

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANA PAULA DE ARAÚJO BOLETI

**POUTERIN, UMA PROTEÍNA LECTINA-LIKE ISOLADA DE
SEMENTES DE *Pouteria torta* E SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS,
INSETICIDAS E FUNGICIDAS.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Ana Paula Araújo Boleti</u> <u>Marcia Leque de Melo</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a obtenção do título de doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPINAS-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

B637p

Boleti, Ana Paula de Araújo

Posterin, uma proteína lectina-like isolada de sementes de *Pouteria torta* e seus efeitos citotóxicos, inseticidas e fungicidas / Ana Paula de Araújo Boleti. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Pouteria torta*. 2. Sementes. 3. Fungos. 4. Inseto. 5. Apoptose. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Pouterin, a lectin-like protein isolated from *Pouteria torta* seeds and its cytotoxic, insecticidal and antifungal effects.

Palavras-chave em inglês: *Pouteria torta*; Seeds; Fungi; Insects; Apoptosis.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Sérgio Marangoni, Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Valdirene Moreira Gomes, Maristela Cesquini Oliveira.

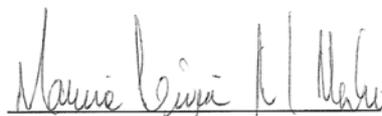
Data da defesa: 20/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

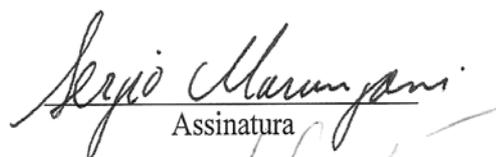
Campinas, 20 de Fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

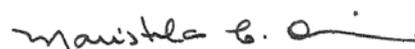
Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


Assinatura

Profa. Dra. Valdirene Moreira Gomes


Assinatura

Profa. Dra. Maristela Cesquini Oliveira


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

Profa. Dra. Bayki Hussein Kassab

Assinatura

À Deus, por me conceder tranquilidade e perseverança
necessária para enfrentar os momentos difíceis e de
atribuições.

Agradeço

...Aos meus queridos pais, Ironilda de Araújo Boleti e Aléssio
Silveira Boleti por nunca terem medido esforços para incentivar
a minha formação acadêmica.

... Aos meus irmãos, Marcos, Mari, Jane e Paty, e suas famílias
pelo incentivo e por compartilharem as dificuldades e os
momentos difíceis.

Dedico

Aqueles que torcem por mim e me incentivam:
...Ao meu tio Antônio,
.....Aos meus amigos Gláucia Mello, Gilberto Justino e Anderson
Santana.

Ofereço

Agradecimentos

A profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo pela confiança e orientação científica ao longo de toda a minha formação acadêmica. Obrigado Lígia por acreditar em mim e permitir que eu vencesse mais uma etapa da minha vida, engrandecendo o meu desenvolvimento profissional;

Aos professores Sérgio Marangoni, José Camillo Novello, Tomomasa Yano e Carmen V. Ferreira por terem me recebido em seus laboratórios colaborando assim com o meu crescimento científico;

Aos professores Drs Sérgio Marangoni, Leonilda M.B. dos Santos, Valdirene Moreira Gomes e Maristela Cesquini Oliveira, por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim o meu trabalho;

Aos professores Hiroshi Aoyama, Leonilda M. B. dos Santos e Cláudio C. Werneck por terem participado da minha banca de qualificação onde puderam apresentar valiosas sugestões e observações importantes para cuidadosa revisão deste trabalho;

Ao meu querido amigo, Cláudio Ventura, pelo companherismo e amizade, pelos ensinamentos com cultivo de células e principalmente pela ajuda na realização dos experimentos e confecção desta tese.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB/UFMS) pela amizade e colaboração nos experimentos;

Aos companheiros do laquip e laboratório de Antígenos Bacterianos pelos saudosos anos de convívio.

A Stella e Paulo Baldasso, pela disponibilidade e apoio técnico,

A Capes pelo apoio financeiro.

Índice

Capítulo I

1. Introdução	1
1.1. Aspectos Gerais	1
1.2. Proteínas lectinas-like de plantas.....	2
1.3. Proteínas de defesa vegetal e seus efeitos fungicidas.....	3
1.4. Papel inseticida das proteínas de defesa vegetal	5
1.4.1. Danos causados por insetos aos grãos armazenados	5
1.4.2. Morfofisiologia da digestão dos insetos	6
1.4.3. Efeito inseticida das lectinas de plantas	8
1.4.4. Efeito inseticida de proteínas de defesa vegetal	10
1.5. Plantas transgênicas no controle de pragas.....	11
2. Objetivos	13
3. Materiais	14
3.1. Material Biológico.....	14
3.1.1. Planta	14
3.1.2. Os animais	16
3.2. Reagentes.....	17
4. Métodos	18
4.1. Caracterização físico-química da proteína lectina-like de sementes de <i>P. torta</i> . 18	
4.1.1. Purificação de Pouterin.....	18
4.1.2. Dosagem de proteína.	18

4.1.3. Ensaio de hemaglutinação.....	18
4.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	19
4.1.5. Efeito da temperatura e do pH.....	19
4.1.6. Dosagem de carboidratos totais.....	19
4.1.7. Inibição da Hemaglutinação.....	20
4.1.8. Composição de Aminoácidos.....	20
4.1.9. Coluna de quitina.....	20
4.2. Estudo da atividade fungicida da proteína lectina-like de sementes de <i>P. torta</i> . 20	
4.2.1. Manutenção e preparação dos esporos e células.....	20
4.2.2. Ensaio de inibição do crescimento dos fungos.....	21
4.3. Estudo da atividade inseticida da proteína lectina-like de sementes de <i>P. torta</i> . 21	
4.3.1. Efeito de pouterin sobre o desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i>	21
4.3.2. Efeito de pouterin sobre o desenvolvimento larval de <i>A. kuehniella</i>	22
4.4. Análise estatística.....	24
5. Resultados.....	25
5.1. Purificação da proteína lectina-like.....	25
5.1.1. Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-100.....	25
5.1.2. Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose.....	26
5.1.3. Cromatografia em Fase-resersa (sistema HPLC).....	27
5.2. Atividade hemaglutinante de pouterin.....	28
5.3. Caracterização de pouterin.....	30
5.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	30
5.3.2. Especificidade de ligação a carboidratos.....	31
5.3.3. Efeito da temperatura e do pH na estabilidade de pouterin.....	32
5.3.4. Composição de aminoácidos.....	34

5.4. Estudo das atividades biológicas de pouterin.....	35
5.4.1. Atividade fungicida de pouterin	35
5.4.2. Efeito de pouterin sobre o desenvolvimento <i>Callosobruchus maculatus</i> ...	36
5.4.3. Efeito de pouterin sobre o desenvolvimento <i>Anagasta kuehniella</i>	38
5.4.4. Mecanismo de ação de pouterin sobre o desenvolvimento <i>Anagasta kuehniella</i>	40
5.5. Coluna de quitina.....	46
6. <i>Discussão</i>	47
7. <i>Conclusões</i>	52
8. <i>Referências Bibliográficas</i>	53

Capítulo II

1. <i>Introdução</i>	62
1.1. Morte Celular.....	62
1.2. Vias de Sinalização da Apoptose.....	64
1.3. Vias de sinalização mediada pelo TNF- α	68
1.4. Proteínas Vegetais e Apoptose.	69
2. <i>Objetivos</i>	72
3. <i>Materiais e Métodos</i>	73
3.1. Reagentes.....	73
3.2. Cultura celular	73
3.3. Ensaio de Viabilidade Celular.....	73

3.4. Dosagem de Lactato Desidrogenase.....	74
3.5. Estudo das Alterações Morfológicas induzidas por Pouterin.....	74
3.6. Marcação do Citoesqueleto de Actina.....	74
3.7. Fragmentação do DNA pelo Ensaio de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling).....	75
3.8. Western blotting	75
3.9. Análise Estatística	76
4. Resultados.....	77
4.1. Citotoxicidade induzida por Pouterin.....	77
4.2. Efeito tempo-dependente de Pouterin sobre células HeLa.....	79
4.3. Efeito de Pouterin sobre a morfologia das células HeLa.....	81
4.4. Alterações induzidas por Pouterin no citoesqueleto de actina	83
4.5. Fragmentação do DNA em células HeLa tratadas com Pouterin.....	84
4.6. Pouterin up regula TNFR1 em células HeLa	85
4.7. Pouterin modula a sinalização do NFκB em células HeLa	86
4.8. Efeitos de pouterin sobre proteínas do ciclo celular em células HeLa.....	88
5. Discussão.....	89
6. Conclusões.....	93
7. Referências Bibliográficas.....	94

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Diagrama Geral do canal alimentar de um inseto	7
Figura 2: Árvore, frutos e sementes de <i>Pouteria torta</i>	15
Figura 3: <i>C maculatus</i> sobre grãos de feijão <i>Vigna unguiculata</i>	16
Figura 4: Inseto adulto de <i>A. kuehniella</i>	17
Figura 5: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacry S-100.	25
Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose	26
Figura 7: Cromatografia de P1-DS em coluna μ -Bondapak	27
Figura 8: Análise em PAGE-SDS de pouterin purificada.....	30
Figura 9A: Efeito da temperatura sobre atividade hemaglutinante de pouterin.....	32
Figura 9B: Efeito dos pH sobre atividade hemaglutinante de pouterin.	33
Figura 10: Efeito de pouterin sobre o crescimento dos fungos	35
Figura 11: Efeito de pouterin sobre larvas de <i>C. maculatus</i>	37
Figura 12: Efeito de pouterin sobre larvas de <i>A. kuehniella</i>	39
Figura 13: Parâmetros fisiológicos avaliados para larvas de <i>A. kuehniella</i> .	42
Figura 14: Atividade tripsina-like das larvas de quarto ínstar alimentadas com dieta controle e dieta contendo 0,5 % de pouterin.	44
Figura 15: PAGE-SDS (10%) contendo gelatina a 0,1 %.	45
Figura 16: Eluição do perfil de pouterin a coluna de quitina.	46

Capítulo II

Figura 1: Diferentes tipos de Morte Celular	63
Figura 2: Vias de sinalização de apoptose.	65
Figura 3: Via de morte e sobrevivência celular mediada pelo TNF α	69

Figura 4: Efeito de Pouterin sobre viabilidade celular das linhagens HeLa, Vero, Hep-2 e HT-29	78
Figura 5: Efeito time-course da IC ₅₀ de pouterin (5 µg/mL) sob a viabilidade das células HeLa pelo método do MTT	80
Figura 6: Alterações morfológicas induzidas por pouterin em células Hela (A-E).	82
Figura 7: Marcação do citoesqueleto de actina em células HeLa após 4 h de incubação.	83
Figura 8: Efeito de pouterin sobre fragmentação de DNA após coramento com TUNEL (A-D).	84
Figura 9: Efeito de pouterin sobre a expressão de TNFR1, TRAF2 e TRADD em células HeLa.	85
Figura 10: Efeito de pouterin sobre a expressão de NFκB p65, IAP1 e Bax em células HeLa.	87
Figura 11: Efeito de pouterin sobre a expressão de p21 e c-myc em células HeLa.....	88

Abreviação para Aminoácidos

<i>AMINOÁCIDOS</i>	<i>ABREVIÇÃO (3 LETRAS)</i>	<i>SÍMBOLO</i>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Lista de Abreviaturas

Apaf-1 - Ativador de protease apoptótica fator 1

BAPNA - *N*-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida

Bax - Proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2 - Proteínas de células B (Linfoma tipo 2)

Bid - proteína pro-apoptica

DD - Domínio de morte

DED - Domínio efetor de morte

DISC - Complexo de sinalização de morte

DMSO - dimetilsulfoxido.

DTT – Ditioneitol

ED₅₀ – Dose efetiva para uma resposta de 50 % no peso médio larval

EGTA - ácido etilenodiaminoglicoltetraácido

FADD - Domínio de morte associado ao Fas

Fas - Membro da superfamília de receptores TNF (ou CD95, ou APO-1)

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

HeLa - Células de carcinoma cervical humano

Hep-2 – Células de carcinoma epitelial alveolar humano

HT-29 – Células de carcinoma colon humano

IAP – Inibidor das proteínas da apoptose

IC₅₀ - Concentração inibitória a 50 %

kDa - Kilodalton

LDH - Lactose desidrogenase

LD₅₀ – Dose letal para uma resposta de 50 % na sobrevivência larval

MEM - Meio Mínimo essencial de Eagle

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NFκB - Fator nuclear Kappa B

PARP - Polimerase poli-ADP-ribose (enzima reparadora do DNA)

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCD - Morte celular programada

PHA-L - Leuco-aglutinina de *Phaseolus vulgaris*

RelA – Complexos homo ou hetero dímeros de polipeptídios que compõe o NFκB

RIP - Proteína de interação ao receptor

RPMI - “Roswell Park Memorial Institute” (meio de cultura)

p21 – quinase ativada

PAGE-SDS - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

t-Bid - Proteína pro-apoptótica ativada

TEMED – N'-N'-N'-N'- tetra metilenodiamina

TLCK - N-p-tosyl-L-lysine chorometril cetona

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

TRADD – Domínio de morte associado ao TNFR1

TRAF-2 - Fator-2 associado ao receptor TNFR

Tris - Hidroximetil aminometano

TRITC – Isotiocianato de Tetrametil-rodamina

Vero - células de rim de macaco verde africano

WGA - Lectina de *Triticum vulgaris*

Resumo

Este estudo descreve a purificação e a caracterização parcial de uma nova proteína de sementes de *Pouteria torta*, pertencente à família Sapotaceae. A proteína foi purificada pela combinação de filtração em gel, cromatografias de troca iônica e fase reversa. PAGE-SDS da proteína purificada resultou em uma única banda de 14 kDa e aglutinou eritrócitos humanos e animais. A atividade de lectin-like foi melhor inibida pelas glicoproteínas fetuína, asialofetuína, heparina, orosomucoide e ovoalbumina. A proteína mostrou um conteúdo de carboidrato de 22 %, estabilidade entre 37- 60 °C e pH 5.0-10.0. Pouterin teve um conteúdo relativamente extenso de aminoácidos como Asx, Glx e Leu, e também um número alto de resíduos de Cys.

Pouterin inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A proteína lectina-like foi avaliada em relação ao seu papel inseticida sobre *C. maculatus* (Coleoptera) e *A. kuehniella* (Lepidoptera). A incorporação de pouterin em dieta artificial (0,12 %) causou 50 % de mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus*, enquanto que a 0,08 % pouterin produziu uma ED₅₀. Pouterin não produziu efeitos significativos na sobrevivência larval de *A. kuehnuella*; entretanto, a uma ca 1 %, produziu uma redução de 71, 4 % no peso médio larval. Os resultados de utilização da dieta realizados com larvas de *A. kuehniella* apresentaram uma redução em ECI, ECD e AD, e um aumento no CM. Pouterin aumentou os níveis de atividade triptica no intestino médio e nas fezes das larvas de *A. kuehniella*.

A citotoxicidade de pouterin em linhagens celulares tumorigênicas e não tumorigênicas também foram investigadas. Nós verificamos que as células tumorais HeLa, Hep-2 e HT-29 foram altamente sensíveis a citotoxicidade de pouterin de maneira dose-dependente, enquanto células Vero não tumorigênica foram relativamente resistentes a proteína. Dentre as linhagens de células tumorais, células HeLa mostraram uma maior susceptibilidade a citotoxicidade de pouterin, exibindo um aumento tempo-dependente na dosagem de LDH e um valor de IC₅₀ de 5 µg/mL. Alterações morfológicas como arredondamento, retração citoplasmática e condensação da cromatina, consistente com morte celular apoptótica foram observados. A indução de apoptose foi demonstrada pela fragmentação de DNA como detectado pelo TUNEL.

Além disso, células HeLa incubadas com pouterin mostraram rompimento do citoesqueleto de actina.

Análise em western blot revelou que pouterin provocou um aumento na expressão da p21, indicando parada do ciclo celular. Estudos subsequentes forneceram evidências de que a apoptose pode ser parcialmente explicada pela ativação da sinalização do receptor 1 TNF (TNFR1). Interessantemente, uma diminuição tempo dependente da expressão da subunidade do fator nuclear kappa B p65 (NFκB), concomitante com a downregulação do inibidor da proteína 1 da apoptose (IAP1) foram observados, sugerindo que a apoptose mediado pelo TNF é a via predominante induzida por pouterin em células HeLa.

Nossos resultados sugerem que pouterin é uma proteína lectina-like com ampla aplicabilidade biológica, e pode ser uma ferramenta para produzir plantas transgênicas mais resistentes a patógenos e insetos utilizando técnicas de biologia molecular. Finalmente, desde que as células Hela, Hep-2 e HT-29 foram altamente sensíveis a citotoxicidade induzida pela lectina-like, futuras investigações são necessárias, pois suas propriedades podem ser uma ferramenta útil, importante nos estudos da terapia contra o câncer humano.

