

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

DETECÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DE DEFESA EM PLANTAS DE MAMOEIRO (CARICA PAPAYA) E DE AVELÓS (EUPHORBIA TIRUCALLI).

¹ Luiz Felipe Sarmiento Bonet (IC-FAPERJ), ¹ Sidney Fernandes Sales Junior, ¹ César Luis Siqueira Júnior (Orientador).

1 – Departamento de Botânica; Instituto de Biociências; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Apoio Financeiro: UNIRIO, FAPERJ

Palavras-chave: Mamoeiro, Defesa vegetal, Cistatina.

INTRODUÇÃO

O Brasil coloca-se, segundo dados da Food and Agriculture Organization (2010) da ONU, como o segundo maior produtor de mamão no mundo, sendo um dos maiores produtos de exportação do país (Lima et al., 2001), apesar de ter sido previsto que o Brasil estaria em primeiro lugar até 2010. Pode-se imaginar que, excluindo as variáveis socioeconômicas, o principal fator que impossibilitou a produção nacional de atingir os níveis esperados pode ter sido o ataque de patógenos aos mamoeiros ou aos frutos já em armazenamento. Como os demais vegetais, o mamoeiro encontra-se exposto a estresses tanto bióticos quanto abióticos, que podem influenciar a produção de frutos. Entretanto, também como os demais vegetais, o mamoeiro possui mecanismos de defesa contra estes estresses, desenvolvidos e refinados por séculos de coevolução entre plantas e seus predadores, cada célula possuindo a capacidade de defesa natural e defesa induzida. A resistência natural, ou pré-formada, trata-se da variedade de barreiras e mecanismos de defesa já existentes no organismo vegetal. Já os mecanismos de defesa induzida permanecem latentes ou inativos, sendo ativados após a exposição ou contato com agentes de indução (Dias e Rangel, 2007). Quando um herbívoro lesiona uma parte do corpo vegetal, são ativados genes defensivos de maneira coordenada pelo reconhecimento de diferentes moléculas sinalizadoras. Esta resposta coordenada resulta na defesa induzida, que pode ser caracterizada por modificações estruturais (Benhamou, 1996), bem como a produção de compostos químicos em resposta aos estímulos das lesões por insetos mastigadores ou patógenos. Na miríade de moléculas induzidas podemos destacar os inibidores de proteinase, as peroxidases, as polifenol oxidases, as proteínas PR e muitas outras (Ryan, 1990; Ananthkrishnan, 1999; Mitra et al, 2008). A síntese de moléculas que interferem no processo digestivo de insetos é uma estratégia largamente observada em plantas (Jouanin et al, 1998), que é o caso dos inibidores de proteinases cisteínicas, ou cistatinas, as principais moléculas de defesa que deseja-se encontrar nos mamoeiros neste trabalho. A presença de fragmentos codificantes de inibidores de proteinases cisteínicas no DNA do mamoeiro é interessante (Song et al, 1995), pois neste mesmo vegetal existe outra defesa contra insetos praga, o látex e suas proteínas (Azarkan et al, 2004). É deste látex que é retirada a papaína, uma protease cisteínica bem conhecida e amplamente utilizada. Em adição, a planta Avelós (*Euphorbia tirucalli*) é um arbusto de médio a grande porte, bem distribuído nas regiões tropicais, como África, Índia e Sri Lanka e bem conhecida popularmente. É um membro da família das Euforbiáceas e, como é característico do gênero, seu látex é rico em diterpenóides e muitas outras substâncias cuja concentração varia de acordo com os estresses sofridos pelo vegetal (Damodaran, 2002; Varricchio, 2005). No geral, seu látex é cáustico e extremamente irritante à pele, com resultados ainda piores nas mucosas. Em contato com os olhos, pode causar até cegueira por vários dias. Devido à essa miríade de substâncias, a Avelós tem sido explorada em vários setores. No campo da medicina, seu uso é amplo, tanto como fitoterápico cultural para problemas simples, como verminoses e dor de ouvido, quanto na medicina tradicional, onde é um expoente no tratamento contra o câncer (Costa, 2011), mas onde também é associado à formação de um tipo de linfoma (van den Bosch, 1993). Adicionalmente, seu látex pode ser facilmente transformado em um equivalente da gasolina, levando muitos a cogitarem uma exploração maior deste recurso, como fez Calvin (1978), que até mesmo calculou a produção em barris por acre de plantação. Com tamanha versatilidade em vista, não é difícil imaginar como essa planta pode ser útil na quadro apresentado acima, como um possível agente protetor de aplicação tópica ou como ativador do sistema de defesa do próprio mamoeiro.

