações. Os esporos foram coletados a partir da adição de 10 ml de água destilada estéril nos meios de culturas

contendo os respectivos fungos. Movimentos suaves na superfície do micélio foram realizados com o auxílio de uma alça de Drigalski (previamente flambada) para a liberação dos esporos. Para a retirada das hifas remanescentes, as suspensões obtidas foram filtradas em dois panos de nylon de malhas finas estéreis. O filtrado resultante foi denominado de suspensão padrão de esporos. Para a realização dos ensaios de inibição de crescimento e da germinação de esporos, as suspensões contendo os esporos foram ajustadas para uma concentração de 2×10^5 esporos/ml. Os esporos foram contados com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60).

2.5 Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico em Meio Líquido e Determinação da IC₅₀

Os ensaios de inibição do crescimento foram realizados conforme a metodologia descrita por Broekaert e colaboradores (1990), com algumas adaptações. Os ensaios foram desenvolvidos em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato (estéreis) de 96 poços. Cada poço continha 10 µl de uma suspensão de esporos (2×10^5 esporos/ml) e 90 µl de meio YPD ("Yeast Peptone Dextrose"). Após 16 h na ausência de luz, a 27 °C, 100 µl das amostras foram adicionados. Os controles negativos e positivos para inibição do crescimento foram o tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, e o peróxido de hidrogênio 100 mM, respectivamente. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm. O crescimento fúngico foi monitorado através de leituras de absorbância a 620 nm, em intervalos de 12 ou 24 horas, até um total

de 48 ou 72 horas, em leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences).

A avaliação do potencial antifúngico das amostras foi feita através da análise dos gráficos das curvas de crescimento dos fungos, quando comparadas àquelas dos controles. As concentrações protéicas capazes de reduzir em 50 % o crescimento fúngico do controle (acetato de sódio 50 mM, pH 5,0), após 48 h de ensaio, foram representadas como IC₅₀. Os valores foram representados em micrograma de proteína por mililitro, a partir de três ensaios realizados independentemente.

2.6 Ensaio de Inibição da Germinação de Esporos

Os ensaios de inibição da germinação de esporos foram realizados seguindo a metodologia descrita por Ji e Kúc (1996), com algumas modificações, sendo adaptadas para placas de polietileno reticuladas. Aliquotas de 10 µl das suspensões de esporos (2×10^5 esporos/ml) foram incubadas com 10 µl das amostras em diferentes concentrações ou com os controles (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 ou peróxido de hidrogênio 100 mM). As placas foram mantidas em recipientes contendo papel de filtro embebido de água destilada, na ausência de luz, a 27 °C. Após 24 h, os resultados foram visualizados em microscópio óptico (Olimpus System Microscope BX 60) e fotografados com câmera digital. Os esporos foram considerados germinados quando apresentaram tubo germinativo correspondente a duas vezes o tamanho dos esporos.

2.7 Ensaio de Inibição do Crescimento em Meio Sólido

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Wang e Ng (2007), com algumas modificações, onde *pellets* dos fungos foram colocados no centro das placas de Petri contendo 25 ml de meio SDA. Com auxílio de ponteiros de 1 ml foram feitos poços radiais no meio de cultura a uma distância de 1 cm da colônia micelial. Alíquotas de 50 µl das amostras foram colocadas nos furos. As placas de Petri foram incubadas a 27 °C por, aproximadamente, 72 h com fotoperíodo de 12 h (claro/escuro), até o crescimento micelial envolver o poço contendo o controle negativo (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0). Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril.

2.8 Envolvimento de Proteínas na Atividade Antifúngica

Para avaliar o envolvimento de proteínas na atividade antifúngica encontrada, a fração proteínas do látex foi fervida durante 30 min ou digerida com enzimas proteolíticas.

As proteínas do látex (150 mg dissolvidos em 50 ml de água destilada) foram incubadas em banho Maria por 30 min a 98 °C. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 min a 25 °C e o sobrenadante resultante foi liofilizado e denominado de PL-98°C.

Paralelamente, as proteínas do látex foram submetidas à digestão utilizando uma mistura de proteases de *Streptomyces griseus* (Pronase), que clivam inespecificamente as ligações peptídicas. Para tanto, as proteínas do látex (200 mg) foram dissolvidas em 20 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e

incubadas com 2 mg da pronase dissolvida em 1 ml do mesmo tampão. Após 24 h de incubação a 37 °C, em banho Maria, o material resultante foi dialisado e liofilizado. Um controle contendo apenas as proteínas do látex foi feito e submetido às mesmas condições de digestão sem pronase (24 h a 37 °C). As amostras foram dialisadas, liofilizadas e avaliadas em eletroforese em gel de poliacrilamida. A amostra submetida à digestão com pronase foi denominada de LP+Pronase.

2.9 Envolvimento das Proteinases Cisteínicas na Atividade Antifúngica

Para examinar os efeitos de proteinases cisteínicas na atividade antifúngica encontrada, o látex foi coletado em água contendo E-64 0,18 mM.

Após coleta do látex, a suspensão foi centrifugada a 5.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi exaustivamente dialisado contra água destilada durante três dias, a 4 °C, e, novamente, centrifugado, nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante resultante foi denominado LP+E-64.

Azocaseína foi utilizada como substrato não específico para investigar a atividade proteolítica total presente na fração inibida com E-64. A reação consistiu de 50 µl (1 mg/ml) das amostras (pré-incubadas com 40 µl de DTT 3 mM por 10 min a 37 °C) e 200 µl de azocaseína 1%, sendo o volume ajustado para 500 µl com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após 60 min a 37 °C, a reação foi parada com adição de 300 µl de TCA 10%. A metodologia foi realizada como descrito no capítulo I desta tese.

2.10 Atividade Antifúngica de Proteinases Purificadas

Papaína, tripsina e quimotripsina comerciais foram utilizadas para avaliar a participação de proteinases na ação antifúngica encontrada no látex de *C. procera*. As enzimas foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (papaína) ou em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tripsina e quimotripsina) e utilizadas nas concentrações de 0,5 mg/ml. Ensaios de inibição da germinação e do crescimento foram realizados como descritos anteriormente.

2.11 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose Fast Flow

Cromatografias de troca iônica foram realizadas com o objetivo de fracionar as proteínas presentes no látex para posterior purificação da(s) proteína(s) com atividade(s) antifúngica(s). Cromatografias realizadas como descrito no Capítulo 1.

2.12 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de Resource-S

O pico PII-CM-Sepharose foi escolhido para posteriores passos de purificação, pois esta fração foi a única que apresentou atividade antifúngica para os três fungos testados (*F. solani*, *Neurospora sp.* e *C. gloeosporioides*). Cromatografias de troca iônica em coluna Resource-S, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 ou 50 mM, pH 6,0 foram realizadas em um sistema de HPLC. O pico PII-CM-Sepharose (50 mg) foi dissolvido em 10 ml de

tampão de equilíbrio da coluna, centrifugado a 20.000 x g a 4 °C por 20 min e filtrado em filtros de 0,22 µm. As proteínas foram eluídas utilizando um gradiente de 0-1 M de NaCl por 60 min a um fluxo de 1 ml/min. Os tubos referentes a cada pico foram reunidos, dialisados contra água destilada, liofilizados e utilizados nos ensaios antifúngicos.

2.13 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas para visualizar o grau de pureza dos picos das cromatografias. As eletroforeses foram realizadas de acordo com Laemmli (1976), com algumas modificações.

2.14 Detecção de Carboidratos na Proteína Purificada

A presença de carboidratos na proteína purificada foi avaliada utilizando o método de Masuko e colaboradores (2005). A reação consistiu de 50 µl da amostra (2 mg/ml), 150 µl de ácido sulfúrico concentrado e 30 µl de fenol 5%, seguindo rigorosamente esta ordem. A reação foi realizada em placas de plástico de fundo chato de 96 poços. As leituras foram realizadas em um leitor de ELISA (Biotrak II Plate Reader, Amersham Biosciences) a 490 nm. Glicose foi utilizada para construção da curva padrão.

2.15 Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH₂-Terminal

A seqüência de aminoácidos NH₂-Terminal da proteína purificada foi determinada através da degradação de Edman utilizando um seqüenciador

automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-213A). A seqüência foi obtida através da amostra em solução ou através da transferência da mesma para membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF). Nesse caso, a amostra separada por eletroforese foi eletrotransferida, através de um sistema "Semi-dry Transfer Unit" (Amersham Biosciences), para uma membrana de PVDF. A eletrotransferência foi conduzida a 100 mA por 1 h a 25 °C. Ao término, a membrana foi corada com uma solução Ponceau S, seguida por lavagem com água grau Milli-Q para retirada do excesso do corante e visualização das bandas protéicas. A banda contendo a proteína foi recortada da membrana e submetida ao seqüenciamento. A seqüência obtida foi submetida ao banco de dados NCBI, utilizando o programa proteinBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.16 Espectrometria de Massas

O grau de pureza e a massa molecular da proteína purificada foram avaliados a partir do espectro de massas da mesma em espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF. A amostra foi cristalizada utilizando ácido sinapínico como matriz, dissolvida em uma solução de ácido trifluoracético 0,1%. O espectrômetro de massas utilizado foi ABI 4700 TOF (Applied Biosystems).

2.17 Eletroforese Bidimensional, Revelação e Análise da Imagem

A proteína purificada (30 µg) foi dissolvida em 200 µl de solução de hidratação [uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, CHAPS 1 % (p/v), IPG buffer 2 % (v/v) e azul de bromofenol 0,002% (p/v)]. As tiras de IPG utilizadas foram de 11 cm e faixas de pH de 3-10. A focalização isoelétrica foi realizada no equipamento Ettan™ IPGPhor II™ (GE-Healthcare) como indicado pelo fabricante. A primeira e a segunda dimensões foram realizadas como descritas no capítulo II desta tese. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R 250 ou com uma solução de Schiff para detecção de glicoproteínas, como descrito anteriormente.

2.18 Dicroísmo Circular

Os ensaios de dicroísmo circular foram realizados para avaliar a composição de estruturas secundárias da proteína purificada. Os ensaios foram realizados em um espectropolarímetro (Jasco, modelo J-815), no intervalo de 190-250 nm, sob N₂ constante, utilizando 8 ciclos de medidas para cada amostra a 25 °C. As medidas foram realizadas com a proteína na concentração de 0,25 mg/ml e em diferentes tampões (glicina 25 mM, pH 3,0; acetato de sódio 25 mM, pH 5,0; e Tris-HCl 25 mM, pH 7 e 9). Foram utilizadas cubetas de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. A análise dos dados foi realizada usando os programas Selcon3, CDSSTR e Continll, como descrito por Sreerama e Woody (2000).

A estabilidade térmica da proteína purificada foi avaliada por dicroísmo circular. Para tanto, a proteína purificada foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 (0,25 mg/ml), e submetida, por 10 min, a diferentes temperaturas, que variaram de 25 a 95 °C, com intervalos de 5 °C.

2.19 Espectro de Fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados utilizando cubetas de quartzo de 0,5 ml com 1 cm de caminho óptico utilizando o fluorímetro ISSK₂. A proteína (0,125 mg/ml) foi excitada a 280 nm ou a 295 nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 a 440 nm.

2.20 Avaliação da Interação da Proteína Purificada com Lipossomos

A interação da proteína purificada sobre modelos de membranas foi avaliada utilizando lipossomos constituídos de palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-1-glicerol (POPG), 1,2-diiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida (DSPE). Primeiramente, os fosfolipídeos foram dissolvidos em solução de clorofórmio:metanol (4:1) e deixados secar sob atmosfera de N₂ para formação dos biofilmes.

Após formação dos biofilmes, os lipossomos foram suspensos em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, para uma concentração de 1 mM. A proteína purificada foi adicionada à suspensão de lipossomos a uma concentração final de 0,25 mg/ml em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. Após 30 min a 25 °C, a

interação da proteína com as vesículas foi avaliada por dicroísmo circular como descrito anteriormente.

2.21 Efeitos sobre a Permeabilidade de Lipossomos

O possível efeito da proteína purificada sobre a permeabilidade de membranas foi avaliado sobre lipossomos constituídos de POPG, pois foi o único em que a proteína interagiu.

Após formação dos biofilmes de POPG, estes foram suspensos em Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, contendo o fluoróforo calceína na concentração de 35 mM. Os lipossomos multilamelares foram submetidos a 10 ciclos de congelamento-descongelamento em N₂ líquido e banho-Maria, a 50 °C, respectivamente. Logo após, os lipossomos foram submetidos à sonicação por 4 ciclos de 15 segundos, com intervalos de 10 segundos, para obtenção de lipossomos unilamelares. A sonda fluorescente foi separada dos lipossomos por cromatografia em coluna de Sephadex G-50 (2 x 30 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,4. A quantidade de fosfolipídios dos lipossomos foi determinada através de ensaio colorimétrico como descrito por McClare (1971).

A capacidade da proteína em permeabilizar os lipossomos de POPG foi realizada medindo a fluorescência da calceína liberada no meio extravesicular (Sa et al., 2004). A fluorescência foi acompanhada através de excitação no comprimento de onda de 492 nm e detecção a 514 nm a 25 °C, em fluorímetro ISSK₂.

2.22 Ensaio de Permeabilidade de Membrana de Esporos utilizando Iodeto de Propídeo

O fluoróforo iodeto de propídeo foi utilizado para determinar a integridade das membranas dos esporos de *F. solani*. O ensaio foi realizado como descrito no item 2.6, com a diferença que foi adicionado iodeto de propídeo a uma concentração final de 1 mM. Após 30 minutos a 37 °C, a capacidade da proteína purificada em destruir a membrana dos esporos foi visualizada em microscópio óptico utilizando filtro de fluorescência (“Olimpus System Microscope BX 60”). Foram considerados esporos permeabilizados aqueles onde os núcleos fluoresceram quando comparados com o controle negativo (tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0).

2.23 Avaliação sobre a Lise de Hemácias

O potencial hemolítico da proteína purificada foi avaliado utilizando hemácias de coelho. A suspensão de hemácias 2% em NaCl 0,9% foi incubada por 48 h com as seguintes amostras: proteínas do látex (10 mg/ml), PII-CM Sepharose (5 mg/ml) e a proteína purificada (0,6 mg/ml). Cloreto de sódio 0,15% foi utilizado como controle negativo e água destilada como controle positivo da hemólise. Após 48 h a 25 °C, a hemólise foi avaliada a olho nu. Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em forma de U.

3. RESULTADOS

O potencial antifúngico das proteínas do látex (PL) foi testado sobre os fungos *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Na concentração de 2,5 mg/ml de PL, o crescimento dos três fungos foi totalmente inibido, similar ao peróxido de hidrogênio na concentração de 100 mM (Figura 2). Os valores de IC₅₀ para *F. solani*, *Neurospora sp* e *C. gloeosporioides* foram $134,5 \pm 8,1$, $549,9 \pm 14,3$ e $455,0 \pm 9,3$ µgProteína/ml, respectivamente. Essas concentrações são muitas vezes menores que o teor de proteínas encontrado naturalmente no látex de *C. procera* (18,59 mg/ml). As proteínas do látex (2,5 mg/ml) também inibiram em 100% a germinação dos esporos dos três fungos estudados (Figura 3).

Para avaliar o envolvimento de proteínas na atividade antifúngica, a fração proteínas do látex (PL) foi fervida durante 30 min (PL-98°C) ou tratada com uma mistura de proteases inespecíficas (PL+Pronase). Tanto nos ensaios de inibição de crescimento como nos de germinação, as proteínas do látex fervidas ou tratadas com pronase perderam a atividade antifúngica (Figura 2 e 3). Estes resultados suportam a hipótese do envolvimento de proteínas nesta atividade biológica.

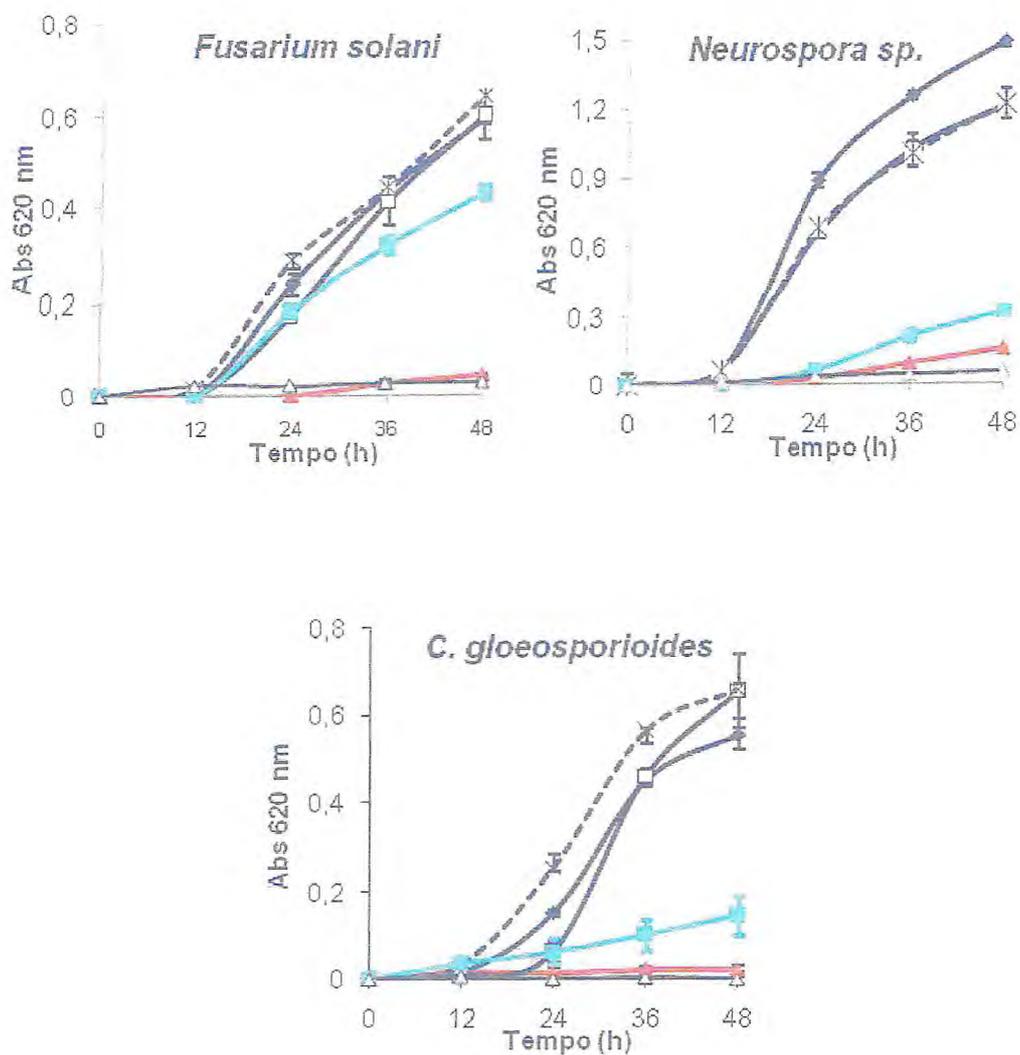


Figura 2: Efeito inibitório das proteínas do látex de *Calotropis procera* sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos. (▲) Proteínas do Látex (PL); (■) PL+E-64; (×) PL+Pronase; (□) LP-98°C; (◆) Controle (tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0); (Δ) Peróxido de Hidrogênio (100 mM).