Abstract

This study describes the purification and characterization of a novel protein from the seeds of *Pouteria torta*, belong to the Sapotaceae family. The protein was purified by a combination of gel filtration, ion-exchange and reverse phase chromatographies. SDS-PAGE of the purified protein resulted in a single protein band of 14 kDa and agglutinated human and animal erythrocytes. The lectin-like activity of pouterin was best inhibited by glycoproteins such as fetuin, asialofetuin, heparin, orosomucoid and ovoalbumin. The protein showed a carbohydrate content of 22 %; stability between 37 and 60 °C and at pH 5.0-10.0. Pouterin had a relatively large content of amino acids such as Asx, Glx and Leu, and there were also a high number of Cys residues.

Pouterin inhibited the growth of the fungi *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum musae* and of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The lectin-like protein was tested for anti-insect activity against *C. maculatus* (Coleoptera) and *A. kuehniella* (Lepidoptera). The incorporation of pouterin into an artificial diet (0.12%) caused 50% mortality in larvae of the insect *Callosobruchus maculatus*, whereas 0.08 % Pouterin produced an ED₅₀. Pouterin did not produce significant effects on survival of *A. kuehniella* larvae; however, at a ca 1 %, it produced a 71.4 % reduction in the average weight of the larvae. The results from dietary utilization experiments realized with *A. kuehniella* larvae presented a reduction in ECI, ECD and AD, and an increase in CM. Pouterin increased the level of trypsin activity in larval midgut and faeces of *A. kuehniella*.

The cytotoxicity of pouterin in tumourigenic and non-tumourigenic mammalian cell lines also was investigated. We found that HeLa, Hep-2 and HT-29 tumor cells were highly sensitive to pouterin cytotoxicity in a dose-dependent manner, whereas non-tumourigenic Vero cells were relatively resistant to the protein. Among the tumor cell lines, HeLa cells showed the highest susceptibility to pouterin cytotoxicity, exhibiting a time-dependent increase in LDH leakage and an IC₅₀ value of 5 µg/mL. Morphological alterations such as rounding, cell shrinkage and chromatin condensation, consistent with apoptotic cell death were observed. Apoptosis induction was demonstrated by DNA fragmentation as detected by terminal dUTP nick-end-labeling (TUNEL). Furthermore, HeLa cells incubated with pouterin showed disruption of the actin cytoskeleton.

Western blot analysis revealed that pouterin caused increased expression of p21, thus indicating cell cycle arrest. Subsequent studies provided evidence that apoptosis may be partially explained in the activation of the TNF receptor 1 (TNFR1) signalling. Interestingly, a time-dependent decrease of the expression of p65 nuclear factor kappa B (NF κ B) subunit, concomitant with a downregulation of the inhibitor of apoptosis protein 1 (IAP1) was observed, suggesting that TNFR-mediated apoptosis is the predominant pathway induced by pouterin in HeLa cells.

Our results suggest that pouterin is a lectin-like protein with wide biological application and could be a tool for the molecular biology. The transformation of the genes coding for this lectin-like could be useful in the development of insect resistance in important agricultural crops. Finally, since HeLa, Hep-2 and Ht-29 cells were highly sensitive to lectin-like-induced cytotoxicity, pouterin merits further investigation due to its properties can be a useful tool in therapy against human cancer.

Capítulo I

Atividade fungicida e inseticida de uma proteína lectina-like de sementes de *Pouteria torta*.

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais

Com o aumento proeminente da população mundial para cerca de 10 bilhões habitantes nas próximas quatro décadas, há uma necessidade imediata para que uma agricultura ambientalmente sustentável alcance uma produção máxima de alimentos e de outros produtos a um custo efetivo (Ferry et al., 2004). Perdas na produção da agricultura devido a pragas e doenças são estimadas em aproximadamente 37 % da produção mundial, sendo que 13 % são causadas por insetos (Gatehouse et al., 1992). Adicionalmente, os danos causados por insetos herbívoros, ácaros, fungos e nematóides causam perdas adicionais à produção por carrear e infectar a lavoura com doenças causadas por patógenos. Mundialmente, mais de 200 doenças de plantas são transmitidas por estes patógenos (Haq et al., 2004).

A necessidade do aumento na demanda da produção que leva a intensificação no uso da lavoura tem aumentado os danos causados por essas pragas e conseqüentemente o seu controle (Macedo et al., 2007). Até o momento, a proteção da lavoura conta predominantemente com o uso de agroquímicos ambientalmente tóxicos que são também deletérios a saúde humana. Ao invés de usar pesticidas químicos em larga escala, outras alternativas tem sido exploradas, baseadas na interdisciplinaridade, “tecnologia e ciência orientando sistemas” e são benéficos em termos de agricultura sustentável (Haq et al., 2004). Estes sistemas sustentáveis diminuirão a entrada de energia e químicos, e não produzirão produtos nocivos, com resíduos de pesticidas (Boulter, 1993).

Para alcançar este objetivo, é necessário aumentar a resistência das plantas a patógenos e insetos através do programa “Integrated Pest Management” (IPM) que inclui uma combinação de estratégias de controle tais como o uso de pesticidas, rotação da lavoura, saneamento do campo. O controle genético ou o uso de plantas transgênicas, expressando genes inseticidas, poderiam ter uma contribuição significativa para a agricultura sustentável e ser um importante componente para IPM.

O controle corrente conta predominantemente com o uso de plantas transgênicas que expressam diferentes endotoxinas do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Zhao et al., 2003). Entretanto, para combater a grande variedade de pragas e insetos, as plantas precisam

fortalecer seus mecanismos de defesas. As plantas sintetizam uma variedade de moléculas para se defender contra o ataque de insetos e patógenos (Bate et al., 1998). Dentre estes mecanismos de defesas químicas, os chamados componentes secundários, como metabólicos terpênicos, fenóis, alcalóides, e glicosídeos cianogênicos, são de grande importância, mas tem sido reportado que proteínas estão envolvidas no sistema de defesa de muitas plantas (Uchôa et al., 2006).

Lectinas e proteínas lectinas-like representam uma classe destas moléculas, assim como inibidores de enzimas digestivas, quitinases e vicilinas. A principal característica dessas lectinas é a sua habilidade de interagir com carboidratos e combinar com glico-componentes da superfície celular. A atividade inseticida e fungicida dessas proteínas contra um grande número de espécies de insetos e fungos tem sido documentada (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002, Macedo et al., 2003, Vasconcelos and Oliveira, 2004). Esta característica representa um potencial para uso de lectinas e proteínas lectina-like de plantas como agentes inseticidas e fungicidas naturais contra pragas que restringem o aumento na produção das lavouras.

1.2. Lectinas de plantas

Lectinas de plantas é um grupo heterogêneo de proteínas classificadas com base em sua habilidade de se ligar de maneira reversível e bem definida a açúcares simples e ou/carboidratos complexos (Pandey et al., 1985). Uma das últimas definições bem estabelecidas deste grupo de proteínas foi realizada por Peumans et al. (1998), onde definiu lectinas como proteínas, com no mínimo um domínio não catalítico, que ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos.

Sua habilidade em aglutinar células é uma característica fisiológica reconhecida que depende de sua especificidade e de sua elevada afinidade de ligação a carboidratos particulares na superfície celular (Mejía and Prisecaru, 2005). A atividade hemaglutinante de lectinas tem sido geralmente a base de sua detecção e purificação, e leva o seu uso para estudar várias funções biológicas (Rüdiger et al., 1997, 1998).

Lectin-like são proteínas que possuem propriedades de lectinas, ou seja, domínios de ligação a carboidratos, entretanto não podem ser classificadas como lectinas verdadeiras, uma vez que partilham características similares com proteínas de outras classes. Nesse sentido, por exemplo, os genes para as lectinas (PHA-E e PHA-L), o inibidor de alfa-amilase (α AI) e as *lectin-like* (Arcelinas) de *Phaseolus vulgaris* são

todos relacionados (*lectin-related*), sendo membros de uma família multigênica de lectina. É suposto que estes genes homólogos surgiram através de duplicações e divergência de um gene ancestral. Isto permitiu que diversas proteínas dentro dessa família apresentassem diferentes propriedades biológicas na defesa de plantas (Chrispeels & Raikhel, 1991; Sparvoli et al., 2003). De uma maneira geral, as *lectins-like* apresentam baixa atividade hemaglutinante e são inibidas por glicoproteínas (Fabre et al., 1998).

Assim como as lectinas de plantas, as proteínas lectina-like tem mostrado serem um grupo de proteínas bioativas encontradas em plantas, e por este motivo, essas proteínas têm sido isoladas de sementes de plantas. Proteínas lectina-like de plantas como arcelina-1, uma proteína inseticida isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* e Labramin, uma proteína fungicida com atividade de lectina-like e estruturalmente homóloga com inibidores de tripsina do tipo Kunitz, presentes em sementes de *Labramia bojeri* foram recentemente purificadas e caracterizadas (Fabre et al., 1998, Macedo et al., 2004). Troncoso et al. (2003) demonstraram que PDTI, um inibidor de tripsina de sementes de *Peltophorum dubium*, com atividade de lectina-like, apresenta efeito tóxico sobre linhagens de células tumorais.

1.3. Proteínas de defesa vegetal e seus efeitos fungicidas

Devido a sua especificidade, lectinas ligantes de quitina podem estar incluídas na função de defesa das plantas contra fungos. Essas lectinas têm sido isoladas de diversas fontes, incluindo bactérias, insetos, plantas e mamíferos (Campos-Oliva et al., 2001; Van Dellen et al., 2002, Van den Berg et al., 2002). Muitas lectinas apresentam atividade contra espécies fitopatogênicas, desde que quitina é o componente chave da parede celular de muitos destes organismos. As lectinas têm mostrado afetar o crescimento e o desenvolvimento dos fungos, bloqueando a síntese e/ou a deposição de quitina e glicoconjugados da parede celular (Selitrennikoff, 2001; Ng, 2004).

Ciopruga et al. (1999) mostraram o efeito da WGA sobre *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* e verificaram que a ligação dessas lectinas à parede celular dos fungos afetou o compartimento interno e o crescimento dos microrganismos, o que pôde ser comprovado pelas mudanças drásticas na morfologia dos fungos, como a lise das hifas e o extravasamento do conteúdo celular. Essas observações são consistentes com o papel de proteção contra fungos das lectinas ligantes de quitina, que poderia diminuir o

desenvolvimento da parede celular por se ligar aos polímeros de N-acetilglicosamina, desestabilizando assim o equilíbrio entre a hidrólise e a síntese de quitina da parede celular dos fungos (Bartniki-Garcia, 1973).

Outras lectinas também apresentam efeitos inibitórios sobre o crescimento de fungos; como a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) que inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Freire et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado por Macedo et al. (2004) que uma proteína lectina-like presente em sementes de *L. bojerii* (Labramin) inibiu o crescimento dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Ngai et al. (2007) mostraram que uma lectina isolada de sementes *Capsicum frutescens* foi capaz de inibir a germinação de esporos *Aspergillus flavus* e *Fusarium moniliforme* e crescimento hifal nos dois fungos.

Nos últimos anos diversas proteínas e peptídeos antifúngicas têm sido encontradas em diferentes espécies de plantas e tradicionalmente estão ligadas ao mecanismo de defesa vegetal (Thomma et al., 2002; Ng, 2004). Vicilinas, por exemplo, uma proteína de reserva de sementes da classe globulina 7S, normalmente de alta massa molecular, isoladas de diferentes sementes de leguminosas tem mostrado interferir com a germinação de esporos ou conidia de fungos fitopatogênicos, e inibir o crescimento de levedura e acidificação estimulada por glicose (Gomes et al., 1997, 1998a). O mecanismo pelo qual vicilinas exercem seus efeitos tóxicos no crescimento dos fungos foi proposto baseado na habilidade das vicilinas de se ligarem à parede celular e a membrana plasmática dos fungos (Gomes et al., 1998b; Rose et al., 2003).

Um mecanismo similar de ação é atribuído a proteínas que contem o “domínio de ligação à quitina” (quitinases específicas, heveína, proteínas heveína-like e peptídeos de *Amaranthus caudatus*), na qual estão envolvidos no mecanismo de defesa de plantas contra patógenos (Raikhel et al., 1993; Fernandes and Xavier Filho, 1998; Sales et al., 2000).

De fato, algumas dessas proteínas, como a heveína (4,7 kDa), uma proteína rica em cisteína, extraída do látex da *Hevea brasiliensis* e aglutinina de *Urtica dioica* (UDA, 8,5 kDa), por serem pequenas podem penetrar na parede celular dos fungos e alcançar a membrana plasmática, bloqueando os sítios ativos das enzimas envolvidas na morfogênese da parede celular (Koo et al., 1998).

1.4. Papel inseticida das proteínas de defesa vegetal

1.4.1. Danos causados por insetos aos grãos armazenados

Dentre os grãos cultivados, os grãos de leguminosas ocupam o terceiro lugar atrás de cereais e sementes oleaginosas na produção mundial (Popelka et al., 2004). Milho, trigo, soja e principalmente as variedades de feijão, tal como *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*, são os grãos que representam uma grande parte da fonte protéica na alimentação humana e de animais (Duranti et al., 1997). O armazenamento adequado destes grãos poderia permitir a manutenção de estoques estratégicos e reguladores além da comercialização posterior.

A cultura de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) é freqüentemente realizada em regiões tropicais, subtropicais e semi-áridos do mundo (Singh and Rachie, 1985), cujas sementes são consideradas uma importante fonte nutritiva, sendo ricas em proteínas (23,4 %) e carboidratos (56,8 %) (Kay, 1979). Essa cultura é um exemplo clássico de perda na produção durante o armazenamento prolongado, pois os grãos são extensivamente atacados por insetos, inviabilizando-os ao plantio e o consumo humano e animal (Machuka et al., 2000). Quando armazenados, os grãos de feijão de corda são severamente danificados pelos bruquideos (Sales et al., 2005).

Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera representam os principais causadores de danos no campo e no armazenamento de culturas de importância sócio-econômica. Os coleópteros da família Bruchidae são as principais pragas de infestações dos feijões, sendo mencionados como as principais espécies predadoras de grãos estocados: *Acanthoscelides clandestinus* (Most), *Zabrotes subfasciatus* (Borth) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (Singh et al., 1985). Este último, *Callosobruchus maculatus* representa a principal praga de *Vigna unguiculata* durante o seu armazenamento (Macedo et al., 1993). Hall et al., 1997 reportaram que este inseto, conhecido como gorgulho ou caruncho do feijão de corda, frequentemente danifica de 50 a 100 % das sementes estocadas num período de 3 a 6 meses, em condições de infestações severas. As infestações dos grãos ocorrem com maior intensidade em climas quentes e áreas tropicais, onde os problemas começam no campo.

Em relação aos lepidópteros podem-se citar alguns exemplos de espécies que afetam culturas importantes. Esta ordem agrupa as mariposas e as borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas

que possuem aparato mastigador. Larvas das espécies do gênero *Helicoverpa* (Lepidóptera: Noctuidae) são consideradas pragas na Ásia, Austrália e nas Américas. Elas causam perdas em muitas culturas importantes tais como de algodão, grão-de-bico, milho, tomate e girassol (Volpicella et al., 2003).

Um outro exemplo é a espécie cosmopolita *Anagasta kuehniella* (Lepidóptera: Pyralidae), predominante em climas temperados, sendo nativa da Europa. Esta espécie ataca grãos e farinhas já processados e armazenados, e poucos produtos vegetais secos e armazenados estão protegidos desta traça. Estes insetos quando presentes em moinhos aglutinam a farinha obstruindo o maquinário, causando interrupção da moagem. Pois, os mesmos podem cobrir as paredes com teias, podendo servir de abrigos a outros insetos (Pacheco and De Paula, 1995).

Além dos insetos serem considerados os maiores causadores de perdas massivas na produção, eles podem agir de forma indireta, pois agem como vetores de vários outros microorganismos fitopatogênicos, como por exemplo, os fungos, agravando assim a perda na produção (Hilder and Boulter, 1999).

1.4.2. Morfofisiologia da digestão dos insetos

No ambiente, os insetos encontram vários fatores bióticos e abióticos, muitos dos quais são potencialmente danosos para eles. Entretanto, o revestimento do seu corpo, em uma grande extensão, protege o inseto dos fatores potencialmente perigosos. No trato digestivo do inseto, os intestinos anteriores e posteriores são também protegidos por uma camada cuticular, cuja função é desempenhar a digestão essencial e absorção dos nutrientes (Wang and Granados, 2001).

A maioria dos estudos sobre os processos digestivos em insetos sugere que eles poderiam ser agrupados de acordo com o tipo de dieta ingerida. Esta hipótese é devido à ocorrência de diferentes proteinases digestivas no canal alimentar que dependem principalmente da composição química da dieta ingerida. Consequentemente, a adaptação ao hábito alimentar é mais importante que as características filogenéticas, determinando assim os tipos e não as quantidades relativas das enzimas presentes no inseto (Terra and Ferreira, 1994).