OBJETIVO

Detectar e caracterizar a atividade de proteínas de defesa envolvidas no mecanismo de resposta ao ataque de predadores em mamoeiro. Caracterizar a atividade de proteínas de defesa em Avelós, a fim de clarificar seu uso quanto ao mamão.

METODOLOGIA

Plântulas de mamoeiro foram germinadas em vermiculita, acondicionadas em estufa BOD sob iluminação diária de 12h à 30°C. Após a germinação as plântulas foram mantidas por aproximadamente 20 dias até que folhas opostas fossem bem visíveis para extração de proteína de tecido foliar. Sementes de mamoeiro foram obtidas a partir de frutos de mamão papaia vendidos em mercados locais. A indução das plântulas foi feita por exposição ao Metil Jasmonato em dois grupos, de vinte e quatro horas e de quarenta e oito horas. As folhas das plântulas foram utilizadas para extração proteica por maceração mecânica. Nesse processo, as mesmas foram cortadas em pequenos pedaços e lavadas em água destilada a fim de se retirar o látex. Posteriormente estas foram maceradas em nitrogênio líquido e as proteínas, extraídas pela adição e incubação em tampão de extração, específico para tecido foliar. As amostras foram, então, centrifugadas a 15.000xg por vinte minutos, sendo o sobrenadante recolhido e utilizado nos experimentos seguintes. O material vegetal extraído foi utilizado em ensaios de inibição da atividade enzimática da protease cisteínica papaína. Os ensaios foram

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

feitos seguindo metodologia descrita por Siqueira Junior (2002). Como substrato para a enzima foi utilizado o BANA. As alíquotas do extrato com sample buffer foram separadas em eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS). A porcentagem de acrilamida usada foi de 10%. O processo foi realizado com voltagem de 120V e amperagem aberta. Os ensaios de imunodeteção foram conduzidos conforme metodologia descrita por Towbin et al. (1979). As proteínas extraídas sendo fracionadas em gel de poli(acrilamida e eletrotransferidas para membrana de PVDF. Os anticorpos policlonais para cistatinas de tomate e proteína A peroxidase foram utilizados para visualização das bandas imunorreativas, posteriormente coradas com a utilização de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Foram retirados pedaços do caule de Avelós adulta, sem indução. Esse material foi trabalhado de forma similar às folhas de mamão, excetuando-se pelos fatos que: o material não foi lavado, a fim de se manter o látex da planta; o tampão de extração utilizado não foi para tecido foliar e o material extraído foi deixado em agitação por 30 minutos a 4°C, a fim de se otimizar a extração. Os passos seguintes serão, também, os mesmos, será realizado o ensaio de inibição de atividade de papaína, seguido pelo SDS-PAGE e o western Blot.

RESULTADOS

Plantas tratadas com ferimento mecânico e Metil Jasmonato por 24H e 48H foram avaliadas quanto a produção proteínas com atividade de inibidores de proteinase cisteínicas (cistatinas) Como resultado, observou-se que plantas tratadas com MeJa produzem proteínas que reduzem drasticamente a atividade de papaína, de modo similar a cistatinas já descritas na literatura. Extrato de plantas tratadas por 24H produziu uma inibição de 26% enquanto que extrato de plantas tratadas por 48H produzem uma inibição ainda maior da ordem de 38%. O extrato de folhas de plantas feridas, assim como o extrato de folhas opostas às feridas (sistêmicas) também apresentaram atividade inibitória 24H e 48H após o tratamento. Contudo a redução na atividade de papaína provocada por esses extratos é menor quando comparado às folhas tratadas com MJ. O extrato de folhas feridas induzido por 24H causou uma inibição significativa, de 27%, ao passo que a inibição causada pelo extrato de 48H foi bem reduzida. Já o extrato de folhas sistêmicas 24h e 48h produzem uma inibição de apenas 14,5% e 12,5% na atividade de papaína, respectivamente. Para analisar bioquimicamente esses extratos, as amostras foram fracionadas por SDS-PAGE 10%. Pode-se observar uma mudança no perfil proteico foliar após os tratamentos comparados as plantas controle. Para verificar a presença de proteínas homólogas a cistatina nos extratos, ensaios de western blot foram feitos utilizando-se como anticorpo primário, anticorpos produzidos contra cistatina do tomate. Os resultados indicam a presença de duas bandas proteicas reativas no extrato de folhas de mamoeiro em todos os tratamentos, contudo observam-se bandas mais proeminentes nas amostras tratadas por 48h, indicando a produção de proteínas homólogas a cistatina do tomate em plantas de mamoeiro em resposta ao ataque de pragas, o que sugere a ativação de vias defesa na planta. A dosagem de proteínas do extrato de Avelós rendeu um valor surpreendentemente baixo, de apenas 0,77µg/µl. Apesar disso, a inibição de atividade de papaína foi significativa, inibindo 40,84% da atividade da proteinase cisteínica. Adicionalmente, ficou claro que não existe uma substância homóloga à papaína, analisando a Amostra Controle do ensaio, na qual não se adiciona papaína, apenas seu substrato e o extrato bruto.