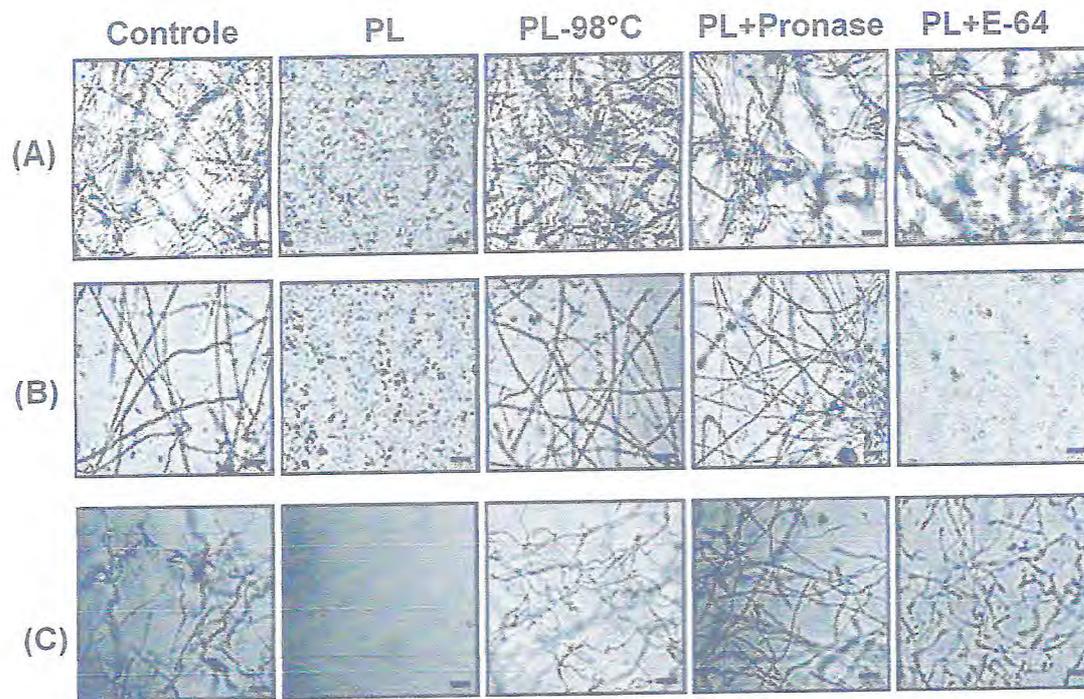


Figura 3: Inibição da germinação de esporos de *F. solani* (A), *Neurospora sp.* (B) e *C. gloeosporioides* (C). Ensaio realizado na concentração de 2,5 mg/ml, em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Fotografias tiradas após 24 h de ensaio a 27 °C. Barras, 40 µm. Legenda: PL, Proteínas do látex de *C. procera*; PL-98°C, Proteínas do látex fervidas por 30 min; PL+E-64, Proteínas do látex inibidas com E-64.

Fluidos laticíferos são conhecidos pela presença de grande quantidade de proteinases cisteínicas e o látex de *C. procera* não é diferente. No capítulo II, foi mostrado que o látex desta planta apresenta forte atividade proteolítica do tipo cisteínica. Para estudar o envolvimento destas proteínas na atividade antifúngica, o látex de *C. procera* foi coletado na presença de um inibidor específico para proteinases cisteínicas (PL+E-64).

Como mostrado nas figuras 2 e 3, é evidente o envolvimento de proteinases cisteínicas sobre a inibição do crescimento e da germinação de esporos de *F. solani*, já que a fração PL tratada com E-64 não apresentou atividade contra este fungo e foi ausente de atividade proteolítica. Interessante notar que a amostra PL+E-64 foi antifúngica contra *Neurospora sp.*, inibindo tanto o crescimento como a germinação dos esporos (Figuras 2 e 3). Quando a amostra PL+E-64 foi testada sobre o fungo *C. gloeosporioides*, houve perda parcial de atividade antifúngica (Figura 2 e 3). Esse conjunto de resultados mostra que, além de proteinases cisteínicas, o látex de *C. procera* possui outras proteínas que participam do arsenal de defesa da planta.

Para evidenciar o papel de defesa de proteinases cisteínicas contra fungos fitopatogênicos e mostrar a especificidade destas enzimas, foram realizados novos ensaios utilizando três proteinases purificadas (Figuras 4 e 5). Papaína, uma proteinase cisteínica de *Carica papaya*, tripsina e quimotripsina, duas proteinases serínicas, foram testadas nas concentrações de 0,5 mg/ml sobre os fungos *F. solani*, *Neurospora sp.* e *C. gloeosporioides* (Figuras 4 e 5).

A papaína foi capaz de inibir parcialmente o crescimento dos fungos *F. solani* e *C. gloeosporioides*, e não apresentou nenhum efeito sobre o

Neurospora sp. Tripsina e quimotripsina não inibiram o crescimento dos três fungos testados (Figura 4).

Em paralelo, ensaios de inibição de germinação foram realizados com as três proteinases purificadas. A figura 5 mostra que a papaína foi capaz de inibir totalmente a germinação dos esporos de *F. solani* e parcialmente os esporos de *C. gloeosporioides*, enquanto não foi ativa sobre os esporos de *Neurospora sp.* A tripsina e quimotripsina não inibiram a germinação dos esporos dos três fungos testados. Os resultados obtidos com estas duas proteinases serínicas foram similares aos obtidos com a BSA e com os controles contendo apenas tampão. Esses resultados reforçam a idéia do envolvimento de proteinases cisteínicas de látex na defesa da planta contra fungos.

A tabela 1 mostra a atividade proteolítica específica da fração PL do látex de *C. procera*, papaína, tripsina e quimotripsina. Os resultados mostram que a papaína apresenta atividade proteolítica específica menor que a da tripsina, quimotripsina e da fração PL do látex de *C. procera*.

Os resultados de atividade proteolítica somados aos de inibição de crescimento e de germinação de esporos sugerem que o mecanismo de ação de proteinases cisteínicas sobre os fungos testados pode ser específico, pois a tripsina e quimotripsina não apresentaram nenhum efeito sobre *F. solani*, *C. gloeosporioides* e *Neurospora sp.*, mesmo apresentando atividades proteolíticas específicas maiores que a papaína. A atividade antifúngica parcial da papaína pode estar relacionada à baixa concentração utilizada nos ensaios.

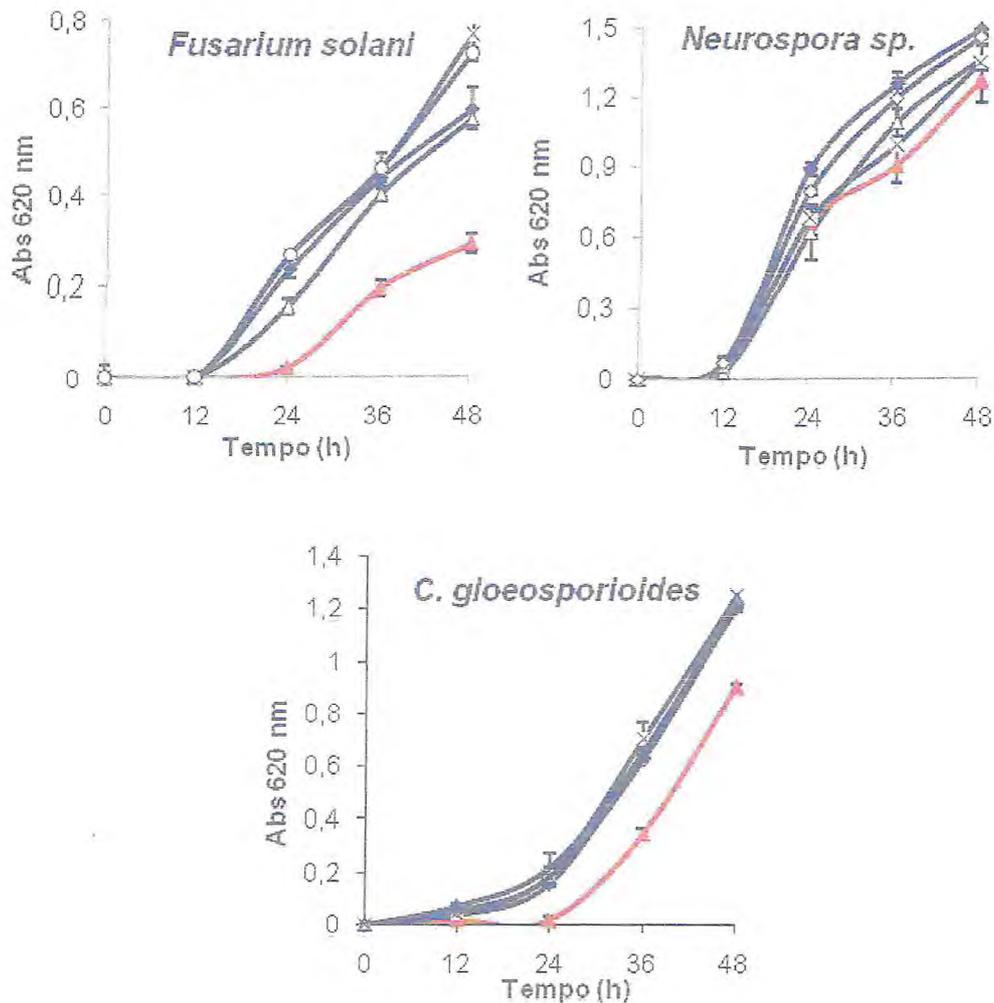


Figura 4: Efeito inibitório de diferentes proteases purificadas sobre o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos. (x) Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 ou tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; (Δ) Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; (▲) **Papaína**; (o) Tripsina; (♦) Quimotripsina. Ensaio realizado nas concentrações de 0,5 mg/ml.

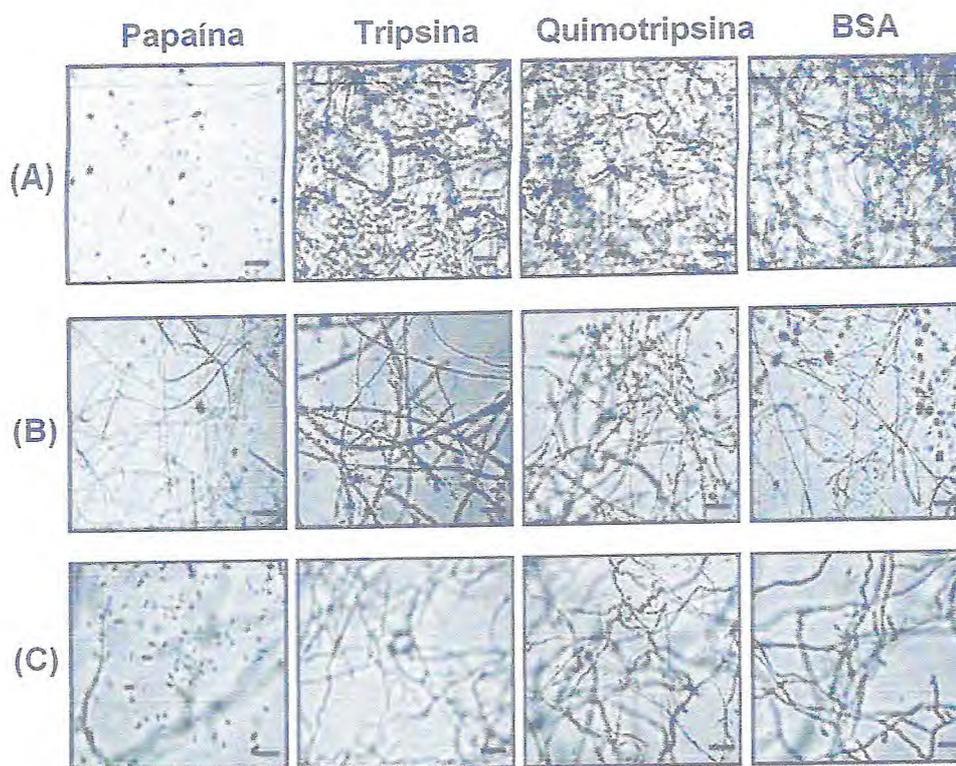


Figura 5: Ensaio de inibição da germinação utilizando esporos de *F. solani* (A), *Neurospora sp* (B) e *C. gloeosporioides* (C). Ensaio realizado nas concentrações de 0,5 mg/ml, em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (papaina e BSA) ou tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tripsina e quimotripsina). Fotos tiradas após 24 h de ensaio. Barras, 40 μ m.

Tabela 1: Atividade proteolítica da fração PL do látex de *C. procera*, papaína, tripsina, quimotripsina e dos picos obtidos da cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose

Amostras	Atividade Proteolítica (UA/μgProteína)	Atividade Proteolítica na presença de E-64 (UA/μgProteína)
PL (<i>C. procera</i>)**	2,71 ± 0,09	0
Papaína	1,54 ± 0,09	0
Tripsina	6,02 ± 0,21	-
Quimotripsina	2,56 ± 0,54	-
PI-CM	ND	-
PII-CM	1,56 ± 0,12	0
PIII-CM	2,27 ± 0,35	0

*Valores são media de três repetições com os respectivos desvios padrões. Ensaio realizado sobre azocaseína 1% a 37 °C em acetato de sódio 50 mM pH 5,0 (*Calotropis procera* e os picos PI, PII e PIII), tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (Papaína) ou em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (tripsina e quimotripsina). ND=Não detectado.** Látex coletado na presença de E-64 0,2 mM.

Ficou evidente nos ensaios anteriores que diferentes proteínas na fração PL estão envolvidas na atividade antifúngica. Com o objetivo de purificar a(s) proteína(s) envolvida(s) nesta atividade, a fração PL foi, primeiramente, fracionada em uma coluna de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow, onde foram obtidos três picos (Figura 6a). Nenhum pico foi obtido após eluição com NaCl 1 M.

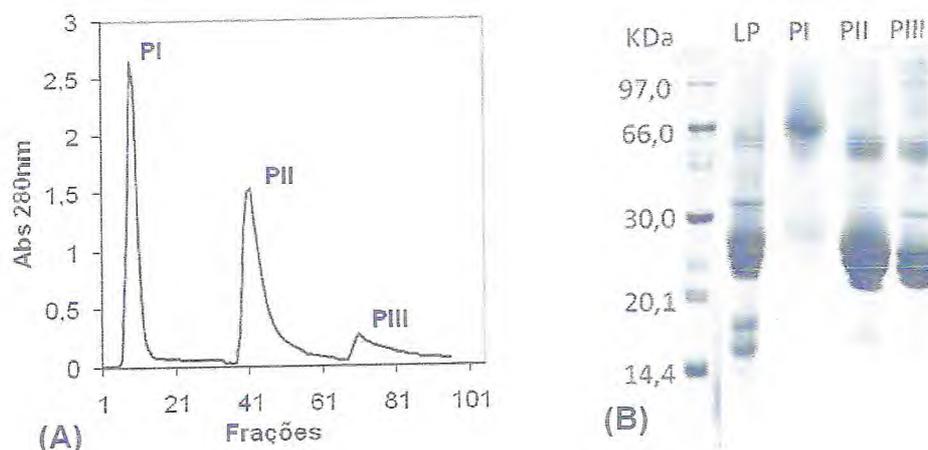


Figura 6: (A) Cromatografia de Troca Iônica da fração PL de *C. procerca* em coluna de CM-Sepharose Fast Flow, equilibrada em tampão acetato 50 mM pH 5,0. Fluxo 0,5 ml/min. Frações de 3 ml. Os picos foram eluídos com tampão de equilíbrio (PI) mais NaCl 0,2 M (PII) ou NaCl 0,3 M (PIII). (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas após cromatografia de troca iônica. Foram aplicados 30 µg de proteína por poço. Gel corado com "Coomassie Brilliant Blue" R-250.

A eletroforese mostra que o pico não retido (PI) foi constituído principalmente por uma proteína com massa molecular aparente de 66 kDa e algumas proteínas com massas moleculares em torno de 25 kDa. Os dois picos retidos (PII e PIII) apresentaram proteínas com perfis eletroforéticos semelhantes, com massas moleculares variando de 97 kDa a 20 kDa (Figura 6b).

Quando as frações cromatográficas foram avaliadas em ensaios de inibição da germinação de esporos de *F. solani*, *Neurospora sp.* e *C. gloeosporioides*, foi observado que o PI não apresentou atividade antifúngica, enquanto o PII foi ativo contra os três fungos testados (Figura 7). O PIII mostrou-se ativo apenas contra o fungo *Neurospora sp.* PII e PIII apresentam atividade proteolítica do tipo cisteínica (Tabela 1), enquanto PI não, evidenciando o envolvimento de proteinases cisteínicas na atividade antifúngica promovida pela fração protéica do látex.

Como o pico PII-CM mostrou-se ativo contra os três fungos testados, ele foi escolhido para posterior fracionamento em coluna de troca iônica (Resource-S) acoplada em um sistema de HPLC, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (Figura 8a). Foram obtidos seis picos, dos quais, dois não retidos (P1 e P2) e quatro retidos (P3, P4, P5 e P6), eluídos em gradiente de cloreto de sódio (0-0,4 M). O perfil eletroforético dos picos obtidos mostra que no P2 predomina uma proteína com massa molecular de, aproximadamente, 20,1 kDa (Figura 8a'). Com o objetivo de melhorar a resolução do P2, a concentração do tampão foi diminuída para 25 mM e novas cromatografias foram realizadas nas mesmas condições de fluxo e gradiente.

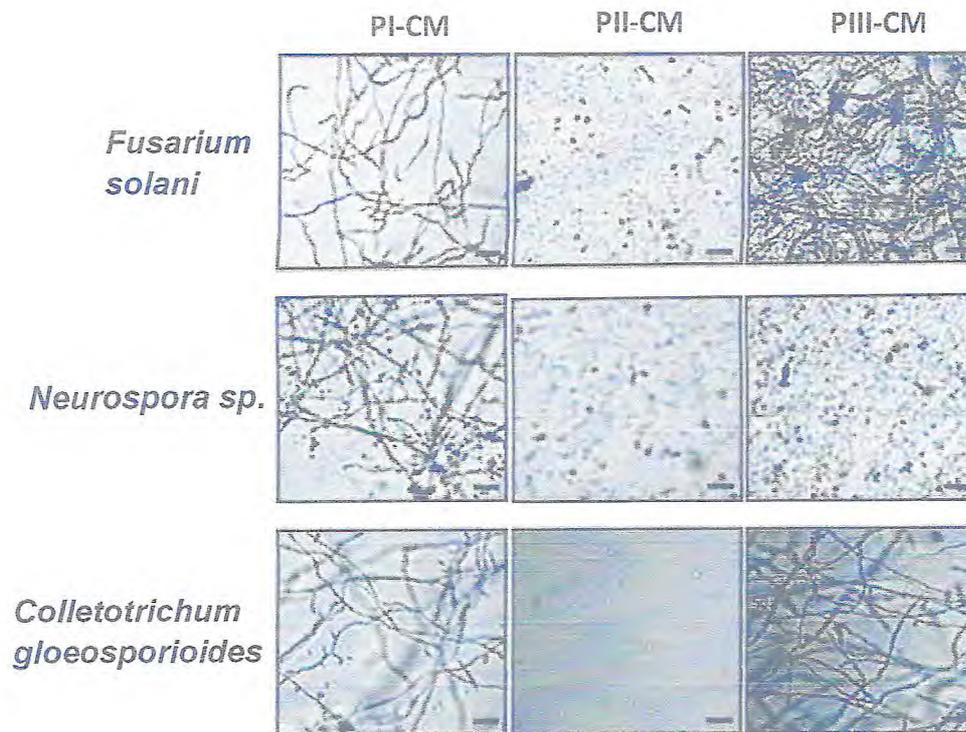


Figura 7: Ensaio de inibição da germinação de esporos de diferentes fungos fitopatogênicos utilizando as frações obtidas após cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose Fast Flow (PI, PII e PIII, Figura 6a). Amostras foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 nas concentrações de 2 mg/ml. Fotografias tiradas após 24 h de ensaio a 27 °C. Barras, 40 µm.

Com a diminuição da força iônica do tampão, o P2 passou a ficar retido na coluna e foi eluído com 0,1 M de NaCl. A eletroforese mostra que a proteína presente no P2 está pura. Os picos obtidos após cromatografia em tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 6,0) foram avaliados quanto à capacidade de inibir a germinação dos esporos de *F. solani*. Os picos P2 e P3 foram os únicos que apresentaram atividade antifúngica (Figura 8c). A atividade proteolítica só foi

detectada no pico P3, logo a proteína presente no P2 é uma proteína antifúngica e não uma protease.