De acordo com a **Figura 1**, pode-se observar um diagrama geral do canal alimentar de um inseto proposto por Terra e Ferreira (1994). O intestino anterior é constituído pela boca onde encontramos as glândulas salivares quando presente em suas

cavidades, faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio que é o local principal da digestão e absorção de nutrientes. O intestino médio (IM) consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico, onde ocorre a produção de enzimas, e a maior parte da digestão e a absorção dos alimentos. O alimento atacado pelas enzimas é fracionado no interior da membrana peritrófica. Posteriormente, as partículas digeridas atravessam essa membrana e seguem, por um sistema de circulação, até as células, que absorvem os nutrientes (Terra et al., 1991).

Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico, que permitem a passagem dos alimentos decompostos, enzimas e água. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O intestino posterior inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

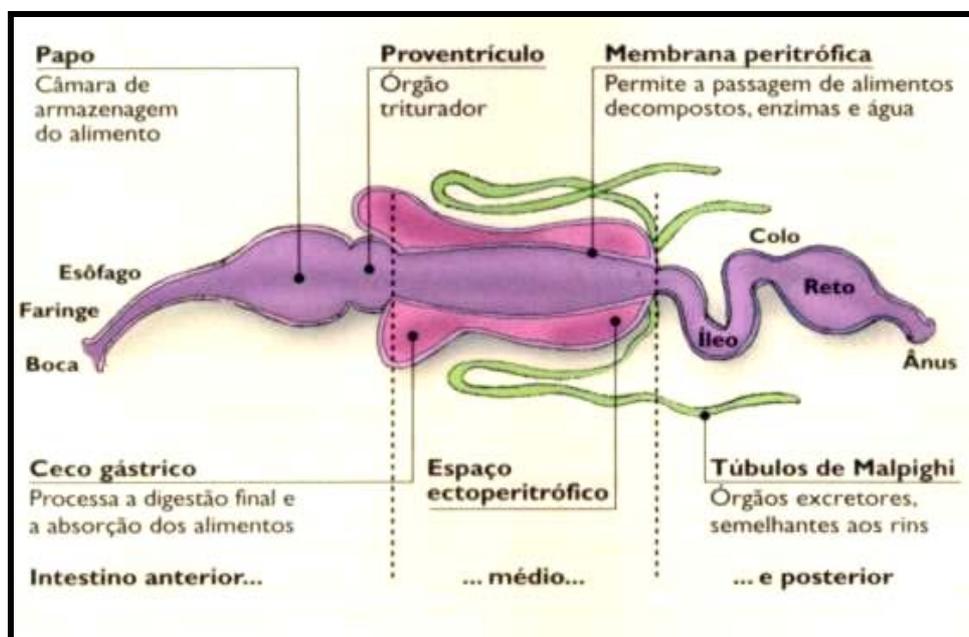


Figura 1: Diagrama geral do canal alimentar de um inseto (Adaptado de Terra and Ferreira. 1994).

A membrana peritrófica (MP) é um filme que circunda o bolo alimentar de muitos insetos. Ela é formada por uma rede de quitina e proteínas com a qual enzimas e outros componentes estão associados. Este pedaço de estrutura com muco gastrointestinal

ancestral apresenta a função de proteger o intestino médio contra alimentos abrasivos e microorganismos, mas também apresenta funções específicas. Estas funções dependem do fato que a MP compartimentaliza o lúmen intestinal dentro do espaço endoperitrófico e ectoperitrófico, incluindo: a prevenção de ligantes alimentares não específicos para a superfície celular; restrição de hidrolases oligoméricas para o espaço ectoperitrófico em Lepidóptera e Díptera, e a prevenção da excreção de enzimas possibilitando a reciclagem de enzimas (Caldeira et al., 2007).

Ocasionalmente, o filme que circunda o alimento pode apresentar uma consistência de gel formando estruturas não membranosas conhecidas como gel peritrófico (GP) (Terra et al., 2001; Terra and Ferreira, 2005). O GP é comumente encontrado em insetos sem restrição na ingestão alimentar, ou seja, naqueles cuja alimentação baseia-se em substâncias de baixo peso molecular, cuja digestão luminal torna-se desnecessária. Poucas Ordens não possuem a PM e muitas vezes, a sua presença está associada com a idade do inseto como em Siphonoptera, onde ocorre apenas no estágio larval, e em borboleta (Lepidoptera) que aparecem em alguns adultos (Peters, 1992). Nos Coleópteros da família Bruchidae não existe uma membrana bem definida e acredita-se que esta família apresente estruturas quitinosas (Firmino *et al.*, 1996). A presença de uma membrana distinta em *Dermestes maculatus* tem sido confirmada pela detecção de quitina nas regiões médias e posteriores do intestino médio (Caldeira et al., 2007).

1.4.3. Efeito inseticida das lectinas de plantas

A atividade inseticida de algumas lectinas de plantas contra espécies de coleópteros, lepidópteros, homópteros e dípteros tem sido muito bem documentada (Vasconcelos and Oliveira, 2004). Mais precisamente, a eficácia de lectinas ligantes de carboidratos, como a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), uma proteína resistente à proteólise no intestino, capaz de cruzar o epitélio intestinal, transportando-se até a hemolinfa, sendo também acumulada nos tecidos de insetos (Powell et al., 1998, Fitches et al., 2001); Devido as suas características GNA tem sido recombinada com outras proteínas na expectativa de obter-se uma proteína com maior nível de ação, podendo ser utilizada como uma nova alternativa de reprimir a resistência dos insetos. GNA foi recombinada com sucesso com neuropeptídeos de insetos (alostatina de *Manduca sexta*, Manse-AS) e neurotoxinas de veneno de aranha (toxina 1 *Segestria florentina*, SF11)

sendo liberadas na hemolinfa de lepidópteras após a ingestão oral (Fitches et al., 2002, 2004; Down et al., 2006).

Lectinas como as presentes em sementes de *Koelreuteria paniculata* (KpLec) também exibiram efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* e *A. kuehniella*, mostrando uma redução de 50 % no peso médio larval de *C. maculatus* a 0,7 % e uma redução de 50 % no peso médio larval de *A. kuehniella* a 0,2 % (Macedo et al., 2003). A lectina de *Talisia esculenta* ligante de glicose/manose produziu 90% de mortalidade quando incorporada a 2 % em dieta artificial para *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Macedo et al., 2002).

Algumas lectinas, como a lectina ligante de galactose presente em folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL), tem mostrado efeito distinto a diferentes espécies de insetos, como foi observado por Macedo et al. (2007), onde mostrou que BmoLL quando incorporada em dieta artificial e oferecida aos insetos promoveu efeitos moderados sobre o desenvolvimento da larvas de *Anagasta kuehniella*, enquanto que quando BmoLL foi oferecido as larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, duas espécies de coleópteras, foram mais afetadas. A LD₅₀ de BmoLL, aos dois insetos também apresentaram efeitos diferentes, com 0,5 % e 0,32 % (w/w) para *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*, respectivamente.

O mecanismo de ação destas lectinas ainda é desconhecido, mas pode envolver a ligação de glicoproteínas presentes nas células epiteliais do intestino médio, rompendo as funções celulares. Como foi observado por Sauvion et al. (2004) através de estudos de microscopia eletrônica e imunohistoquímicos, mostraram que Con A induz severas expansões celulares das células epiteliais no afídio da ervilha (*Acyrtosiphon pisum*), acompanhado pela hipersecreção e um afastamento progressivo da membrana apical, não sendo observado lise do epitélio, nem perda da integridade das células epiteliais. Os autores sugerem que diferentes lectinas apresentam modos diferentes de ação a nível celular.

Outro pré-requisito para a toxicidade das lectinas seria a sua capacidade de sobreviver ao ambiente proteolítico do intestino médio dos insetos. Dependendo da sua resistência, a proteólise intestinal e sua especificidade aos receptores carboidratos, as lectinas podem-se ligar a diferentes partes do intestino e causar varias mudanças na função e morfologia (Puszai et al., 1990). Lectinas inseticidas como TEL e *Griffonia*

simplicifolia são altamente resistentes à atividade enzimática digestiva (Zhu-Salzman et al., 1998, Macedo et al., 2003).

1.4.4. Efeito inseticida de proteínas de defesa vegetal

Além das lectinas de plantas, outras proteínas como as proteínas lectina-like de planta, como arcelina; proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), quitinases, canatoxinas e formas modificadas de proteínas de reserva, como as vicilinas também estão envolvidas no complexo mecanismo de defesa vegetal (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). Arcelina, por exemplo, são proteínas inseticidas encontradas em feijão comum e tem mostrado conferir resistência contra os bruquideos *Zabrotes subfasciatus* (Paes et al., 2000). Estes estudos mostraram que arcelina-1 rompe a estrutura epitelial em algumas regiões do intestino médio de *Z. subfasciatus*, sendo também detectadas na hemolinfa deste inseto.

Proteínas de reserva são sintetizadas e acumuladas durante o desenvolvimento da planta. Em sementes de leguminosas há proteínas de natureza globulínica que conferem resistência à planta contra o ataque de insetos predadores. Vicilina, uma proteína de origem globulínica, obtida de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), foi resistente ao bruquideo *Callosobruchus maculatus*, evidenciando assim a potencialidade desta proteína como agente inseticida (Macedo et al., 1993). O mecanismo de ação desta proteína não está bem estabelecido, mas pode envolver o reconhecimento e uma interação com glicoproteínas e outros constituintes da membrana ao longo do trato digestivo do inseto (Sales et al., 2001), assim como sua presença em diferentes órgãos internos de larvas e adultos de *C. maculatus* (Uchôa et al., 2006).

Canatoxina (CNTX), uma proteína tóxica isolada de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), apresentou efeitos inseticidas sobre duas espécies de insetos, *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus* (Carlini et al., 1997), onde CNTX somente foi letal a insetos que apresentavam catepsinas como sua principal enzima digestiva, como *R. prolixus* e *C. maculatus*. Ao contrário, insetos que apresentavam digestão baseada em tripsina não foram afetados pela digestão de CNTX. Subsequentemente, a ativação proteolítica de CNTX por catepsina de insetos foi demonstrada pela interferência no efeito tóxico com inibidores de enzimas, E-64 e/ou pepstatina A e pela formação *in vitro* de peptídeos entomotóxicos (Ferreira-Da Silva et al., 2000). Follmer et al. (2001) mostraram que esta proteína tóxica de *C. ensiformis*, a canatoxina, é uma isoforma da urease (JBU) também presente na mesma semente. Além

disso, eles mostraram que os efeitos biológicos da CNTX eram independentes de sua atividade ureolítica, assim como o efeito inseticida de JBU foi menos potente que CNTX (Follmer et al., 2004).

Muitas proteínas que ligam à quitina estão relacionadas com o mecanismo de defesa de plantas contra organismos que contem este polissacarídeo como constituinte de sua membrana. Este grupo inclui, lectinas ligantes de quitina, tal como TEL e KpLec, e proteínas lectina-like tal como arcelina (Macedo et al., 2002, 2003, Fabre et al., 1998), assim como as vicilinas (Sales et al., 2001). O modo de ação dessas proteínas é ainda desconhecido, mas pode interferir com os nutrientes pela ligação a quitina na membrana do intestino médio larval. (Vasconcelos and Oliveira, 2004).

1.5. Plantas transgênicas no controle de pragas

Benefícios ambientais, econômicos e na saúde, envolvendo plantas transgênicas resistentes a insetos têm sido documentados (James, 2005; Ferry, 2006). Nos Estados Unidos, seis plantas derivadas da biotecnologia foram plantadas em 2003 (canola, milho, algodão, papaia, abóbora e soja) e produziram 2,4 milhões de toneladas de alimentos e fibras. A produção de plantas transgênicas que expressam as endotoxinas inseticidas derivadas da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (plantas Bt) foram as primeiras a serem comercializadas em 1996. As expressões destas toxinas conferem proteção contra as pragas (Shelton et al., 2000).

A letalidade de Bt é altamente dependente do ambiente alcalino do intestino do inseto, uma característica que assegura que estas toxinas não estarão ativas em vertebrados, especialmente em humanos (Nicholson, 2007). Estas proteínas têm sido comercialmente produzidas, sendo utilizada contra as pragas de algodão, tabaco, batata, milho e arroz (Shelton et al., 2000). Este método de proteção a colheitas tem grandes benefícios devido a sua segurança ambiental e humana, bem como os baixos custos (Shelton et al., 2000; Rowe and Margaritis, 2004).

Vários experimentos têm apresentado evidências diretas de que as lectinas podem atuar na proteção da planta contra insetos predadores e oferecem a possibilidade de investigar como as lectinas agem em associação com outros compostos defensivos presentes nas plantas (Gatehouse *et al.*, 1998). A habilidade da lectina específica de manose de *Galanthus nivalis* (GNA) em servir como proteína carreadora liberando

peptídeos inseticidas e proteínas na hemolinfa de larvas de lepidópteras tem sido um grande sucesso (Fitches, 2002; 2004).

GNA exibe toxicidade a insetos de diferentes ordens, incluindo homóptera, coleóptera, lepidóptera. Linhagens transgênicas expressando GNA têm gerado várias espécies de plantas geneticamente modificadas tais como: tabaco, cana-de-açúcar, arroz, batata e trigo (Hilder et al., 1987; Allsopp et al., 1996; Rao et al., 1998; Birch et al., 1999; Stoger et al., 1999). O efeito do consumo GNA pelos insetos varia entre as espécies devido à diferença no comportamento alimentar e na digestão do inseto. Esta lectina quando expressa em cana-de-açúcar e testada contra dois Lepidopteras, *Eoreuma loftini* (Dyar) e *Diatraea saccharalis* (F.), provocou uma redução na longevidade das fêmeas adultas de ambas as pragas (Sétamou *et al.*, 2002).

Assim como GNA, outras lectinas também têm mostrado ser inseticidas a insetos sugadores de seiva. A lectina de folhas de *Allium sativum*, por exemplo, quando expressas em plantas de tabaco transgênicas diminui substancialmente a porcentagem de sobrevivência do afídio *Myzus persicae* (Dutta et al., 2005). A fusão desta proteína com Cry1Ac, por exemplo, pode aumentar o número potencial de interações a nível molecular nos insetos alvos.

O sucesso desta estratégia depende da execução de todas as etapas: purificação e estudo das propriedades da proteína de defesa; investigação da sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos; determinação da seqüência parcial ou total de aminoácidos da proteína; clonagem de cDNAs e DNAs que codificam-na; estudo da expressão destes genes sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse; estudo da expressão transgênica dos genes transferidos para verificar se estes produzirão as proteínas correspondentes nas plantas alteradas e verificação do aumento da resistência de plantas transgênicas no campo (Garcia-Olmedo et al., 1996).

2. *Objetivos*

Este trabalho teve por objetivo, fazer um estudo das proteínas de sementes de *Pouteria torta*, logo, pretendeu-se:

- Isolar e Caracterizar uma proteína lectina-like da família Sapotaceae, presente em sementes de *Pouteria torta*;
- Avaliar as seguintes atividades biológicas da lectina de *P. torta*:
 - Ação inibitória no desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e levedura.
 - Potencial inseticida sobre *C. maculatus* e *A. kuehniella*; assim como o mecanismo de ação desta proteína sobre *A. kuehniella*;

3. Materiais

3.1. Material Biológico

3.1.1. Planta

Pouteria torta (Mart.) Radlk, conhecida como abiu piloso, é uma espécie pertencente à família Sapotaceae. A árvore apresenta cerca de 8 a 14 metros de altura e 30 a 40 centímetros de largura, suas folhas são do tipo coriáceas, concentrada nas extremidades dos ramos. *P. torta* é encontrada na região Amazônica, até o Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná, nas florestas semiciduais e pluviais (Lorenzi, 1992).

A madeira é apropriada para construção civil, marcenaria e obras internas de carpintaria. A árvore floresce durante os meses de outubro e novembro. Os frutos amadurecem em dezembro e janeiro e são comestíveis e muito saborosos. As sementes são retiradas dos frutos através de abertura manual (**Figura 2**) (Lorenzi, 1992).

Neste trabalho foram utilizados sementes de *P. torta*, coletadas no município de Três Lagoas-MS.



Fotos Rubens B. de Azevedo



Fotos Lorenzi, 1992.

Figura 2: Árvore, frutos e sementes de *Pouteria torta*.

3.1.2. Os animais

a) Fungos/Levedura.

Linhagem de *S. cerevisiae* 1038 foram obtidas do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil. Os fungos *F. oxysporum* e *Colletotricum musae* foram amavelmente cedidas pela CNPF/EMBRAPA, Goiânia, GO, Brasil.

b) Insetos.

Para estudo da atividade inseticida da proteína lectina-like de *P. torta*, foram utilizados os insetos *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) e *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera).

Callosobruchus maculatus Fabricius (**Figura 3**) é uma praga importante que ataca principalmente feijões de várias espécies do gênero *Vigna*, principalmente feijões caupi (Lienard *et al.*, 1994). Este inseto é uma espécie pertencente à ordem Coleoptera, da família Bruchidae. As colônias de *C. maculatus* usadas foram cedidas pelo Dr. J. H. R. Santos (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil). Os insetos foram cultivados a 28 °C e umidade relativa de 65-75% , sendo alimentados em sementes de um cultivar susceptível Epace-10.



Figura 3: *C maculatus* sobre grãos de feijão *Vigna unguiculata* (Foto: P.C.Strikis)

O inseto *A. kuehniella* (**Figura 4**) é um dos principais predadores de produtos armazenados como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativum*) e amendoim (*Arachis hypogea*). Porém ele prefere se alimentar de farinhas, farelos e

outros produtos deixando-os, na maioria das vezes, impróprios para o consumo. O inseto *Anagasta kuehniella* Zell pertence à ordem Lepidoptera, família Pyralidae (Gullan *et al.*, 1994). As colônias de *A. kuehniella* foram cedidas pelo Departamento de Entomologia, ESALQ/USP, Piracicaba (SP), Brasil e mantidas no Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB), Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas (MS), Brazil.



Figura 4: Inseto adulto de *A. kuehniella* (Foto: Van Waters G. Rogers)

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e obtido comercialmente. Reagentes para eletroforese: acrilamida, metilenobisacrilamida, Temed, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250 e persulfato de amônio foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Rachamond, EUA). Os reagentes utilizados para a determinação da composição de aminoácidos foram adquiridos do Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e Pharmacia. As resinas utilizadas para cromatografia bem como os padrões de massa molecular foram adquiridos da Amersham Biosciences-Pharmacia (Uppsala, Sweden). Os carboidratos foram obtidos da Sigma.

4. Métodos

4.1. Caracterização físico-químico da proteína lectina-like de sementes de *P. torta*.

4.1.1. Purificação de Pouterin

As sementes de *P. torta* foram trituradas e moídas em moinho analítico para obter uma farinha de fina granulação. Posteriormente esta farinha foi delipidada com hexano devido à presença de lipídios nas sementes. A farinha delipidada foi submetida a uma extração com NaCl 150 mM (1:5 média para razão de tampão) por 24 h a 4°C e então centrifugada a 10,000 x g por 30 min a mesma temperatura. O sobrenadante (extrato bruto) foi usado para determinar o conteúdo de proteína e atividade hemaglutinante.

O extrato bruto foi diluído em tampão fosfato 100 mM, pH 7.6, contendo NaCl 100 mM e aplicado a uma coluna Sephacryl S-100 (2.5 cm × 40 cm) e equilibrada com a mesma solução. A fração foi aplicada a uma coluna DEAE-Sepharose (2 cm x 20 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, e eluído com gradiente linear de NaCl (0-1.0 M). A fração de proteína lectina-like foi aplicada a uma coluna μ -Bondapak C₁₈ (0.78 cm x 30 cm) (Waters 991-PDA system) e as proteínas foram eluídas com gradiente linear (0-100 %, v/v) de acetonitrila (solvente B) a uma razão de fluxo de 2 mL/min. A atividade hemaglutinante de pouterin foi monitorada durante a purificação e sua pureza foi verificada em PAGE-SDS 17 % (Laemmli, 1970). A proteína purificada foi dializada e liofilizada e, posteriormente, armazenada a -20 ° C.

4.1.2. Dosagem de proteína.

A concentração de proteína foi determinada como descrito por Bradford (1976) usando BSA como padrão. De acordo com o método, 2,5 mL da solução de Bradford foram adicionados a 100 μ L da amostra. A leitura foi realizada 10 minutos após o início da reação a 595 nm.

4.1.3. Ensaio de hemaglutinação.

A atividade hemaglutinante de pouterin foi analisada usando placas de microtitulação como previamente descrito por (Wititsuwannakul et al., 1998). Um volume final de 100 μ L, contendo 50 μ L de suspensão a 2 % de eritrócito humano ou animal previamente lavado 3 vezes em solução salina e 50 μ L de uma diluição seriada

da solução de proteínas. Nos demais experimentos, eritrócitos tratados e não tratados com tripsina foram utilizados em tampão contendo 10 mM de CaCl_2 , MnCl_2 , ou $\text{CaCl}_2 + \text{MnCl}_2$. A atividade hemaglutinante foi determinada após incubação por 1 h a temperatura ambiente, e o título hemaglutinante foi determinado como a maior diluição que produz hemaglutinação completa.

4.1.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida.

PAGE-SDS foi realizado em gel de poliacrilamida 17 % como descrito por Laemmli (1970). O gel de separação da amostra (main gel) foi preparado em tampão tris/HCl 0,1 M, pH 8,8 contendo SDS 20 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100 mg/ml). O gel superior ou de aplicação (stanking gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 5 % em tampão tris/HCl 0,1 M, pH 6,8, SDS 20 %, persulfato de amônio (100 mg/ml) e TEMED concentrado. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

Para o preparo das amostras, utilizou-se tampão de amostra (tris/HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo 10 % de glicerol, 0,02 % de azul de bromofenol e 20 % de SDS). Como tampão de corrida foi utilizado glicina/tris-HCl 0,18 M, 0,25 M, pH 8,3, contendo 0,1 % de SDS. A corrida foi realizada a 15 mA, deixando a voltagem livre. Um marcador de peso molecular foi utilizado como padrão.

4.1.5. Efeito da temperatura e pH.

O efeito da temperatura e pH na atividade hemaglutinante de pouterin foram determinados pela incubação da proteína a vários valores de pH (3-11) e a diferentes temperaturas (37-100 °C) por 1 h ou a temperatura definida por 30 min. A atividade hemaglutinante residual foi determinada após a mistura ter sido ajustada a pH 7,0 ou 37 °C. No mínimo três replicatas foram feitas para cada teste, para confirmar os resultados.

4.1.6. Dosagem de carboidratos totais

O conteúdo de açúcar neutro total da proteína foi estimado colorimetricamente de acordo com o método phenol/ H_2SO_4 (Dubois et al., 1956), usando D-glicose como padrão.

4.1.7. Inibição da Hemaglutinação

Para avaliar a inibição da hemaglutinação, 25 μ L da diluição seriada de glicoproteínas, mono e oligossacarídeos, metil monoglicosídeos, laminarina, e agarose em PBS 0,05 M, pH 7,4, foram adicionadas com volume igual ao de pouterin correspondente a duas unidades de hemaglutinação (2 HU), e as placas de microtitulação foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h. Subseqüentemente, 25 μ L da suspensão de eritrócito humano A Rh⁺ estabilizados com glutaraldeído foram adicionados no mesmo tampão, e a inibição da hemaglutinação foi determinada após 1 h e 24 h a temperatura ambiente (Imai et al., 1974). A concentração inibitória mínima foi determinada como concentração mínima de carboidrato ou glicoproteína capaz de reduzir a hemaglutinação a 50 % (IC₅₀).

4.1.8. Composição de Aminoácidos.

Análise de aminoácidos foi realizada no analisador de aminoácidos Pico-Tag (Water system), como descrito por Henrikson and Meredith (1984), onde a identificação dos aminoácidos foram determinadas através da cromatografia em HPLC do produto final feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização dos aminoácidos obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectadas em concentrações de 1,0 pmol.

4.1.9. Coluna de quitina.

Para examinar a afinidade de pouterin a quitina, uma coluna imobilizada em matriz inerte foi usada (2 mL de volume). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 100 mM. Após a absorção das proteínas (2 mg of pouterin em 200 μ L de tampão fosfato), a coluna foi lavada com o mesmo tampão até a absorbância de 230 nm retornar a 0, após pouterin foi eluída com HCl 100 mM. Frações de 2 mL foram coletadas, e a proteína foi estimada com base na absorbância a 230 nm e a atividade hemaglutinante foi avaliada.

4.2. Estudo da atividade fungicida da proteína lectina-like de sementes de P. torta.

4.2.1. Manutenção e preparação dos esporos e células

Os ensaios foram conduzidos como descrito por Freire et al., (2002) usando células (*S. cerevisiae*) e esporos (*F. oxysporum* e *C. musae*). Cepas de *F. oxysporum* e

C. musae foram inicialmente colocadas para crescer em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, durante 10 dias à temperatura ambiente. Após este período, inóculos desse material (em forma de disco) foram transferidos para solução salina 0,15 M e estocados a 4 °C por até seis meses. Células de *S. cerevisiae* crescidas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud por três dias foram transferidas para ágar Sabouraud inclinado e armazenadas a 4 °C por até três meses.

Inóculos dos fungos foram colocados para crescer no centro de placas de Petri contendo ágar Sabouraud e deixados à temperatura ambiente por 10 dias. Após esse período, 10 mL de salina estéril 0,15 M foram vertidos sobre o crescimento micelial e a liberação de esporos feita com o auxílio de uma alça de Drigalski. Os esporos extraídos foram recuperados e quantificados em câmara de Neubauer com o uso de microscópio. Inóculos das células de *S. cerevisiae* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram deixadas crescer por um período de três dias a temperatura ambiente. Após o crescimento, um novo inóculo foi retirado das placas e transferido para solução salina 0,15 M para quantificação das células em câmara de Neubauer.

4.2.2. Ensaio de inibição do crescimento dos fungos

Esporos de *F. oxysporum* e *C. musae* (4×10^3) e células de *S. cerevisiae* (10.000 cel/mL) foram incubados em 200 µL de caldo Sabouraud contendo 280 µg/mL de pouterin. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), a temperatura ambiente por um período de 60 horas. A determinação da densidade ótica (reflexo do crescimento micelial e celular) foi feita de 6 em 6 horas em um “leitor de ELISA”, a 660 nm. Todo o procedimento de preparo do ensaio foi realizado em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

4.3. Estudo da atividade inseticida da proteína lectina-like de sementes de P. torta.

4.3.1. Efeito de pouterin sob o desenvolvimento larval de *C. maculatus*

Os bruquídeos *C. maculatus* (Figura 3) foram mantidos em sementes de *Vigna unguiculata* em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampas metálicas perfuradas. As colônias foram mantidas em B.O.D. (câmaras de criação) a temperatura de 28-30 °C e umidade relativa em torno de 65-70 °C. A cada geração fez-

se a infestação de novas sementes com fêmeas de 2 dias de idade, por um período de postura de 1 dia. Após um período de aproximadamente 28 dias, uma nova geração de insetos é obtida.

Sistema de dieta artificial desenvolvido previamente por Macedo et al. (1993) foi usado para examinar os efeitos de pouterin sob o desenvolvimento larval de *C. maculatus*. Sementes artificiais (400 mg) foram preparadas pela mistura de farinha de feijão (*V. unguiculata*) da variedade EPACE-10 (cultivar suscetível) com a proteína lectina-like de *P. torta*. A proteína foi homogeneizada com a farinha de EPACE-10 num graal, transferida para um molde de latão e prensada com auxílio de uma prensa manual. A pressão exercida permitiu uma consistência e dureza que possibilitou a postura e desenvolvimento do inseto.

As incorporações de pouterin foram realizadas nas concentrações de 0; 0,1; 0,15; 0,5 e 1,0 % e oferecidas as fêmeas de *C. maculatus* com 2 dias de nascido para ovoposição. Após 20 dias, as sementes artificiais foram abertas e analisadas quanto ao número de larvas e o seu peso médio. Foram realizadas 30 sementes artificiais para cada concentração acima, cada uma com 4 ovos de *C. maculatus* (n=120).

4.3.2. Efeito de pouterin sob o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

Os lepidópteros *A. kuehniella* (Figura 4) foram mantidos em uma sala de criação em temperatura relativa de 26-27 °C e umidade relativa de 65-70 °C. A dieta artificial foi preparada pela mistura de trigo integral, gérmen de trigo, farelo de trigo e levedura (8:2:1, 9:0:1). A cada geração realizou-se a infestação de novas colônias com ovos de um dia de ovoposição. As incorporações de pouterin foram realizadas nas concentrações de 0; 0,2; 0,5 e 1,0 %. Cada tratamento foi repetido 5 vezes com 5 larvas neonatas (n=25) para cada concentração acima. Os experimentos foram analisados após 24 dias, verificando o peso médio e o número de sobreviventes de *A. kuehniella*. Também foi analisada a quantidade de dieta consumida e a quantidade de fezes produzidas por cada larva.

Consumo larval e produção fecal foram analisados com base no seu peso seco. As atividades tripticas das amostras do intestino médio e fecal foram também analisadas.

4.3.3. Preparação do Intestino Médio

As larvas dos lepidopteras (4º ínstar de desenvolvimento) foram imobilizadas por ação de baixa temperatura por alguns minutos para facilitar a dissecação do seu

intestino médio. Em seguida, os intestinos médios foram cuidadosamente retirados com auxílio de pinças e sob lupa estereoscópica numa solução de NaCl 150 mM e guardados numa temperatura de -20 °C. Os intestinos médios de *A. kuehniella* foram homogeneizados em Potter numa solução de NaCl 150 mM, em banho de gelo, durante 10 min, obtendo-se um extrato. O extrato foi centrifugado a 17.000 x g durante 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi imediatamente utilizado nos ensaios enzimáticos. A concentração de proteína dos extratos foi determinada de acordo com Bradford (1976), usando BSA como padrão.

4.3.4. Preparação das fezes

As fezes das larvas de quarto ínstar alimentadas com dieta controle e dieta contendo pouterin a 0,5 %. Após a separação foram estocadas a - 8 °C. Para utilização nos ensaios, foram homogeneizadas em tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e centrifugadas a 17.000 g por 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram imediatamente utilizados nos ensaios bioquímicos como fonte das enzimas para os ensaios enzimáticos.

A) Ensaio Enzimático.

A atividade triptica dos extratos do intestino e amostra fecal das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dietas contendo 0,5 % de pouterin e dieta controle foram analisadas usando substrato sintético BAPNA (Erlanger, 1961). BAPNA foi usado a uma concentração final de 1 % (v/v) de DMSO em um volume final de 1,5 mL a pH 8,0. Tampão e enzima foram pré-incubados a 37 °C por 10 min antes de adicionar o substrato para iniciar a reação, sendo a incubação prosseguida por mais 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido acético 30 % (v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata. A absorbância foi lida a 410 nm.

B) Análise eletroforética das enzimas das larvas de 4º ínstar de *A. kuehniella*

Proteínas extraídas dos extratos fecais e intestinos médios de larvas de *A. kuheniella* alimentadas com dietas com ou sem pouterin a 0,5 %, sem redução e aquecimento, foram corridas em PAGE-SDS (10 %) (Michaud et al., 1993). Os extratos de proteínas foram incubados com TLCK (1 mM) por 10 min a 30 °C. Esta mistura foi então corrida em PAGE-SDS contendo gelatina a 0,1 %, a 5 °C. Em seguida, o gel foi lavado com solução Triton X-100 2,5 % por 2 h com agitação para remover o SDS, e posteriormente foi incubado com Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 por 2-3 horas. O gel foi subseqüentemente corado com Coomassie brilliant blue R-250.

C) Parâmetros Nutricionais.

Os parâmetros nutricionais foram comparados entre as larvas de quarto ínstar expostas a dieta controle e dieta contendo pouterin a 0,5 %. Larvas, fezes e o restante de dieta não consumida foram separados, secadas e pesadas. Índices nutricionais do consumo, digestão e utilização do alimento foram calculados como descrito por Scriber and Slansky Jr (1981):

$$\text{a) Eficiência de conversão do alimento ingerido (\%): } ECI = \frac{B \times 100}{I}$$

$$\text{b) Eficiência de conversão do alimento digerido (\%): } ECD = \frac{B \times 100}{I-F}$$

$$\text{c) Digestibilidade aproximada (\%): } AD = \frac{I-F}{I} \times 100$$

$$\text{d) Custo metabólico (\%): } CM = 100 - ECD$$

onde, **T**- tempo de duração do período de alimentação; **I**- alimento consumido; **F**- alimento não digerido + produto de excreção; **I-F**- alimento assimilado durante T; **B**- peso médio da larvas durante T.

4.4. Análise estatística.

A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e teste *Tukey* para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

5. Resultados

5.1. Purificação da proteína lectina-like

5.1.1. Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-100

Amostras de 300 mg de Extrato Bruto liofilizado foram solubilizadas em tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6 e aplicadas à coluna Sephacryl S-100. A eluição foi realizada com o mesmo tampão. As frações foram coletadas em um fluxo de 45 mL/h, coletando-se 3 mL/ tubo. A atividade hemaglutinante foi detectada na terceira fração eluída, como mostra o perfil cromatográfico apresentado na **Figura 5**.