CONCLUSÃO

Plantas de mamoeiro submetidas a ferimento mecânico nas folhas produz proteínas com atividade de inibição e proteinases cisteínicas. As proteínas produzidas em resposta a ferimento e tratamento com metil jasmonato possuem homologia com uma cistatina de tomate. Certificou-se a produção de alguma forma de cistatina em Avelós, mas as natureza e sua aplicação só poderão ser determinados com a continuação do estudo.

REFERÊNCIAS

- ANANTHAKRISHNAN, T.N. (1999) Induced responses, signal diversity and plant defense: implications in insect phytophagy. *Curr. Sci.* 76: 285.
- AQUINO, C.L., et al. (2008) High dilutions of *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz) modify the viability and glycolytic metabolism of cell lines. *Int J High Dilution Res*, n. 7, v. 24, p. 132-139.
- AZARKAN, M., et al. (2004) Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. *Elsevier. Phytochemistry* 64. 525:534.
- BENHAMOU, N. (1996) Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends in Plant Science*. 1: 233.
- CALVIN, M. (1978) *Petroleum Plantations*. Lawrence Berkeley National Laboratory, USA.
- COSTA, L.S. (2011) Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas: uma revisão. Campina Grande, PB.
- DMODARAN, M. (2002) Plants in pest control. Disponível em: <<http://www.ciks.org/september.PDF>> Acessado em: 13/05/2014
- DIAS, G.B., RANGEL, T.B.A. Indução de resistência em plantas: o papel do óxido nítrico. *Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia*, Natal, n.3, p. 1-8, 2007.
- JOUANIN, L., et al. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*, 131:1.
- LIMA, R. C. A., et al. (2001) Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 26:689.
- MITRA, S., et al. (2008) Silencing 7 herbivory-regulated proteins in *Nicotiana attenuata* to understand their function in plant-herbivory interactions. *Funct. Ecol.* 22:606-615.
- RYAN, C.A. (1990) Proteinase inhibitors in plant: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual. Review of Phytopathology*. 28: 425.
- SIQUEIRA JUNIOR, C.L., et al. (2002) 87 kDa Tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40: 247.
- SONG, I., et al. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. (1995) *Elsevier. Gene* 162. 221:224.



13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979) Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350.

VAN DEN BOSCH, et al. (1993) Are plant factors a missing link in the evolution of endemic Burkitt's lymphoma? *Br J Cancer*, n. 68, v. 6, p. 1232-1235.

VARRICCHIO, M.C.B.N., et al. (2008) Cultivo in vitro de *Euphorbia tirucalli* (aveloz), avaliação da constituição química do látex, em diferentes condições de cultivo, e teste de atividade larvívica e juvenilizante em *Aedes aegypti*. *Revista de Biologia e Farmácia*, v. 2, n. 1.

VARRICCHIO, M.C.B.N., et al. (2008) Chronic toxicological effects of high diluted solutions of Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.) on healthy mice: a preliminary study. *Int J High Dilution Res*, n. 7, v. 25, p. 174-178.

VARRICCHIO, M.C.B.N. (2005) Estudos integrados: biotecnologia, toxicologia, metabólitos especiais e atividade antitumoral de *Euphorbia tirucalli* L. Dissertação – Dissertação Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro.