

## 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

### BIOLOGIA

#### DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA HOMÓLOGA A CISTATINA DO TOMATE EM SEMENTES DE MAMOEIRO (CARICA PAPAYA)

<sup>1</sup> Maria Fernanda Ferreira Jeunon (IC – Unirio); <sup>1</sup> César Luis Siqueira Junior (orientador).

1- Instituto de Biociências (IBIO), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro;

Apoio financeiro: UNIRIO, FAPERJ.

Palavras-chave: sementes; carica papaya; proteínas de defesa; fitocistatinas.

#### INTRODUÇÃO

Consumido no mundo todo e repleto de vitaminas, sais minerais e fibras, o mamão origina-se da América Tropical e tem como seu maior produtor o Brasil, com oferta de 45% do total da produção mundial (Moreira Souza, 2007). No entanto, da mesma forma que outros vegetais, o mamoeiro encontra-se diariamente exposto a estresses bióticos (ataques de pragas e doenças) e abióticos (como oscilações de temperatura) aos quais precisa resistir. Por conta da imobilidade, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa físicos e químicos, nos quais cada célula possui capacidade de defesa induzida e pré-formada (Rizzardi et al., 2003). Tendo isto em vista, as defesas pré-formadas constituem a variedade de barreiras físicas e químicas intrínsecas ao organismo. Por sua vez, os mecanismos induzidos ficam inativos ou latentes até serem ativados pela exposição ou contato com algum agente de indução. Essas moléculas induzidas podem ser inibidores de proteinases, as peroxidases, e outras (Ryan, 1990). Dos inibidores de proteinase pode-se destacar os inibidores de cisteínas e tripsinas, deles, a cistatina (proteína que inibe cisteínas-proteinases por inibição competitiva) é encontrada em sementes de vegetais monocotiledôneos e dicotiledôneos, agindo contra proteinases de insetos e patógenos (Richardson, 1991). Por serem de uma família diferente de outras cistatinas (como as encontradas em animais), nos vegetais elas podem ser chamadas de fitocistatinas e têm tamanhos que variam entre 5 e 87kDa (Melo Silva, 2007). Cistatinas já foram isoladas em variadas plantas, identificando-se diversas de suas funções que não somente o mecanismo de defesa contra invasão de patógenos ou ataque de pragas (Arai et al, 2002); como por exemplo, a mobilização de reservas no momento da embriogênese e na germinação das sementes, e a morte celular programada (apoptose) (Abe et al., 1987; Misaka et al., 1996; Solomon et al., 1999). No estudo aqui apresentado, analisou-se as sementes de mamoeiro quanto à presença de inibidores de proteinase cisteínica (cistatina) com ênfase na detecção de uma cistatina homóloga à cistatina presente no tomate, que já teve sua eficácia como biofungicida demonstrada anteriormente sobre os fungos *Fusarium solani* e *Trichoderma viride* (Siqueira Junior et al., 2002).

#### OBJETIVO

Detectar e caracterizar uma proteína homóloga à cistatina do tomate em sementes de mamoeiro (*Carica papaya*) assim como suas funções na defesa de plantas.

#### METODOLOGIA

Material Vegetal:

Foram coletadas sementes de mamão (*Carica papaya*) a partir de frutos adquiridos comercialmente para a elaboração de experimentos para detecção de inibidores de proteinase. Após serem removidas dos frutos de forma manual, essas sementes foram lavadas em água corrente para remover os vestígios do fruto assim como a sarcotesta das sementes, e colocadas para secar ao sol.

Extração de proteinase a partir de sementes de plantas:

As proteínas foram extraídas das sementes de mamão por meio da trituração das sementes até a obtenção de uma farinha a qual foi adicionada ao tampão de extração (fosfato de sódio 5 mM; pH 6,5; em quantidade de 5 mL de tampão para cada 1 g de sementes) e PVPP (em proporção equivalente a 10% do peso das sementes).

A mistura foi mantida em um béquer a 4°C por uma hora, sendo centrifugada em seguida por 20 minutos a 15000 xg. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado por mais 30 minutos a 15000 xg, por duas vezes. Ao fim das centrifugações, o sedimentado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como solução contendo inibidores de proteinase de sementes de mamoeiro sendo parte aliquoteada para análise em SDS-PAGE e imunoblotting.