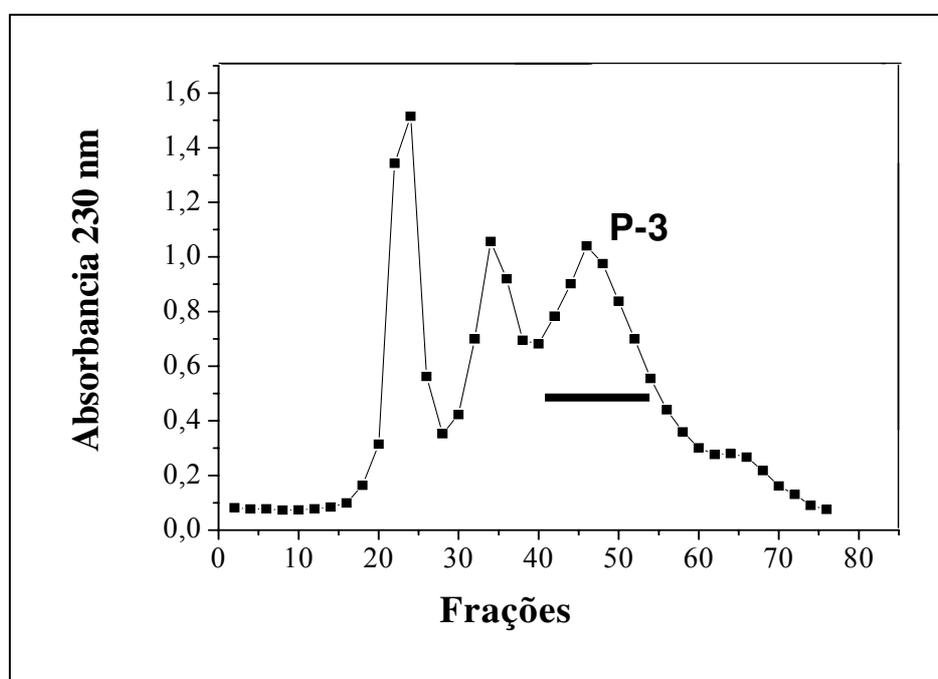


Figura 5: Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-100. A coluna (2,5 x 40 cm) equilibrada com tampão fosfato 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,6. Foram coletadas frações de 3mL/tubo em um fluxo de 45 mL/hora. Absorbância monitorada a 230 nm. Atividade hemaglutinante (-).

5.1.2. Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose

A fração P3, proveniente da Sephacryl S-100 foi submetida a uma cromatografia em DEAE-Sepharose. A **Figura 6** mostra um perfil cromatográfico de dois picos de proteína, a atividade hemaglutinante foi detectada no primeiro pico.

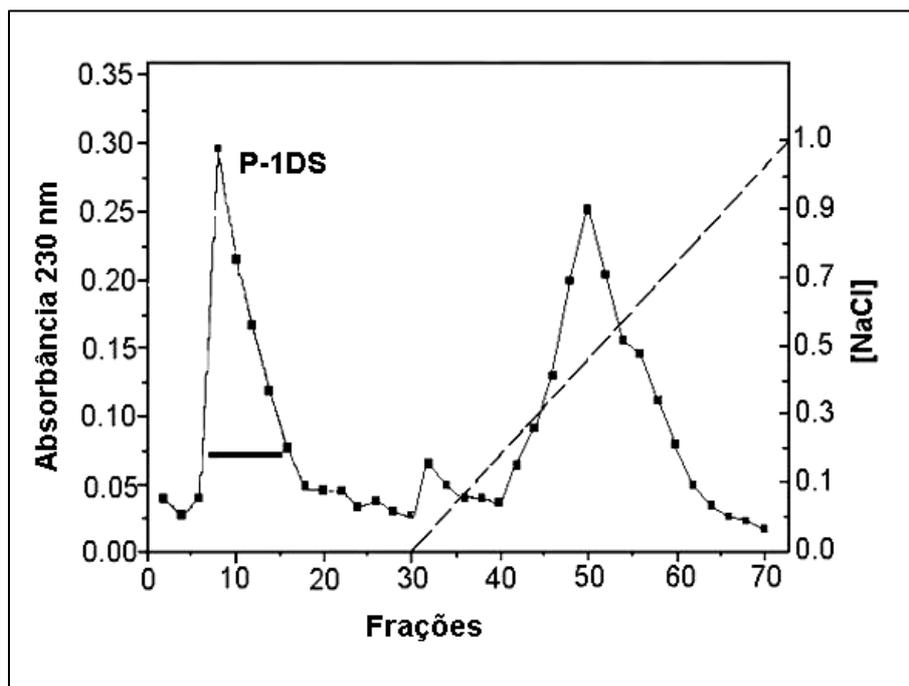


Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose. A coluna (2 x 20 cm) foi submetida a um fluxo de 45 mL/hora, usando tampão tris/HCl 0,05 M, pH 8,0 e foram coletadas frações de 3 mL/tubo. A absorbância foi monitorada a 230 nm.. Atividade hemaglutinante (-).

5.1.3. Cromatografia em Fase-reversa (sistema HPLC)

A fração P-1DS, proveniente da cromatografia de troca iônica, foi submetida a uma cromatografia de fase reversa (HPLC) em coluna C₁₈ μ -Bondapak a qual foi eluída com gradiente linear de TFA em ACN (66 %). A **Figura 7** mostra o perfil cromatográfico com três picos, sendo que o segundo pico, eluído em torno de 47 % de acetonitrila, apresentou atividade hemaglutinante, este foi denominado de Pouterin. A eluição foi monitorada a 230 nm.

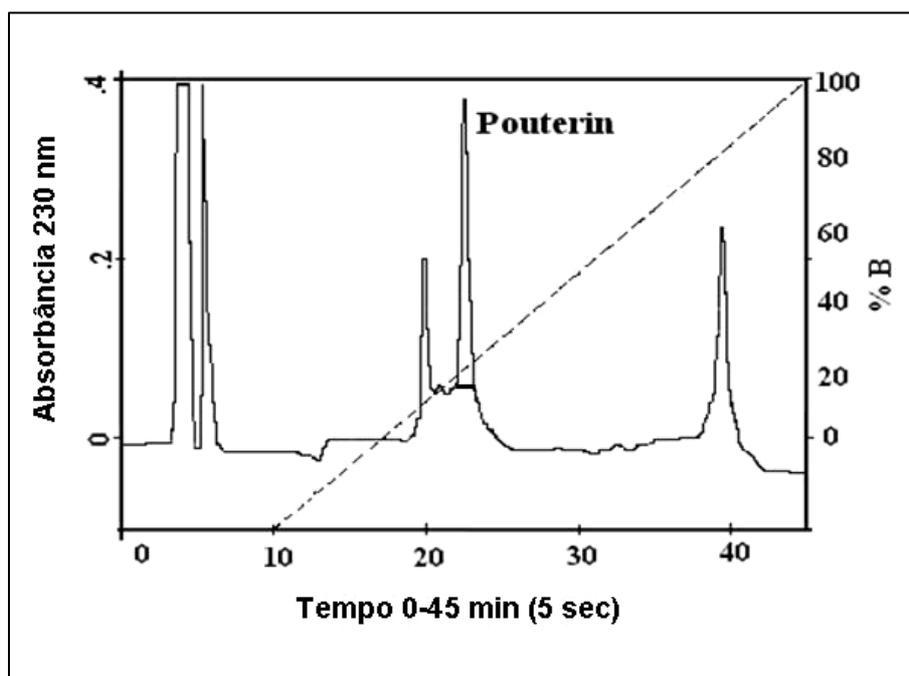


Figura 7: Cromatografia de P1-DS em coluna μ -Bondapak (0.78 cm x 30 cm) acoplada ao HPLC, equilibrada com TFA 0,1 % (solvente A). Solvente A: TFA 0,1 %. Solvente B: acetonitrila 66 % em TFA 0,1 %. Fluxo de 1 mL/min. Absorbância 230 nm. Atividade hemaglutinante (-).

5.2. Atividade hemaglutinante de pouterin

A atividade hemaglutinante de pouterin foi determinada usando eritrócitos de humanos (ABO) e de animais (rato, boi e coelho). Pouterin aglutinou eritrócitos de rato, boi e coelho, bem como eritrócitos humanos de todos os tipos sanguíneos (**Tabela 1**). Pouterin também hemaglutinou eritrócitos de coelho e humano do tipo A tratados com tripsina. Pouterin mostrou reproduzível título hemaglutinante de 16 (concentração de proteína 3,6 µg/mL) para eritrócitos de coelho e humano tipo A não tripsinizados e um título de 256 (concentração de proteína 0,2 µg/mL) para as células correspondentes tripsinizadas.

A hemaglutinação dos eritrócitos humano tipo A Rh⁺ foram aumentados pelo tratamento com Ca²⁺ + Mn²⁺, com título hemaglutinante de 64, correspondente a uma concentração de proteína de 1,1 µg/mL. Os íons divalentes isolados não produziram efeito sobre a atividade hemaglutinante de pouterin.

Tabela 1: Pouterin induziu hemaglutinação em diferentes espécies de eritrócitos

<i>Eritrócitos</i>	<i>Hemaglutinação (título^a)</i>
Humano (tipo A)	4
Humano (tipo B)	3
Humano (tipo AB)	4
Humano (tipo O)	3
Rato	5
Boi	5
Coelho	4
Humano A , tratado-tripsina	8
Coelho, tratado-tripsina	8
Humano A, Ca ²⁺	5
Humano A, Mn ²⁺	4
Humano A, Ca ²⁺ + Mn ²⁺	6

^aTítulo corresponde ao inverso da diluição a qual causou 50 % de aglutinação total dos eritrócitos. A lectina-like final foi 3.6 µg mL⁻¹ no primeiro poço da placa.

5.3. Caracterização de pouterin

5.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese de poliacrilamida na presença de SDS 17 % (PAGE-SDS) foi realizada para verificar as etapas de purificação de pouterin. A **Figura 8** mostra que pouterin apresenta (Linha 5) uma única banda principal com massa relativa de 14 kDa, tanto na ausência como na presença do agente redutor DTT (Linha 6). Este comportamento indica que pouterin não apresenta pontes dissulfeto.

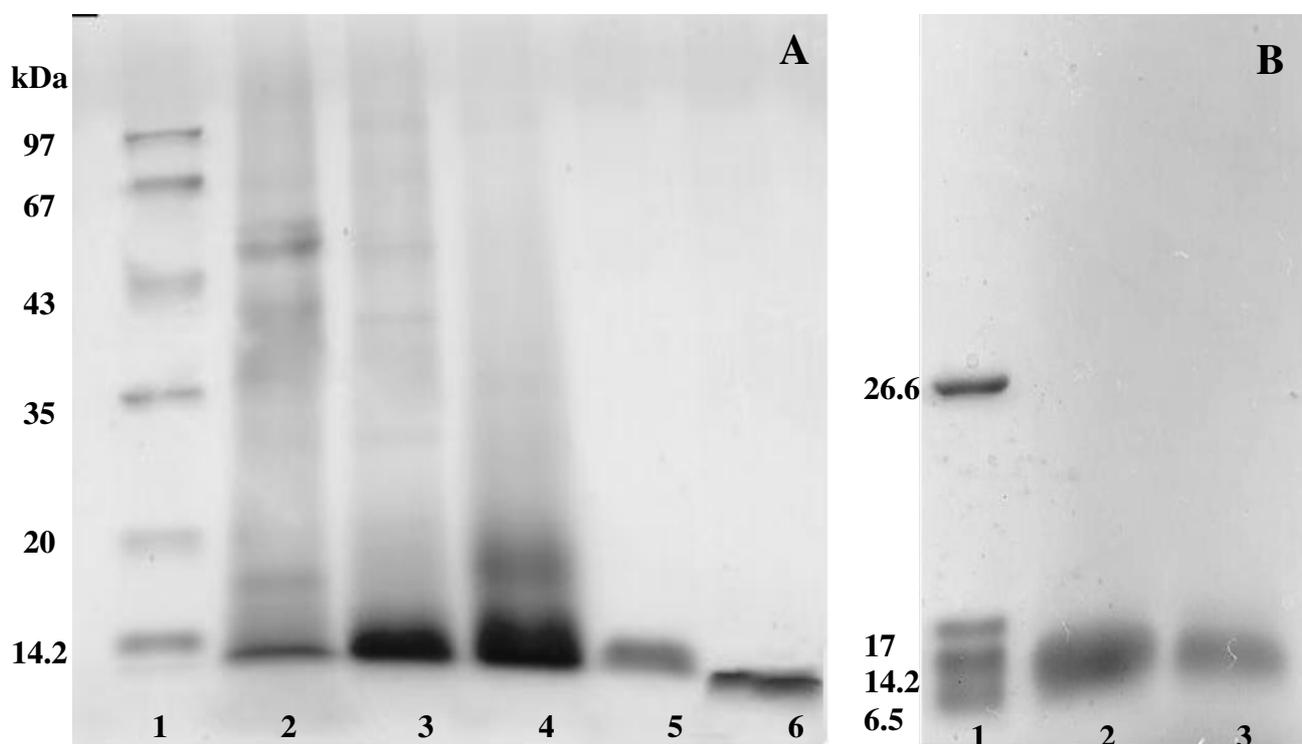


Figura 8: Análise em PAGE-SDS de pouterin purificada. **(A)** lane 1 – padrão de massa molecular, Linha 2 – extrato bruto; Linha 3 – P3; Linha 4 – P-1 DS; Linha 5 – pouterin; Linha 6 – pouterin na presença de DTT. **(B)** Linha 1 - padrão de massa molecular, Linha 2- pouterin, Linha 3- pouterin na presença de DTT.

5.3.2. Especificidade de ligação a carboidratos

A ação inibitória dos carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de pouterin foi analisada. Foi utilizado para os ensaios sangue humano A Rh⁺ a 2 % estabilizados com glutaraldeído. Como mostrado na **Tabela 2**, glicoproteínas como fetuína, asialofetuína, heparina, orosomucoide e ovoalbumina produziram inibição da atividade hemaglutinante. Caseína a 1 mg/mL não foi inibida.

Tabela 2: Especificidade de ligação a açúcares de pouterin.

<i>Glicoproteínas</i>	<i>μg mL⁻¹</i>
Fetuína	77
Asialofetuína	121
Heparina	31
Orosomucoide	145
Ovoalbumina	590
Caseína	NI ^a

A concentração mínima de pouterin requerida para ter 50 % de inibição da aglutinação dos eritrócitos humanos A⁺ estabilizados com glutaraldeído a uma concentração de pouterin de 172 μg/mL. **NI**: nenhuma inibição a 1mg/mL. A seguir os monossacarídeos e derivados que não foram inibidos a uma concentração >100 mM: metil-α-glicopiranosídeo, metil-α-galactopiranosídeo, metil-α-manopiranosídeo, glicosamina, manosamina, galactosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, fucose, frutose, sacarose, lactose, maltose, glicose, manose, maltose, rafinose.

5.3.3. Efeito da temperatura e pH na estabilidade de pouterin

A estabilidade térmica e de pH de pouterin foi realizada em diferentes temperaturas e pHs (**Fig. 9**). A **Figura 9A** mostra o efeito das diferentes temperaturas na atividade hemaglutinante de pouterin. Pouterin teve sua atividade hemaglutinante estável na faixa de temperatura de 37 a 60 °C. Nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C houve uma redução de 22 %, 34 % e 78 % na atividade hemaglutinante, respectivamente. À 100°C não foi detectada atividade hemaglutinante.

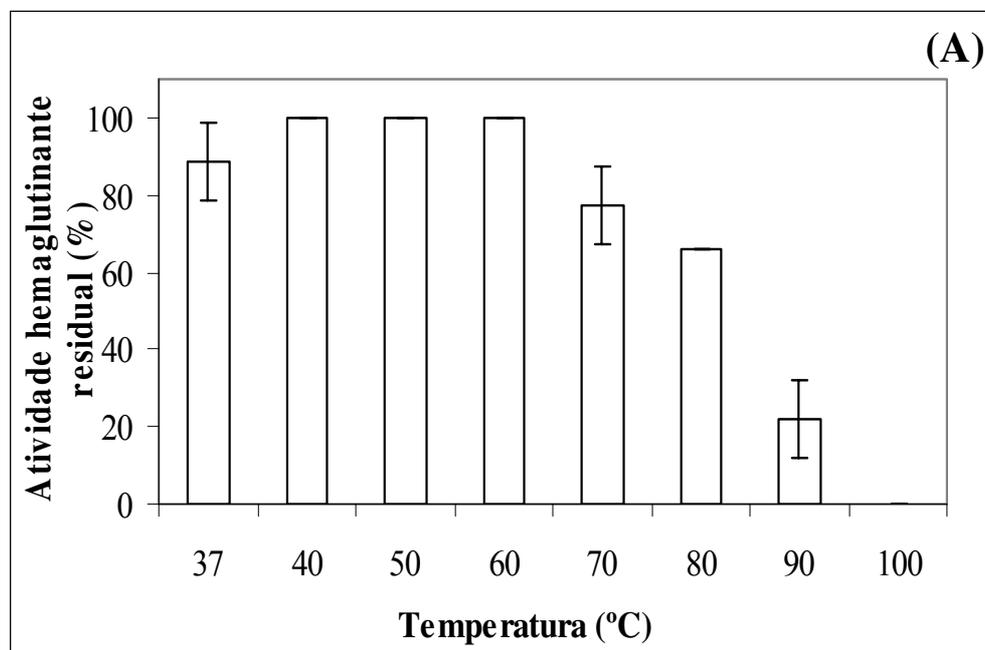


Figura 9A: Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de pouterin. A atividade hemaglutinante foi determinada após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas. Cada valor representa à média \pm SD de 5 repetições.

A **Figura 9B** mostra a atividade das amostras submetidas à variação de pH, sendo observada uma estabilidade na faixa de pH de 5 a 10. Em pH 3 a 4 houve uma redução de 45 % na atividade hemaglutinante e em pH 11 houve uma redução de 67 % na atividade hemaglutinante.

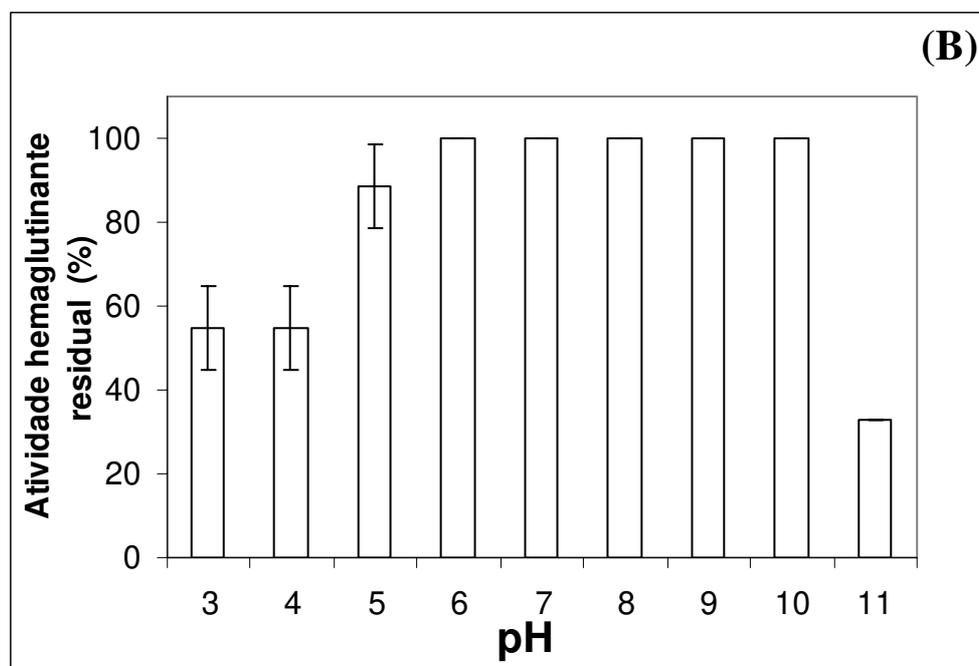


Figura 9B: Efeito dos pH na atividade hemaglutinante de pouterin. A atividade hemaglutinante da lectina-like foi verificada após 30 minutos de incubação em tampões com diferentes pHs. Cada valor representa à média \pm SD de 5 repetições.

5.3.4. Composição de aminoácidos

Os resultados da análise de aminoácidos são apresentados na **Tabela 3**. A análise foi evidenciada pelo alto conteúdo de Asx, Glx, Arg, Cys e Leu e baixo conteúdo nos níveis de Phe, Ile, Tyr e Thr. Os resíduos de triptofano (Trp) não foram detectados pelo método.

Tabela 3: Composição de aminoácidos de pouterin

<i>Aminoácidos</i>	<i>mol %</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>mol %</i>
Asx	7	Tyr	1
Glx	28	Val	2
Ser	3	Met	2
Gly	3	Cys	5
His	3	Ile	1
Arg	8	Leu	10
Thr	1	Phe	1
Ala	2	Lys	3
Pro	3	Trp	ND ^a

ND^a: Não detectado

5.4. Estudo das atividades biológicas de pouterin.

5.4.1. Atividade fungicida de pouterin

Pouterin foi testada em relação à inibição do crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A **Figura 10** mostra que pouterin na concentração de 280 µg/mL inibiu o crescimento dos fungos testados a 280 µg/mL, inibindo o crescimento de *F. oxysporum* (85 %) e *C. Musae* (54 %) a partir de 26 h e um forte efeito sobre a levedura *S. cerevisiae*, inibindo seu crescimento em 100 %.

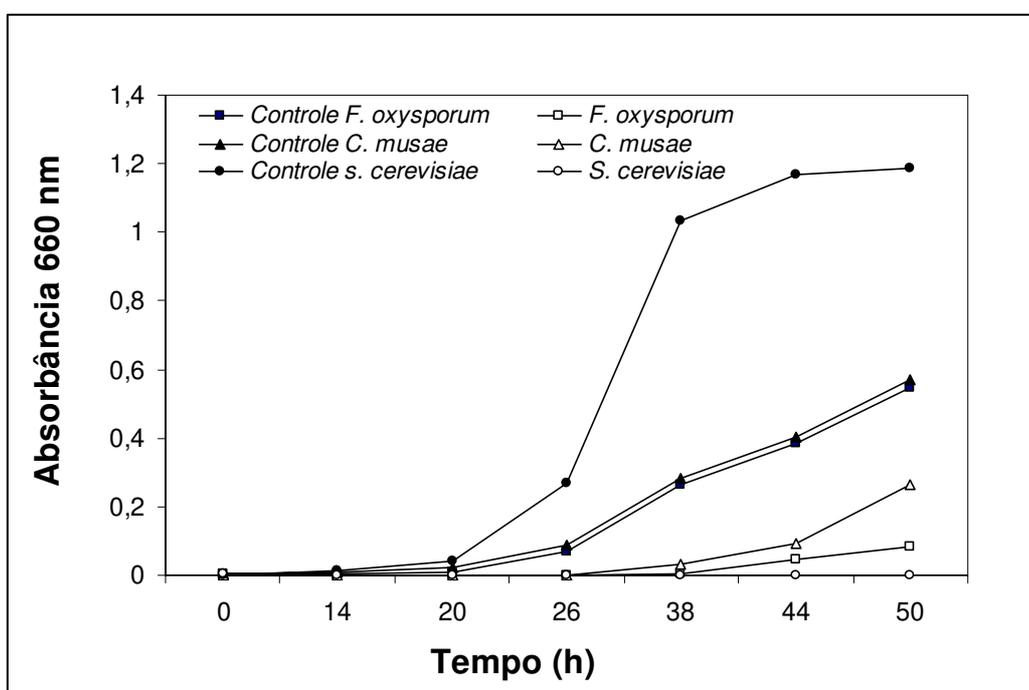


Figura 10: Efeito de Pouterin sobre o crescimento dos fungos. O aumento na absorvância a 660 nm foi usado para acompanhar o crescimento dos fungos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.4.2. Efeito de pouterin sob desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*

O efeito de pouterin no desenvolvimento larval de *C. maculatus* foi verificado pela determinação do número de larvas sobreviventes (quarto ínstar) e o peso médio larval, alimentadas com dieta contendo quantidades crescentes de pouterin. **Figura 11** mostra o efeito de pouterin sobre a mortalidade e peso das larvas de *C. maculatus* após 20 dias de dieta. A mortalidade e peso das larvas que foram alimentadas com sementes controle (representado pelos valores eixo Y) foram de aproximadamente 7,5 % e 7,8 mg, respectivamente, enquanto que a 0,3 % de pouterin causou 100 % de mortalidade (dado não mostrado).

A 0,12 % pouterin causou 50 % de mortalidade larval (LD_{50}), enquanto que a 0,08 % causou uma redução de 50 % no peso médio larval (ED_{50}) (**Fig. 11A e B**). Análise de regressão linear mostrou que para cada 0,01 % no aumento da concentração de pouterin, há um aumento de 4,98 % na mortalidade ($r^2=0,95$) e uma diminuição de 0,61 mg no peso ($r^2=0,98$).

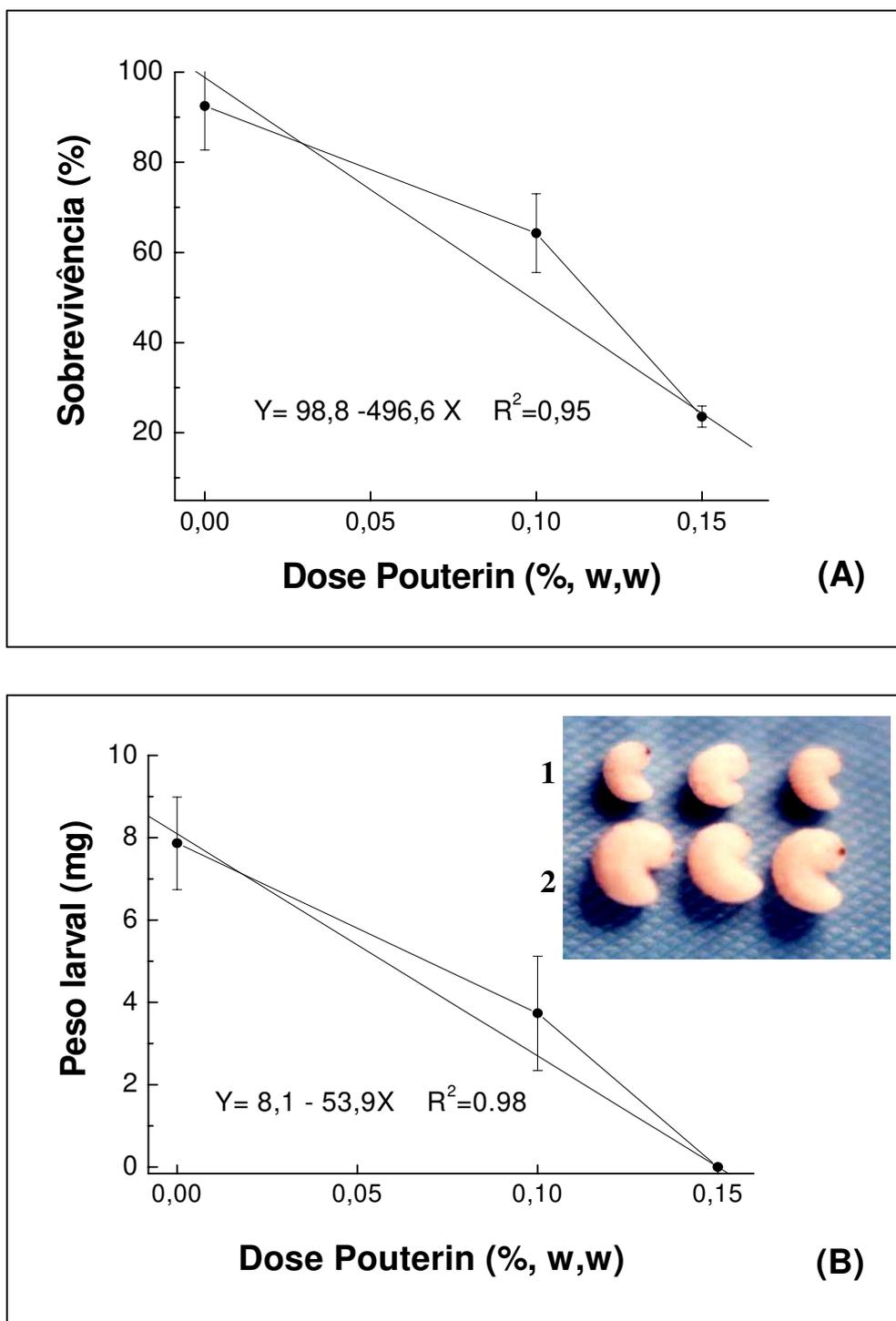


Figura 11: Efeito de pouterin sobre larvas de *C. maculatus* alimentadas em dieta artificial contendo pouterin (A) mortalidade e (B) peso. Inserido: (1) Larvas alimentadas com pouterin 0.1 % e (2) larvas alimentadas com dieta controle. Cada ponto representa $n \geq 100$ e as barras de erros indicam erro padrão das médias.

5.4.3. Efeito de pouterin sob desenvolvimento de *Anagasta kuehniella*

O efeito de pouterin no desenvolvimento larval de *A. kuehniella* foi verificado pela determinação do número de larvas sobreviventes (quarto ínstar) e peso larval, alimentadas com dieta contendo quantidades crescentes de pouterin. As **Figuras 12 A e B** mostram o efeito de pouterin sobre a mortalidade e peso das larvas de *A. kuehniella* após 24 dias de dieta. A mortalidade e o peso das larvas que foram alimentadas com dietas controle (representado pelos valores eixo Y) foram de aproximadamente 14 % e 6,7 mg, respectivamente, enquanto que as dietas contendo 1,0 % pouterin causou 20 % de mortalidade, e uma redução de 71,4 % no peso médio das larvas (**Fig. 12 B**).

A uma concentração de 0,6 % pouterin causou uma redução de 50 % no peso médio larval (ED_{50}) (**Fig. 12 B**). Análise de regressão linear mostrou que para cada 0,1 % no aumento da concentração de pouterin, há um aumento de 0,76 % na mortalidade ($r^2=0,94$) e uma diminuição de 0,44 mg no peso ($r^2=0,91$). A figura inserida mostra a variação no tamanho das larvas dos insetos alimentados com pouterin 0,1 % e a dieta controle. Nenhum dos tratamentos demonstrou qualquer deformação morfológica aparente.

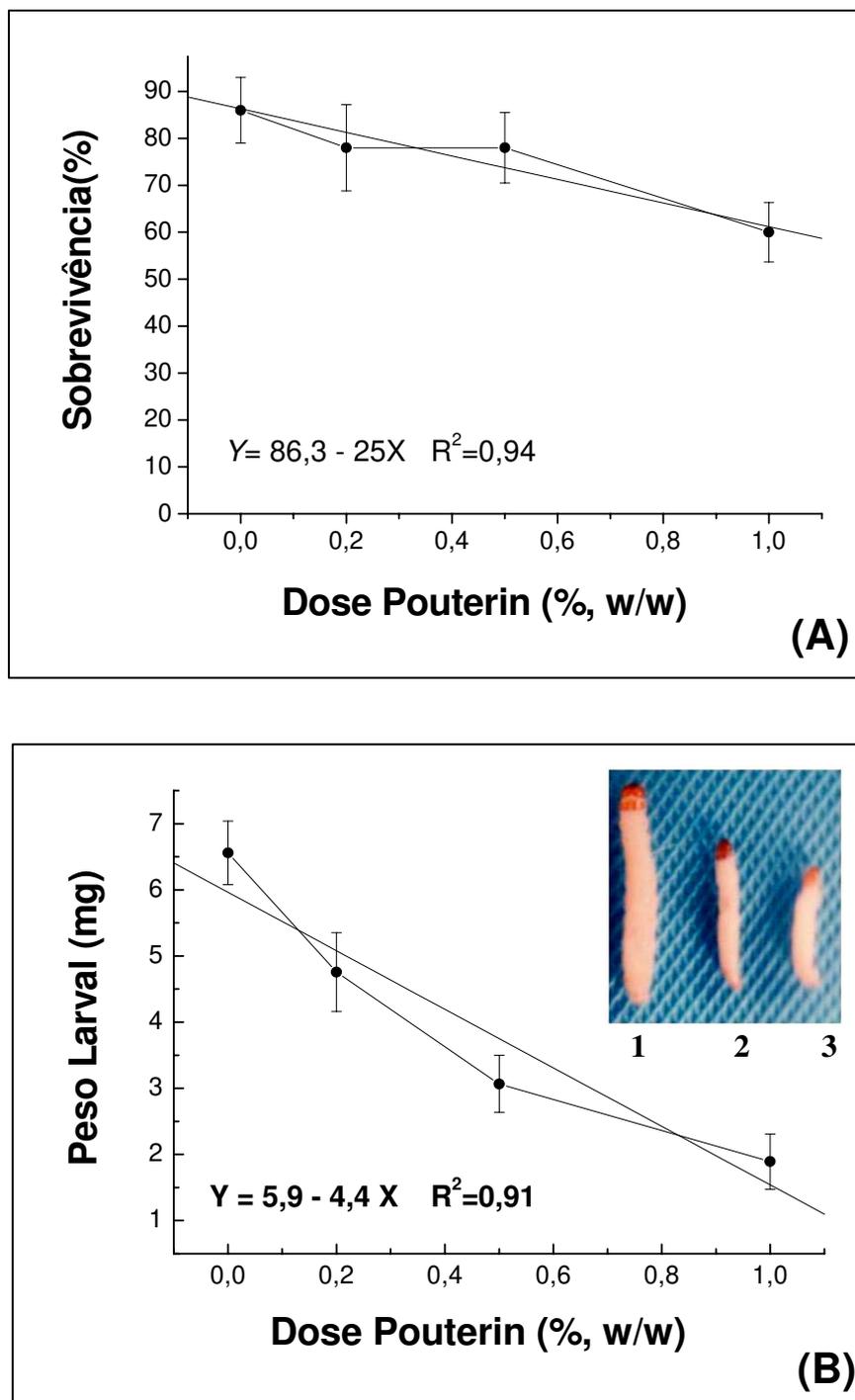


Figura 12: Efeito de pouterin sobre larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta artificial contendo pouterin **(A)** Mortalidade e **(B)** peso. O eixo que intercepta-Y em **(A)** é a mortalidade, e **(B)** é o peso das larvas alimentadas com dieta controle. Inserido: **(1)** Larvas alimentadas com pouterin 0,1 % e **(2)** larvas alimentadas com dieta controle. Cada ponto representa $n = 25$ e as barras de erros indicam erro padrão das médias.

5.4.4. Mecanismo de ação de pouterin sob *Anagasta kuehniella*

A. Análise nutricional

Análise nutricional revelou que pouterin apresentou efeitos tóxicos quando ingerida pelas larvas (**Tabela 4**). Pouterin, quando incorporada a 0,5 % em dieta artificial reduziu ECI, ECD e AD e aumentou o custo metabólico para as larvas de *A. kuehniella* quando comparada com o controle. Ambos ECI e ECD mostraram diminuição significativa de 6,6 % e 22,9 %, respectivamente, e o CM teve um aumento de 23 % quando comparado com larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dietas controles.

Tabela 4: Índice nutricional de larvas de quarto ínstar *A. kuehniella* tratadas com dieta contendo pouterin a 0.5 % e dieta controle.

<i>Índice nutricional</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta pouterin</i>
ECI (%)	31 ± 1,8a	24,4 ± 0,9b
ECD (%)	48 ± 4,2a	25,1 ± 1,1b
AD (%)	65,9 ± 7,2a	15,5 ± 1,4b
CM (%)	52 ± 6,7a	75 ± 8,3b

Abreviações: ECI= eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD= eficiência da conversão do alimento digerido; AD= digestibilidade aproximada; CM= custo metabólico.

^{a,b} indica diferença significativa entre os tratamentos controle e pouterin (ANOVA, $p < 0.05$, Student's *t*-test).

B. Dieta Consumida e fezes produzidas por *A. kuehniella* quando tratadas com pouterin

O consumo das dietas pelas larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta artificial, assim como as fezes produzidas foram quantificadas (**Fig. 13**). Como mostrado na **Figura 13A**, o consumo da dieta pelas larvas de *A. kuehniella* criadas em dieta contendo 0,5 % de pouterin mostrou uma diminuição significativa de 16,5 mg/larva, quando comparado com o consumo da dieta controle (20,6 mg/larva).

Produção fecal das larvas de *A. kuehniella* criadas em dieta artificial contendo 0,5 % de pouterin foi menor do que o grupo controle, com uma diminuição de 0,55 mg/larva, quando comparado com as larvas do grupo controle (3,1 mg/larva) (**Fig. 13B**). Estes resultados sugerem que pouterin está agindo no trato digestivo dos insetos ou interferindo com a digestão.

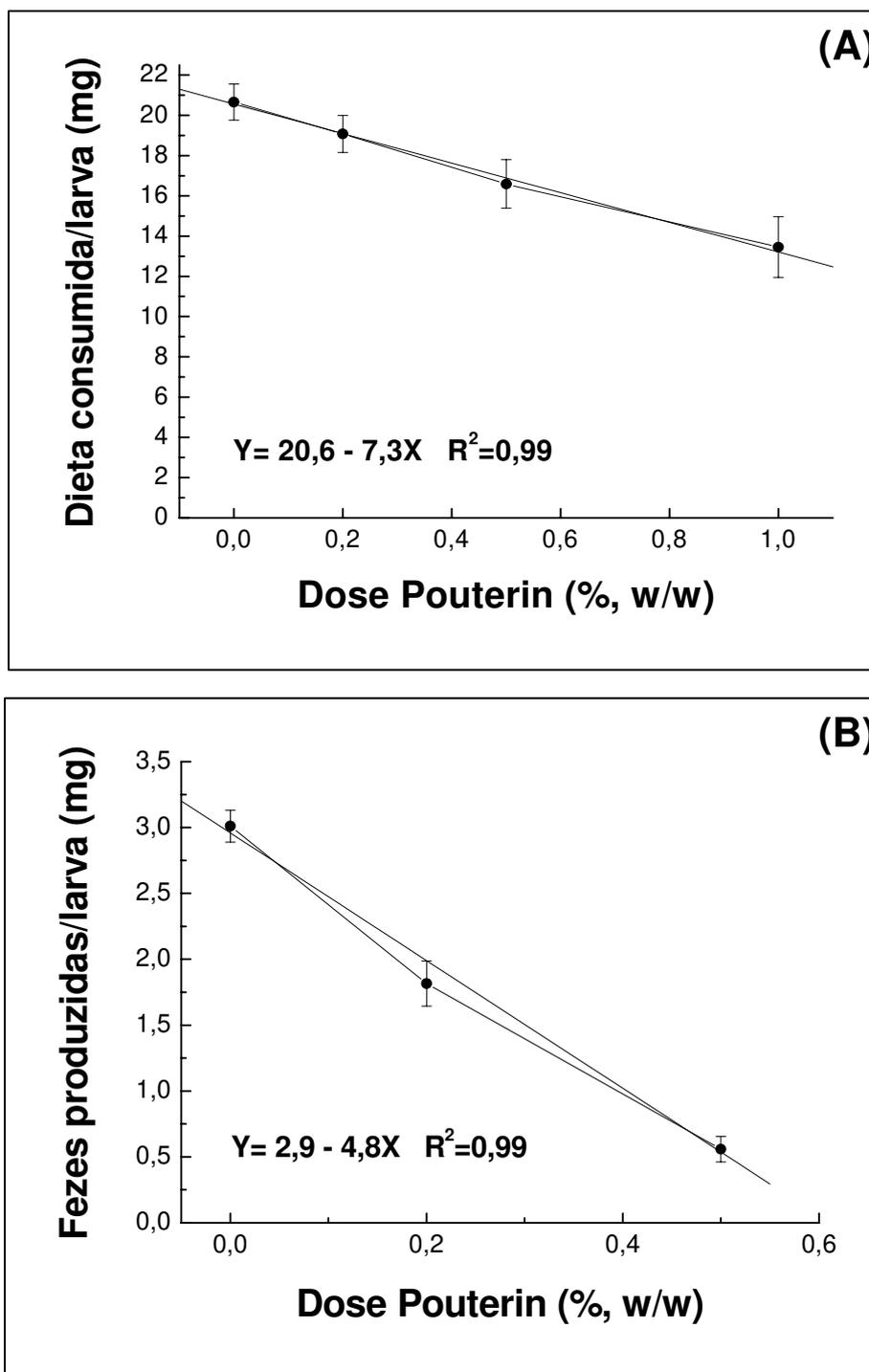


Figura 13: Parâmetros fisiológicos avaliados para larvas de *A. kuehniella*. Larvas foram alimentadas por 24 dias na dieta controle, ou dieta contendo pouterin a 0,5 %. **(A)** Dieta consumida por larvas (mg; base em peso seco). **(B)** produção fecal por larvas (mg; base em peso seco). Cada ponto representa um n = 25. Barras de erros indicam erro padrão das médias.

C. Atividade enzimática dos extratos de intestino médios e fezes das larvas de A. kuehniella.

A atividade proteinase geral das larvas criadas em dietas artificiais contendo 0,5 % de pouterin foram observadas para atividade proteinase tripsina-like, utilizando TLCK como um inibidor sintético. Como mostrado na **Figura 14** a atividade triptica foi significativamente aumentada pelos intestinos médios e fezes, entre os tratamentos controle e com pouterin (**Fig. 14A e B**). O consumo da dieta artificial contendo pouterin a 0,5 % alterou a atividade triptica dos intestinos médios de *A. kuehniella* em 48 % (**Fig. 14A**), e alterou a atividade triptica das fezes em 84 %, quando comparados com o controle (**Fig. 14B**).

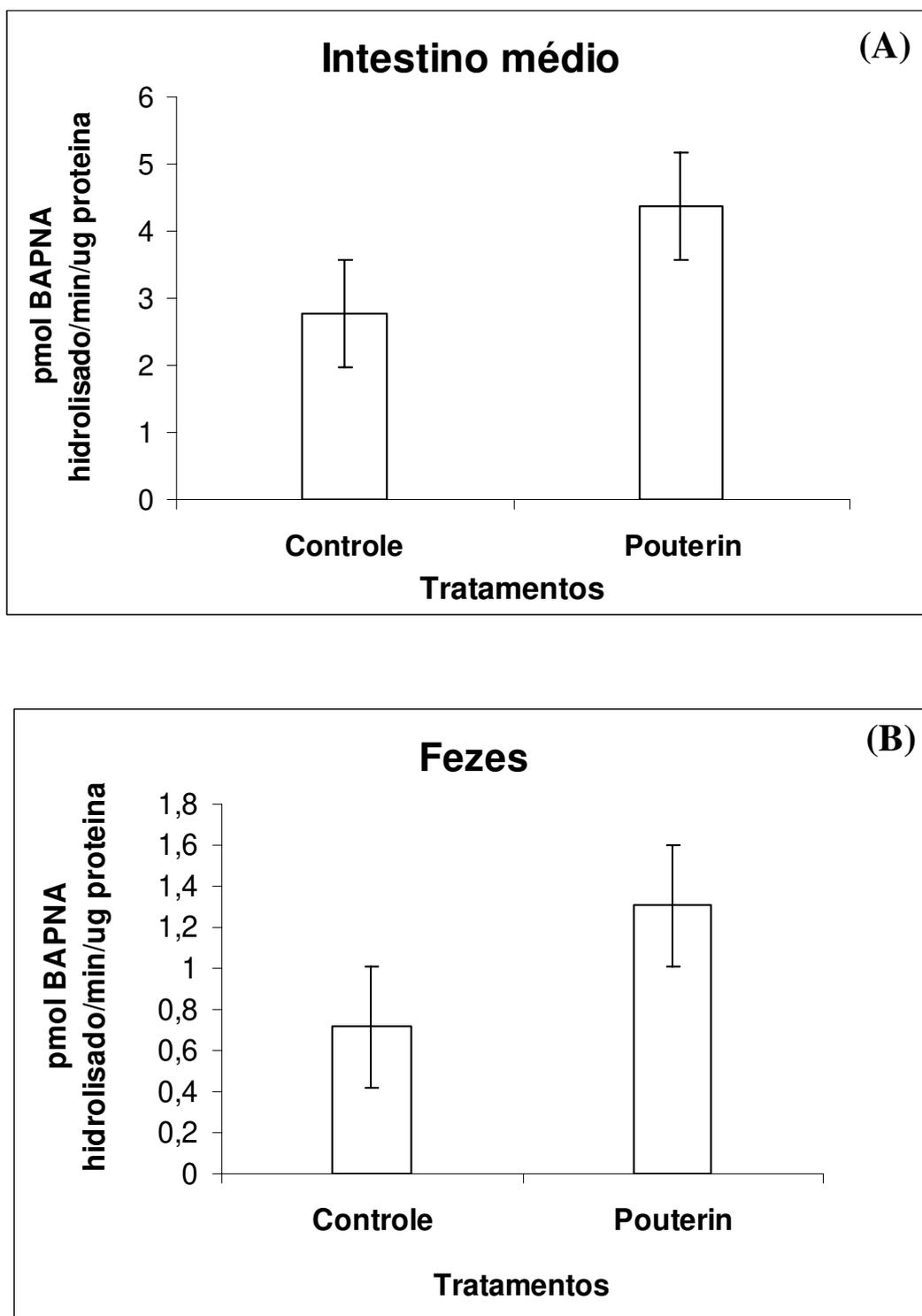


Figura 14: Atividade tripsina-like das larvas de quarto ínstar alimentadas com dieta controle e dieta contendo 0,5 % de pouterin. (A) Atividade enzimática do intestino médio. (B) Atividade enzimática das fezes. Atividade tripsina foi avaliada usando Bapna como substrato. Barras de erros indicam erro padrão das médias.

D. Gel de poliacrilamida contendo 0,1 % de gelatina

Gel de poliacrilamida contendo 0,1 % de gelatina foi usado para confirmar a ação de pouterin na atividade triptica nos intestinos médios e fezes de *A. kuehniella*. Como mostrado na **Figura 15**, a atividade triptica (controle) dos extratos dos intestinos médios e fezes controle foram visualizados na linha 1 e 3, respectivamente, e linhas 2 e 4 mostram as mudanças que dieta artificial contendo pouterin a 0,5 % causou na atividade triptica das fezes e intestino médios dos insetos. Linhas 5, 6, 7 e 8 indicam atividade triptica das amostras 1, 2, 3 e 4, respectivamente inibidas com TLCK. Os resultados mostram que, sob estas condições a atividade tripsina relativa na gelatina foi aproximadamente à mesma de um substrato sintético e nenhuma alteração no perfil destas enzimas foram verificados.

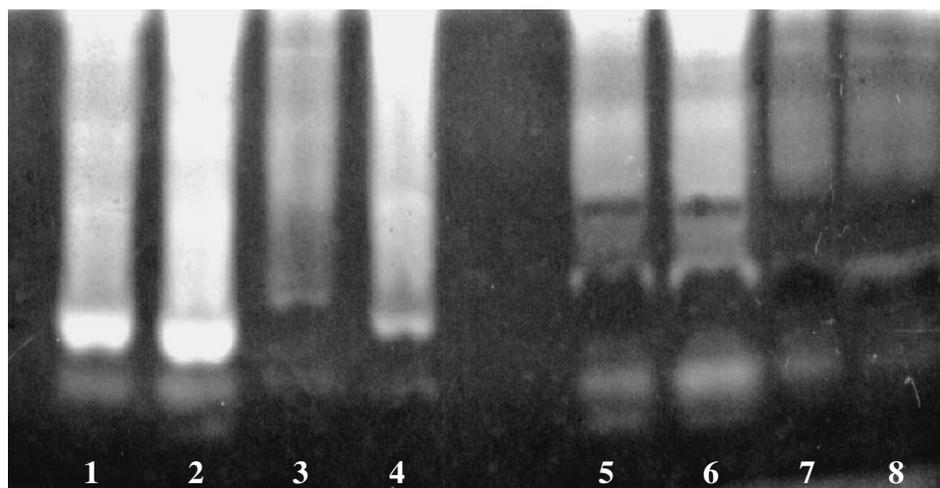


Figura 15: PAGE-SDS (10%) contendo gelatina a 0,1 %. (1) Intestino médio das larvas alimentadas com dieta controle. (2) Intestino médio das larvas alimentadas com dieta contendo 0,5 % de pouterin. (3) Fezes das larvas alimentadas com dieta controle. (4) Fezes das larvas alimentadas com dieta contendo 0,5 % de pouterin. (5, 6, 7 and 8): Amostras 1, 2, 3 e 4 tratadas com TLCK. Atividade proteolítica aparece na região clara contra o “background” escuro.

5.5. Coluna de quitina

Com o objetivo de avaliar se pouterin interagia com resíduos de N-acetilglicosamina (quitina), resolvemos cromatografar pouterin em uma coluna de quitina (**Figura 16**). Como pode-se observar dois picos principais foram obtidos, um eluído com tampão de equilíbrio (tampão fostato 50 mM, pH 7,6) e outro pico eluído com HCl 100 mM. A atividade hemaglutinante foi detectada nos dois picos.

