



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Ellivelton Pereira Lima

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PODAGRINA:
UMA PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS TIPO 1 DE
Jatropha podagrica.

FORTALEZA

2017

Ellivelton Pereira Lima

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PODAGRINA:
UMA PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS TIPO 1 DE
*Jatropha podagrica.***

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

FORTALEZA

2017

ELLIVELTON PEREIRA LIMA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PODAGRINA:
UMA PROTEÍNA INATIVADORA DE RIBOSSOMOS TIPO 1 DE
*Jatropha podagrica.***

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa Dra. Lúcia Betânia da Silva Andrade
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva Souza
Universidade Federal do Ceará- UFC

A minha família: mãe, pai e
irmão.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, meu pai e meu irmão por toda confiança, ensinamentos e dedicação dados no dia-a-dia para eu poder chegar até o ensino superior.

Agradeço aos meus amigos de faculdade que se tornaram amigos para a vida. Também agradeço aos amigos pessoais que estiveram presentes em muitos momentos importantes.

Agradeço ao professor André Luis pela dedicação e orientação na presente monografia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar com mais inteligência.”

(Henry Ford)

RESUMO

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) são proteínas tóxicas que apresentam atividade rRNA-N-glicosidase e que se ligam ao ribossomo de forma irreversível, inibindo a síntese proteica. Viu-se que RIPs se ligam à A₄₃₂₄ (Adenina₄₃₂₄) da porção 28S do ribossomo de ratos, o que impede que a subunidade 60S se ligue aos fatores de alogamento necessários para síntese de proteínas. Apesar de serem divididas em dois grandes grupos (RIPs tipo 1 e 2), novos estudos têm mostrado que existem outros tipos de RIP diferentes dos já conhecidos e merecem destaque para uma nova classificação. As RIPs apresentam em cada cadeia, aproximadamente, 30 kDa. As do tipo 1 são menos tóxicas que as do tipo 2 por não apresentar um domínio lectina, como estas últimas. A espécie *Jatropha podagrica* apresenta algumas atividades biológicas importantes, como antipiréticas, diuréticas, coleréticas e purgativas. Estas plantas são usadas em infecções de pele ou para infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mostrando assim uma importante aplicação biotecnológica. Neste trabalho foi estudado a atividade biológica da podagrina, uma RIP do tipo 1, extraída das sementes de *Jatropha podagrica*, em helmintos (*Ascaridia galli*) e em sistema livre de células. Também foram produzidos anticorpos anti-podagrina em coelhos albino da raça Nova Zelândia. Os resultados mostraram a podagrina como sendo uma típica RIP 1. Houve resultados satisfatórios na inibição da síntese proteica em helmintos e no sistema livre de células. Os resultados relacionados a produção de anticorpos também foram satisfatórios. Como conclusão, vê-se o potencial da podagrina como anti-helmíntico, potencial para desenvolvimento de imunotoxinas e futuras aplicações na medicina veterinária e agricultura.

Palavras-chaves: Proteínas inativadoras de ribossomos, *Jatropha podagrica* Hook.

ABSTRACT

Ribosome inactivating proteins (RIPs) are toxic proteins that exhibit rRNA-N-glycosidase activity and irreversibly bind to the ribosome, inhibiting protein synthesis. RIPs have been shown to bind to A4324 (Adenine 4324) of the 28S portion of the rat ribosome, which prevents the 60S subunit from binding to the releasing factors required for protein synthesis. Despite being divided into two major groups (RIPs type 1 and 2), new studies have shown that there are other types of RIPs different from those already known and deserve to be highlighted for a new classification. RIPs have approximately 30 kDa in each chain. Type 1 is less toxic than type 2 because it does not have a lectin domain, such as the latter. *Jatropha podagrica* presents some important biological activities, such as antipyretic, diuretic, choleric and purgative. These plants are used in skin infections or for sexually transmitted infections (STIs) thus showing an important biotechnological application. In this work the biological activity of podagrin, a type 1 RIP, extracted from the seeds of *Jatropha podagrica*, in helminths (*Ascaridia galli*) and in a cell-free system was studied. Anti-podagrin antibodies were also produced in New Zealand albino rabbits. The results showed podagrin to be a typical RIP 1. There were satisfactory results in inhibition of protein synthesis in helminths and in the cell free system. Results related to antibody production were also satisfactory. As a conclusion, the potential of podagrin as anthelmintic, potential for the development of immunotoxins and future applications in veterinary medicine and agriculture is seen.

Keywords: Ribosome inactivating proteins, *Jatropha podagrica* Hook.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
1 – Sementes de <i>Ricinus communis</i> (A) e de <i>Abrus precatorius</i> (B).	15
2 - Diferentes estruturas de rRNA ribossomal em diferentes organismos.	16
3 - Estrutura das RIPs tipo 1 e 2.	17
4 - Estrutura das RIPs proRIP b-32 e JIP60.	18
5 - Região de <i>loop</i> Sarcina/ricina, onde ocorre clivagem enzimática.	19
6 - Plantas (A e B) e sementes (C) de <i>Jatropha podagrica</i> .	22
7 - SDS-PAGE (15%) do extrato bruto da farinha de sementes de <i>Jatropha podagrica</i> e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio.	34
8 - Purificação da RIP tipo 1 de sementes de <i>Jatropha podagrica</i> .	35
9 - Dicroísmo circular da podagrina.	36
10 - Atividade rRNA- <i>N</i> -glicosidase <i>in vitro</i> da podagrina em gel de agarose/formamida.	37
11 - Cinética da produção de anticorpos anti-podagrina em coelhos imunizados com diferentes quantidades de podagrina.	40
12 - Determinação dos títulos dos anticorpos produzidos no coelho imunizado com 100 µg de podagrina.	41
13 - Purificação do anticorpo policlonal anti-podagrina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A.	42
14 - SDS-PAGE (15%) do anticorpo policlonal anti-podagrina.	43
15 - Análise da atividade do anticorpo anti-podagrina por <i>Western blotting</i> .	43
16 - Inibição da síntese proteica promovida pela podagrina em sistema livre de células (TNT® <i>Coupled Reticulocyte Lysate System</i>).	44

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - Rendimento da farinha obtida a partir de sementes de <i>J. podagrica</i> .	32
2 - Dosagem de proteínas solúveis extraída das farinhas de sementes sob diferentes condições pH	32
3 - Predição da estrutura secundária e da temperatura de transição da podagrina	36
4 - Percentual médio de mortalidade da podagrina sobre <i>Ascaridia galli</i> , no teste <i>in vitro</i> , ao longo de 96 horas de tratamento.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

28S	Índice de sedimentação (S) 28 do RNA ribossomal
A ₄₃₂₄	Adenina localizada na posição 4324 do RNA ribossomal
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CD	Dicroísmo Circular
DO _{600nm}	Densidade óptica à 600 nanômetros
EB	Extrato bruto de <i>Jatropha podagrica</i>
EF 1,2	Fatores de alongamento 1 e 2
EGTA	Ácido etileno-bis (oxietilenitrilo) tetraacético
GAGA	Sequência de Guanosina-Adenina-Guanosina-Adenina
GTP	Guanosina Trifosfato
h	Hora
IgG	Imunoglobulina G
JIP60	RIP tipo 3
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilo Dalton
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanometro
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Relação peso / volume
RIP	Proteínas inativadoras de Ribossomos
rRNA	RNA ribossomal
Tris- HCl	(hidroximetil)aminometano – cloreto de hidrogênio
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
µL	Micro litro

YPD

Meio Levedura Peptonada Dextrose

°C

Grau Celsius

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)	15
1.2. Mecanismos de ação das RIPs	18
1.3. Distribuição das RIPs na natureza.	19
1.4. Propriedades físico-químicas e estruturais das RIPs	20
1.5. Atividades e potencial biotecnológico das RIPs	21
1.6. A espécie <i>Jatropha podagrica</i>	21
2. OBJETIVO	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS	24
3.1. Vegetal	24
3.2. Animal	24
3.3. Reagentes	24
4. MÉTODOS	25
4.1. Preparação da farinha de semente de <i>J. podagrica</i>	25
4.2. Obtenção do extrato total a partir da farinha de sementes de <i>J. podagrica</i> .	25
4.3. Dosagem de proteínas solúveis	25
4.4. Avaliação da atividade hemaglutinante dos extratos brutos (EBs)	25
4.5. Precipitação das proteínas com sulfato de amônio	26
4.6. Cromatografia de exclusão molecular	26
4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	26
4.8. Análise de Dicroísmo Circular (CD)	27
4.9. Atividade rRNA N-glicosidase in vitro	27
4.10. Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células	29
4.11. Avaliação da atividade anti-helmíntica	29
4.12. Produção de anticorpos policlonais	30
4.13. Avaliação dos anticorpos produzidos	30
4.14. Análise estatística	31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Preparação da farinha de semente de <i>J. podagrica</i>	32
5.2. Extração e dosagem de proteínas solúveis da farinha de sementes de <i>J. podagrica</i>	32
5.3. Atividade hemaglutinante dos extratos brutos (EBs)	32
5.4. Precipitação com sulfato de amônio	33
5.5. Isolamento e purificação da RIP de sementes de <i>J. podagrica</i> .	34
5.6. Análise de dicroísmo circular (CD)	35
5.7. Atividade RNA N-glicosidase in vitro da podagrina	36
5.8. Atividade anti-helmíntica da podagrina	38
5.9. Anticorpos policlonais anti-podagrina e ensaios de imunodeteção	38
5.10. Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células	43
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que dentro das culturas populares as plantas possuem diversos interesses para o Homem, seja medicinal, econômico, alimentício ou outro. Além destas características importantes, algumas plantas produzem toxinas que podem ser letais para os seres vivos que as ingerir, como é o caso das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs).

Esta classe de proteínas começou a ser estudada no final do século XIX com a descoberta da toxicidade em sementes de mamona (*Ricinus communis*) e de jequeriti (*Abrus precatorius*) (FIG. 1). Respectivamente, ricina e abrina, foram as toxinas estudadas na época e, desde então, estas toxinas têm despertado o interesse de cientistas.

FIGURA 1 – Sementes de *Ricinus communis* (A) e de *Abrus precatorius* (B).



Fonte: *Wikipedia* e *Wikimedia Commons*.

Neste trabalho será discutido a atividade biológica da podagrina, uma RIP extraída da semente de *Jatropha podagrica*, também conhecida como pinhão-brabo. Ademais, será apresentado outros dados importantes sobre RIPs, como mecanismo de ação, sua distribuição na natureza, propriedades estruturais e físico-químicas, entre outras. Também será visto o potencial biotecnológico destas proteínas.

1.1. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs)

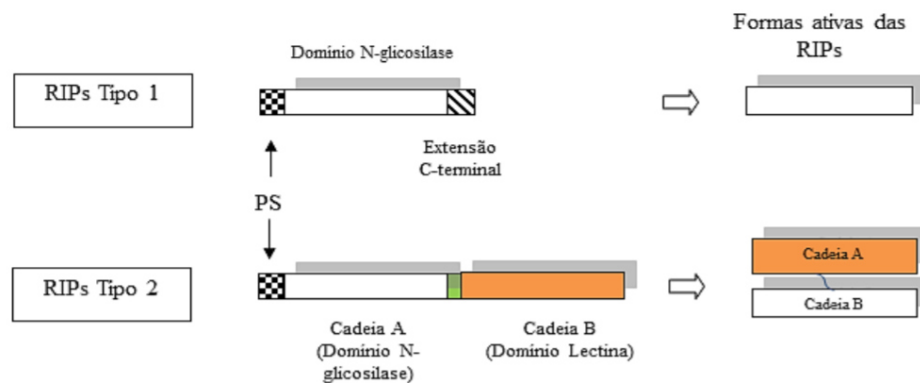
Historicamente, o poder tóxico destas proteínas foi estudado, inicialmente, em 1887, por Dixon, o qual suspeitou do potencial tóxico de uma proteína de *Ricinus comunis*. Posteriormente Stillmark, em 1888, purificou esta proteína e estudou seu poder

As RIPs, geralmente são classificadas em 2 tipos: RIPs tipo 1 e RIPs tipo 2. Entretanto, recentemente, proteínas encontradas em cereais têm feito esta classificação aumentar para três tipos. Neste trabalho será apresentado brevemente este novo tipo de RIP, ficando o destaque para os tipos iniciais mais conhecidos e estudados na literatura.

As RIPs do tipo 1 (FIG. 3) são proteínas de caráter básico, com domínio único (apenas uma cadeia polipeptídica) e com peso molecular, geralmente, de 30 kDa. Nas RIPs do tipo 1 a ausência da porção lectínica “torna” estas proteínas menos tóxicas que as do tipo 2. Ressalta-se que macrófagos e trofoblastos apresentam uma elevada sensibilidade a este tipo de RIP.

As RIPs do tipo 2 (FIG. 3) apresentam duas cadeias de proteínas: uma ativa (cadeia A) com uma atividade RNA N-glicosidase (semelhante a RIP tipo 1) e outra cadeia B, com a presença de uma lectina galactose específica. Estas duas cadeias de polipeptídeos são ligadas covalentemente por uma ligação dissulfeto e ambas apresentam peso molecular de aproximadamente de 30 kDa. Como esta porção tem especificidade por galactoses as glicoproteínas e os glicolipídios de membrana das células eucarióticas tornam-se alvos destas proteínas.

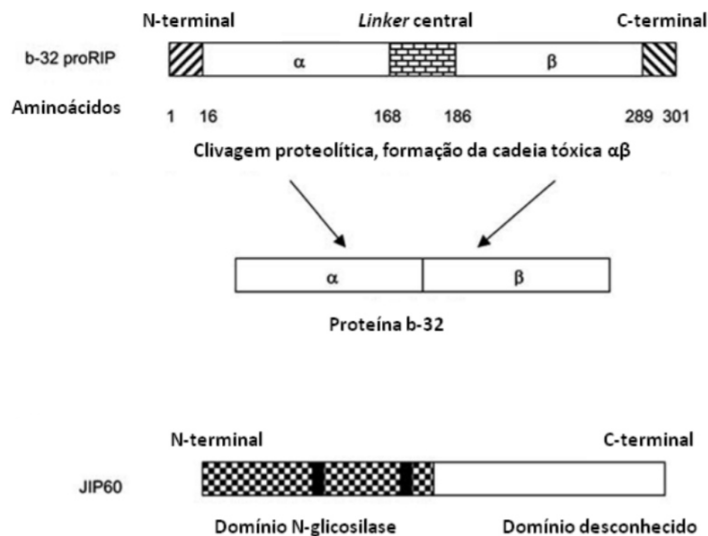
FIGURA 3 – Estrutura das RIPs tipo 1 e 2.



Fonte: Reyes, 2011.

As RIPs do tipo 3 (FIG. 4) incluem uma proteína chamada JIP60, a qual apresenta uma cadeia C-terminal com função ainda não conhecida e a porção N-terminal com o domínio N-glicosidase. O outro subgrupo de RIP tipo 3 inclui as proRIP b-32, as quais apresentam um *linker* central (forma imatura) que precisa ser clivado para a formação da proteína ativa.

FIGURA 4 – Estrutura das RIPs proRIP b-32 e JIP60.

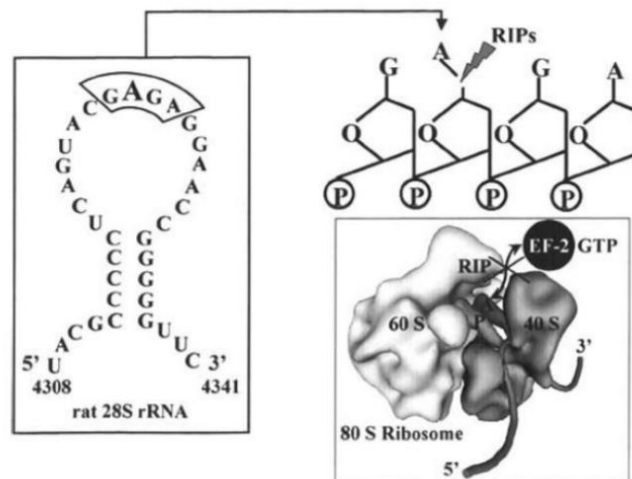


Fonte: Reyes, 2011.

1.2. Mecanismos de ação das RIPs

As RIPs inibem de forma irreversível a síntese proteica em ribossomos. Uma única molécula de ricina é capaz de inativar 1500 ribossomos/minuto. O mecanismo de ação destas proteínas foi estudado primeiramente por ENDO e colaboradores (1987), que as descreveu como um grupo de enzimas RNA N-glicosidases com capacidade de catalisar a clivagem de uma Adenina conservada na molécula 28S do RNA ribossomal de ratos, bloqueando, assim, a tradução. Segundo este mecanismo, as RIPs reconhecem uma estrutura específica em formato de *loop* (alça sarcina/ricina), no qual está inserida a Adenina₄₃₂₄, presente em uma sequência conservada GAGA (FIG. 5). Esta clivagem específica resulta em danos irreversíveis para o ribossomo, mais precisamente na subunidade 60S, a qual fica impossibilitada de fazer ligações com dois fatores de alongamento (EF1 EF2), impedindo, assim, a síntese proteica.

FIGURA 5 – Região de *loop* Sarcina/ricina, onde ocorre clivagem enzimática específica pela ação das RIPs, na qual a Adenina₄₃₂₄ é depurinada impedindo a síntese proteica



Fonte: Girbés *et al.*, 2004.

1.3. Distribuição das RIPs na natureza

As RIPs do tipo 1 estão em maior número na natureza do que as do tipo 2 (HARTLEY *et al.*, 1996). Evolutivamente, é possível que as RIPs do tipo 2 tenham se fundido com algum outro tipo de RIP para apresentar sua estrutura atual (LAPADULA e AYUB, 2017). As RIPs estão presentes em diversos tecidos e órgãos vegetais, principalmente de angiospermas (mono e dicotiledôneas), como, por exemplo, na semente (endosperma), frutas carnudas, raízes, folhas, cascas e látex (HARTLEY *et al.*, 1996).

Os tipos de RIPs têm sido relatados em diferentes famílias de plantas (cerca de 13), englobando mais de 50 espécies de vegetais. Genes de RIPs também foram encontrados em bactérias, fungos e até cianobactérias.

Segundo Lapadula e Ayub (2017), os genes que codificam para RIPs em bactérias são, rapidamente, associados a cepas de gram negativas da ordem Enterobacteriales. Porém, estudos recentes mostraram a presença destes genes em gram positivas da ordem Entomoplasmatales e Streptomycetales. Isto mostra que, assim como em plantas, a presença de RIPs é bem maior neste grupo de seres-vivos do que o esperado. Ressalta-se, também, a presença de genes de RIPs - encontradas por meio de estudos *in*

silico - em duas espécies de Cianobacterias: *Tolypothrix boutheillei* e *Calothopix parietina*; pertencentes a ordem Nostocales.

Nos fungos as espécies com atividades inibitória da síntese proteica semelhante as de RIPs foi detectada em *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, *Lyophyllum shimeji*, *Hypsizigua marmoreus* e *Pleurotus tuber-regium* Segundo Yao e colaboradores (1998), citado por Lapadula e Ayub (2017), a atividade de depuração foi descrita somente em *Volvariella volvaceae*. Ademais, viu-se que *Volvariella volvacea* e *Flammulina velutipes* não tem evidências de genes que codificam para RIPs.

Por fim, alguns trabalhos mostraram tecidos de mamíferos com atividade adenina-glicosidase semelhante à atividade das RIPs, porém nenhuma inibição da síntese proteica foi constatada. Ressalta-se que devido ao avanço das técnicas e ferramentas de análise da genômica moderna, viu-se que sequências no genoma de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* codificavam genes de RIPs.

1.4. Propriedades físico-químicas e estruturais das RIPs

As RIPs apresentam, em sua maioria, massa molecular de aproximadamente 30 kDa por cadeia. Esta classe de proteínas teve pela primeira vez sua estrutura estudada em 1987, por meio de técnicas de difração de raio-X, onde foi visto que a ricina apresentava uma estrutura globular e um heterodímero glicosilado, com os monômeros unidos por uma simples ligação dissulfeto.

É sabido que a massa molecular das RIPs é, geralmente, determinada por SDS-PAGE, pois a basicidade das RIPs tipo 1, por exemplo, reage com a matriz em filtrações a gel não havendo, portanto, resultados satisfatórios. O que corrobora os resultados obtidos por SDS-PAGE são os resultados alcançados por sequenciamento completo (BARBIERI *et al.* 1993). Quanto ao pI destas proteínas, sabe-se que o das de tipo 1 é invariável e básico ≥ 9.5 . Já os da de tipo 2 varia de 4.6 a 8.6. Destaca-se a RIP milho b-32 com dois pI diferentes um ácido (6.5) na sua forma inativa e outro básico (> 9) quando ativa.

Estruturalmente, a maioria das RIPs são glicoproteínas, das quais a parte carboidrato não apresenta importância no bloqueio da síntese proteica. Os açúcares presentes podem ser glicose, galactose, manose, fucose, xilose e N-acetil-D-glicosamina. De acordo com Barbieri *et al.*(1993), isto é demonstrado pelos seguintes fatos:

- Algumas RIPs não apresentam a porção carboidrato;

- RIPs diferentes podem variar, em qualidade e quantidade, a composição de seus açúcares;
- Em um lisado de reticulócitos de coelho, contendo gelonina e ricina com a cadeia A deglicosiladas, viu-se que elas ainda eram capazes de inibir a síntese proteica;
- A cadeia A da ricina quando produzida em *E. coli* permanece funcional, mesmo sendo produzida com ausência de açúcares.

1.5. Atividades e potencial biotecnológico das RIPs

As atividades vistas das RIPs são: antitumoral (LEE-HUANG *et al.*, 2000), antiviral (PURI *et al.* 2009), imunossupressivas e abortíferas (BARBIERI *et al.*, 1993), antifúngicas e inseticidas (STIRPE, 2013). Isto leva a cientistas desenvolverem importantes pesquisas com aplicação biotecnológica seja na medicina, na agricultura ou em outra área. Isto pode ser visto, por exemplo, na marcação de algumas moléculas como anticorpos monoclonais, lectinas, hormônios, fatores de crescimento para ligação a células específicas (FRACASSO *et al.*, 2010 *apud* STIRPE, 2013). Na agricultura, estas atividades são importantes para o desenvolvimento de produtos capazes de combater doenças em plantas e de combater algumas pragas (STIRPE, 2013).

1.6. A espécie *Jatropha podagrica* Hook

Jatropha podagrica é uma planta da Família Euphorbiaceae, comum na América. Porém, encontrada também nas Ilhas Havaianas, África do Sul, Moçambique, Zâmbia e algumas partes da África. Também conhecida como noz coral, pinhão brabo, ruibarbo da Guatemala, entre outros nomes. As plantas pertencentes a este gênero apresentam fontes de fitoquímicos importantes. Além disso, atividades biológicas e tóxicas de alguns compostos purificados já foram descritas na literatura. Estas plantas são usadas, por exemplo, para infecções de pele ou para as sexualmente transmissíveis (gonorreia) e febre. As atividades apresentadas por diversas partes da planta são: antipiréticas, diuréticas, colerético e purgativa (STIRPE, 2013). Na figura 6 são mostrados exemplares de plantas e de sementes de *Jatropha podagrica*.

FIGURA 6 – Plantas (A e B) e sementes (C) de *Jatropha podagrica*.



Fonte: *World of Succulents* e *Wikimedia Commons*

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Avaliar as atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* da podagrina, uma proteína inativadora de ribossomos tipo 1 (RIP tipo 1) presente em sementes de *Jatropha podagrica*.

2.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar a RIP tipo 1 podagrina de sementes de *J. podagrica*;
- ✓ Avaliar a pureza e a integridade conformacional da podagrina;
- ✓ Avaliar a atividade rRNA-*N*-glicosidase da podagrina utilizando a levedura *Pichia pastores* como modelo;
- ✓ Testar a capacidade da podagrina de inibir a síntese proteica em sistema livre de células;
- ✓ Avaliar a atividade anti-helmíntica em *Asacaridia galli* da podagrina;
- ✓ Produzir anticorpos policlonais anti-podagrina e avaliar atividade e a especificidade desses anticorpos.

3. MATERIAIS

3.1. Espécie vegetal

As sementes de *Jatropha podagrica* foram coletadas em Manguinhos-Espírito Santo. Depois de removidas dos frutos maduros, as sementes foram lavadas com água destilada, secadas e armazenadas na geladeira até o uso.

3.2. Animal

Foram utilizados coelhos albinos (raça Nova Zelândia) adultos e saudáveis, os quais foram obtidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia-UFC e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Os animais estavam em gaiolas apropriadas de livre acesso à ração e água.

Para análise da atividade rRNA-*N*-glicosidase foi utilizada linhagem comercial de *Pichia pastoris* GS115.

Os helmintos de *Ascaridia galli* foram produzidos e cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

3.3 Reagentes

Cloreto de sódio; corantes (*Coomassie brilliant blue*); albumina sérica bovina; acrilamida; bis-acrilamida; 2-mercaptoetanol; tampão fosfato de sódio (PBS); etanol; metanol; reagente Trizol®; Sepharose-4B; Tris [2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol]; Ribonuclease; Meios YPD e M119; fluoresceína isotiocianato; kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems*; ácido clorídrico; ácido acético; sulfato de amônio e outros reagentes de grau analítico.

4. MÉTODOS

4.1. Preparação da farinha das sementes de *J. podagrica*.

Após o descongelamento, as sementes de *J. podagrica* foram submetidas à delipidação com hexano (1:5 p/v) por 6 horas, com trocas a cada 2 h. Após a delipidação, o material foi submetido a secagem até 12 h a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi novamente triturado e peneirado até a obtenção de um pó fino e homogêneo. O rendimento foi calculado e a farinha foi acondicionada em tubos tipo Falcon.

4.2. Obtenção do extrato total a partir da farinha de sementes de *J. podagrica*.

A farinha de sementes foi submetida à extração (1:10 p/v) de proteínas utilizando diferentes tampões: Glicina 20 mM pH 2,6; Acetato de sódio 20 mM pH 4,0; Tris-HCl 20 mM pH 7,4 e Borato 20 mM pH 9,0, todos contendo NaCl 150 mM. Cada extração durou três horas e foi realizada sob agitação a 10 °C. Em seguida, os extratos (denominados EBs) foram centrifugados a 12000 xg, por 30 min a 5 °C, depois filtrados e utilizados nos ensaios de dosagem de proteínas.

4.3. Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas foi realizada conforme o método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A presença de proteína também foi detectada pela medida da absorbância a 280 nm utilizando espectrofotômetro.

4.4. Avaliação da atividade hemaglutinante dos extratos brutos (EBs)

Neste ensaio foram utilizadas hemácias de coelhos adultos e sadios. Primeiro, o sangue coletado foi lavado quatro vezes com uma solução salina (NaCl 150 mM) para remover o plasma, os glóbulos brancos e anticoagulante, deixando apenas com as células vermelhas (hemácias). A atividade hemaglutinante dos EBs foi avaliada conforme a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). Esse ensaio foi realizado em placa de microtitulação através de diluições seriadas. Resumidamente, 50 µL de cada EB (concentração de 1 mg/mL NaCl 150 mM) testado foi adicionado separadamente a igual

volume de uma solução de NaCl 150 mM e desta mistura foram feitas diluições seriadas. Às diferentes diluições proteicas, foram adicionados 50 µL de uma suspensão de hemácias de coelho a 2 %. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 30 min, seguidos de mais 30 min a temperatura ambiente. A aglutinação foi observada a olho nu. A maior diluição que mostrou hemaglutinação positiva foi considerada como título. A quantidade de proteína presente nesta diluição representa a quantidade mínima de proteína necessária para aglutinar os eritrócitos e é definida como unidade de hemaglutinação (UH). A atividade específica é o número de unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína (UH/mgP).

4.5. Precipitação das proteínas com sulfato de amônio

O extrato bruto das sementes obtido com tampão pH 7,4 foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, utilizando 60% de saturação conforme a metodologia utilizada por Lin *et al.* (2010). O extrato saturado com sulfato de amônio foi mantido em repouso por 6 h a 5 °C e em seguida, centrifugado a 12000 xg por 20 min. O precipitado foi coletado, solubilizado com o tampão de extração, dialisado por 12 h contra água destilada e por mais 4 h com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. O extrato bruto precipitado (denominado Fr0/60) foi submetido à dosagem de método de Bradford (1976).

4.6. Cromatografia de exclusão molecular

A Fr0/60, obtido conforme descrito no item 4.5, foi solubilizada em o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 e aplicada numa coluna de Sephadex G-100 (0,8 cm por 100 cm), previamente equilibrada com a mesma solução tampão. Na sequência, a matriz também foi eluída com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 utilizando um fluxo de 1 mL/min. As frações cromatográficas foram coletadas, quantificadas em espectrofotômetro e analisadas por ensaios eletroforéticos (PAGE-SDS).

4.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)

As frações cromatográficas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras conforme a metodologia de Laemmli (1970), com modificações. Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 12,5 % de acrilamida em tampão Tris-

HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1 %. A mobilidade eletroforética foi realizada a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1 %, β -mercaptoetanol 0,1 %, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 min e centrifugadas a 1.000 *xg* por 5 min à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v).

4.8. Análise de Dicroísmo Circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO. Inicialmente, foi utilizada uma alíquota de 100 μ L de amostra proteica (contendo aproximadamente 20 μ g de proteína em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M). As medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico, a temperatura controlada de 25 °C. Primeiro, foi obtido um espectro do branco, ou seja, apenas da solução do tampão de solubilização da proteína, para que não houvesse interferência do tampão. As contribuições do tampão, obtidas sob condições idênticas, foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Foi feita então, uma varredura de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 16 acumulações. Os programas utilizados para processar os dados foram *Spectra ManagerTM II*, *Origin®* e *Protein Secondary Structure Estimation Program Jasc for windows* (que faz parte do pacote de *softwares* adquiridos junto com o equipamento). A predição quantitativa das contribuições da estrutura secundária foi realizada pela desconvolução dos espectros de CD usando o programa *SELCON 3*, desenvolvido por Sreemana e Woody (2000).

4.9. Atividade rRNA N-glicosidase *in vitro*

Os ribossomos de levedura (*Pichia pastoris*) foram obtidos conforme a metodologia descrita por Smith *et al.* (2003). Resumidamente, 5 mL de um pré-inóculo (contendo a levedura) em meio YPD foi incubado a 37 °C, *overnight*, sob agitação (250 *xg*). Esse pré-inóculo foi diluído em 500 mL de meio YPD suplementado com sacarose (2 %), adenina e uracila (0,2 %). As células foram crescidas a 37 °C, sob agitação de 250 *xg* até atingir uma $D.O_{600nm} = 1$ (cerca de 12 h). Uma vez atingida tal densidade, a cultura foi centrifugada 5000 *xg* por 10 min, a 4 °C. O precipitado obtido foi lavado (3x) com

água estéril RNase *free* e ressuspensão em 4 mL do tampão de lise (Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, contendo KCl 200 mM, sacarose 200 mM, MgCl₂ 25 mM, EGTA 25 mM e β-mercaptoetanol (0,01%). Ao tubo contendo as células foi adicionado igual volume de “pérolas de vidro” para romper a parede celular através de agitação vigorosa por 10 min. A ressuspensão foi centrifugada a 1250 *xg* por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 20000 *xg* por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi novamente coletado e submetido a uma ultracentrifugação de 100.000 *xg* por 1 h, a 4 °C. Após este processo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os ribossomos foi ressuspensão em 100 µL do tampão Endo (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 com KCl 25 mM e MgCl₂ 5 mM) e estocado (-80 °C) em alíquotas com 10 µg/µL de concentração.

A avaliação da atividade RNA-*N*-glicosidase da fração cromatográfica do pico 4 (denominada podagrina) foi realizada conforme a metodologia descrita por Ayub *et al.* (2008). Para esse ensaio, 3 µL de ribossomos de levedura (10 µg/µL) foram incubados a 30 °C por 1 h com 15 µL da podagrina (concentração de 1 mg/mL de PBS pH 7,4) em uma reação final contendo 50 µL do tampão Endo (Tris-HCl 250 mM pH 7,6; KCl 250 mM e MgCl₂ 50 mM) e 2 µL de *Ribonuclease Vanadyl Complex* (Biolabs), em um volume final de 500 µL. A reação foi interrompida pela a adição de SDS 1%. O RNA ribossomal foi obtido através da extração com reagente Trizol® (Invitrogen) conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi ressuspensão em 20 µL de água ultrapura estéril e, em seguida, 10 µL desse foi misturado com 50 µL de anilina-acética pH 4,5 (1 anilina: 1,6 ác. acético: 7,4 H₂O ultrapura v/v/v) e incubado por 4 min, a 60 °C em banho-seco. Após a incubação, a reação foi interrompida pela a adição de 0,1 volume de acetato de amônio 2 M e 3 volumes de etanol 100% gelado. As amostras foram centrifugadas por 20 min, a 10.000 *xg*, a 5 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados de RNA foram ressolubilizados em 15 µL de tampão Tris-Fosfato-EDTA (Tris 3,6 mM; NaH₂PO₄ 3 mM; EDTA 0,2 mM) contendo formamida 60%. A identificação dos fragmentos de rRNA depurinados foi realizada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose-formamida, utilizando brometo de etídio e visualizados sob luz UV do transluminador. Como controle positivo foi utilizada a RIP tipo 2 ricina (Sigma). Como controle negativo, uma alíquota da reação da ricina foi processada com a adição água ultrapura no lugar da anilina-acética.

4.10. Ensaio de inibição da síntese proteica em sistema livre de células

A capacidade da podagrina purificada de inibir a síntese de proteínas foi medida utilizando o kit *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega). O funcionamento desse kit baseia-se na medida da expressão *in vitro* da proteína repórter luciferase em um sistema livre de células e que tem a vantagem de ter acopladas as etapas de transcrição e de tradução gênica num extrato celular eucarioto. Desta forma, esse sistema pode ser usado para avaliar quantitativamente a capacidade de moléculas de inibir (*in vitro*) síntese proteica. Neste ensaio, diferentes concentrações da podagrina foram usadas. Como controle positivo da reação da luciferase, apenas água ultrapura (*MilliQ*) foi adicionada a reação. Como controle positivo da reação de inibição, foi utilizada a ricina comercial (Sigma). As reações contendo a podagrina, bem como os controles foram incubados 45 min a 30 °C. Em seguida, 2,5 µL da reação foram misturados com 25 µL do substrato da luciferase (*Luciferase Assay Reagent*). A medida de luz emitida foi realizada em um luminômetro, com 2 seg de tempo retardado e 20 seg de aquisição por amostra. Os resultados foram expressos em URL/s (unidades relativas de luz por segundo) em função da concentração das proteínas. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores representados como média de cinco medidas.

4.11. Avaliação da atividade anti-helmíntica

Esse ensaio foi realizado utilizando helmintos adultos, machos e fêmeas de *Ascaridia galli* cedidos pelo Laboratório de Parasitologia da UECE. Os parasitos de tamanho variando de 6 a 8 cm foram selecionados e lavados em solução salina 0,9%, e aqueles considerados ativos foram transferidos para placas de Petri descartáveis (150 × 15 mm), contendo solução Tyrode (KALEYSA, 1975) pré-aquecida (37 °C), totalizando 10 nematoides por placa. A seguir, foram adicionadas alíquotas da podagrina nas seguintes concentrações: 1; 2; 3; 4 e 5 mg/mL. Os nematoides foram mantidos em estufa BOD, à temperatura de 37±1 °C, e examinados 6, 24, 48, 72 e 96 h após o tratamento. Os nematoides imóveis, mesmo após breve pressão com agulha estéril, foram considerados mortos (SHILASKAR; PARASAR, 1985). O experimento foi repetido 3 vezes para cada dose, e a porcentagem de parasitas mortos em cada grupo foi calculada. Esse teste foi

acompanhado de dois controles negativos constituídos por água e solução salina 0,9% e um controle com a droga referência, citrato de piperazina (5 mg/mL), administrada de acordo com o fabricante (Proverm Tortuga).

4.12. Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais (IgGs) específicos para a podagrina foram produzidos em quatro coelhos machos adultos, da raça Califórnia (com cerca de 8 meses). Foram avaliadas quatro doses contendo 50, 100, 200 e 300 µg da podagrina. Antes da imunização, todos os animais foram submetidos a uma primeira sangria para coletar o soro controle (pré-imune). A sensibilização inicial foi feita por via intramuscular, na parte interna da coxa do animal, com uma emulsão contendo a proteína e o adjuvante completo de Freund (1:1; v:v). Após 21 dias, foram administradas subcutaneamente, no dorso, as doses-reforço de iguais conteúdos proteicos emulsionados em adjuvante incompleto de Freund (1:1; v/v). O sangue coletado foi mantido em repouso por 1 h a 37 °C e o soro obtido, foi centrifugado a 4.000 xg por 10 min. As sangrias dos animais foram feitas em intervalos de 7 dias até o 42º dia após a primeira imunização. Os soros coletados foram submetidos a fracionamentos com sulfato de amônio com 33 % de saturação, para obtenção da fração rica em imunoglobulinas. Esta fração foi posteriormente submetida à diálise sequencial usando-se água e PBS pH 7,4. Em seguida a fração foi centrifugada a 15.000 xg, 20 min, a 4 °C, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de Sepharose-proteína A previamente equilibrada com PBS pH 7,4. A fração não-retida foi eluída com mesmo tampão. A fração retida (anticorpos anti-podagrina) foi eluída com o tampão glicina 0,1 M pH 2,5 contendo NaCl 0,15 M. Essa fração foi dialisada com PBS 7,4, concentrada por dialofiltração e utilizada nas etapas posteriores de quantificação e avaliação da síntese dos anticorpos produzidos.

4.13. Avaliação dos anticorpos produzidos

As análises da sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-podagrina foram realizadas análise pelos métodos de ELISA e técnica de *Western blot*, respectivamente. Primeiramente, testes preliminares foram realizados para determinar a menor quantidade de podagrina a ser utilizada na sensibilização da placa e o melhor tampão de bloqueio na sensibilização de cada poço utilizados no método de ELISA. Para isso, as placas foram sensibilizadas com 1,0 µg da podagrina (antígeno)/poço e colocadas sobre refrigeração a 8 °C em por 16 horas. As placas foram lavadas com PBS Tween

0,05%, após cada tratamento. A seguir foi feito o bloqueio com PBS-BSA (1%), distribuindo-se 100 µL em cada poço e incubação por 1 h a 37° C. Os soros obtidos dos coelhos foi diluído na razão dois, a partir de uma proporção inicial de 1:100 (v/v) em PBS, até a proporção final de 1:12.800 (v/v), adicionando 50 µL das amostras/poço. As placas foram incubadas em câmara úmida por 2 h a 37 °C. O conjugado anti-IgG conjugado com a peroxidase foi diluído 1:4000 (v/v) em PBS e distribuído 50 µL do conjugado em todos os poços. A incubação foi feita em câmara úmida por 2 h a 37 °C. A revelação foi feita com 100 µL de solução de SIGMAFAST™ OPD. A reação foi neutralizada com ácido sulfúrico 2,5 N. O estudo do nível de reação dos anticorpos policlonais (sensibilidade) foi realizado a partir da diluição inicial dos anticorpos na proporção 1:100 (v/v) em duplicata, calculando-se o *cut off* do ELISA (média das absorvâncias do controle mais 3 vezes o desvio padrão). Consideraram-se as diluições cujas médias de absorvância foram inferiores ao *cut off* como negativas, e positivas as diluições anteriores com valores acima do *cut off* (ponto de corte). A partir deste pressuposto, calculou-se o título dos anticorpos.

Para a técnica de *Western blot*, primeiramente a podagrina purificada foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), na presença de SDS e sob condições redutoras. Após a eletroforese, a banda proteica correspondente a podagrina foi transferida para uma membrana de nitrocelulose utilizando PBS como tampão de transferência e a aplicação de 38 mA e 40 V por 2 h. Após a transferência, a membrana foi incubada em PBS mais 5% de leite Molico® (solução de bloqueio) por 5 minutos sob agitação lenta e a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada (2 h, a 8 °C) com o anticorpo primário (anti-podagrina). Após esse tempo, a membrana foi lavada (3x) com PBS pH 7,4 e incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG conjugado com a peroxidase) por mais 2 h, a 8 °C. O processo de revelação da membrana foi feito com solução de peróxido de hidrogênio 30%, cloreto de níquel e tampão Tris-HCl pH 7,2, no escuro e a temperatura ambiente.

4.14. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste Student-Newman-Keuls, com auxílio do programa *InStat* (Graphpad InStat: GraphPad Software Oberlin, San Diego – CA, USA). O nível de significância adotado foi $P < 0,05$ (PIMENTEL-GOMES, 1987).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação da farinha de semente de *J. podagrica*

Após os processos de coleta, limpeza das sementes, destegumentação, trituração dos cotilédones e delipidação, o rendimento da farinha produzida está representado na tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento da farinha obtida a partir de sementes de *J. podagrica*.

Espécie	mg de farinha/g de sementes*
<i>Jatropha podagrica</i>	944 \pm 22

*As pesagens foram realizadas em balança analítica com 5 repetições

5.2. Extração e dosagem de proteínas solúveis da farinha de sementes de *J. podagrica*

Quando a farinha processada de sementes de *J. podagrica* foi submetida à extração de proteínas solúveis em diferentes valores de pH, os maiores teores proteicos determinados pelo método de Bradford foram obtidos quando a extração foi feita em o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (Tabela 2). Já é bem conhecido que um dos fatores com maior influência na carga líquida das proteínas em solução é o pH (MORAES, 2013).

Tabela 2 - Dosagem de proteínas solúveis extraída das farinhas de sementes sob diferentes condições de pH.

Espécie	mg de Proteína/g de Farinha*				
<i>Jatropha podagrica</i>	pH 2,6	pH 4,0	pH 6,0	pH 7,4	pH 9,0
	11,40	13,00	15,21	22,00	18,08

* A determinação foi realizada pelo método de Bradford

5.3. Atividade hemaglutinante dos extratos brutos (EBs)

Como resultado, os EBs da farinha de sementes de *J. podagrica* não foram capazes de aglutinar os eritrócitos testados, evidenciando a ausência de RIPs tipo 2. Ao contrário das RIPs tipo 1, as RIPs tipo 2 geralmente são capazes de aglutinar eritrócitos devido à presença de uma subunidade lectínica. A subunidade com atividade rRNA-N-

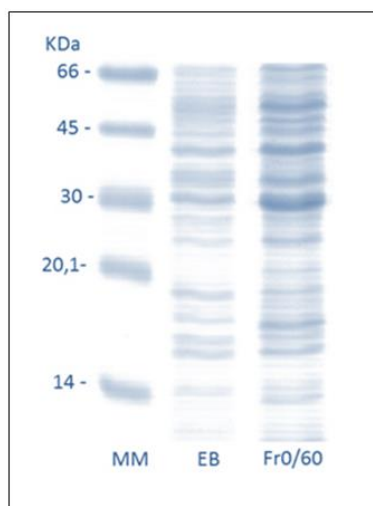
glicosidase é ligada (por meio de uma ligação dissulfeto) à subunidade lectínica, geralmente com afinidade a resíduos de galactosil, que permite a aglutinação de eritrócitos (STIRPE, 2013). Desta forma, um simples ensaio de atividade hemaglutinante frente a hemácias pode ser utilizado para detectar a presença de RIPs do tipo 2.

5.4. Precipitação com sulfato de amônio

A determinação de proteínas solúveis mostrou que EB (pH 7,4) precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% (denominada Fr0/60) apresentou um conteúdo proteico de 2,05 mg por grama da fração precipitada. Lin *et al.* (2010) obtiveram um valor menor em sementes de *Jatropha curcas* (1,17 mg de proteína por grama da fração proteica precipitada) nas mesmas condições, quando analisada pela metodologia proposta por Lowry *et al.* (1951). Essa diferença pode ter ocorrido por que o método de Bradford (1976) é mais sensível e está sujeito a bem menos interferentes que o método de Lowry. O sulfato de amônio, usado na precipitação de proteínas, é um interferente no método de Lowry e pode ter sido, também, um motivo do menor valor de concentração proteica quando se usou este método. O sulfato de amônio, na concentração maior que 15%, diminui a absorvidade devido ao aumento do pH da amostra (FRYER *et al.*, 1986).

Alíquotas do EB (pH 7,4) e da fração Fr0/60 foram submetidas a eletroforese (SDS-PAGE) para comparar o perfil proteico das duas amostras. Conforme pode ser observado na figura 7, a precipitação com sulfato de amônio permitiu uma concentração significativa das proteínas solúveis totais presentes no extrato bruto da farinha de sementes de *J. podagrica*.

FIGURA 7. SDS-PAGE (15%) do extrato bruto da farinha de sementes de *Jatropha podagrica* e da fração proteica precipitada com sulfato de amônio. MM – Marcadores moleculares; EB – Extrato proteico bruto; Fr0/60 – Fração proteica saturada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%.

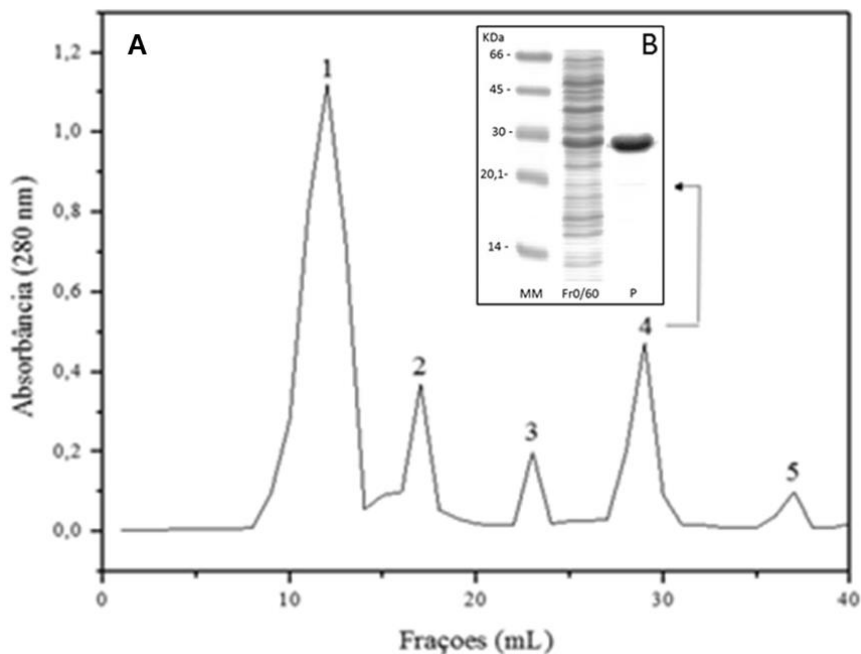


Fonte: elaborada pelo autor.

5.5. Isolamento e purificação da RIP de sementes de *Jatropha podagrica*.

Quando submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100, a fração Fr0/60 apresentou cinco picos proteicos (Figura 8A). Esse procedimento mostrou-se mais eficiente na separação das proteínas do que o utilizado por Lin *et al.* (2010), os quais, utilizando a mesma matriz cromatográfica, observaram a presença de apenas dois picos proteicos para o extrato bruto precipitado de *Jatropha curcas*. A eletroforese da amostra correspondente ao conjunto de frações do pico cromatográfico 4 mostrou uma única banda proteica de peso molecular aparente de 29 kDa (Figura 8B), correspondente aos valores citados na literatura para a curcina, uma RIP tipo 1 presente em sementes de *Jatropha curcas* (Lin *et al.*, 2010). Essa amostra (denominada podagrina) foi analisada quanto a atividade RNA-*N*-glicosidase. As frações referentes os picos cromatográficos 1, 2, 3 e 5 foram descartadas por apresentarem bandas proteicas contaminantes e por não terem os pesos moleculares compatíveis com RIP tipo 1.

FIGURA 8. Purificação da RIP tipo 1 de sementes de *Jatropha podagrica*. **(A)** Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex-G100. **(B)** SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras. MM – marcador molecular; Fr0/60 fração proteica do extrato de podagrina; P – podagrina.



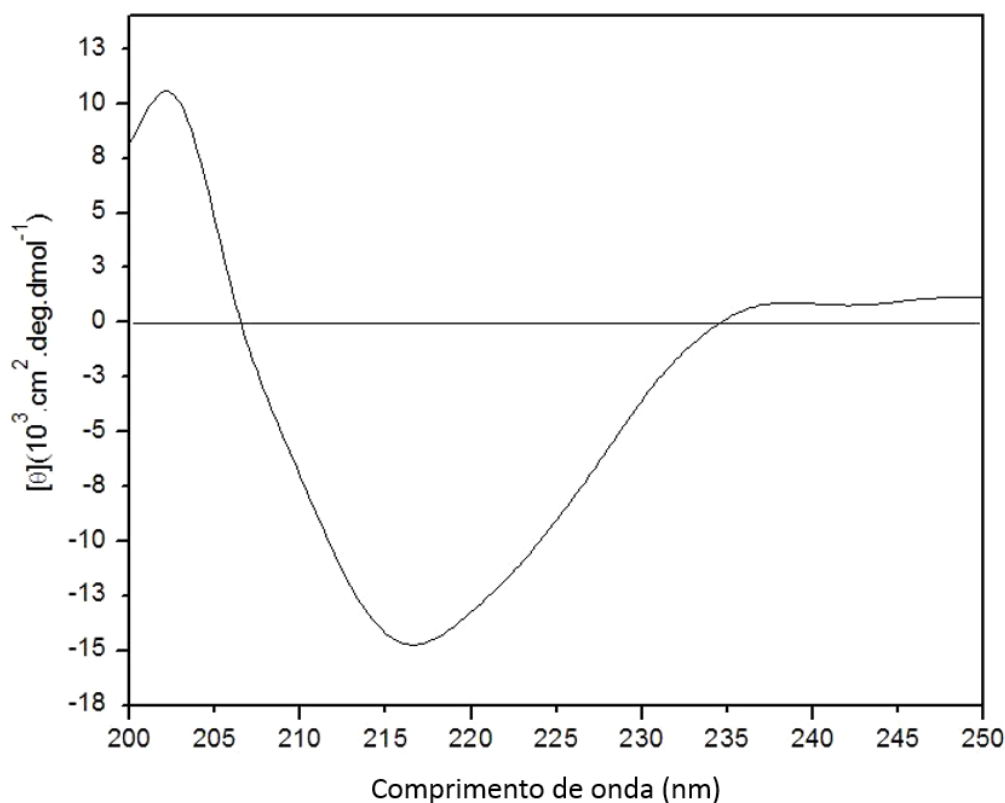
Fonte: elaborada pelo autor.

5.6. Análise de dicroísmo circular (CD)

Antes dos ensaios para avaliar as atividades biológicas da podagrina, foram realizadas análises de CD para verificar o padrão conformacional da proteína. De acordo com os resultados obtidos, a podagrina apresentou um padrão conformacional característico de enovelamento proteico e com predominância de estruturas folhas- β (Tabela 3). Esse padrão é representado pela presença de uma banda negativa com mínimo em 217 nm e uma banda positiva em torno de 200 nm (Figura 9). Esses são similares aos encontrados para a curcuma que possui 43,5% de estruturas em folhas- β , enquanto a podagrina apresenta 41,3% de folhas- β em sua estrutura secundária.

O ensaio de termoestabilidade também demonstrou que a podagrina apresenta uma temperatura de *melting* em torno de 65 °C (Tabela 3).

FIGURA 9. Dicroísmo circular da podagrina.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3. Predição da estrutura secundária e da temperatura de transição da podagrina.

Estrutura secundária	(%)
Folhas-β	41,3
Hélices-α	23,1
Voltas	20,8
Não ordenadas	10,4
*T_m (°C)	65

*Temperatura de *Melting* calculada com base no monitoramento do ponto em 217 nm dos espectros de CD da CTS obtidos em diferentes valores de temperatura.

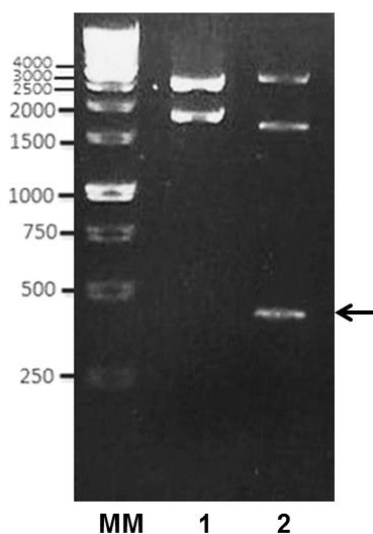
5.7. Atividade RNA *N*-glicosidase *in vitro* da podagrina

Na avaliação da atividade RNA-*N*-glicosidase *in vitro*, a podagrina foi incubada com ribossomos isolados de levedura (*Pichia pastoris*). Em seguida o rRNA foi extraído e tratado com anilina. Diferentes estudos apontam que as RIPs promovem a depurinação da subunidade maior do RNA ribossômico, liberando um pequeno fragmento de 130-400 nucleotídeos da porção 3' do rRNA (ENDO et al., 1987). Este fragmento é conhecido como fragmento de Endo, sendo considerado um diagnóstico da atividade

enzimática das RIPs e pode facilmente ser observado através de eletroforese em gel de agarose/formamida (SMITH et al., 2003).

Como resultado, pode-se verificar que a amostra correspondente a podagrina foi capaz de depurar o RNA na concentração de 10 μg (Figura 10). O rRNA tratado com a podagrina apresentou uma banda similar ao fragmento de Endo (de aproximadamente 400 nucleotídeos) liberado do rRNA de levedura e detectado após o tratamento com anilina. Este fragmento não foi detectado nas amostras controle (contendo apenas o rRNA e o rRNA tratado somente com a anilina). Esse resultado somado aos demais, confirmaram que a podagrina é uma RIP tipo 1, por ser um monômero com atividade rRNA-*N*-glicosidase.

FIGURA 10. Atividade rRNA-*N*-glicosidase *in vitro* da podagrina em gel de agarose/formamida. MM – marcador molecular; 1 – controle negativo (rRNA sem tratamento); 2 – rRNA de *Pichia pastoris* incubado com 10 μg de podagrina. A seta indica o fragmento de Endo liberado e detectado após tratamento com RIP e anilina.



Fonte: elaborada pelo autor.

5.8. Atividade anti-helmíntica da podagrina

A percentagem média de mortalidade nos testes *in vitro*, usando-se diferentes concentrações da podagrina, em diferentes tempos de exposição do parasito a RIP tipo 1, está disposta na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual médio de mortalidade da podagrina sobre *Ascaridia galli*, no teste *in vitro*, ao longo de 96 horas de tratamento.

Amostras	Concentração (mg/mL)	Tempo (h) / Taxa de mortalidade (%)				
		6	12	24	48	72
Água	-	0	0	0	0	0
Piperazina	5	0	12,2 ^a	25,0 ^a	50,0 ^a	100 ^a
Podagrina	1	0	0	0,32 ^d	3,33 ^d	3,33 ^e
	2	0	0	3,33 ^d	13,3 ^c	16,7 ^d
	3	0	3,33 ^c	6,67 ^c	16,7 ^c	40,0 ^c
	4	0	6,67 ^b	16,7 ^b	40,0 ^b	76,6 ^b
	5	0	6,67 ^b	16,7 ^b	40,0 ^a	100 ^a

Médias com letras iguais na coluna, não diferem entre si pelo método de Student (P>0,05)

A podagrina começou a apresentar efeito a partir de 12 horas nas concentrações de 3 a 5 mg/mL, sendo esse efeito não muito significativo, quando comparado com o controle positivo. Porém, na 72^a e 96^a hora nas concentrações de 4 e 5 mg/mL, houve diferença estatisticamente significativa, considerando-se a podagrina, o controle positivo (piperazina) e o controle negativo (água). A maior concentração da podagrina (5 mg/mL) demonstrou melhor eficiência no combate ao parasito, sendo a taxa de mortalidade de 100%. Quarenta e oito horas pós-tratamento, foi verificado que tanto a podagrina na concentração de 4 mg/mL quanto na concentração de 5 mg/mL, demonstraram efeito anti-helmíntico igual ao da piperazina.

5.9. Anticorpos policlonais anti-podagrina e ensaios de imunodeteção

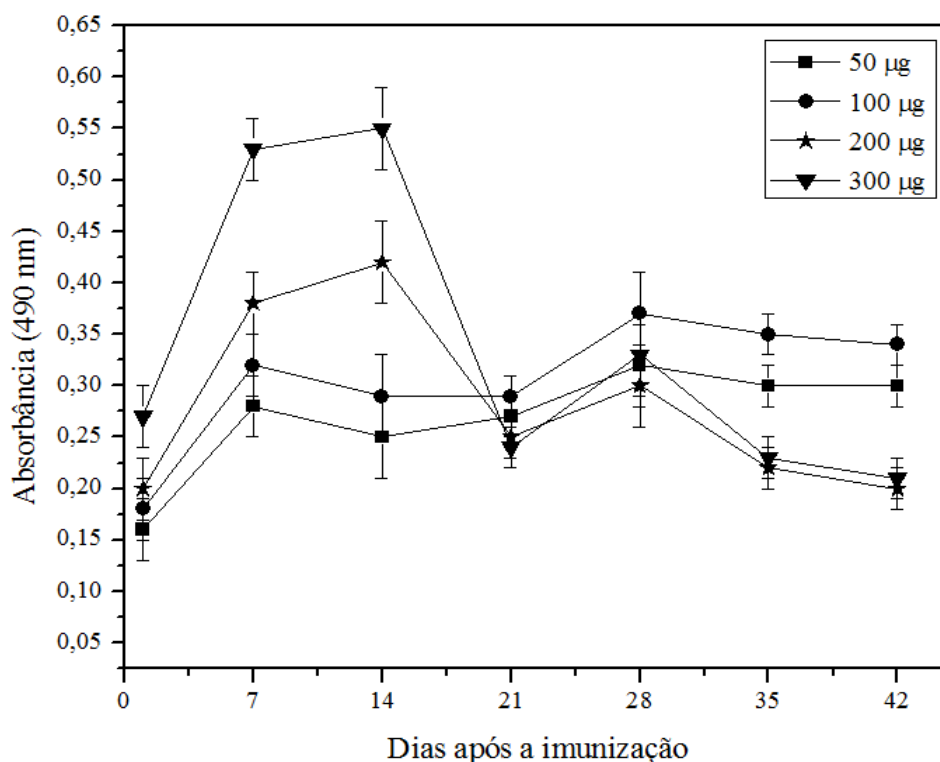
As análises da sensibilidade e especificidade dos anticorpos produzidos contra a podagrina foram realizadas pelos métodos de ELISA e técnica de *Western blotting*, respectivamente.