Precipitação em Sulfato de Amônio:

O extrato bruto foi submetido à precipitação em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulfato de Amônio) 0 -50% por 1 hora a 4°C sob agitação. Após esse período a mistura foi centrifugada a 15.000 xg por 20 minutos a 4°C. O sedimentado foi descartado e o sobrenadante novamente submetido à precipitação em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 - 90% por 1 hora a 4°C sob constante agitação. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspenso em água ultrapura e analisado quanto à presença de inibidores de papaína e submetido a análises por SDS-PAGE e imunoblotting.

Análise da inibição da atividade enzimática de papaína por extratos de sementes de mamoeiro:

De forma a se avaliar a atividade enzimática de papaína em presença de extrato foi utilizado BANA (Na-Benzoyl-DL-Arginine β-Naphtylamide) da SIGMA-

### 13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ALDRICH de acordo com a metodologia descrita por Siqueira Junior (2002). A enzima papaína (5 µg) foi pré-incubada individualmente com 50 µg do extrato bruto e do precipitado 50-90% por 5 min a 37°C em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, contendo EDTA 2.5 mM e β-mercaptoetanol 25 mM. Com a adição de 35 µL de BANA 5 mM em DMSO 10%, para um volume total de ensaio de 350 µL, a reação foi iniciada. Após a incubação a 37 °C por 10 min, parou-se a reação pela adição de 500 µL de HCl 2% em etanol e a coloração foi obtida pela adição de 500 µL de p-dimetilaminacinnamaldeído 0,06% em etanol. A atividade enzimática foi avaliada espectrofotometricamente a 540 nm. A inibição foi avaliada como percentagem de redução da absorvância em relação à amostra controle.

Imunodeteção de inibidores de proteinase em sementes:

Os ensaios de imunodeteção foram conduzidos conforme metodologia descrita por Towbin et al. (1979). As proteínas extraídas foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Os anticorpos policlonais e proteína A peroxidase foram utilizados para visualização das bandas imunorreativas, coradas com a utilização de TrueBlue Peroxidase Substrate.

#### RESULTADOS

Por meio dos ensaios enzimáticos foi possível observar que utilizando-se 100µg total de proteínas do extrato bruto das sementes de mamão, a redução aproximada de 58% da atividade catalítica total da papaína, com desvio padrão de 4% para mais e para menos. Tais dados foram obtidos da média de três experimentos distintos. Por sua vez, das amostras que passaram pela sedimentação em sulfato de amônio, somente as de 50-90% mostraram resultados na redução da atividade catalítica da papaína (também sendo utilizadas 100µg de proteína total), sendo esta de ~54%. Para confirmar a presença de proteínas homólogas à cistatina do tomate foram realizadas análises em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e imunoblotting, nas quais detectou-se bandas proteicas comuns ao extrato bruto e ao precipitado de ~31kDa e ~45kDa que reagiram cruzadamente com um anticorpo policlonal produzido contra cistatina de folhas de tomate, sendo a de ~45kDa aparentemente presente em maior quantidade no precipitado.

#### CONCLUSÃO

Observou-se a presença de dois inibidores de proteinases cisteínicas em sementes de mamoeiro homólogas à cistatina do tomate, indicando a presença de cistatinas em sementes de mamoeiro. Demais análises incluindo o isolamento dessas proteínas estão sendo desenvolvidas no Laboratório Integrado de Biologia Vegetal.

#### REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. (1987) Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol. Chem.*, 262:16793.
- ARAI, S. et al. (2002) Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.6612-6617.
- MELO SILVA, M. (2007) Expressão recombinante da canacistatina em células de inseto. Universidade Federal de São Carlos, 74 f.
- MISAKA, T., et al. (1996) Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur Jor Biochem*, 240:609.
- MOREIRA SOUZA, S. A. Mamão no Brasil: distribuição regional da produção e comportamento dos preços no período 1996-2005. *Informações Econômicas*, SP, v.37, n.9, set. 2007.
- RICHARDSON, M.J. (1991) Seed storage protein: the enzyme inhibitors. Academic Press: New York. p. 259-305.
- RIZZARDI, M. A., et al. (2003) Herbicides action in plant defence mechanisms to pathogens. *Ciência Rural*, 33:957.
- 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) 87kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals I prosystemin overexpressing transgenic plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 40:247-254.
- SOLOMON, M. et al. (1999) The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell*, v. 11, 431-443.