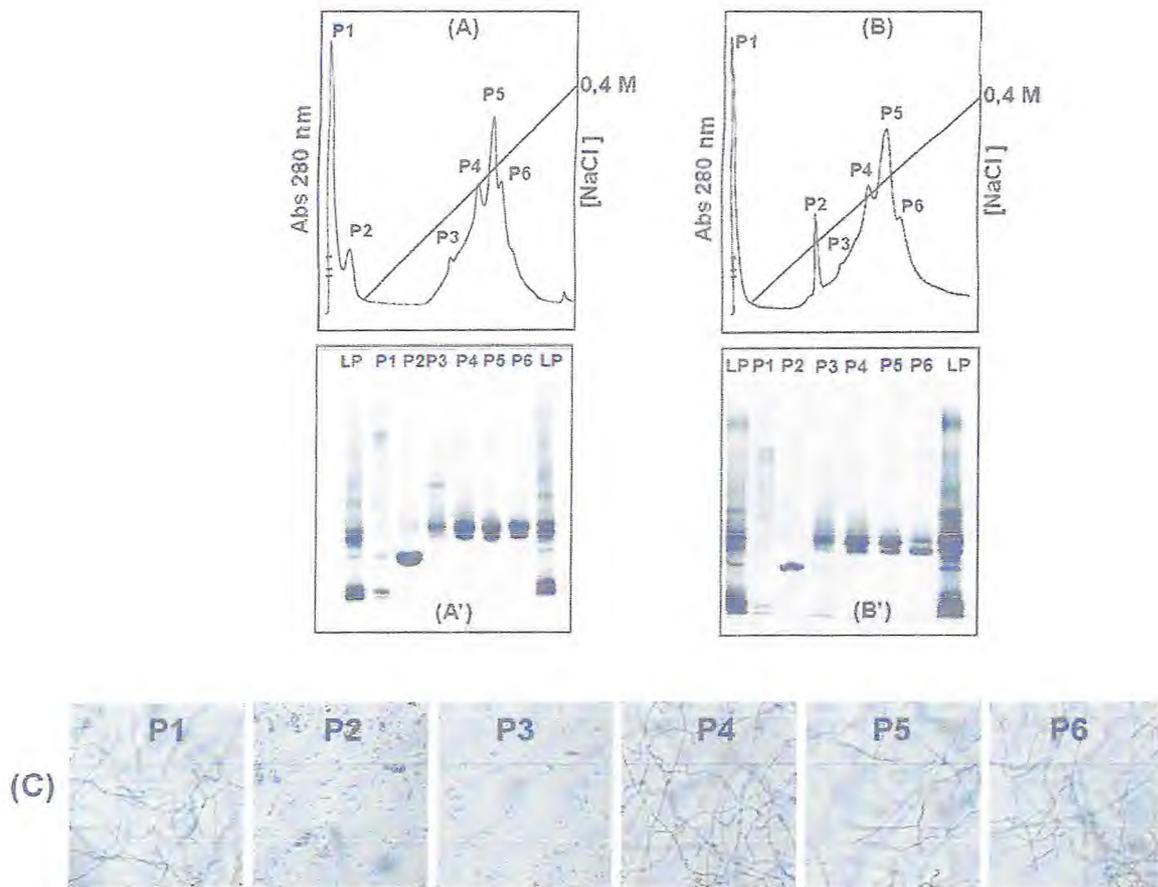


Figura 8: Cromatografia de troca iônica da fração PII-CM-Sepharose em coluna Resource-S equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 (A) ou equilibrada em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0 (B). Coluna acoplada em sistema de HPLC com fluxo de 1 ml/min. Foi utilizado um gradiente de 0-0,4 M de NaCl durante 60 min. Cada cromatografia foi realizada com 5 mg de PII-CM em 1 ml do respectivo tampão de equilíbrio. (A') e (B') Eletroforeses em géis de poliacrilamida (12,5%) das frações obtidas das respectivas cromatografias. Géis corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

(C) Ensaio de inibição da germinação de esporos de *F. solani* com os picos obtidos da cromatografia (B), utilizando 10 µg de proteína.

A seqüência N-terminal da proteína purificada (P2) foi avaliada e uma seqüência de 40 aminoácidos foi determinada. A seqüência obtida, quando submetida a programas de alinhamento de seqüências de aminoácidos, mostrou-se bastante similar a osmotinas ou proteínas relacionadas à proteína taumatina. Estas proteínas são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese e pertencem à família 5 das PR-proteínas (Tabela 2). Essas proteínas são reconhecidamente relacionadas com a defesa da planta contra fungos.

A tabela 4 mostra o rendimento da proteína purificada. A osmotina apresentou um rendimento de, aproximadamente, 1,2% de massa seca e de 1,2% de proteína solúvel da fração PL do látex (Tabela 3).

A osmotina purificada apresentou massa molecular aparente de 20,1 kDa, determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Figura 9a). A figura 9b mostra que a osmotina é uma glicoproteína, observada através de coramento do gel com reagente de Schiff. Lactotransferina bovina (LTB) foi utilizada como controle positivo, enquanto a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) foi utilizada como controle negativo. Carboidratos também foram detectados na osmotina pelo método colorimétrico de Masuko e colaboradores (2005). Neste caso, foi estimado que a osmotina

continha 3,2 % de carboidratos em sua estrutura. Pode ser notado, também, que a presença de glicoproteínas no látex de *C. procera* é abundante, pois a maioria das bandas protéicas foi corada com o reagente de Schiff (Figura 9b).

Tabela 2: Alinhamento da seqüência N-terminal de uma proteína de 20,1 KDa purificada do látex da planta *C. procera*. BLAST feito utilizando o banco de dados NCBI

Identificação	Organismo	Seqüência	% Similaridade	Score Bits	E-Value
20,1 KDa protein	<i>Calotropis procera</i>	1-ATFTIRNNCPYTIWAAAVP-GGGRRLNSGGTWTINVAPGTA-40	-	-	-
PR-protein	<i>Helianthus annuus</i>	22-AVFTIRNNCPYTVWAGAVP-GGGRQLNSGQTWSLTVAAAGTA-61	87	67,4	3e-10
Osmotin	<i>Piper colubrinum</i>	30-ANFLIRNNCPYTVWAAAVP-GGGRRLDRGATWSLNVPAQT--68	84	65,1	1e-09
Thaumatococin-like protein	<i>Capsicum annuum</i>	22-ATFEVRNNCPYTVWAAASTFVGGGRRLDRGQTWTINAPPGTA-62	82	63,5	5e-09
Thaumatococin-like protein	<i>Coffea arabica</i>	1-----NNCPYTVWAAAVP-GGGRRLDRGQTWTINVAAGTA-34	82	62,8	8e-09
Osmotin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	23-ATFEILNQCSYTVWAAASP-GGGRRLDAGQSWRLDVAAGT--61	79	57,0	4e-07
Osmotin	<i>Hevea brasiliensis</i>	1-ATFTIRNNKPYTVWAAASP-GGGRRLDMARIW-----31	74	56,6	6e-07

*Letras em azul referem-se aos aminoácidos conservados em todas as osmotinas analisadas.

Tabela 3: Rendimento da osmotina purificada do látex de *Calotropis procera*

Amostra	Massa Seca (mg)	*Proteína Solúvel (mg)	Rendimento de Proteína Solúvel (%)
Proteínas do Látex (LP)	100	72,41	100
P11 CM-Sepharose	29,90	24,65	34,1
P2 Resource-S (Osmotina)	1,17	0,85	1,2

*Proteínas Solúveis estimadas pelo método de Bradford (1976).

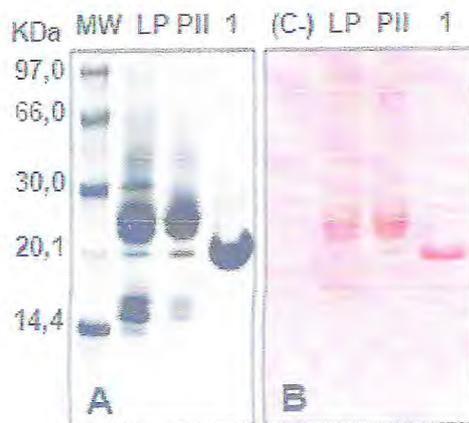


Figura 9: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) da osmotina purificada do látex de *Calotropis procera*. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. LP: Proteínas do látex de *C. procera*; PII: Pico II retido da coluna de CM-Sepharose Fast Flow; 1: Osmotina na ausência de 2-mercaptoetanol. (B) Detecção de glicoproteínas pelo método de Schiff. (-): Lectina de semente de *Canavalia ensiformis*. Foram aplicados 20 µg de proteína por poço, exceto na amostra de osmotina que foram 10 µg.

Eletroforeses bidimensionais foram realizadas com o objetivo de determinar o ponto isoelétrico da osmotina, além da observação de isoformas e do grau de pureza da mesma. A figura 10a mostra que a osmotina purificada apresenta duas isoformas, com massas moleculares de 21,5 kDa e 21,3 kDa e pI 8,9 e 9,2, respectivamente. A presença das duas isoformas pode ser atribuída a modificações pós-traducionais do tipo glicosilação, pois ambas isoformas foram coradas com reagente de Schiff (Figura 10b).

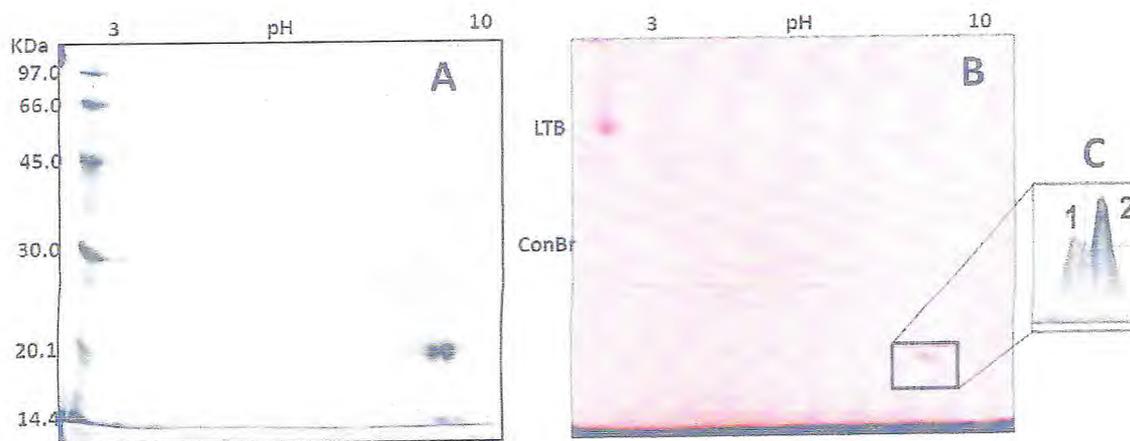


Figura 10: (A) Eletroforese bidimensional da osmotina. Foram aplicados 30 μg de proteína. Gel corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Detecção de glicoproteínas, utilizando o reagente de Schiff. Foram aplicados 45 μg de proteína. (C) Imagem tridimensional da osmotina mostrando a presença de duas isoformas. 1- Massa molecular de 21,5 kDa e pI 8,9 (35,3%); e 2-Massa molecular de 21,3 kDa e pI 9,2 (61,7%). Dados determinados utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare).

Com o objetivo de confirmar que os dois 'spots' referentes na figura 10a eram isoformas da osmotina e não contaminação, ambos 'spots' foram submetidos à digestão com tripsina e posterior análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). A tabela 4 mostra que as duas proteínas são osmotinas e confirma a presença de isoformas.

Tabela 4: Identificação dos 'spots' 1 e 2 referentes da figura 10 por MALDI TOF-TOF

Spot N°	Teoric/Experimental		Method (MS/MS)	Protein Score/ Ion Score	Parental ions	Sequence	ID (NCBI)	Similar Protein (Organism)
	Molecular mass	pI						
1	25,6/21,2	8,1/8,9	MS/MS	112/112	1421.60	APGGCNPCTVFK	gi 161375756	Osmotin (<i>Piper colubrinum</i>)
					1788.72	DDPTSTFTCPGGTNYR		
2	25,6/21,2	8,1/9,2	MS/MS	112/112	1421.60	APGGCNPCTVFK	gi 161375756	Osmotin (<i>Piper colubrinum</i>)
					1788.72	DDPTSTFTCPGGTNYR		

As duas isoformas da osmotina também foram observadas através do espectro de massas, onde foram observados dois picos com massas moleculares de 22.340,47 e 22.536,81 Da. Contudo, um pico de 11.189,78 Da foi detectado no espectro. Esse pico pode ser referente ao íon da osmotina duplamente carregado (Figura 11). Estes resultados foram obtidos utilizando a matriz ácido sinapínico, pois a matriz ácido alfa-cianocinâmico não foi capaz de ionizar a osmotina.

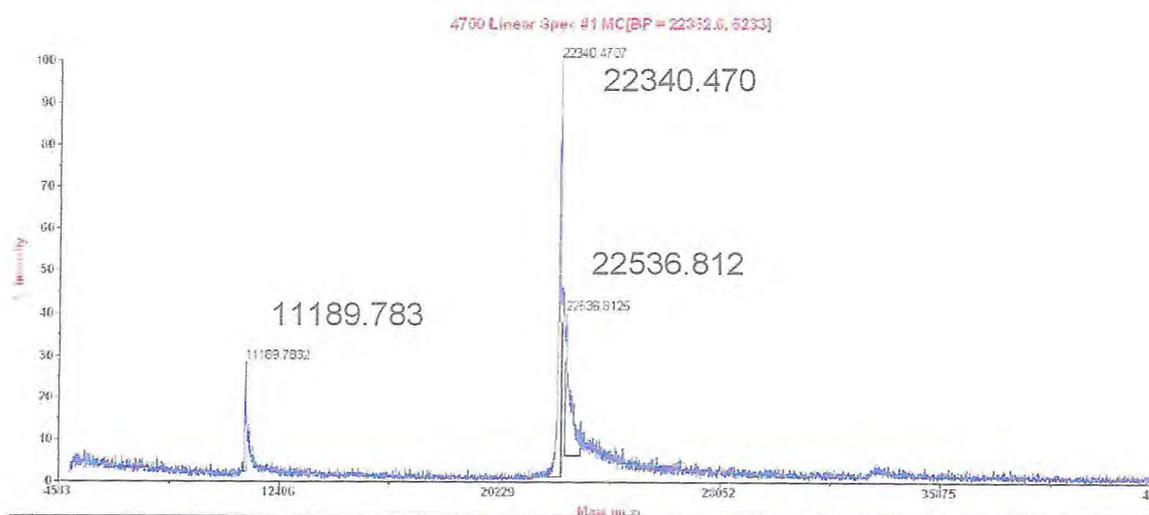


Figura 11: Espectro de massas em MALDI-TOF da osmotina purificada. A matriz utilizada foi o ácido sinapínico. Foram obtidos três picos com massas moleculares de 11.189,783; 22.340,470 e 22.536,812 Da.

O espectro de dicroísmo circular da osmotina em pH 7,0 mostrou a presença de dois máximos, um na faixa de 232 nm e outro na faixa de 195 nm, e um mínimo de 211 nm (Figura 12). O máximo de 232 nm é característico da presença de pontes dissulfeto na proteína. A desconvolução dos espectros obtidos em pH 7,0 foi realizada com o objetivo de avaliar as frações de estruturas em α -hélice, folhas betas e voltas, além de estruturas não ordenadas. Para isso, foram utilizados os programas Selcon3, CDSSTR e Continll (Sreerama e Woody, 2000). A figura 13 mostra que apenas CDSSTR e Continll apresentaram uma desconvolução satisfatória. Baseado nestes dois programas, a osmotina apresentou composição de estrutura secundária em valor de pH 7,0: voltas = 19%, não ordenado = 28%, alfa-hélice = 20% e folha beta = 33%.

A estrutura secundária da osmotina não apresentou modificações nos diferentes valores de pH avaliados (pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0), evidenciando que a estrutura desta proteína é bastante estável.

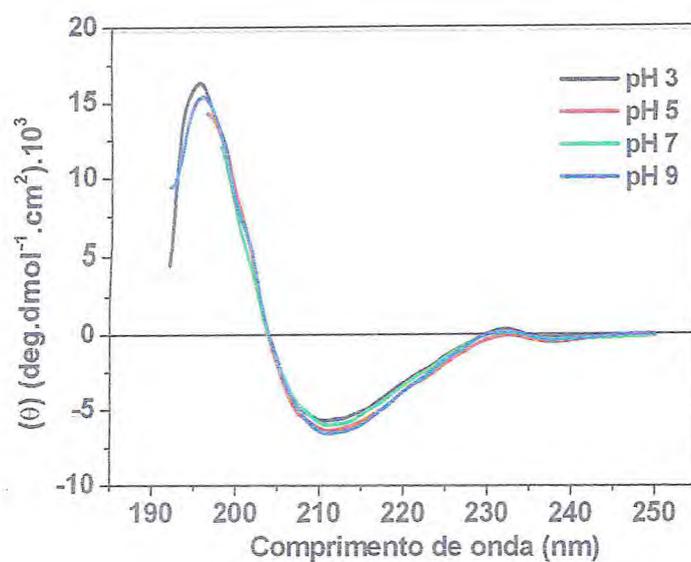


Figura 12: Efeito do pH na estrutura secundária da osmotina do látex de *Calotropis procera*. A osmotina foi incubada por 30 min em cada tampão (glicina 25 mM, pH 3,0; acetato de sódio 25 mM, pH 5,0; Tris-HCl 25 mM, pH 7,0 e 9,0) a uma concentração de 0,25 mg/ml.

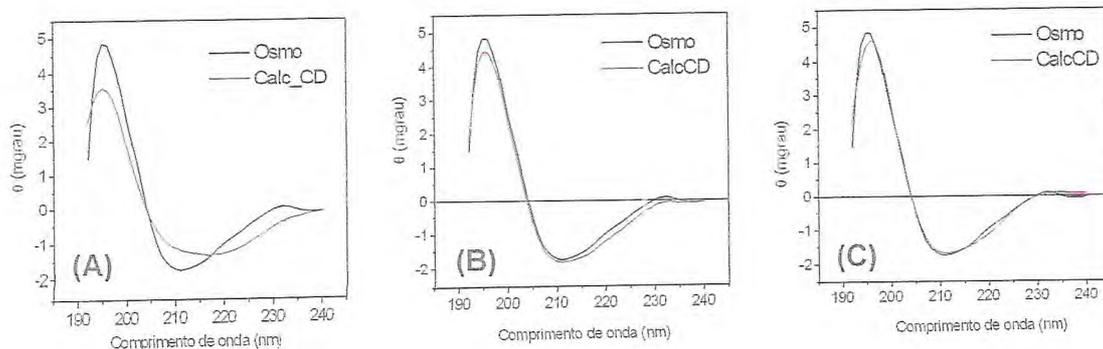


Figura 13: Comparação do espectro da osmotina em pH 7,0 com espectros de proteínas com estruturas secundárias conhecidas depositadas no banco de dados de estrutura secundária. Os resultados foram obtidos utilizando os programas: Selcon3 **(A)**, CDSSTR **(B)** e Continll **(C)**.

Possíveis modificações na estrutura da osmotina em diferentes valores de pH também foram avaliadas por fluorescência. Primeiramente, a osmotina foi excitada a 280 nm e depois a 295 nm. Os dados de fluorescência da osmotina foram similares para todos os valores de pH estudados quando excitada a 280 nm, contudo a intensidade foi levemente alterada quando a proteína foi excitada a 295 nm (Figura 14). O máximo de fluorescência da osmotina foi de 340 nm em todos os pHs estudados.

O efeito da temperatura na estrutura secundária da osmotina também foi avaliado. Para isso, a osmotina foi incubada em diferentes temperaturas por 10 min, variando de 25 a 95 °C, de 5 em 5 °C. A figura 15 mostra que a osmotina manteve sua estrutura secundária estável até 75 °C, mostrando perda de estrutura apenas a partir de 80 °C.

Plotando alguns valores de diâmetro circular para a osmotina em diferentes temperaturas, pode-se obter a temperatura em que 50 % da proteína estava na forma nativa e 50 % estava na forma desnaturada (valor este denominado de T_m). A partir da figura 16 foi obtido um valor de 77,8 °C, indicando que a osmotina é bastante estável e resistente a altas temperaturas.

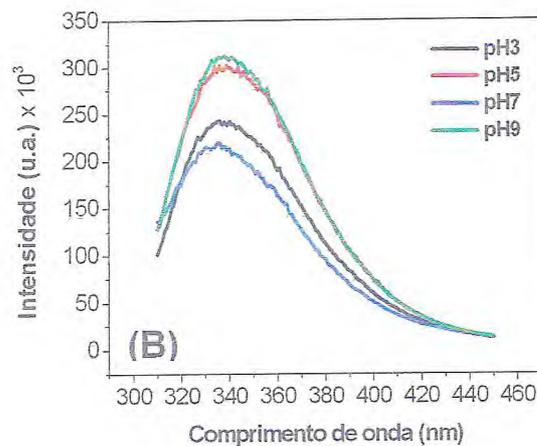
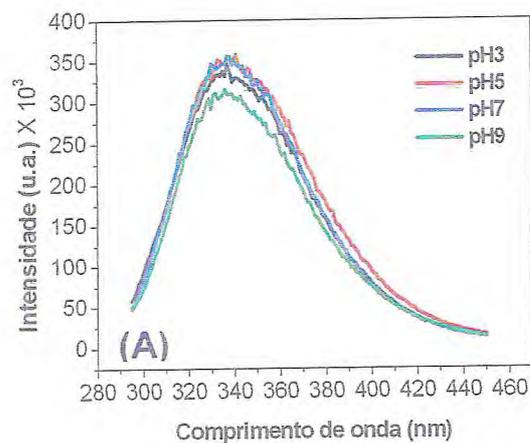


Figura 14: Espectro de fluorescência da osmotina em diferentes valores de pH a uma concentração de 0,125 mg/ml. A osmotina excitada a 280 nm (A); ou a 295 nm (B).

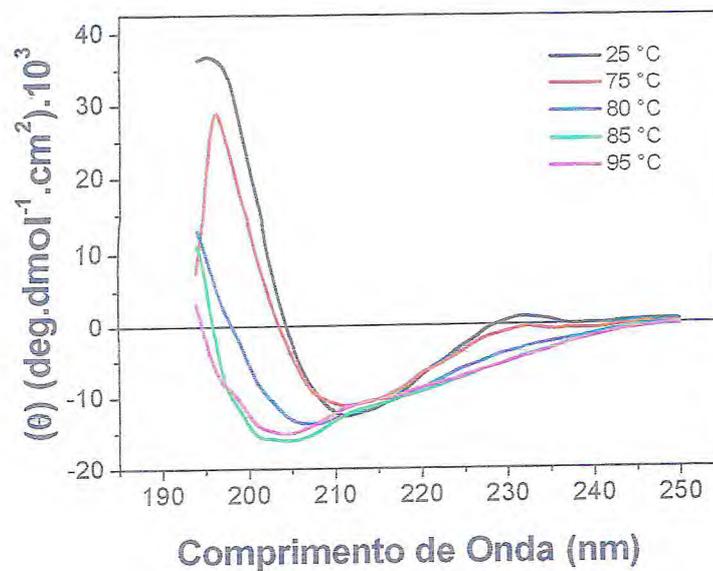


Figura 15: Efeito da temperatura na estrutura secundária da osmotina medido por dicroísmo circular. A osmotina foi dissolvida em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,0, a uma concentração de 0,25 mg/ml e incubada por 10 min a temperaturas sucessivas de 25 a 95 °C, de 5 em 5 °C.

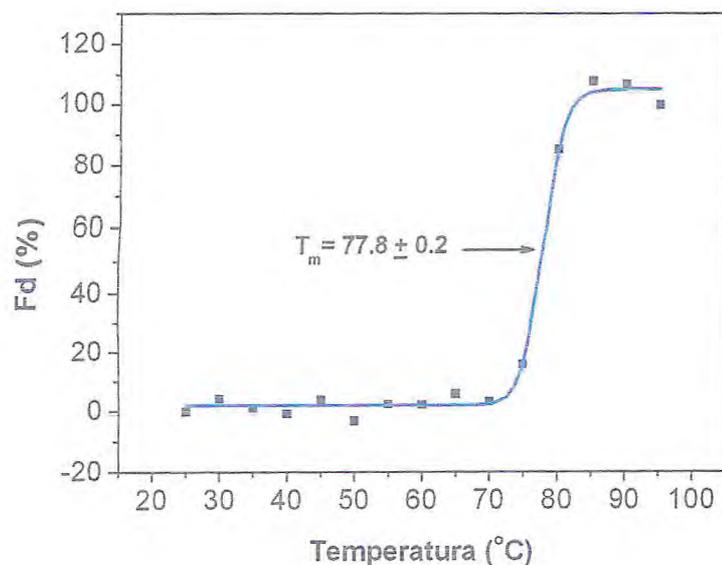


Figura 16: Temperatura média de desnaturação da osmotina em pH 7.0. Os pontos do gráfico são referentes a medidas de dicroísmo circular a 205 nm da osmotina em diferentes temperaturas. Fd: Fração de proteína desnaturada.

O próximo passo foi avaliar se a osmotina era capaz de voltar para sua estrutura nativa após aquecimento a 95 °C por 10 min. A figura 17 mostra que a osmotina foi capaz de retornar quase que completamente para sua estrutura inicial (25 °C), mesmo após o tratamento térmico. Os resultados de desconvolução da osmotina "renaturada" foram: voltas = 18 %, não ordenado = 30 %, alfa-hélice = 8 % e folha beta = 44 %. Estes resultados foram similares com os da proteína nativa (voltas = 19 %, não ordenado = 28 %, alfa-hélice = 20 % e folha beta = 33 %). A grande diferença foi na diminuição de hélice de 20 % para 8 % e aumento de folha-betas de 33 % para 44 %. Esses resultados mostram que esta proteína, além de ser bastante resistente ao tratamento

térmico é capaz de retornar, parcialmente, para sua estrutura secundária, mesmo após aquecimento a uma temperatura de 95 °C.

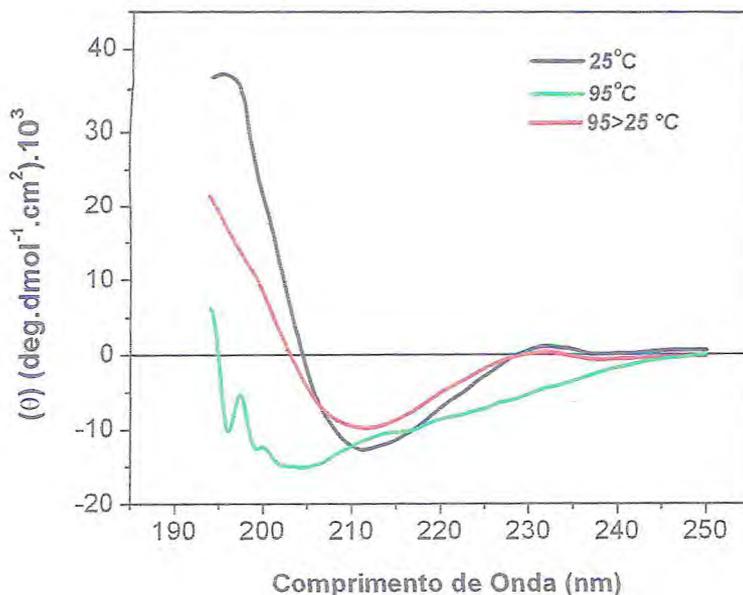


Figura 17: Espectro de dicroísmo circular da osmotina após aquecimento por 10 min a 95 °C e incubação a 25°C por 30 min.

O mecanismo de ação da osmotina foi primeiro avaliado testando a capacidade de interação com lipossomos de constituições fosfolipídicas distintas. Para tanto, lipossomos constituídos de Palmitoil-2-oleoil-sn-Glicero-3-Fosfo-rac-1-Glicerol (POPG), 1,2-Diiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamida (DSPE) foram produzidos e incubados com uma solução de osmotina a 0,25 mg/ml em tampão Tris-HCl pH 7,0 por 20 min. A interação da osmotina com as vesículas foi avaliada através

de dicroísmo circular. A figura 18 mostra que a estrutura da osmotina foi modificada quando incubada com lipossomos constituídos por fosfolípidos carregados negativamente (POPG), enquanto que na presença dos lipossomos carregados positivamente (DSPE) ou neutros (DMPC) houve discretas alterações na intensidade nos valores próximos aos 211 nm. O fato de haver modificações estruturais na osmotina na presença de lipossomos do tipo POPG gera indícios de interação desta proteína com os fosfolípidos destas vesículas.

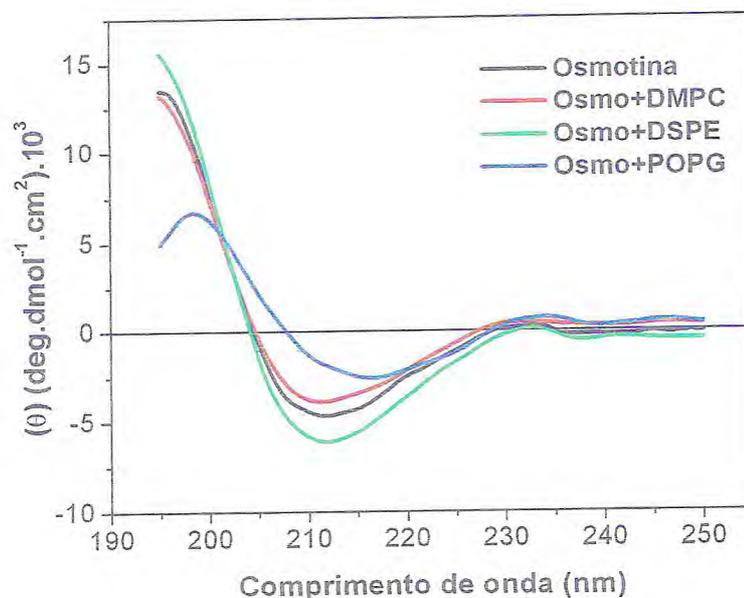


Figura 18: Interação da osmotina com lipossomos constituídos de DMPC, DSPE e POPG medida de dicroísmo circular. A osmotina (0,25 mg/ml em tampão Tris-HCl pH 7,0) foi incubada com cada lipossomo por 20 min a 25 °C.

O próximo passo foi avaliar se a osmotina era capaz de alterar a permeabilidade na membrana de lipossomos constituídos de POPG. Para avaliar este efeito, lipossomos de POPG foram produzidos contendo em seu interior um fluoróforo (calceína). A permeabilidade das membranas foi monitorada pelo aumento da fluorescência após incubação com a osmotina em diferentes concentrações.

A figura 19 mostra que a osmotina foi capaz de alterar a permeabilidade da membrana dos lipossomos constituídos de POPG em concentrações tão baixas quanto 1 μM .

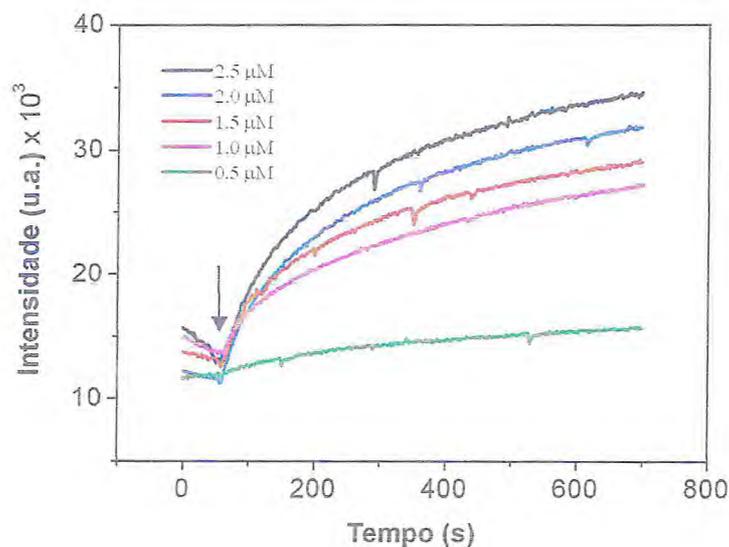


Figura 19: Efeito da osmotina sobre a permeabilidade de lipossomos constituídos de POPG. A liberação da calceína foi acompanhada através de excitação no comprimento de onda de 492 nm e detecção a 514 nm, a 25 °C em fluorímetro ISSK₂ durante 700 s. A amostra foi adicionada 1 min após do início das medidas, indicado pela seta.

A porcentagem de liberação da calceína foi medida para cada concentração de osmotina, utilizando o Triton X-100 1 % como 100 % de liberação da calceína. A figura 20 mostra que a osmotina na concentração de 2 μM (0,044 mg/ml) foi capaz de causar 33,13% de liberação da calceína. Uma concentração de 10 μM equivalente a 0,22 mg/ml de osmotina, foi capaz de produzir 59 % de liberação de calceína após 700s de incubação a 25 °C (Figura 20).

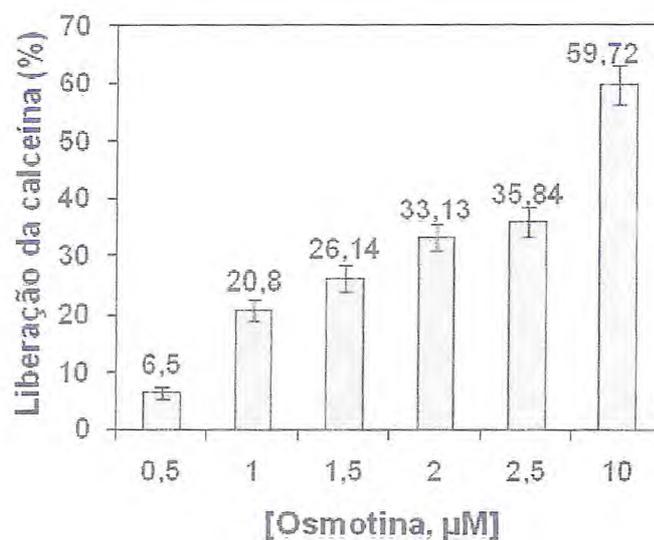


Figura 20: Porcentagem de liberação de calceína de lipossomos constituídos de POPG após incubação com osmotina em diferentes concentrações após 700s a 25 °C. Triton X-100 foi utilizado como controle para 100 % de liberação de calceína.

Ante a capacidade da osmotina em alterar a permeabilidade de lipossomos artificiais, novos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar este efeito sobre os esporos de *F. salani*. Para isso, foi utilizado o fluoróforo

iodeto de propídio, que é impermeável à membrana plasmática íntegra. Como pode ser visto na figura 21, a osmotina foi capaz de permeabilizar os esporos de *F. solani*, uma vez que o brilho vermelho refere-se à ligação do iodeto de propídio com o DNA de esporos cujas membranas plasmáticas foram permeabilizadas.

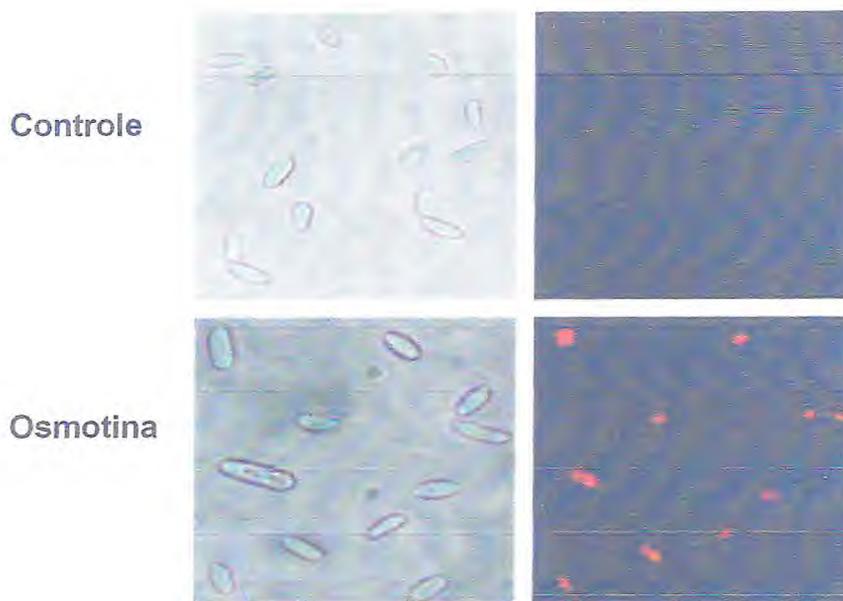


Figura 21: Efeito da osmotina sobre a permeabilidade da membrana plasmática de esporos de *F. solani*. Uma suspensão de esporos de *F. solani* (2×10^6 esporos/ml) foi incubada por 30 min com a osmotina (0,25 mg/ml). O fluoróforo iodeto de propídio (1 mM) foi utilizado para determinar a integridade das membranas dos esporos.

Para verificar se a capacidade da osmotina permeabilizar membranas era um evento específico, a osmotina foi incubada com hemácias de coelho e

hemólise foi avaliada durante 48 h. Após este período, não foi observada ação hemolítica da osmotina, nem das outras amostras analisadas: proteínas do látex (10 mg/ml) e PII-CM (10 mg/ml) (Figura 22). Esses resultados mostram que a capacidade da osmotina em destruir ou permeabilizar membranas plasmáticas pode ser específica para membranas de fungos.

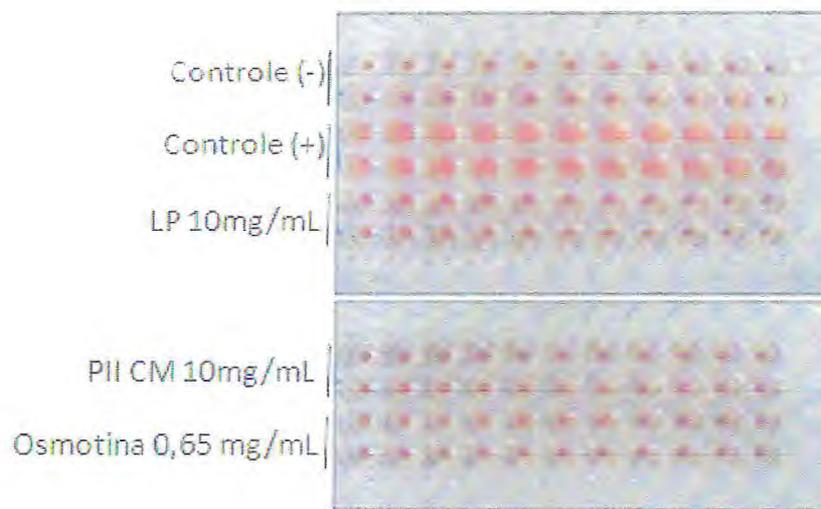


Figura 22: Avaliação do potencial hemolítico da osmotina. Foi adicionado 50 μ l das amostras e 50 μ l de uma suspensão de hemácias de coelho a 2 % em NaCl 0,15M. O ensaio foi realizado em tampão fosfato de sódio pH 7,5 contendo 0,15 M de NaCl. Fotografia tirada após 48 h de ensaio. Controle (-): Tampão fosfato; Controle (+): Água destilada.

Osmotinas são conhecidas por possuírem grande quantidade de pontes dissulfeto. Fundamentado nesta observação, o papel destas na estrutura e, conseqüentemente, na atividade antifúngica da osmotina foram avaliados. Eletroforeses da osmotina reduzida com 2-mercaptoetanol mostraram a presença de três fragmentos com massas moleculares de 14,0, 11,0 e 7,0 kDa. Quando a amostra foi reduzida com DTT e analisada por espectrometria de massas, foram identificados três picos com massas moleculares de 14.918, 11.198 e 7.494 Da (Figura 23). O pico de 14.918 Da foi identificado como apenas um pequeno pico, pois este deve ter dado origem aos fragmentos de 7.494 Da.

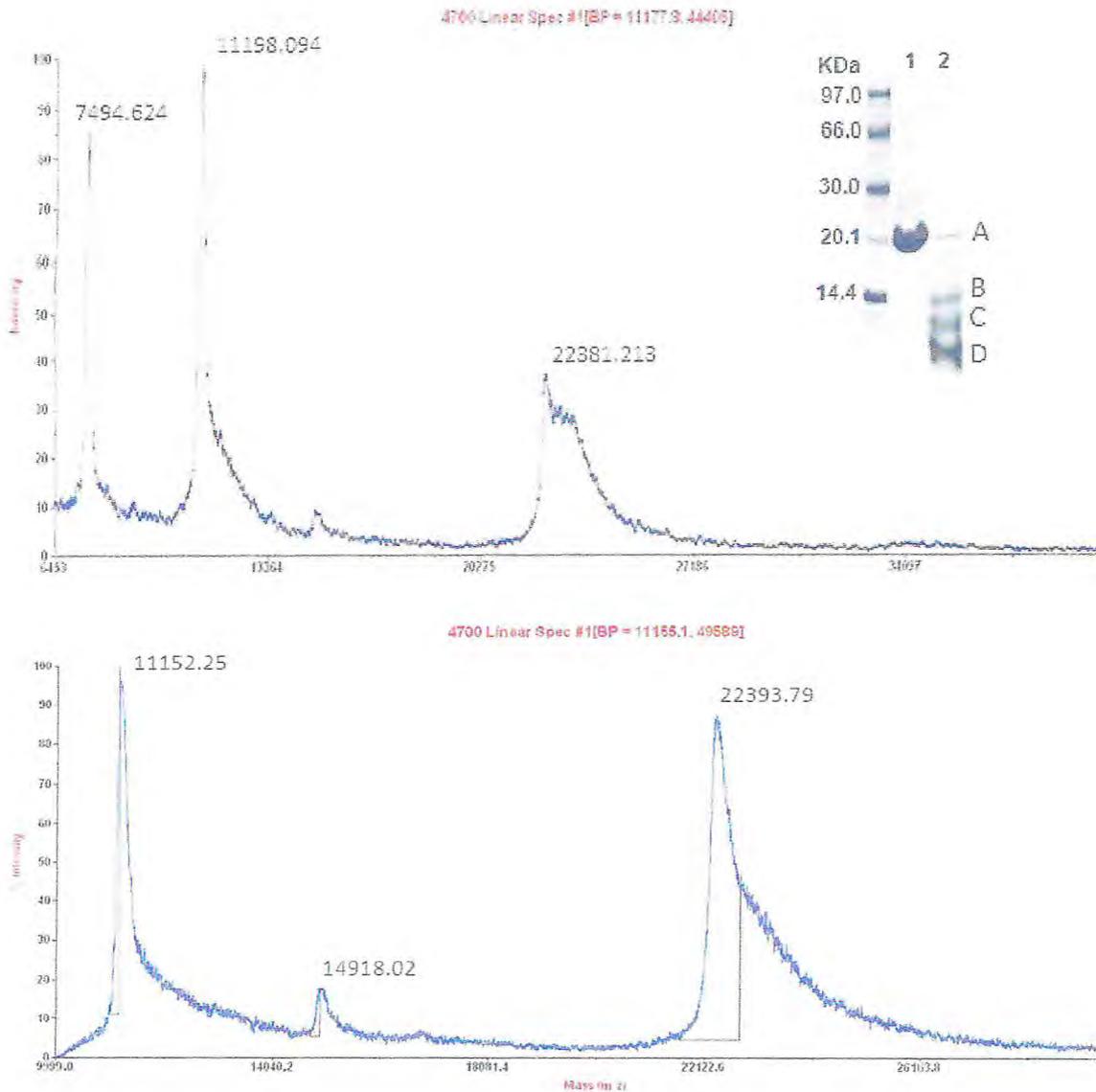


Figura 23: Efeito das pontes dissulfeto na estrutura da osmotina do látex de *C. procera*. Espectro de massas da osmotina reduzida com 30 mM de DTT em MALDI-TOF usando a matrix ácido sinapínico. Dentro do espectro, eletroforese (12,5%) da osmotina (1) sem 2-mercaptoetanol e (2) na presença de 2-mercaptoetanol 5%. A, B, C e D: bandas da osmotina após tratamento com 2-mercaptoetanol.

As pontes dissulfeto presentes na osmotina são essenciais para manutenção da estrutura e atividade antifúngica da mesma, pois na presença de DTT a osmotina perdeu a atividade antifúngica contra *F. solani*, *Neurospora sp* e *C. gloeosporioides* (Figura 24).

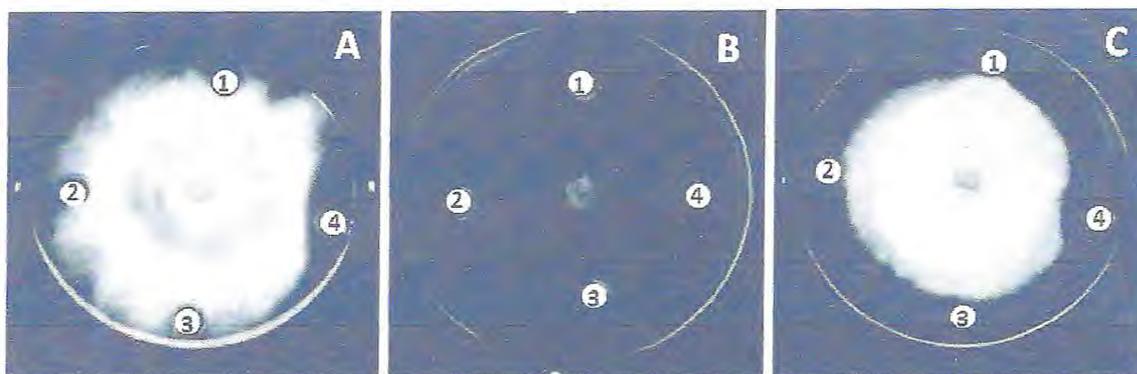


Figura 24: Inibição de crescimento em meio sólido da Osmotina purificada do látex de *C. procerca*. (A) *F. solani*; (B) *Neurospora sp*; (C) *C. gloeosporioides*. 1=Tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0; 2=Tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0)+10mM DTT; 3=Osmotina 50 µg+DTT e 4= Osmotina 50 µg sem DTT. (A e C) Fotografias das placas após 48 h da adição das amostras, enquanto (B) após 24 h. Osmotina foi dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

4. DISCUSSÃO

Através de estudos proteômicos, o capítulo II mostrou que a fração proteínas do látex (PL) é rica em proteínas reconhecidamente antifúngicas, dentre as quais se enumeram quitinases, proteinases, proteínas transferidoras de lipídeos, inibidores de proteinases, peroxidases e osmotinas. Fundamentado nesta observação, esta fração foi avaliada quanto à capacidade de inibir o crescimento vegetativo e a germinação de esporos de três fungos fitopatogênicos (*F. solani*, *Neurospora sp.* e *C. gloerosporioides*).

A fração PL foi capaz de inibir em 100 % o crescimento vegetativo e a germinação dos esporos dos fungos testados, resultados similares aos obtidos com o peróxido de hidrogênio. Os valores de IC₅₀ obtidos foram muitas vezes menores que a concentração que ocorre naturalmente no látex de *C. procera*. Atividades antifúngicas de fluidos laticíferos de diferentes espécies tais como *Lactuca sativa*, *Asclepias curassavica*, *Manihot glaziovii*, *Carica papaya* e *Hevea brasiliensis* foram também descritas (MOULIN-TRAFFORT *et al.*, 1990; GIORDANI *et al.*, 1991; GIORDANI *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 1999).

No presente trabalho, o envolvimento de proteínas na atividade antifúngica foi confirmado quando a fração PL foi fervida por 30 min ou digerida com enzimas proteolíticas, pois estas duas frações não apresentaram atividade antifúngica, tanto nos ensaios de inibição de crescimento como nos ensaios de inibição da germinação. Várias proteínas com atividade antifúngica foram

descritas em látex. Pereira e colaboradores (1999) associaram a atividade antifúngica do látex de *M. glaziovii* com a presença da atividade quitinásica e β -1,3-glucanásica. Taira e colaboradores (2005) purificaram e caracterizaram três quitinases do látex de *Ficus microcarpa* com atividades antifúngicas contra *Trichoderma viride*. Heveína, uma proteína com afinidade pela quitina do látex de *H. brasiliensis*, mostrou atividade antifúngica contra três diferentes espécies de leveduras em concentrações tão baixas quanto 12 μ g/ml (KANOKWIROON *et al.*, 2007). A atividade antifúngica do látex de *H. brasiliensis* também foi associada com enzimas envolvidas na degradação da parede celular de fungos, tais como N-acetil- β -D-glucosaminidase e α -D-manosidase (GIORDANI *et al.*, 2002).

A atividade antifúngica do látex de *C. procera* foi parcialmente associada com a atividade proteolítica do tipo cisteínica, pois quando o látex foi coletado na presença de E-64, a atividade antifúngica contra *F. solani* foi totalmente perdida. O envolvimento de proteases na atividade antifúngica de látex ainda não foi estudado, mesmo sabendo que estes fluidos são ricos nestas enzimas. No entanto, atividade antifúngica e antibacteriana de proteases cisteínicas de outras espécies são descritas na literatura. Krüger e colaboradores (2002) mostraram que a expressão do gene Rcr3, que codifica uma proteinase cisteínica em folhas de tomate, está envolvida na resistência deste ao ataque do fungo *Cladosporium fulvum*. Hao e colaboradores (2006) mostraram que a expressão de dois genes codificantes para proteinases cisteínicas é necessária para a resistência de plantas de *Nicotiana benthamiana* ao fungo *Colletotrichum destructum*. Além dos relatos de defesa contra fungos, as

proteínases cisteínicas também estão envolvidas na defesa da planta contra bactérias (BERNOUX *et al.*, 2008).

A confirmação do envolvimento de proteínases cisteínicas na defesa de plantas laticíferas contra fungos veio quando a papaína, uma proteínase cisteínica de *Carica papaya* foi testada e foi capaz de inibir o crescimento e a germinação de esporos de *F. solani* e *C. gloerosporioides*. A especificidade destas proteínases frente esta atividade biológica foi confirmada quando a tripsina e a quimotripsina, duas proteínases serínicas, não mostraram nenhuma ação antifúngica, embora estas enzimas tenham apresentado atividades proteolíticas específicas maiores que da papaína.

A fração protéica do látex de *C. procera*, inibida para atividade proteolítica do tipo cisteínica, mostrou-se ativa contra os fungos *Neurospora sp.* e *C. gloerosporioides*. Esses resultados tornam claro que outras proteínas, além de proteínases cisteínicas, estão envolvidas na defesa da planta *C. procera* contra fungos.

Proteases aspárticas também são descritas por participar na defesa da planta contra fungos. Duas proteases aspárticas, uma purificada de tubérculo e outra da folha de batata (*Solanum tuberosum*) apresentaram atividade antifúngica contra *Phytophthora infestans* e *Fusarium solani*. (GUEVARA *et al.*, 2001, 2002, 2004). Recentemente, Mendieta e colaboradores (2006) mostraram que o mecanismo de ação da atividade antifúngica da proteínase aspártica de folha de batata envolve indução da produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilização da membrana plasmática. No capítulo I, a atividade proteolítica da fração PL foi parcialmente inibida com pepstatina,

indicando a presença de proteases aspárticas no látex de *C. procera* que poderiam participar na atividade antifúngica do látex.

Em vista da grande variedade de proteínas antifúngicas no látex de *C. procera*, este foi fracionado através de dois passos cromatográficos, onde se obteve uma proteína purificada, cujo rendimento foi de 1,2 %. A sequência N-terminal da proteína purificada apresentou grande similaridade (mais de 74%) com osmotinas de diferentes espécies. Apesar de estas proteínas terem sido purificadas de diferentes plantas, nenhum trabalho na literatura descreve a purificação de osmotinas de fluidos laticíferos, sendo apenas identificada no látex de *H. brasiliensis* por seqüência N-terminal. Neste caso, uma osmotina com massa molecular de 25 kDa foi identificada a partir de géis unidimensionais (SUBROTO *et al.*, 2001).

A osmotina purificada neste trabalho apresentou massa molecular de aproximadamente 20,1 kDa, a partir de géis de poliacrilamida unidimensionais, e 22 kDa, por espectrometria de massas, similar como observado para outras osmotinas, que possuem massas moleculares entre 21 kDa e 25 kDa (HEJAARD *et al.*, 1991; CHU e NG, 2003; HO, *et al.*, 2007).

A osmotina purificada foi caracterizada como uma glicoproteína, após coramento com reagente de Schiff. Entre todas as osmotinas purificadas e caracterizadas, nenhum trabalho descreve se estas proteínas são glicoproteínas ou não. Para avaliar se as osmotinas são glicoproteínas foi utilizado um programa que faz uma predição de possíveis sítios de glicosilação em proteínas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>). Para este teste, foram utilizadas as seqüências completas das proteínas que foram similares à

osmotina purificada deste trabalho (Tabela 2). As seqüências foram obtidas através do endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Os números de acesso foram *Helianthus annuus* (gi|20385169|); *Piper colubrinum* (gi|161375756|); *Capsicum annuum* (gi|15419836|); *Coffea arabica* (gi|158668022|), e *Arabidopsis thaliana* (gi|21537409|). Todas as seqüências analisadas apresentaram vários possíveis sítios de glicosilação. Um exemplo pode ser visto na figura 25, que utilizou a seqüência completa da osmotina de *H. annuus*. Como controle as seqüências das proteínas lactotransferina bovina (gi|30794292) e da lectina de *Canavalia ensiformis* (gi|2225921) foram testadas no mesmo programa. Como esperado, a lactotranferina bovina, uma glicoproteína, apresentou vários sítios de glicosilação, enquanto a lectina de *C. ensiformis* (gi|442707) não apresentou nenhum (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>). Desta forma, esses resultados sugerem que osmotinas podem ser glicoproteínas.

SeqName	Residue	O-GlcNAc result	Potential	Thresh. (1)	Thresh. (2)
H.	3	T ++	0.5532	0.3796	0.4621
H.	4	S +	0.4499	0.3843	0.4684
H.	25	T +	0.4879	0.4659	0.5784
H.	69	T +	0.4758	0.4150	0.5098
H.	101	T ++	0.4878	0.3949	0.4827
H.	191	T +	0.4321	0.4161	0.5113
H.	205	T +	0.3730	0.3643	0.4414
H.	206	S +	0.4198	0.3742	0.4548
H.	214	T +	0.4096	0.3879	0.4732

Figura 25: Análise de possíveis sítios de glicosilação da osmotina de *Helianthus annuus*. Na parte superior, a letra G se refere a possíveis sítios de glicosilação desta proteína. Na parte inferior, podemos ver os resíduos de aminoácidos que são passíveis de glicosilação e o sinal (+) é referente ao resultado positivo.

Eletroforeses bidimensionais mostraram que a osmotina purificada se apresenta em duas isoformas com massas moleculares (21.524 e 21.389 Da) e pontos isoelétricos (pI 8,9 e 9,2) muito próximos. Essa pequena diferença na massa molecular e no ponto isoelétrico pode ser devido a pequenas modificações pós-traducionais do tipo glicosilação, pois ambos os spots são glicoproteínas e foram identificados como osmotinas por espectrometria de massas. A presença de isoformas também foi confirmada por espectrometria de massas, uma vez que foram detectados dois picos com massas moleculares muito próximas (22.340 e 22.536 Da). A presença de isoformas de osmotinas

parece ser comum em plantas. Oito isoformas de osmotinas foram preditas em cevada por cDNA, das quais sete de folha e uma de semente. Todas elas apresentaram massas moleculares e pontos isoelétricos diferentes. As massas moleculares variaram de 15,6 a 21,8 kDa e os pontos isoelétricos de 4,3 a 8,1 (REISS *et al.*, 2006).

As análises de dicroísmo circular mostraram que a osmotina de *C. procera* é constituída de 33% de folhas betas e 20% de alfa-hélice. Esse resultado é semelhante aqueles obtidos de osmotinas que tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas. Os resultados de estrutura tridimensional por difração de raios X mostram que as osmotinas são constituídas basicamente por 11 folhas betas (domínio I), enquanto que o domínio II é constituído basicamente por uma α -hélice (KOIWA *et al.*, 1998; GHOSH e CHAKRABARTI, 2008). As osmotinas também são caracterizadas pela grande quantidade de resíduos de cisteína em suas estruturas que podem formar 5 ou 6 pontes dissulfeto (REISS *et al.*, 2006; GHOSH e CHAKRABARTI, 2008). Essa grande quantidade de pontes dissulfeto tornam estas proteínas resistentes à proteólise, à desnaturação em diferentes valores de pH e a diferentes temperaturas (VELAZHAHAN *et al.*, 1999). O espectro de dicroísmo circular da osmotina não diferenciou com a mudança de pH (3,0, 5,0, 7,0 e 9,0) ou quando aquecida por 10 min até 75 °C, com temperatura média de desnaturação de 77,8 °C. Mais interessante foi que a osmotina foi capaz de retornar sua estrutura secundária quase que completamente após o tratamento térmico. Ho e colaboradores (2007) mostraram que a osmotina de banana foi ativa contra o fungo *Mycosphaerella arachidicola* em valores de pH 10, 11, 12,

13 e 14 ou quando aquecida até 70 °C. Esses conjuntos de resultados evidenciam que as osmotinas são proteínas muito estáveis.

Alguns trabalhos utilizam dados de fluorescência para verificar mudanças estruturais das proteínas, sejam elas em diferentes soluções ou através de interação com vesículas ou com outras moléculas (SZABÓ *et al.*, 2009; ZORKO *et al.*, 2009; KAVITHA *et al.*, 2009). Triptofano e tirosina são dois aminoácidos aromáticos que absorvem luz e emitem fluorescência. Os dois aminoácidos absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm, entretanto apenas o primeiro absorve a 295 nm (NELSON e COX, 2008). Modificações no espectro de fluorescência de uma proteína são indícios de modificações estruturais (VIVIAN e CALLIS, 2001; KAVITHA *et al.*, 2009). Entretanto, uma modificação na intensidade do espectro de fluorescência não pode ser considerada como uma modificação na estrutura de uma proteína, pois a fluorescência pode ser influenciada pela carga dos aminoácidos na vizinhança dos resíduos de triptofano e tirosina (VIVIAN e CALLIS, 2001). Os dados de deslocamento do máximo de fluorescência são mais conclusivos em se tratando de modificações na estrutura de uma proteína (LADOKHIN *et al.*, 2000), caso esse que não ocorreu quando a osmotina foi excitada a 280 nm ou a 295 nm em diferentes soluções tampão. Em ambos os casos, o máximo de fluorescência da osmotina foi de 340 nm. Esses resultados e os de dicroísmo circular mostram que a osmotina não apresentou modificações detectáveis na sua estrutura sob os valores de pH estudados.

Os resultados de fluorescências foram importantes também para mostrar que a proteína estava no seu estado conformacional nativo, pois o pico de

fluorescência foi de 340 nm. Quando uma proteína está no seu estado desnaturado, ela apresenta seus aminoácidos hidrofóbicos expostos ao meio aquoso, caracterizado por um pico de fluorescência entre 355-360 nm, que é referente ao máximo de fluorescência do triptofano em solução (LADOKHIN *et al.*, 2000).

A membrana plasmática de fungos é alvo de uma grande variedade de proteínas e peptídeos antimicrobianos. A interação de proteínas e peptídeos com a membrana plasmática pode levar à formação de poros, que terá como consequência o efluxo de componentes celulares e morte do microorganismo (FERREIRA *et al.*, 2007). O experimento de interação da osmotina com diferentes lipossomos mostrou que a osmotina foi capaz de interagir somente com lipossomos constituídos de fosfolipídios carregados negativamente (POPG). Isso pode ser explicado pelo fato que, em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,0 esta proteína (pI 9,0) apresenta-se carregada positivamente, e isso facilitaria sua interação com os lipossomos carregados negativamente. Além de interagir com lipossomos de POPG, a osmotina foi capaz de causar 21% de permeabilidade destes lipossomos em doses tão baixas quanto 1 μ M, que equivale a 22 μ g/ml de osmotina. Esta concentração é quase 10 vezes menor que a estimada ocorrer naturalmente no látex (216 μ g/ml). Esses resultados foram confirmados quando esporos de *F. salani* foram incubados com a osmotina, a qual levou à permeabilização da membrana plasmática dos esporos, detectada pelo fluoróforo iodeto de propídio. A capacidade da osmotina em permeabilizar membranas plasmáticas parece ser específica, pois esta não foi capaz de lisar eritrócitos de coelho mesmo após concentrações tão

altas como 650 µg/ml. Esta concentração é 30 vezes maior que a capaz de alterar a permeabilidade de lipossomos.

As proteínas que apresentam atividade antifúngica e atuam sobre a membrana plasmática possuem uma grande variedade de estruturas tridimensionais. Entretanto, todas apresentam, no mínimo, duas características em comum: uma carga líquida positiva em condições fisiológicas, que promoverá a interação com a superfície carregada negativamente da membrana plasmática de microorganismos e uma estrutura hidrofóbica ou neutra que permitirá a formação dos poros (EPAND e VOGEL, 1999; TOSSI *et al.*, 2000; WON *et al.*, 2008). Logo, pode-se inferir que a osmotina de *C. procera* atua na defesa da planta contra fungos agindo sobre a membrana plasmática destes. A literatura também descreve que osmotinas alteram a permeabilidade da membrana plasmática de fungos (NARASIMHAN *et al.*, 2001).

A atividade antifúngica da osmotina foi dependente de sua estrutura tridimensional, pois quando esta foi reduzida com DTT a atividade antifúngica contra *F. salani*, *Neurospora sp.* e *C. gloeosporioides* foi perdida. Isso se deve ao fato que a osmotina, na presença de DTT, foi fragmentada em três peptídeos com massas moleculares diferentes, confirmados por espectrometria de massas.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O látex de *C. procera* é rico em atividade proteolítica do tipo cisteínica, além da evidência da presença de proteinases aspárticas. A atividade proteolítica total foi promovida por pelo menos quatro proteinases com distintas massas moleculares e com poucos determinantes imunogênicos em comum com a papaína.

Apesar da planta *C. procera* ter sido pouco estudada, possuindo poucos dados de seqüências nos bancos de dados, o número de proteínas identificadas por técnicas proteômicas foi surpreendente, revelando que o látex é rico em proteínas relacionadas com a defesa da planta contra fungos e insetos.

A atividade antifúngica encontrada no látex de *C. procera* está associada a diferentes proteínas, incluindo proteinases cisteínicas e osmotinas, que podem agir sinergicamente na defesa da planta. Além destas duas proteínas, quitinases, inibidores de proteinases e proteínas transferidoras de lipídeos detectadas no látex também podem atuar na defesa da planta.

6. PERSPECTIVAS

O presente trabalho gera grandes perspectivas na purificação de proteínas com atividades inseticidas ou fungicidas, como quitinases, proteinases, inibidores de proteinases, peroxidases e proteínas transferidoras de lipídeos.

A separação de sub-frações celulares do látex poderá revelar a presença de proteínas pouco abundantes, que poderão ser alvos de purificação e estudos de atividade biológica, de modo a contribuir para um maior entendimento da função do látex nas plantas.

O isolamento do RNAm da osmotina purificada será útil na caracterização estrutural mais detalhada desta proteína. Além disto, este RNAm poderá ser utilizado em estudos de transformação genética de cultivares susceptíveis a fungos fitopatogênicos, além de poder conferir às plantas maior resistência ao estresse hídrico ou salino ou atuar como uma proteína crioprotetora.

7. REFERÊNCIAS

- ABAD, L.R., D'URZO, M.P., LIU, D., NARASIMHAN, M.L., REUVENI, M., ZHU, J.K. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science.**, 118:11–23. 1996
- AGIZZIO, A.P., CARVALHO, A.O., RIBEIRO, S.F.F., MACHADO, O.L.T., ALVES, E.W., OKOROKOV, L.A., SAMARÃO, S.S., BLOCH JR., C., PRATES, M.V., GOMES, V.M. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, 416: 188–195. 2003
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, Academic Press Inc., London. 1997.
- ALIA, P., SARADHI, P., MOHANTY, P. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamageThe **Journal of Photochemistry and Photobiology.**,38 : 253–257. 1997.
- BATALIA, M.A., MONZINGO, A.F., ERNST, S., ROBERTUS, J.D. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. **Nature Structural & Molecular Biology.**, 3:19–23. 1996.
- BECKER-RITT, A.B., MARTINELLI, A.H.S., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G.E., SANTI, L., VAINSTEINA, M.H., OLIVEIRA, J.T.A.,

- FIUZA, L.M., PASQUALIA, G., CARLINI, C.R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon.**, 50: 971–983. 2007.
- BERNOUX, M., TIMMERS, T., JAUNEAU, A., BRIÈRE, C., WIT, P.J.G.M., MARCO, Y., DESLANDES, L. RD19, an Arabidopsis Cysteine Protease Required for RRS1-R-Mediated Resistance, Is Relocalized to the Nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 Effector. **The Plant Cell.**, 20: 2252–2264. 2008.
- BROEKAERT, W. F., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, 69: 61-66. 1990.
- CARUSO, C., CHILOSI, G., LEONARDI, L., BERTINI, L., MAGRO, P., BUONOCORE, V., CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry.**, 58: 743–750. 2001.
- CHANDRASHEKAR, K.R., SANDHYARANI, S. Salinity induced chemical changes in *Crotalaria striata* DC. Plants, **Indian Journal Plant of Physiology.**, 1: 4-48. 1996.
- CHANG, H.T., CHENG, Y.H., WUA, C.L., CHANG, S.T., CHANG, T.T., SU, Y.C. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. **Bioresource Technology.**, 99: 6266–6270. 2008.
- CHU, K.T., NG, T.B. Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the Kweilin chestnut *Castanopsis chinensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, 301: 364–370. 2003.

EPAND, R.M., VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1462: 11-28. 1999.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology.**, 8: (5), 677–700. 2007.

FREIRE, M.G.M., GOMES, V.M., CORSINI, R.E., MACHADO, O.L.T., SIMONE, S.G., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry.**, 40: 61–68. 2002.

GHOSH, R., CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta.**, 228:883–890. 2008

GIORDANI, R., SIEPAIO, M., MOULIN-TRAFFORT, J., REGLI, P. Antifungal action of *Carica papaya* latex: isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes. **Mycoses.**, 34, 469–477. 1991.

GIORDANI, R., GACHON, C., BUC, J., REGLI, P., JACOB, J. L. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. **Mycoses.**, 42, 465–474. 1999.

GIORDANI, R., REGLI, P., BUC, J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. **Mycoses.**, 45, 476–481. 2002.

GRENIER, J., POTVIN, C., TRUDEL, J., ASSELIN, A. Some thaumatinlike proteins hydrolyze polymeric β -1,3-glucans. **Plant Journal.**, 19: 473–480. 1999.

GUEVARA, M.G., DALEO, G.R., OLIVA, C.R. Purification and characterisation of an aspartic protease from potato leaves. **Physiology Plant.**, 112: 321–326. 2001.

GUEVARA, M. G., OLIVA, C. R., HUARTE, M., DALEO, G. R. An aspartic protease with antimicrobial activity is induced after infection and wounding in intercellular fluids of potato tubers. **European Journal of Plant Pathology.**, 108, 131–137. 2002.

GUEVARA, M. G., VERÍSSIMO, P., PIRES, E., FARO, C., DALEO, G.R. Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. **Journal of Plant Pathology.**, 86, 233–238. 2004.

HAO, L., HSIANG, T., GOODWIN, P.H. Role of two cysteine proteinases in the susceptible response of *Nicotiana benthamiana* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*. **Plant Science.**, 170: 1001-1009. 2006.

HEJAARD J, JACOBSEN S, SVENDSEN I. Two: thaumatin-like proteins from barley grain. **FEBS Letters.**, 291:127–31. 1991.

HERMOSA, M.R., TURRA, D., FOGLIANO, V., MONTE, E., LORITO, M. Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology.**, 68: 138–148. 2006.

- HO, V.S.M., WONG, J.H., NG, T.B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides.**, 28: 760-766. 2007.
- HONG, J.K., JUNG, H.W., LEE, B.K., LEE,S.C., LEE,Y.K., HWANG, B.K. An *osmotin-like protein gene*, CAOSM1, from pepper: differential expression and in situ localization of its mRNA during pathogen infection and abiotic stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology.**, 64: 301–310. 2004.
- HUSAINI, A.M., ABDIN, A.Z. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. **Plant Science.**, 174: 446–455. 2008.
- JAYARA, J., PUNJA, Z.K. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. **Plant Cell Rep.**, 26:1539–1546. 2007.
- JI, C., KUC, J. Antifungal activity of cucumber beta-1,3-glucanase and Chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology.**, 49, 257-265. 1996.
- KANOKWIROON, K., TEANPAISAN, R., WITITSUWANNAKUL, D., HOOPER, A.B., WITITSUWANNAKUL, R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses.**, 51, 301–307. 2007.
- KAVITHA, M., SULTAN, N.A.M., SWAMY, M.J. Fluorescence studies on the interaction of hydrophobic ligands with *Momordica charantia* (bitter gourd) seed lectin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.**, 94: (1) 59-64. 2009.

- KOIWA, H., KATO, H., NAKATSU, T., ODA, J., YAMADA, Y., SATO, F. Purification and characterization of tobacco pathogenesis-related protein PR-5d, an antifungal thaumatin-like protein. **Plant Cell Physiology.**, 38: 783–91. 1997.
- KOIWA, H., KATO, H., NAKATSU, T., ODA, J., YAMADA, Y., SATO, F. Crystal Structure of Tobacco PR-5d Protein at 1.8 Å Resolution Reveals a Conserved Acidic Cleft Structure in Antifungal Thaumatin-like Proteins. **Journal Molecular Biology.**, 286, 1137-1145. 1998.
- KOIWA, H., KATO, H., NAKATSU, T., ODA, J., YAMADA, Y., SATO, F. Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. **Journal Molecular Biology.**, 286:1137-1145. 1999.
- KRÜGER, J., THOMAS, C.M., GOLSTEIN, C., DIXON, M.S., SMOKER, M., TANG, S., MULDER, L., JONES, J.D.G. A Tomato Cysteine Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. **Science.**, 296(5568): 744 – 747. 2002.
- LADOKHIN, A.S., JAYASINGHE, S., WHITE, S.H. How to Measure and Analyze Tryptophan Fluorescence in Membranes Properly, and Why Bother? **Analytical Biochemistry.**, 285, 235–245. 2000.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature.**, 227: 680-685. 1970.
- LAURENCE, M.B., VRIET, C., PEUMANS, W.J., BARRE, A., VAN DAMME, E.J.M., ROUGE, P. A molecular basis for the endo- β -1,3- glucanase

- activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. **Biochimie.**, 85:123–31. 2003.
- LEAH, R., TOMMERUP, H., SVENDSEN, I., MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. **Journal of Biological Chemistry.**, 246:1564–1573. 1991
- MASUKO, T., MINAMI, A., IWASAKI, N., MAJIMA, T., NISHIMURA, S.I., LEE, Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry.**, 339: 69-72. 2005
- MCCLARE, C.W.F. An accurate and convenient organic phosphorus assay. **Analytical Biochemistry.**, 39(2): 527-530. 1971
- MELO, V.M.M., VASCONCELOS, I.M., GOMES, V.M., CUNHA, M., SOARES, A.A., OLIVEIRA, J.T.A. A cotyledonary agglutinin from *Luetzelburgia auriculata* inhibits the fungal growth of *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* and *Aspergillus niger* and impairs glucose-stimulated acidification of the incubation medium by *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Plant Science.**, 169: 629-639. 2005.
- MENDIETA, J.R., PAGANO, M.R., MUNOZ, F.F., DALEO, G.R., GUEVARA, M.G. Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. **Microbiology.**, 152: 2039–2047. 2006.
- MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology.**, 6: 245–252. 2003.
- MOULIN-TRAFFORT, J., GIORDANI, R., REGLI, P. Antifungal action of latex saps from *Lactuca sativa* and *Asclepias curassavica*. **Mycoses.**, 33: 383–392. 1990.

- NARASIMHAN, M.L., DAMSZ, B., COCA, M.A., IBEAS, J.I., YUN, D.J., PARDO, J.M., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. **Molecular Cell.**, 8: 921-930. 2001.
- NARASIMHAN, M.L., DAMSZ, B., COCA, M.A., JIN, J., YAMAUCHI, T., ITO, Y., KADOWAKI, T., KIM, K.K., PARDO, J.M., DAMSZ, B., HASEGAWA, P.M., YUN, D.J., BRESSAN, R.A. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. **Molecular Cell.**, 17: 171-180. 2005.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger, Princípios de Bioquímica**. Ed Sarvier. 4^o edição. pp 975. 2005.
- NEWTON, S.S., DUMAN, J.G. An osmotin-like cryoprotective protein from the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Plant Molecular Biology.**, 44: 581–589. 2000.
- NG, T.B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides.**, 25: 1215-1222. 2004.
- ONISHI, M., TACHI, H., KOJIMA, T., SHIRAIWA, M., TAKAHARA, H. Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of PR-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant Physiology and Biochemistry.**, 44: 574–580. 2006.
- OSMOND, R.I.W., HRMOVA, M., FONTANE, F., IMBERTY, A., FINCHER, G.B. Binding interactions in between barley thaumatinlike proteins and (1,3)- β -D-glucans. **European Journal Biochemical.**, 268:4190–9. 2001.

- PEREIRA, L. S.; GOMES, M. V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P., XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. **Revista Brasileira de Botânica.**, 22(1): 1-8. 1999.
- PEREZ-ALFOCEA, F., ESTAN, M.T., CARO, M., GUERRIER G. Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculantum* and *L. pennillii* under NaCl and polyethylene glycol. 6000 iso-osmotic stresses. **Physiology Plant.**, 87: 493–498. 1993.
- RAJAM, M.V., CHANDOLA, N., GOUD, P.S., SINGH, D., KASHYAP,V., CHOUDHARY, M.L., SIHACHAKR, D. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. **Biologia Plantarum.**, 51 (1): 135-141. 2007.
- REISS, E., SCHLESIER, B., BRANDT, W. cDNA sequences, MALDI-TOF analyses, and molecular modelling of barley PR-5 proteins. **Phytochemistry.**, 67: 1856–1864. 2006.
- SA, J.M., CHIOATO, L., FERREIRA, T.L., De OLIVEIRA, A.H., RULLER, R., ROSA, J.C., GREENE, L.J., WARD, R.J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane damaging activity. **Biochemical Journal.**, 382: 191–198. 2004.
- SAMUEL, D., KUMAR, T.K.S., GANESH, G., JAYARAMAN, G., YANG, P.W., CHANG, M.M., TRIVEDI, V.D., WANG, S.L., HWANG, K.C., CHANG, D.K., YUN, C. Proline inhibits aggregation during protein refolding. **Protein Science.**, 9: 344–352. 2000.

SINGH, N.K., BRACKER, C.A., HASEGAWA, P.M., HANDA, A.K., BUCKEL, S., HERMODSON, M.A. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology.**, 85:529–36. 1987.

SREERAMA, N., WOODY, R.W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry.**, 287, 252–260. 2000.

SRIDEVI, G., PARAMESWARI, C., SABAPATHI, N., RAGHUPATHY, V., VELUTHAMBI, K. Combined expression of chitinase and b-1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. **Plant Science.**, 175: 283–290. 2008.

SUBROTO, T., VRIES, H., SCHURINGA, J.J., SOEDJANAATMADJA, U.M.S., HOFSTEENGED, J., JEKEL, P.A., BEINTEMA, J.J. Enzymic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (lutoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology Biochemical.**, 39: 1047–1055. 2001.

SZABÓ, A., KOTORMÁN, M., LACZKÓ, I., SIMON, L.M. Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. **Process Biochemistry.**, 44: 199–204. 2009.

TAIRA, T., OHDOMARI, A., NAKAMA, N., SHIMOJI, M., ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of Gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex Chitinases: Both the chitin-binding and the antifungal activities of

class I Chitinases are reinforced with increasing ionic strength.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry., 69: 811-818. 2005.

TOSSI, A., SANDRI, L. AND GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers.**, 55, 4–30. 2000.

VANDER W.H., LOEVE, K. Isolation and characterization of thaumatin I & II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **European Journal Biochemical.**, 31: 221-225. 1972.

VASCONCELOS, I.M. MORAIS, J.K.S., SIEBRA, E.A., CARLINI, C.R., SOUSA, D.O.B., BELTRAMINI, L.M., MELO, V.M.M., OLIVEIRA, J.T.A. SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. **Toxicon.**, 51, 952–963. 2008.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Plant Physiology.**, 44, 135–162. 2006.

VELAZHAHAN, R., DATTA, S.K., MUTHUKRISHNAN, S. **The PR-5 family: thaumatin-like proteins in plants.** In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. Pathogenesis-related proteins in plants. Boca Raton, FL: CRC press, p. 107–129. 1999.

VINCENT S.M. HO, JACK H. WONG, T.B. NG. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana. **Peptides.**, 28: 760-766. 2007.

VIVIAN, J.T., CALLIS, P.R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. **Biophysical Journal.**, 80: 2093–2109. 2001.

- WANG, H. X., NG, T.B. An antifungal peptide from red lentil seeds. **Peptides.**, v. 28, p. 547-552. 2007.
- WON, H.S., KANG, S.J., LEE, B.J. Action mechanism and structural requirements of the antimicrobial peptides, gaegurins. **Biochimica et Biophysica Acta.** doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.021. 2008.
- WONG, J.H., NG, T.B. Sesquin, a potent defensins-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides.**, 26:1120–1126. 2005.
- YE, X.Y., WANG, H.X., NG, T.B. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, 263: 1002-1013. 1999.
- ZAREIE, R., MELANSON, D.L., MURPHY, P.J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions.**, 15: (10) 1031-1039. 2002.
- ZHU, B., CHEN, T.H.H., LI, P.H. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during the induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. **Plant Molecular Biology.**, 21:729–35. 1993.
- ZHU, B., CHEN, T.H.H., LI, P.H. Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. **Plant Molecular Biology.**, 28:17-26. 1995.

Freitas C.D.T. (2009) Identificação, Purificação, Caracterização...

ZORKO, M., JAPELJ, B., HAFNER-BRATKOVIČ, I., JERALA, R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 1788: 314–323. 2009.



Research article

**Enzymatic activities and protein profile
of latex from *Calotropis procera***

Cleverson Diniz T. Freitas^a, Jefferson Soares Oliveira^a,
Maria Raquel A. Miranda^a, Nívea Maria R. Macedo^a, Maurício Pereira Sales^b,
Laurival A. Villas-Boas^c, Márcio Viana Ramos^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici,
Cx. Postal 6033, Fortaleza, Ceará CEP 60451-970, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

^c Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

Received 6 February 2007; accepted 25 July 2007

Available online 31 July 2007

Abstract

The laticifer fluid of *Calotropis procera* is rich in proteins and there is evidence that they are involved in the pharmacological properties of the latex. However, not much is known about how the latex-containing proteins are produced or their functions. In this study, laticifer proteins of *C. procera* were pooled and examined by 1D and 2D electrophoresis, masses spectrometry (MALDI-TOF) and characterized in respect of proteolytic activity and oxidative enzymes. Soluble laticifer proteins were predominantly composed of basic proteins (PI > 6.0) with molecular masses varying between 5 and 95 kDa. Proteins with a molecular mass of approximately 26,000 Da were more evident. Strong anti-oxidative activity of superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) ($1007.74 \pm 91.89 \text{ U g}^{-1} \text{ DM}$) and, to a lesser extent ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.1) ($0.117 \pm 0.013 \mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), were detected. However, catalase (EC 1.11.1.6) was absent. The strong proteolytic activities of laticifer proteins from *C. procera* were shown to be shared by at least four distinct cysteine proteinases (EC 3.4.22.16) that were isolated by gel filtration chromatography. Serine and metalloproteinases were not detected and aspartic proteinase activities were barely visible. Chitinases (EC 3.2.1.14) were also isolated in a chitin column and their activities quantified. The presence of these enzymatic activities in latex from *C. procera* may confirm their involvement in resistance to phytopathogens and insects, mainly in its leaves where the latex circulates abundantly.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Latex; Proteolytic activity; Oxidative enzymes; Plant defense

1. Introduction

Latex is widely distributed in plants and 12,000–35,000 species have been reported to contain it [14,20]. It is a milky fluid composed of a liquid serum holding, either in suspension or solution, constituting a complex mixture of molecules [25]. A wide range of proteins is found in latex fluids, such as carbohydrate-binding proteins (lectins) and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidases.

These were purified from *Hevea brasiliensis* latex [17,18] and chitinases were detected in *Carica papaya* and *Ficus microcarpa* latexes [4,36]. Proteolytic enzymes, mainly serine and cysteine types, are more abundant proteinases found in latex fluids [27]. Cysteine proteinases have been recently purified to homogeneity from distinct latex fluids [11,24,31] and papain, found in the latex of *C. papaya*, has been continuously studied since it was discovered [5].

Evidences have supported the possible involvement of laticifer proteins (LP) in the plant defense mechanisms [28]. However, additional information about its occurrence, biological activities and structure of latex proteins is still required to confirm this hypothesis.

Abbreviations: LP, laticifer proteins; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Tel.: +55 85 3366 9403; fax: +55 85 3366 9789.

E-mail address: vramos@ufc.br (M.V. Ramos).

The shrub *Calotropis procera* is found mainly in tropical regions and to a lesser extent in sub-tropical areas. The plant is well-known for its great capacity of producing latex which exudates from damaged leaves. There is a growing demand in popular medicine for the different parts of the plant, including the latex, and as a consequence a vast literature describes its related potential. However, limited information about the biochemical properties of the latex of *C. procera* is available. A bacteriolytic enzyme and recently the purification of a cysteine proteinase from *C. procera* latex have been described [12,35], however, these are the only laticifer proteins from *C. procera* of which there is information. The motivations factor for this study is the lack of information available about latex proteins from *C. procera*. Therefore, preliminary bioassays testing the potential of these proteins against insects were recently concluded in our laboratory. The results suggested that the laticifer proteins could be part of the defensive strategies against insects. In an attempt to investigate this hypothesis, a partial biochemical and enzymatic characterization was performed to obtain new information on the occurrence and biological activities of proteins from the latex of *C. procera*.

2. Results and discussion

2.1. Protein content

Six independent samples of the whole latex from *C. procera* were independently prepared as described in Section 4.2.1. The dry mass of rubber in 20 ml was estimated and as shown in Table 1, rubber corresponded to more than 80% of the dry mass while the remaining soluble fraction comprised less than 20%. The content of soluble proteins was shown to be approximately 8 mg ml⁻¹. This suggests that the latex from *C. procera* is a rich source of proteins. Soluble proteins were thus, used to characterize the biochemical and enzymatic profile of the latex. Two-dimensional electrophoresis (2D) analyses revealed that LP exhibits a large range of proteins with relative molecular masses varying from 5000 to 95,000 Da. This information was further checked by masses spectrometry (Fig. 1). In both figures (A and B), an important protein component with an approximate molecular mass of

26,000 Da was seen. Most proteins, by 2D, were distributed in the pH range above 5.5 with prevalence of basic characters. LP was fractionated by gel filtration in a Sephacryl S-100 column (Fig. 2). The fractions recovered were divided in sub-fractions according to the absorbance profile and examined by electrophoresis. As expected, the main protein peak was represented by proteins with molecular mass corresponding to 26,000 Da. These fractions were further tested for proteolytic activities. It was interesting to note that a high molecular weight protein barely detected in LP fraction was seen clearly in electrophoresis (Fig. 2). This protein appeared in PI after the fractionation of LP on Sephacryl. A discrete peak with 95,745 Da was also observed in the masses spectra (Fig. 1).

2.2. Enzymes

2.2.1. Anti-oxidative enzymes

Both abiotic and biotic stresses may enhance the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) [3,16]. Most ROS are generated in plants due to dismutation of superoxide, which is formed as a result of a single electron transfer to molecular oxygen in an electron transfer chain, mainly in the chloroplasts. Hydrogen peroxide plays an important role in plant defense mechanisms as its generation is one of the earliest responses to phytopathogenic microorganism invasion. H₂O₂ generated during the oxidative burst under biotic stress is involved in restricting pathogen growth and inducing pathogenesis related (PR) proteins, such as phytoalexins and anti-oxidant enzymes [7,21].

The activity of the anti-oxidant enzymes in LP fraction is presented in Table 1. Superoxide dismutase (SOD) activities are high in latex, thus SOD might play an important role in dismutation of superoxide radicals. Catalase (CAT) activities were not detectable, although there were ascorbate peroxidase (APX) activities indicating that APX contributes, to some extent, in H₂O₂ detoxification in the latex of *C. procera*. Enzymes involved in anti-oxidative metabolism have been described as occurring in other laticifer materials [8,38]. Although the absence of catalase activity agrees with the results of other studies that failed to detect such activity in latex

Table 1
Recoveries of rubber and proteins from the whole latex of *C. procera* and anti-oxidative enzyme activities investigated in LP fraction from *C. procera*

Samples ^a	Dry mass of rubber		Dry mass of lyophilized proteins		Total mass of protein in the whole latex (mg ml ⁻¹)	Total soluble proteins in LP (mg ml ⁻¹) ^b
	mg	%	mg	%		
X	1.314	82.52	277.83	17.48	13.88	8.85
SD	±0.14	±3.63	±62.31	±3.63	±3.12	±1.87
Enzymes						Activity
Ascorbate peroxidase						0.117 ^d ± 0.013 μMol H ₂ O ₂ g ⁻¹ min ⁻¹
Catalase						Not detected
Superoxide dismutase						1007.749 ± 91.892 U g ⁻¹ DM

^a Six independent samples of 20 ml of latex from *C. procera* were prepared as described in Section 4.2.1. Dry mass of lyophilized proteins (LP) was considered as the fraction free of rubber.

^b Soluble proteins were estimated by Bradford using a 10 mg ml⁻¹ solution of LP.

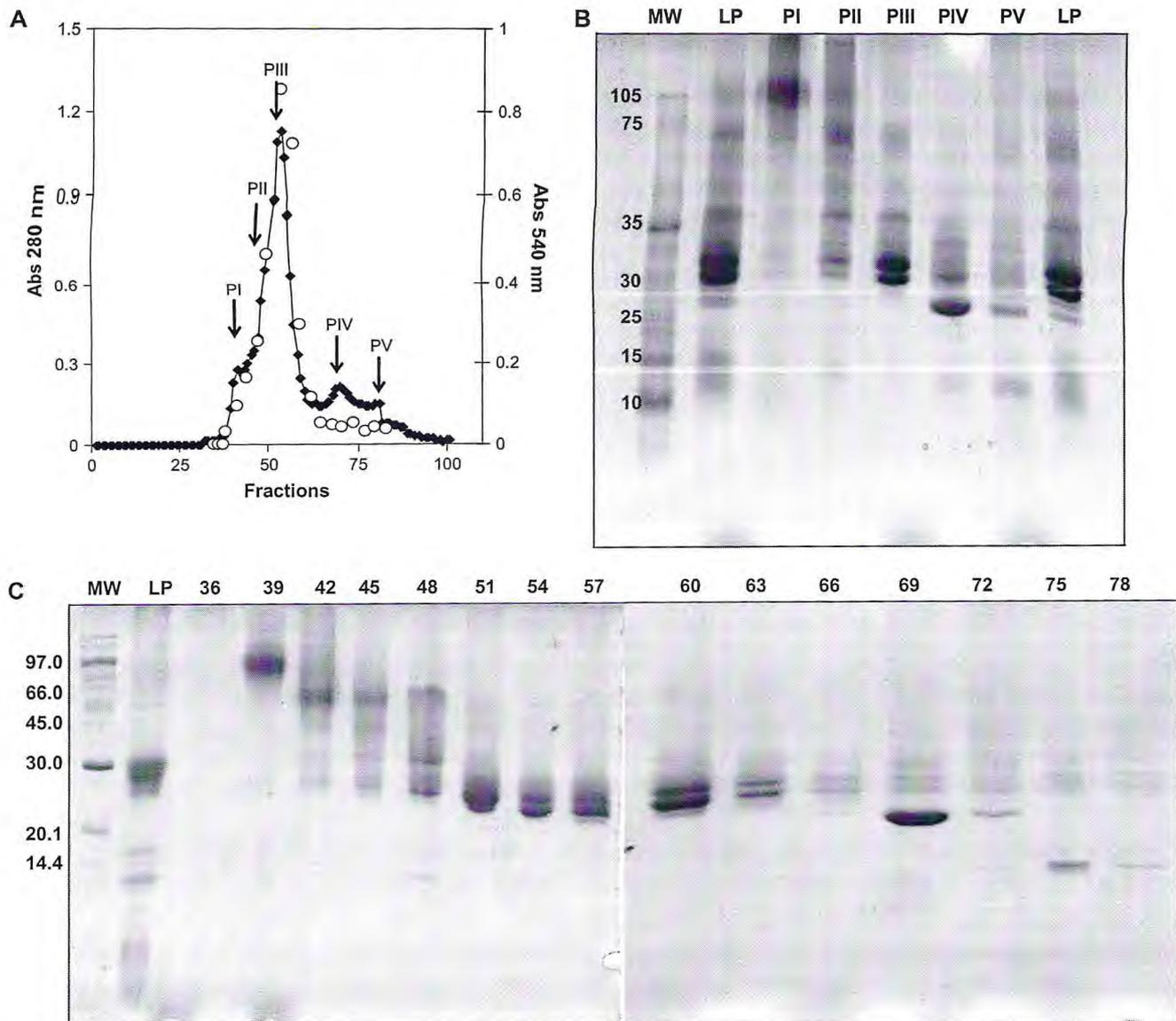


Fig. 2. (A) Gel filtration chromatography on Sephacryl-100 (104 × 2 cm) column and proteolytic activity (○) in the fractions using BANA as substrate. Laticifer proteins (30 mg ml⁻¹) were eluted with 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 7.9. Flow rate: 0.5 ml/min. Fractions: 2.5 mL. Arrows indicate intervals of fractions used to separate and poll the peaks. (B) Polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis of the peaks recovered after gel filtration. Molecular weight markers were from Amersham Biosciences Product N. RPN 800. (C) Polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis of sequential fractions recovered during gel filtration on Sephacryl S-100. Numbers correspond to fractions collected. Molecular weight markers were from Amersham Biosciences Product N. 17-0446-01. Proteolytic activity against BANA was detected in fractions: 42–69 with a maximum of 51.

was more active. However, saturation of the column was considered because activity in PI was considerably diminished while PII was similar, when the chromatography was developed with 25 mg of LP instead of 50 mg. Class I chitinase has been found in the latex of *F. microcarpa* and other latex fluids and this activity has been shown to exhibit anti-fungal activity [36]. Class II chitinases have been described in *C. papaya* latex [4]. The physiological role of plant chitinases is thought to protect plants against phytopathogenic fungi by degrading chitin, the major component of the cell walls of many fungi. A chitin-binding protein named hevein was first detected in the latex of *H. brasiliensis*. This short peptide is a potent anti-fungal agent but devoid of chitinolytic

activity. Following this view, chitinases present in the latex of *C. procera* are thought to form part of the defensive strategy of the plant.

2.2.3. Proteolytic activity

The ability of LP to digest substrates for endoproteinases, such as azocasein, BANA and BA_pNA was determined in different pH conditions (Fig. 4). The proteolysis in the presence of azocasein was more intense in pH 5.0. However, when LP was activated with DTT prior to the proteolysis, the total activity was greatly increased and the optimum pH was observed at pH 6.0. This result confirms the presence of a strong

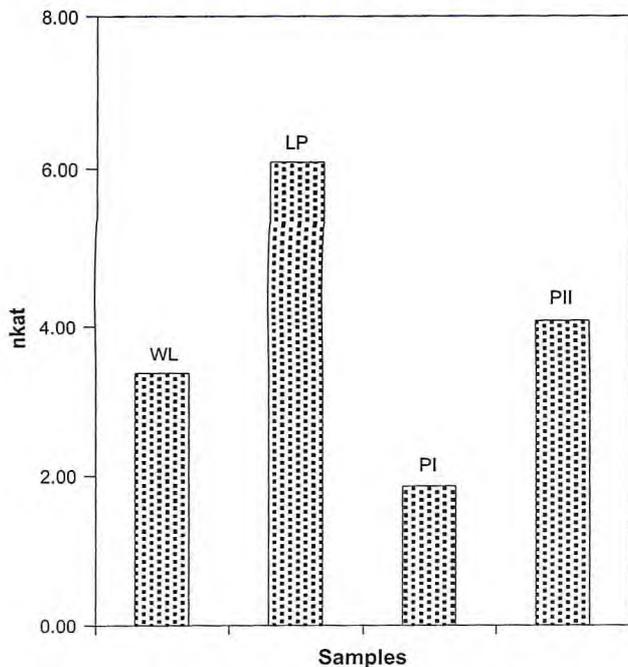


Fig. 3. Chitinolytic activity content in the whole latex of *C. procera* (WL), LP and chromatographic (PI) and (PII) peaks obtained after passing through a chitin column.

proteolysis in this latex which is mediated by cysteine proteinases activated by DTT [12].

Proteolysis of LP on BANA, a cysteine proteinase specific substrate, was higher at pH 6.0, however, lower to that of azocasein. This information and the fact that LP has ability to degrade azocasein without prior activation with DTT suggest the presence of proteolytic activity other than that of cysteine proteinases. Such an activity could not be attributed to serine proteinases since no proteolysis was detected when LP was assayed against BApNA.

In addition, the proteolytic activity of LP was investigated in gelatin-containing gel at different pH (data not shown). Stronger proteolysis was detected at pH 5.0. Four distinct bands were also easily identified, suggesting the presence of at least four endogenous proteinases. Multiple cysteine proteinases have been described in the latex of *Calotropis gigantea* [2,32]. Recent works by Dubey and Jagannadham [12,13] suggested the presence of at least four distinct cysteine proteinases in *C. procera* latex and thus confirm the findings of this study. Other authors suggest that the presence of cysteine proteinase in different latex fluids may somehow be related to the defensive role of latex [37].

2.3. Characterization of proteolytic activity

Further characterization of the proteolytic activities was performed in inhibitory assays using specific inhibitors of proteinases. The inhibitors PMSF, EDTA and EGTA did not alter the total proteolytic activity of LP, however, E-64, a specific inhibitor of cysteine proteinase consistently diminished the proteolysis. Lack of inhibition by PMSF, EDTA and EGTA

confirms the absence of serine and metalloproteinases in LP. However, pepstatin, which specifically inhibits aspartic proteinases was also a strong inhibitor of azocasein proteolysis (Fig. 4). This data could explain the proteolysis of azocasein at the pH optimum of 5.0, observed when LP was not activated by DTT, and highlights the presence of an aspartic proteinase.

Digestion of BANA by LP was affected by PMSF, E-64 and iodoacetamide. The two latter inhibitors are highly specific for cysteine proteinases and thus confirm the previous results. PMSF, which is a common inhibitor of serine proteases, is reported to be able to inhibit cysteine proteinases [15].

Heat treatment of LP prior to proteolysis on azocasein affected enzymatic activities at 60 °C followed by a progressive loss of activity up to 90 °C (Fig. 5). This was not observed when BANA was used as a substrate. In this case, proteolysis was progressively reduced and annulled at 90 °C.

3. Conclusions

Little information is available about the biochemical activities present in the latex of *C. procera*. This work analyzed the protein and enzymatic profile of the latex after separating the proteins and rubber fractions. The latex was shown to be a rich source of proteins with distinguished proteolytic potency and anti-oxidant capacity. Among the evaluated anti-oxidant enzymes, superoxide dismutase was mainly responsible for ROS elimination. Cysteine proteinases were the stronger enzymatic activities detected and quantified but aspartic proteinases were also present. The presence of cysteine proteinases could be related to a defensive role of latex in plants. Likewise, the presence of chitinases reinforces the probable involvement of the latex in defensive actions. As initially stated, proteins of *C. procera* latex have been shown to have interesting effects on insects when tested in preliminary bioassays. Such results will appear elsewhere in the future. It is now expected that the occurrence of the chitinase and proteolytic enzymes in the latex could explain detrimental effects observed upon insects and this hypothesis is currently being tested. In conclusion, the soluble protein phase of *C. procera* latex emerges as a very interesting source of different classes of proteins worthy of being exploited as protecting proteins.

4. Methods

4.1. Chemicals

N-Benzoyl-DL-argininyl-*p*-nitroanilide (BapNA), *N*-benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide hydrochloride (BANA), *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino)-butane (E-64), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetra acetic acid (EGTA), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 4-(dimethyl-amino)cinnamaldehyde, pepstatin (PEP) and azocasein were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Iodoacetamide (IAA), molecular weight markers and Sephacryl S-100 were from Amersham Biosciences. Others chemicals were of analytical grade.

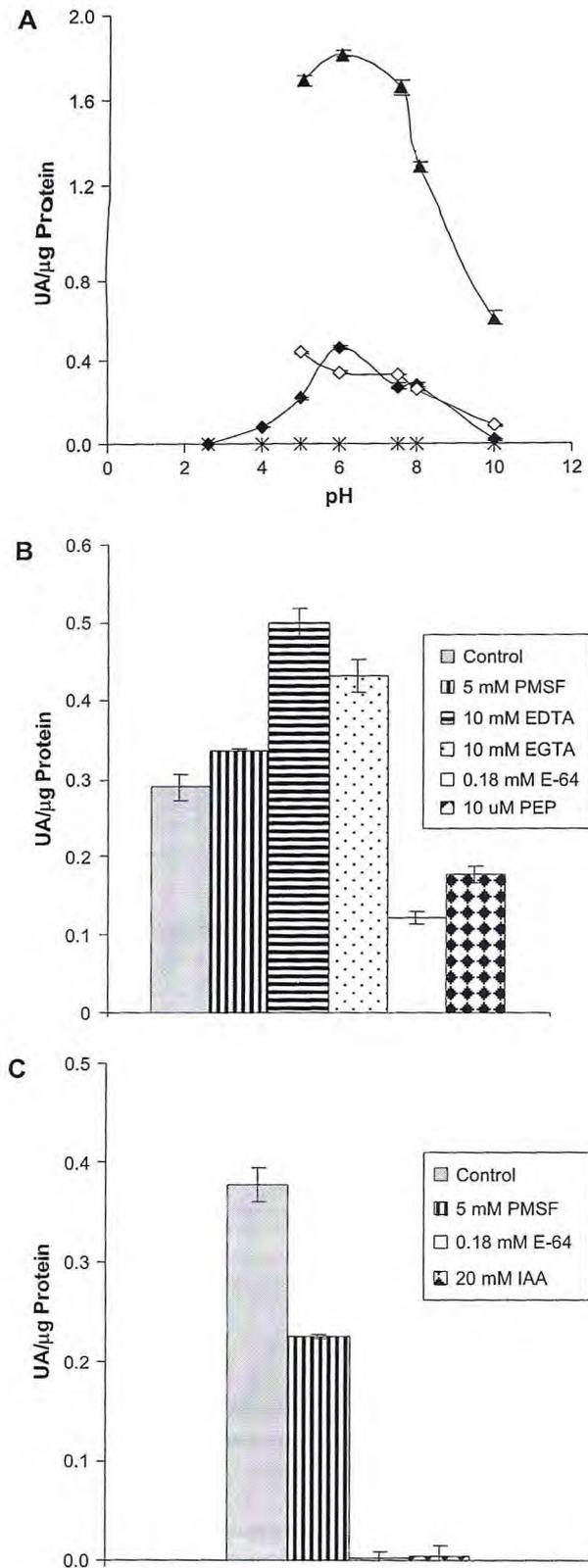


Fig. 4. Effect of pH on the proteolytic activity of LP (A) using azocasein (◇); BApNA (×); and proteolytic activity of LP pre-activated with DTT using Azocasein (▲) or BANA (●) and effects of various enzyme inhibitors on the proteolytic activity of laticifer proteins from *Calotropis procera*, using (B) azocasein and (C) BANA + DTT, as substrates. Each point has $n = 3$. Error bars indicate standard error of the mean.

4.2. Protein extraction and biochemical analysis

4.2.1. Latex preparation

The crude latex from *C. procera* (Ait.) R.Br. was collected from non-cultivated healthy plants and placed in distilled water (ratio of 1:1) and kept at room temperature until laboratory analysis was undertaken. The plant exsiccate (sample specimen no. 32663) as authenticated by Prof. Edson Paula Nunes, was deposited at the Prisco Bezerra Herbarium of the Universidade Federal do Ceará, Brazil.

Natural coagulation-like effect of the material was partially prevented by gentle agitation during collection. The samples were centrifuged at $5000 \times g$, 10 min at 4°C and the supernatant, still containing non-precipitated rubber, was exhaustively dialyzed in distilled water and once more submitted to centrifugation as described. The clean supernatant, devoid of rubber, was lyophilized and stored until use; this fraction was denominated as laticifer proteins (LP). The dialysis step successfully precipitated 100% of the remaining rubber, and washed out small metabolites soluble in water. This was achieved using dialysis tube with a cut off of 8000 Da. After this procedure, the sample was expected to contain concentrated proteins.

4.2.2. Protein determination

Protein content was measured according to the Bradford procedure with bovine serum albumin as the protein standard [10].

4.2.3. 1D SDS-PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS (PAGE-SDS) and 2-mercaptoethanol was performed as described by Laemmli [23]. Protein samples were dissolved in sample buffer [0.0625 M Tris buffer (pH 6.8) containing 2% SDS]. Runs were performed at 25 mA per gel at 25°C for 4 h. Gels were stained with coomassie brilliant blue (R-350) solution in water:acetic acid:methanol (8/1/3.5, v/v/v) and de-colored with the same solution without the dye.

4.2.4. 2D SDS-PAGE

Eleven centimeter Immobiline DryStrips, pH 3–10 or 6–11 (Amersham Biosciences) were rehydrated overnight with buffer [7 M urea/2 M thiourea/1% CHAPS/2% appropriate IpG-buffer/bromophenol blue] containing the proteins. The electrophoretic run was performed on an Ettan IPGphor II system from Amersham Pharmacia Biotech. Electrical conditions were as suggested by the supplier. After the first-dimensional run, the IpG gel strips were incubated at room temperature to equilibrate the strips in 3 ml of equilibration buffer (50 mM Tris, 30% Glycerol, 6 M urea, 2% SDS and traces of bromophenol blue). The second dimension electrophoresis was performed on a vertical system with uniform 12.5% separating gel (14×14 cm), at 25°C . Protein spots in 2-DE gels were seen by silver staining. Each experiment was conducted in duplicate. The gels were scanned using an Imager Scanner (Amersham Biosciences) with the help of LabScan software. All details of individual gels and comparative analysis

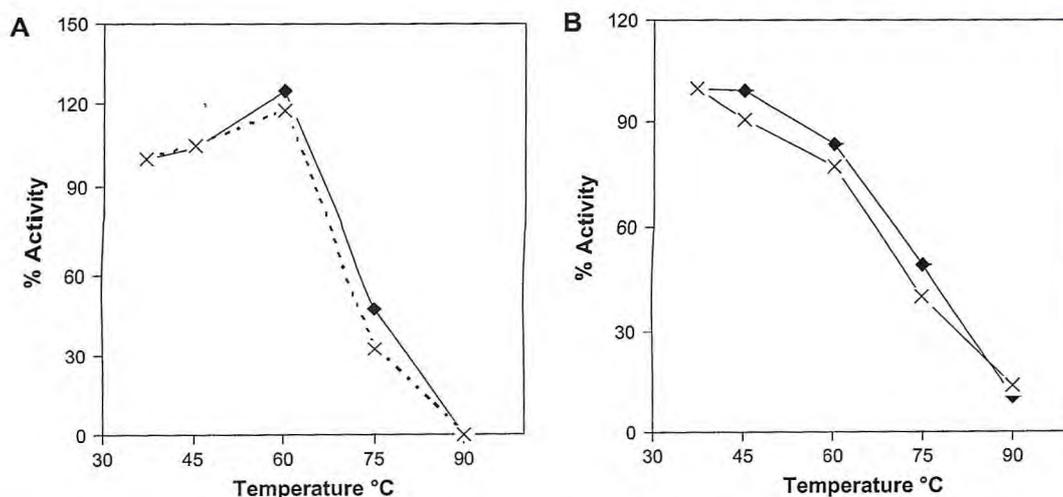


Fig. 5. Thermo-stability of the proteolytic activity of LP using (A) azocasein or (B) BANA + DTT, as substrates. (◆) 15 min and (×) 30 min. Each point has $n=3$. Error bars indicate standard error of the mean.

were performed using ImageMaster 2D Platinum Software (Amersham Biosciences).

4.2.5. Masses spectrometry

The protein profile of LP was performed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) and Time of Fly (TOF) analysis to obtain a masses spectrometry map using a Vision 2000 TOF-Voyager instrument (Finningan Mat. Bremen, Germany) equipped with a 337 UV laser.

4.3. Protein isolation

4.3.1. Gel filtration chromatography (Sephacryl S-100)

Samples of LP fraction (30 mg ml^{-1}) were submitted to gel filtration in a Sephacryl S-100 column ($104 \times 2 \text{ cm}$) that was previously equilibrated with 50 mM ammonium bicarbonate buffer (pH 7.9). The sample, in the same buffer, was separated from insoluble material (centrifugation at $20,000 \times g$ at 4°C for 20 min) and loaded on to the column. Protein elution was performed with the same buffer at a flow rate of 0.5 ml/min and the protein profile was measured at 280 nm. The resulting fractions were checked by electrophoresis and proteolytic activity.

4.3.2. Affinity chromatography on chitin

Samples of 50 or 25 mg of LP were dissolved in 5 ml of saline isotonic (150 mM) and subjected to centrifugation for 10 min at 10°C and $10,000 \times g$ for removal of any insoluble material. The cleared samples were applied to a chitin column ($2 \times 15 \text{ cm}$) previously equilibrated with the corresponding solution and the column was washed until the absorbance at 280 nm of the eluted samples reached a value close to zero. The proteins bound to the column were eluted by washing the column with 1 M acetic acid. Pooled fractions were tested for chitinolytic activity.

4.4. Enzymatic assays

4.4.1. Anti-oxidative enzymes (SOD, CAT and APX)

The lyophilized LP fraction was investigated for anti-oxidant enzyme activity. Samples of $200 \mu\text{g}$ were homogenized with a mortar and pestle in 4 ml of ice-cold extraction buffer [100 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.0) + 0.1 mM EDTA]. The homogenate was filtered through a muslin cloth and centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min. The supernatant fraction was used as a crude extract for enzyme activity assays and all the procedures above were performed at 4°C . The following analyses were determined in duplicate and the results were expressed as a mean value \pm SEM.

Total superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) activity was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium chloride (NBT), as described by Ref. [16]. The reaction mixture (1.5 ml) contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM methionine, 75 mM NBT, 2 mM riboflavin and 50 μl enzyme extract. Riboflavin was added last and the tubes were shaken and illuminated under two 20 W fluorescent lamps. The reaction was left for 15 min, after which the lights were switched off and the tubes covered with a black cloth. The absorbance of the reaction mixture was measured at 560 nm. One unit of SOD activity (U) was defined as the amount of enzyme required to cause a 50% reduction in the NBT photoreduction rate. The results were expressed as U g^{-1} of dry mass (DM).

Total catalase (CAT, EC 1.11.1.6) activity was measured according to the Beers and Sizer's method [6]. The reaction mixture (1.5 ml) consisted of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 20 mM H_2O_2 and 50 μl enzyme extract. The reaction was started by adding the enzyme extract, and the decrease in H_2O_2 was monitored at 240 nm and quantified by its molar extinction coefficient ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The results were expressed as $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DM}$.

Total ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) activity was assayed according to Nakano and Asada [30]. The reaction mixture (1.5 ml) composed of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM ascorbate, 1.0 mM H₂O₂ and 50 µl enzyme extract. The reaction was started by adding H₂O₂ and ascorbate oxidation was measured at 290 nm for 1 min. Enzyme activity was measured using the molar extinction coefficient for ascorbate (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹) and the results expressed in µMol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ DM, taking into consideration that 2 mol ascorbate are required for a reduction of 1 mol H₂O₂.

4.4.2. Chitinolytic activity

The colorimetric assay was performed using a modification of Ref. [9]. The assay mixture contained 250 µl of LP (1 mg ml⁻¹) in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.2) and 2 mg of colloidal chitin in a total volume of 500 µl. It was incubated at 37 °C for 60 min. The reaction was boiled for 5 min and then centrifuged (10,000 × g for 20 min). For each 300 µl of the supernatant, 100 µl of 0.6 M potassium tetraborate were added and the amount of *N*-acetyl-glucosamine liberated was determined according to Reissig et al. [33]. The activity was determined from a calibration curve according to Boller et al. [9]. The controls included enzyme and substrate blanks as well as internal standards.

4.4.3. Total proteolytic activity

Azocasein was used as a non-specific substrate to investigate total proteolytic activity in LP. The reaction mixture contained 50, 100, 150 or 200 µl (1 mg ml⁻¹) of the LP (pre-incubated or not with 3 mM DTT for 10 min) and 200 µl of 1% azocasein in 50 mM PBS buffer (pH 6.0). The reaction was performed at 37 °C and stopped 60 min later by adding 300 µl of 20% trichloroacetic acid (TCA). The tubes were centrifuged (5000 × g for 10 min at 25 °C) and the supernatants were alkalized with 400 µl of 0.2 N NaOH solution. The color developed was measured by absorbance at 420 nm [39]. One unit of activity was defined as the amount of enzyme capable of increasing absorbance by 420 nm at 0.01.

4.4.4. Assays for cysteine proteinases

Assays for cysteine proteinases were conducted utilizing BANA as a substrate. Aliquots of 50, 100, 150 and 200 µl of the LP [1 mg ml⁻¹ in 50 mM PBS (pH 6.0)] were pre-incubated with 40 µl of an activation solution in the presence or absence of 3 mM DTT and 2 mM EDTA for 10 min at 37 °C and 200 µl of BANA were added [1 mM in 50 mM PBS (pH 6.0)]. After 30 min, the reaction was stopped by adding 500 µl of 2% HCl in ethanol and 500 µl of 0.06% 4-(dimethyl-amino)cinnamaldehyde. After 40 min, the resulting color was measured by absorbance at 540 nm [1]. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme that increases the absorbance at 540 nm by 0.01. All assays were performed in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value ± SEM.

4.4.5. Assays for serine proteases

Assays for serine proteases were performed utilizing BApNA as a substrate. Aliquots of 50, 100, 150 and 200 µl of the LP [1 mg ml⁻¹ in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)] were incubated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) for 10 min at 37 °C and 500 µl of 1.25 mM BApNA solution were added. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 150 µl of acetic acid (30%). The resulting color was measured by absorbance at 405 nm [19]. All assays were performed in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value ± SEM.

4.4.6. Activity versus pH

The effect of pH on enzyme stability was evaluated using the following buffers: 50 mM glycine (pH 2.6), 50 mM sodium acetate (pH 4.0 and 5.0), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0 and 7.0) and 50 mM Tris-HCl (pH 8.0 and 10.0). The remaining activities were determined at 37 °C and both the substrates, azocasein and BANA, were tested as described above.

4.4.7. Heat stability and effect of proteinase inhibitors

For testing heat stability, latex proteins were incubated at different temperatures ranging from 37 to 90 °C in 50 mM PBS, pH 6.0 for 15 and 30 min. After these periods, the proteolytic activity was measured at 37 °C using azocasein or BANA under standard assay conditions.

To elucidate the mechanistic nature of the proteolytic activity in latex of *C. procera*, a set of inhibitors for different types of proteases was tested. Aliquots of 50 µl (1 mg ml⁻¹ in 50 mM PBS, pH 6.0) of LP were pre-incubated for 30 min at room temperature in the presence of 20 µl of the following inhibitors: 0.1 M iodoacetamide, 5 mM PMSF, 5 mM TPCK, 0.18 mM of E-64 and 10 µM pepstatin, in separate aliquots. The remaining activities were determined at 37 °C pH 6.0 using BANA or azocasein as substrates.

4.4.8. Detection of proteases by Zymography

The electrophoresis was carried out according to the Schagger and Jagow methods [34]. LP was dissolved in 1 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), containing 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol in the presence or absence of 5% 2-mercaptoethanol. The sample was separated by electrophoresis through 10% polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin at 25 °C as in Ref. [26]. After electrophoresis, the gels were immersed in water containing 2.5% of Triton X-100 (renaturing solution) and gently shaken for 30 min at 25 °C to wash out SDS and allow protein rearrangement. The gels were then incubated in 50 mM PBS (pH 6.0) containing 3 mM DTT and 2 mM EDTA for 3 h at 37 °C. The incubated gels were stained with 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-350 in 40% methanol and 10% acetic acid followed by treatment using the same solution without the dye. Enzymatic activity was detected as transparent bands.

4.4.9. Effect of pH on gelatinolytic activities

The following developing buffers were used to determine pH activity profiles: 50 mM glycine (pH 2.6), 50 mM sodium

acetate (pH 4.0 and 5.0), 50 mM sodium phosphate (pH 6.0 and 7.0) and 50 mM Tris–HCl (pH 8.0), containing 3 mM DTT and 2 mM EDTA. The samples were separated by electrophoresis and the gel was immersed in 2.5% Triton X-100 as before. In addition, the gels were immersed in different solutions cited above for 3 h followed by the experimental procedures already described to detect proteases.

Acknowledgements

Biochemical, functional and applied studies of the latex from *C. procera* have been supported by grants from FUNCAP, CNPq, PADCT, RENORBIO and IFS (M.V.R.).

References

- [1] M. Abe, K. Abe, M. Kuroda, S. Arai, Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies, *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 933–937.
- [2] K.I. Abraham, P.N. Joshi, Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. II. Physico-chemical properties of calotropain-FI and FII, *Biochim. Biophys. Acta* 568 (1) (1979) 120–126.
- [3] R.G. Alscher, J.L. Donahue, C.L. Cramer, Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, *Physiol. Plant.* 100 (2) (1997) 224–233.
- [4] M. Azarkan, A. Amrani, M. Nijs, A. Van der Meers, S. Zerhouni, N. Smolders, Y. Looze, *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase, *Phytochemistry* 46 (8) (1997) 1319–1325.
- [5] M. Azarkan, A. El Moussaoui, D. Van Wuytswinkel, G. Dehon, Y. Looze, Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*, *J. Chromatogr. B* 790 (2003) 229–238.
- [6] R.F. Beers Jr., I.W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 133–140.
- [7] S. Bhattacharjee, Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants, *Curr. Sci.* 89 (7) (2005) 1113–1121.
- [8] F. Bilka, A. Balazova, A. Bilkova, M. Psenak, Purification of polyphenol oxidase from opium poppy latex, *Pharmazie* 55 (2) (2000) 155–156.
- [9] T. Boller, A. Gehri, F. Mauch, U. Vogeli, Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function, *Plants* 157 (1983) 22–31.
- [10] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [11] S.E.V. Cavalli, M.C. Arribère, A.C. Nestor, O. Caffini, N.S. Priolo, Morrenain b I, a Papain-Like Endopeptidase from the Latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*), *J. Protein Chem.* 22 (1) (2003) 15–22.
- [12] V.K. Dubey, M.V. Jagannadham, Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*, *Phytochemistry* 62 (7) (2003) 1057–1071.
- [13] V.K. Dubey, M.V. Jagannadham, Differences in the unfolding of procerain induced by pH, guanidine hydrochloride, urea, and temperature, *Biochemistry* 43 (2003) 12287–12297.
- [14] D.E. Dussourd, R.F. Denno, Deactivation of plant defense: correspondence between insect behavior and secretory canal architecture, *Ecology* 72 (1991) 1383–1396.
- [15] J. Fernandez, A.F. Mohedano, M.J. Polanco, M. Medina, M. Nunez, Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528, *J. Appl. Bacteriol.* 81 (1) (1996) 27–34.
- [16] C.N. Giannopolitis, S.K. Rieis, Superoxides dismutases. I. Occurrences in higher plants, *Plant Physiol.* 59 (1977) 309–314.
- [17] X. Gidrol, H. Chrestin, H.L. Tan, A. Kush, Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex, *J. Biol. Chem.* 269 (12) (1994) 9278–9283.
- [18] R. Giordani, S. Benyadia, M. Teissere, G. Noat, Purification and properties of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Hevea brasiliensis* latex, *Plant Sci.* 84 (1) (1992) 25–34.
- [19] C.E.M. Gomes, A.E.A.D. Barbosa, I.I.P. Macedo, J.C.M. Pitanga, F.T. Moura, A.S. Oliveira, Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly), *Plant Physiol. Biochem.* 43 (2005) 1095–1102.
- [20] J.B. Harborne, Introduction to Ecological Biochemistry, fourth ed. Academic Press, London, 1993, 186–210.
- [21] G. Invenish, A. Valeina, D. Ozol, Induction of ascorbate peroxidase activity in stressed pine (*Pinus sylvestris*) needles – a putative role for ethylene, *Plant Sci.* 112 (1995) 167–173.
- [22] T. Joet, V. Dubois, J.C. Prevot, J.L. Jacob, A.V. Clement, Both APx and GPx, involved in the detoxification of reactive oxygen species in vivo, might play a role in stress resistance and/or regulate the duration of latex flow, *J. Rubber Res.* 5 (2002) (4th abstract).
- [23] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [24] C. Liggieri, M.C. Arribère, S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Avilés, N.S. Priolo, Purification and biochemical characterization of Asclepain c I from the Latex of *Asclepias curassavica* L. *Protein J.* 23 (6) (2004) 403–411.
- [25] K.R. Lynn, N.A. Clevette-Radford, Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae, *Phytochemistry* 26 (1987) 939–944.
- [26] M.L. Macedo, M.D. Freire, A. Parra Jr., A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2533–2540.
- [27] S.R. Morcelle, N.O. Caffini, N. Priolo, Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex, *Fitoterapia* 75 (5) (2004) 480–493.
- [28] A. EL Moussaoui, M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azakan, Y. Looze, Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (4) (2001) 556–570.
- [29] A. Mura, F. Pintus, P. Lai, A. Padiglia, A. Bellelli, G. Floris, R. Medda, Catalytic pathways of *Euphorbia characias* peroxidase reacting with hydrogen peroxide, *Biol. Chem.* 387 (5) (2006) 559–567.
- [30] Y. Nakano, K. Asada, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 22 (1981) 867–880.
- [31] S. Nallamsetty, S. Kundu, M.V. Jagannadham, Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*, *J. Protein Chem.* 22 (1) (2003) 1–13.
- [32] G. Pal, N.K. Sinha, Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*, *Arch. Biochem. Biophys.* 202 (2) (1980) 321–329.
- [33] J.L. Reissig, J.L. Strominger, L.F. Leloir, A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars, *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 959–966.
- [34] H. Schagger, G.V. Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166 (1987) 368–379.
- [35] O.P. Shukla, C.R.K. Murti, Properties and partial purification of a bacteriolytic enzyme from latex of *Calotropis procera* (Madar), *J. Sci. Ind. Res.* 20 (1961) 109–112.
- [36] T. Taira, A. Ohdomari, N. Nakama, M. Shimoji, M. Ishihara, Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (4) (2005) 811–818.
- [37] R.A. Van der Hoorn, J.D. Jones, The plant proteolytic machinery and its role in defense, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (4) (2004) 400–407.
- [38] D. Wititsuwannakul, N. Chareonthiphakorn, M. Pace, R. Wititsuwannaku Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization, *Phytochemistry* 61 (2) (2002) 115–121.
- [39] J. Xavier-Filho, F. Campos, A.P. Maria, B. Ary, C.P. Silv M.M.M. Carvalho, Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 1139–1143.