Como resultado, todos os animais imunizados apresentaram um aumento na síntese anticorpos a partir do 7^o dia após a inoculação da primeira dose da podagrina

(Figura 11). Os animais que receberam doses iniciais de 150 e 100 µg tiveram seu pico máximo de produção de anticorpos no 14º dia, ambos sofrendo, em seguida, uma redução drástica na produção. Também foi observado, que mesmo após a dose reforço (aos 21 dias) não houve alterações significantes na resposta imunológica desses animais. Isso pode ser decorrente da tolerância imunológica, em que a produção de anticorpo é drasticamente reduzida, embora o antígeno continue estimulando a defesa imunológica por outros mecanismos (HOYNE et al., 2000; JANEWAY et al., 2007).

O fenômeno da tolerância imunológica induzida através das vias oral e nasal é bastante estudado. A tolerância oral é bem reconhecida como uma forma de tolerância periférica, em que linfócitos maduros nos tecidos linfoides periféricos tornam-se não funcionais ou hiporeativos por administração oral prévia do antígeno. Outras vias mucosas, tais como mucosa nasal e brônquica, também são eficazes na modulação de respostas imunitárias sistêmicas (JANEWAY et al., 2007; MOWAT *et al.*, 1994). Contudo, a tolerância induzida através da via subcutânea tem sido pouco explorada, sendo escassas as referências na literatura.

FIGURA 11. Cinética da produção de anticorpos anti-podagrina em coelhos imunizados com diferentes quantidades de podagrina.



Fonte: elaborada pelo autor.

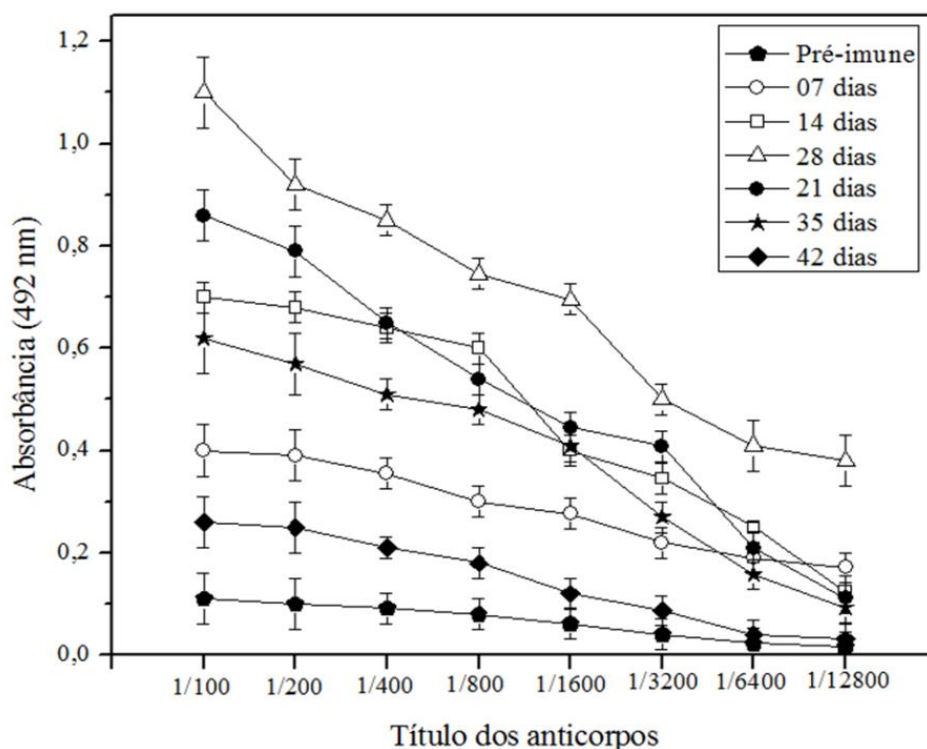
Já os coelhos imunizados inicialmente com 50 e 25 µg de podagrina apresentaram uma resposta imunológica primária tardia, com os picos máximos de produção de anticorpos somente após a administração das doses reforço (aos 21 dias após a imunização). Após administração da dose reforço, só foi observado um aumento significativo na produção de anticorpos no animal que foi imunizado com 100 µg de podagrina, mantendo-se estável até o final do experimento. Esses resultados apontaram que a dose de 100 µg foi a que apresentou a melhor resposta de síntese de anticorpos.

Os soros dos animais imunizados, coletados a cada 7 dias, foram diluídos para determinar até qual diluição os anticorpos anti-podagrina são capazes de reagir com o antígeno (podagrina) imobilizado na placa. Nessa etapa, os soros de cada sangria foram comparados ao pré-imune e aqueles que apresentaram absorbância acima do *cut off* foram considerados positivos para a reação antígeno-anticorpo.

A determinação do título dos anticorpos produzidos pelo coelho imunizado com 100 µg do antígeno mostrou expressiva sensibilidade dos soros coletados nos dias 7,

14, 21 e 28, uma vez apresentaram reatividade até a diluição 1:12.800 (Figura 12). O soro coletado aos 42 dias reagiu somente até a diluição de 1:800. Por apresentar uma maior reatividade nas diferentes diluições, o soro obtido aos 28 dias foi o mais indicado para aplicações experimentais de imunodeteccção.

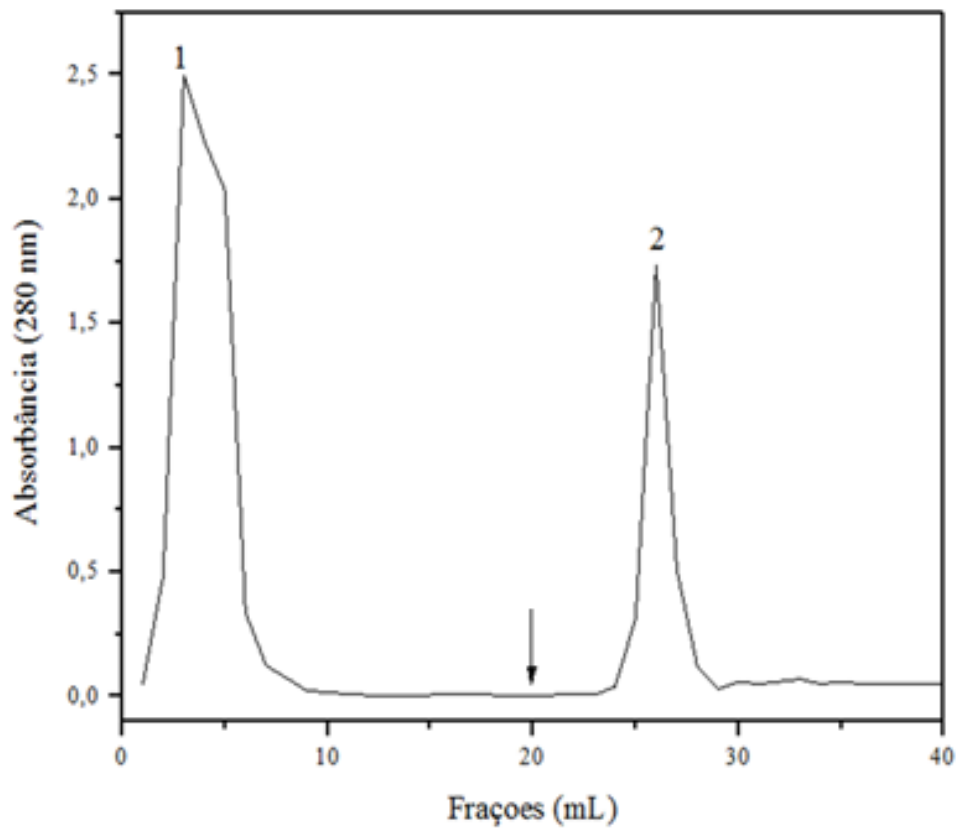
FIGURA 12. Determinação dos títulos dos anticorpos produzidos no coelho imunizado com 100 µg de podagrina.



Fonte: elaborada pelo autor.

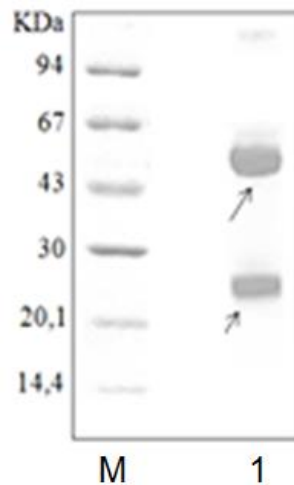
Antes de ser utilizado nos ensaios de imunodeteccção e imunoafinidade, o soro obtido após 28 dias de imunização com a podagrina foi submetido ao processo de purificação em coluna de Sepharose-Proteína A (Figura 13). Foram obtidos dois picos cromatográficos: o pico 1 referente as proteínas que não interagiram com a matriz e o pico 2, referente a fração rica em IgG (correspondente a fração anti-podagrina) que interagiu com a matriz e foi eluída por redução do pH. A eletroforese (PAGE-SDS 15%) sob condição reduzida mostrou a eficiência do processo de purificação da IgG utilizando a matriz de proteína A (Figura 14). O gel de eletroforese mostrou claramente as duas cadeias (pesada e leve, com 55 e 25 KDa, respectivamente) características das IgGs.

FIGURA 13. Purificação do anticorpo policlonal anti-podagrina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A. 1- fração não retida; 2- fração retida.



Fonte: elaborada pelo autor.

FIGURA 14. SDS-PAGE (15%) do anticorpo policlonal anti-podagrina feita sob condições redutoras. M- marcador molecular; 1 – fração referente ao anticorpo anti-podagrina. As setas indicam as cadeias leves e pesadas dos anticorpos.



Fonte: elaborada pelo autor.

O ensaio de *Western blotting*, que confirmou a atividade e eficiência do anticorpo anti-podagrina pela especificidade e forte interação com a podagrina (Figura 15).

FIGURA 15. Análise da atividade do anticorpo anti-podagrina por *Western blotting*. (A) SDS-PAGE (15%): M-marcadores moleculares; 1- podagrina purificada; (B) *Western blotting* com o anticorpo anti-podagrina.

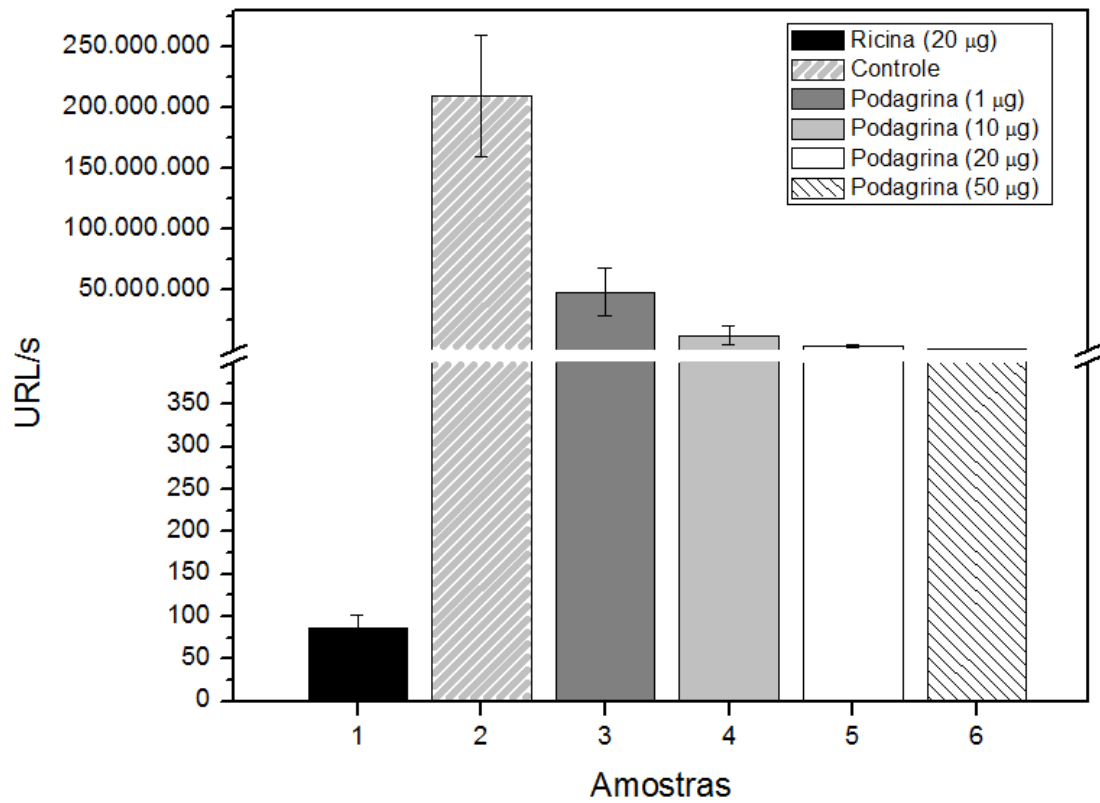


Fonte: elaborada pelo autor.

5.10. Ensaio de inibição da síntese protéica em sistema livre de células

De acordo com os resultados obtidos foi constatado que a podagrina possui uma atividade inibitória expressiva quando comparada ao controle, mas relativamente baixa quando comparada a RIP tipo 2 ricina, que apresentou quase 100% de inibição na concentração de 20 μg (Figura 16). Pesquisas mostram que as RIPs apresentam uma variação na sua capacidade de inativar a síntese proteica *in vitro* e que esta diferença engloba valores de concentração que vão da ordem de picomol (no caso das RIPs tipo 1) à nanomol (no caso das RIPs tipo 2).

FIGURA 16. Inibição da síntese proteica promovida pela podagrina em sistema livre de células (TNT® *Coupled Reticulocyte Lysate System*).



Fonte: elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a podagrina é uma RIP com atividade clássica de inibição da síntese proteica (presença do fator ENDO), com potencial anti-helmíntico em frangos, podendo ser utilizada no futuro para desenvolvimento de produtos para medicina veterinária. Também se destaca o potencial para desenvolvimento de imunotoxinas. Entretanto, as quantidades produzidas neste trabalho não se aplicam a produção em larg escala. Para produção em larga escala é aconselhado a produção da podagrina em *E.coli*, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- ARGENT, R.H., PARROTT, A.M., DAY, P.J, ROBERTS, L.M., STOCKLEYS, P.G., LORD, M.J., RADFORD, S.E. **Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain.** *J. Biological Chem.* Vol. 275, 9263-9269, 2000.
- ARROYO-REYNA, A., HERNÁNDEZ-ARANA, A. **The termal denaturation of stem bromelian is consistent with a irreversible two-state model.** *Biochem. Biophys. Acta.* Vol. 1248, 1230-1238, 1995.
- BARBIERI, L., BATTELLI, M. G., STIRPE, F. **Ribosome-inactivating proteins from plants.** *Toxicon*, Vol. 1154, 237-282, 1993.
- BELTRAMINI, L.M., ARAÚJO, A.P.U. **Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*. Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies.** *FEBS J.*, Vol. 272, 1201-1210, 2005.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 248-254, 1976.
- DESMYTER, S., ROUGE, P., PEUMANS, W.J. **Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes.** *Crit. Rev. Plant Sci.* Vol. 20, 395-465, 2001.
- ENDO Y., TSURUGI, K. **RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes.** *J. Biol.Chem.* Vol. 262, 8128-8130, 1987.
- ENDO, Y., MITSUI, K. MOTIZUKI, M., TSURUGI, K. **The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal caused by the toxins.** *J. Biol. Chem.* Vol. 262, 5908-5912, 1987.
- FRYER, H.J.L.; DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M; VARON, S. **Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer.** *Anal. Biochem.*, Vol. 153, 262-266, 1986.
- HARTLEY, M., CHACIDOCK, J., BONNES, M. **The structure and function of ribosome-inactivation proteins.** *Trends in Plant Science*, Vol.1, 254-260, 1996

HOYNE, G. F.; CORSIN-JIMENEZ, M.; TAN, K.; WAHL, K.; STEWART, M.; HOWIE, S. E. M. **Immunological tolerance to inhaled antigen.** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol.162, 169-174, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLMCHIK, M.J. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.** *Artmed*, p. 848, 2007.

KELLY, S.M., PRICE, N.C. **The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding.** *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 1338, 161-185, 1997.

LACKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** *Plenum Press*, New York, 1983.

_____. **Topics in fluorescence spectroscopy. Vol.1: Techniques.** *Plenum Press*, 1992.

LAPADULA, W.J., AYUB, M.J. **Mini review - Ribosome Inactivating Proteins from an evolutionary perspective.** *Toxicon*, Vol. 136, 6-14, 2017.

LIN, J.; ZHOU, X.; WANG, J., JIANG, P.; TANG, K. **Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*.** *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, Vol. 40, 107–118, 2010.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951

MOWAT, A. M. **Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens.** In: OGRA, P.L.; STROBER, W.; MESTECKY, J.; LMM, M.E.; BIENENSTOCK, J.E. (Eds.). *Handbook of mucosal immunity*, 185-201, 1994.

PEREIRA, M. R. P.; GUEDES, M. I. F. **Imunização oral e alergenecidade induzida por proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L) em camundongos Sweet e sua modulação por carboidratos.** *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, Vol.18, 90-97, 2005.

PURI, M. et al. **Ribosome inactivating protein (RIPs) from *Momordica charantia* for antiviral therapy.** *Curr. Mol. Med.* Vol. 9, 1080–1094, 2009.

PURI, M., KAUR, I., PERUGINI, M. A., GUPTA, R. C. (2012, July). **Ribosome-inactivating proteins: Current status and biomedical applications.** *Drug Discovery Today*, Vol. 17, 774-783, 2012.

RAMOS, M.V., MOTA, D.M., TEIXEIRA, C.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. **Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds.** *Toxicon*, Vol. 36, 477-484, 1998.

- ROBERTUS, J.D., MONZINGO, A.F. **The structure of ribosome inactivating proteins.** *Mini-Rev. Med. Chem.*, Vol. 4, 477-486, 2004.
- S. LEE-HUANG, *et al.* **Inhibition of MDA-MB-231 human breast tumor xenografts and HER2 expression by anti-tumor agents GAP31 and MAP30.** *Anticancer Res.*, Vol. 20, 653-659, 2000.
- SANDVIG, K., VAN DEURS, B. **Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries.** *FEBS Lett.* Vol. 452, 67-70, 1999.
- SILVA, A.L.C, GOTO, L.S., DINARTE, A.R., HANSEN, D., MOREIRA, R.A., WANG, B.Z., LIU, W.Y. **Refolding of partially thermo-unfolded cinnamomin A-chain mediated by B-chain.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* Vol. 306, 39-45, 2003.
- SILVA, A.L.C, GOTO, L.S., DINARTE, A.R., HANSEN, D., MOREIRA, R.A., TAHIROV, T.H., LU, T.C., LIAW, Y.C., CHEN, Y.L & LIN, J.Y. **Crystal structure of abrin-a at 2.14 Å.** *J. Mol. Biol.* Vol. 250, 354-367, 1995.
- STIRPER, F. **Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins.** *Toxicon*, Vol.67, 12-16, 2013.
- STIRPE, F., BAILEY, S., MILLER, S.P., BODLEY, J.W. **Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants.** *Nucleic Acids Res.* Vol. 16, 1349-1357, 1988.
- VAN DAMME, E.J.M., HAO, Q., CHEN, Y., BARRE, A., VANDENBUSSCHE, F., SMITH, D.C, MARSDEN, C.J, LORD, M., ROBERTS, L.M. **Expression, purification and characterization of ricin vectors used for exogenous antigen delivery into the MHC class I presentation pathway.** *Biol. Proced. Online*, Vol. 5, 13-19, 2003.
- WATANABE, K., HONJO, E., TSUKAMOTO, T., FUNATSU, G. **Fluorescence studies on the interaction of adenine with ricin A-chain.** *FEBS Letters* Vol.304, 249-251, 1992.
- WOODY, R.W. Circular dichroism of peptides and proteins. In: Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R.W. (eds.) **Circular Dichroism. Principles and Applications.** VCH Publishers, Inc., 473-521, 1994.