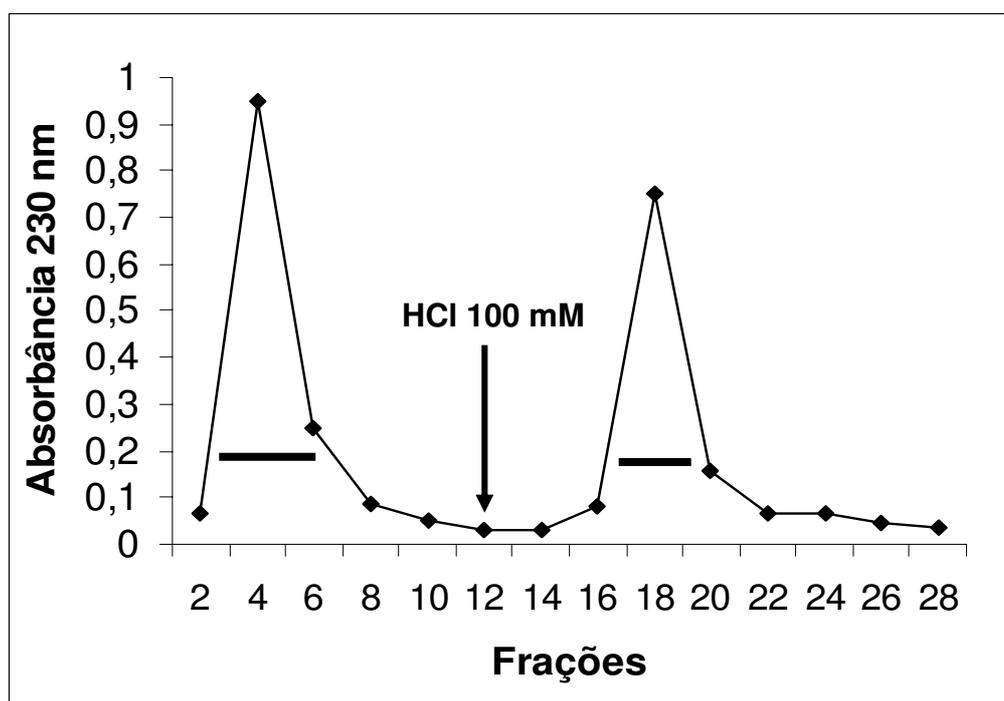


Figura 16: Eluição do perfil de pouterin a coluna de quitina. Pouterin foi aplicada a uma coluna (20 mL), inicialmente eluída com tampão fostato 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 100 mM, seguido pelo HCl 100 mM. Frações (2,0 mL/tubo) foram coletados a um fluxo de 35 mL h⁻¹ e o perfil de eluição foi monitorado a 230 nm.

6. Discussão

Proteínas lectina-like tem sido detectadas em sementes de plantas (Fabre et al., 1998, Troncoso et al., 2003, Macedo et al., 2004), e o isolamento e caracterização de pouterin, uma proteína lectina-like de sementes de *P. torta*, correspondem a estes estudos. Pouterin foi purificada pela combinação de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e fase reversa. Na presença e ausência de DTT 1M, a proteína purificada mostrou somente uma banda de proteína de aproximadamente 14kDa em PAGE-SDS (**Fig. 8B**, lane 1 e 2). Pouterin apresentou um conteúdo relativamente extenso de aminoácidos como Asx, Glx and Leu, e também um número alto de resíduos de Cys (**Tabela 3**). Pouterin é uma glicoproteína, com 22 % de açúcar neutro. Este conteúdo de carboidratos são similares a outras lectinas e proteínas lectina-like, tal como labramin (Macedo et al., 2004), TEL (Freire et al., 2002) e KpLec (Macedo et al., 2003), nas quais os valores para as proteínas são 16.2 %, 18.8 % e 14 %, respectivamente.

As propriedades de lectina-like de pouterin foram confirmadas pela hemaglutinação de eritrócitos na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} (**Tabela 1**). Pouterin teve um título hemaglutinante reproduzível de 16 (3,6 $\mu\text{g/mL}$) com eritrócitos humanos A Rh^+ e com eritrócito de coelho; e um título alto de 256 (0,2 $\mu\text{g/mL}$) foi obtido com as células correspondentes tratadas com tripsina. A baixa capacidade de pouterin aglutinar eritrócitos humanos provavelmente está relacionada com o requerimento de Ca^{2+} e Mn^{2+} no meio (dado não mostrado).

A atividade hemaglutinante de pouterin foi similar a de labramin, que obteve um título de 64 (6 $\mu\text{g/mL}$) com eritrócitos humanos A Rh^+ tripsinizados e não tripsinizados (Macedo et al., 2004). Fabre et al. (1998) reportou que a proteína lectina-like arcelina-1 teve títulos de 128 (30 $\mu\text{g/mL}$) e 32 (125 $\mu\text{g/mL}$) com eritrócitos humanos O Rh^+ e de coelho tripsinizados, respectivamente. Pouterin mostrou afinidade pelas glicoproteínas como fetuína, asialofetuína, ovoalbumina e orosomucoide, bem com heparina (**Tabela 2**). Ao contrário, não foi aparentemente inibida por açúcares simples e derivados. Uma afinidade similar para glicoproteínas também foi descrita para labramin (Macedo et al., 2004), arcelina-1 (Fabre et al., 1998) e PDTI (Troncoso et al., 2003).

A atividade hemaglutinante de pouterin foi mantida sob a extensa faixa de pH 5,0-10; os pH 3-4 tiveram 55 % de perda da atividade, enquanto que em pH 11 teve 67 % de

perda de atividade. Estes resultados são similares aos das lectinas de plantas, KpLec reteve atividade máxima nas faixas de pH 5,0-10 (Macedo et al., 2003), e ACLEC (lectina de *Annona coriacea*) foi estável nos pH 3,0-9,0 (Coelho et al., 2003). Uma propriedade geral de muitas proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas é sua marcante estabilidade térmica (Peumans and Van Damme, 1995). De acordo com isto, pouterin foi estável até 60 °C, com uma perda progressiva de atividade a altas temperaturas: perda de 22 % a 70 °C, 34 % a 80 °C e 78 % a 90 °C; TEL também é estável a 60 °C (Freire et al., 2002).

Muitas plantas contribuem com o seu próprio sistema de defesa fornecendo resistência contra insetos, bactérias e fungos. Em particular, lectinas ligantes de quitina aparentemente tem uma função no mecanismo de defesa de plantas contra fungos e insetos. A habilidade de lectinas de inibir o crescimento de fungos varia entre as espécies fungais. Freire et al (2002) mostrou que TEL inibiu o crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *S. cerevisiae* em aproximadamente 50 % a uma concentração de 280 µg/mL⁻¹. Macedo et al. (2004) mostrou que labramin inibiu o crescimento de *C. lindemuthianum* em 35% a uma concentração de 120 µg/mL⁻¹, mas não teve efeito significativo em *F. oxysporum*.

Pouterin inibiu o crescimento dos *F. oxysporum* (85%), *C. musae* (54%) e da levedura *S. cerevisiae* (100%), assim como ligou a quitina. A concentração requerida para inibir o crescimento dos fungos foi de 280 µg/mL. Mananas, quitinas e outros sacarídeos são importantes componentes de muitas paredes celulares dos fungos e provavelmente pouterin inibiu o crescimento dos fungos pela interação destes com os carboidratos. A variação na susceptibilidade da linhagem dos fungos à inibição pelas lectinas e proteínas relacionadas pode refletir diferenças na composição molecular e organização da parede dos fungos e/ou estar relacionada ao tamanho pequeno de muitas lectinas, o que permite que elas penetrem através da parede celular dos fungos (Van Parijz et al., 1992).

A atividade inseticida de lectinas de plantas e proteínas lectina-like contra espécies de insetos pertencentes às ordens coleóptera, lepidóptera, díptera e homóptera tem sido bem documentado (Fabre et al., 1998, Carlini and Grossi-de-Sá, 2002, Macedo et al., 2006). Estas proteínas apresentam uma vantagem como agentes inseticidas contra as pragas que restringem o aumento na produção da colheita, pois ocorrem naturalmente na natureza. De modo geral, a utilização de bioensaios *in vitro* é utilizada para avaliar as

características biológicas e incluir estas proteínas estudadas dentro de dietas artificiais, e oferece-las aos insetos alvos durante um determinado período de tempo. Vários parâmetros indicam os efeitos nocivos das lectinas e proteínas lectin-like nos insetos: como peso larval, tamanho, cor, mortalidade, inibição da alimentação, efeitos antimetabólicos, níveis de excreção de “honeydew”, pupação, retardamento no tempo total de desenvolvimento, emergência dos adultos e/ou fecundidade na primeira e/ou segunda geração dos insetos nas quais foram criados nas dietas artificiais contendo lectinas e proteínas relacionadas (Vasconcelos and Oliveira, 2004).

Pouterin foi tóxica as larvas de *C. maculatus* e causou perda de peso (Boleti et al., 2007). A LD₅₀ de 50 % a uma concentração de 0,12 % estimada por pouterin foi comparável a extensa concentração (0,1-1,0 %) a qual TEL, KpLec e lectina de *Bauhinia monandra* causaram 50 % de mortalidade, respectivamente (Macedo et al., 2002; 2003; 2007). Estas lectinas podem provocar efeitos deletérios pela ligação em receptores glicanos na superfície do revestimento celular no intestino dos insetos (Macedo et al., 2004). Macedo et al. (2004) propuseram que a atividade inseticida de TEL para as larvas de *C. maculatus*, se deve possivelmente (1) a ligação a componente de quitina (ou estruturas equivalentes) no intestino do inseto; (2) pela interação com glicogonjugados na superfície das células endoteliais ao longo do trato digestivo; (3) pela ligação a açúcares de uma variedade de enzimas digestivas glicosiladas e/ou proteínas assimilatórias nos extratos dos intestinos médios, e (4) pela resistência da digestão enzimática pelas proteinases cisteína-like.

Os resultados apresentados aqui, para *A. kuehniella* mostraram que pouterin retardou o desenvolvimento das larvas a lepidóptera. A ingestão de pouterin não causou uma redução significativa na sobrevivência das larvas de *A. kuehniella*, entretanto a dieta com pouterin mostrou efeito significativo no peso médio das larvas, reduzindo 71,4 % do peso quando a dieta continha 1 % de pouterin e provocando uma diminuição de 50 % do peso das larvas quando usado na concentração de de 0,6 %..

Muitos componentes de plantas podem afetar o comportamento e crescimento dos insetos, agindo como deterrentes, toxinas e reguladores do crescimento dos insetos (Wheeler and Isman, 2001). Diversas lectinas detrimental ao crescimento de insetos mostram agir como toxinas e anti-feedants, tal como GNA tem mostrado efeito anti-feedant contra *Nilaparvata lugens* (Powell et al., 1995). KpLec, administrada a 1,0 % na dieta artificial causou uma redução de 84 % no peso larval de *A. kuehniella* e LD₅₀ a

0,65 % (Macedo et al., 2003). Macedo et al. (2007) mostrou que a lectina de folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL) produziu uma diminuição de 40 % na massa de *A. kuehniella* quando administrada a 1,0 %, e BmoLL a 1,0 % não diminuiu significativamente a sobrevivência larval.

Os mecanismos pelos quais lectinas exercem seus efeitos tóxicos sobre insetos são pouco conhecidos, mas desde que glicoproteínas são os maiores constituintes da membrana do trato digestivo dos insetos, é plausível que o intestino dos insetos contenha moléculas de ligação aos ligantes específicos que são alvos para as lectinas de plantas (Zhu-Salzman et al., 1998). A membrana peritrófica do intestino de muitos insetos em um ou mais estágios do ciclo de vida, facilita o processo digestivo no intestino e protege o inseto da invasão de microorganismos, parasitas e também de partículas abrasivas de alimentos. A membrana peritrófica consiste de proteínas, proteoglicanos e quitina (contem resíduos de N-acetilglicosamina) (Tellan et al., 1999). Pouterin ligou a quitina, mas não completamente. O fato de pouterin apresentar efeito no crescimento das larvas de *A. kuehniella*, assim como efeito inseticida contra larvas de *C. maculatus* pode estar relacionado a esta propriedade de ligação a coluna de quitina.

Os experimentos de utilização da dieta mostraram que pouterin incorporada dentro de dieta artificial reduziu o crescimento das larvas em aproximadamente 70 % dentro de 20 dias. Isto corresponde à diminuição na razão de consumo e produção de fezes das larvas de *A. kuehniella* (**Fig. 13A e B**). Provavelmente esta diminuição na razão de consumo seja devido à natureza tóxica de pouterin. A tabela de utilização da dieta mostrou que AD, ECI e ECD também diminuíram a uma concentração de 0,5 % de pouterin. Os valores de AD das larvas de quarto ínstar de *A. kuehniella*, no presente estudo, foram reduzidos no período de alimentação do experimento (**Tabela 4**), indicando que as larvas tratadas não absorveram os nutrientes do intestino com a mesma eficiência dos insetos não tratados com pouterin. O ECI mede a habilidade do inseto a utilizar o alimento que ingeriu para o crescimento. Uma mudança no ECI indica que mais alimento esta sendo metabolizado para energia e menos esta sendo convertido em massa corporal (Koul et al., 2003).

ECD também diminui com a proporção de alimento digerido que está sendo metabolizado para aumento de energia (Wheeler and Isman et al., 2001). Diminuição dos valores de ECI e ECD indicam que a ingestão de pouterin também exibiu alguma

toxicidade crônica. Confirmando estes resultados, a Tabela 4 demonstra um aumento de 75 % no custo metabólico (CM) em larvas de *A. kuehniella*, como descrito por Mordue and Blackwell (1993). Nós sugerimos que a redução no ECD seja provavelmente resultado de um aumento na proporção de energia assimilada convertida para o crescimento para compensar o custo metabólico associado com a detoxificação e disposição de pouterin.

Uma outra complicação antinutricional adicional para os insetos alimentados com dieta artificial contendo lectina é a possibilidade de que as lectinas possam desestabilizar o metabolismo do inseto por interferir com a função enzimática do intestino, seja indiretamente ou pela ligação a enzimas digestivas glicosiladas no intestino (Van Damme *et al.*, 1998). Estudos dos efeitos de lectinas, como GNA e Con A, as proteinases tripsinas são conseqüentemente documentadas (Fitches and Gatehouse, 1998). No presente estudo as atividades trípticas nas fezes e intestino médio. Pouterin promoveu aumento nos níveis de tripsina nas fezes e intestino médio das larvas de *A. kuehniella* (**Fig. 14A e B**). Deste modo pouterin pode ligar e afetar indiretamente o mecanismo regulatório enzimático como uma conseqüência da perturbação do ambiente na matriz peritrófica (Fitches and Gatehouse, 1998).

Uma mudança no ambiente da membrana e conseqüentemente o rompimento dos mecanismos de reciclagem enzimáticos podem fornecer uma explicação alternativa para os aumentos observados na atividade triptica dos extratos fecais coletados das larvas de *A. kuehniella* alimentados com pouterin. Coelho *et al.* (2007) mostraram que a lectina de *Annona coriacea* (ACLEC) produziu uma mudança no ambiente da membrana do intestino e conseqüentemente rompeu os mecanismos de reciclagem enzimáticos das larvas de *A. kuehniella*.

Em conclusão, nós identificamos uma nova proteína lectina-like de sementes de *Pouteria torta*, pertencente à família Sapotaceae, com propriedades biologicamente importantes. De acordo com as análises de seus efeitos sobre insetos (*C. maculatus* e *A. kuehniella*) e fungos, podemos sugerir que Pouterin, após estudos mais aprofundados, poderá tornar-se uma importante ferramenta na biotecnologia de plantas, para melhorar o mecanismo de defesa vegetal contra o ataque de insetos e patógenos.

7. Conclusões

- A proteína lectina-like presente em sementes de *Pouteria torta* é uma glicoproteína com 22 % de carboidratos totais, dependente de Ca^{2+} e Mn^{2+} para exercer sua atividade hemaglutinante;
- É uma proteína estável numa ampla faixa de pH (5-10) e de temperatura (37-60 °C);
- A atividade lectina-like de pouterin foi inibida pelas glicoproteínas como fetuína, asialofetuína, heparina, orosomucoide e ovoalbumina;
- Pouterin apresentou em PAGE-SDS uma única banda de ~14 kDa, na presença e ausência de DTT;
- Pouterin inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum musae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- A incorporação de pouterin em dieta artificial (concentração final=0,12 %) causou 50 % de mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus*, enquanto que 0,08 % de pouterin produziu uma ED_{50} ;
- Quando pouterin foi oferecida na forma de dieta artificial ao lepidóptero *Anagasta kuehniella* não produziu efeitos significativos na sobrevivência, entretanto na concentração de 1%, produziu 71,4 % de redução no peso médio larval;
- Resultados da utilização da dieta realizados com *A. kuehniella* apresentaram redução do ECI, ECD e AD, e um aumento no CM;
- Pouterin aumentou o nível de atividade triptica das fezes e intestino médio das larvas de *A. kuehniella*;

8. Referências Bibliográficas

- Allsopp, P.G., Mcghe, T.K. (1996). Snowdrop and wheatgerm lectin and avidin as antimetabolites for the control of sugarcane whitegrubs. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 409-414.
- Bartnicki-Garcia, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis *Symp. Soc. Microbial*, 23, 245-267.
- Bate, N.J., Rothstein, S.J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16: 561-569.
- Birch, A.N.E., Geoghegan, I.E., Majerus, M.E.N., McNicol, J.W., Hackett, C., Gatehouse, A.M.R., and Gatehouse, J.A. (1999). Tri-trophic interactions involving pest aphids predatory 2-spot ladybirds and transgenic potatoes expressing snowdrop lectin for aphid resistance. *Mol. Breeding*, 5: 75-83.
- Boleti, A.P.A.; Freire, M.G.M.; Coelho, M.B.; Silva, W.; Baldasso, P.A.; Gomes, V.M.; Marangoni, S.; Novello, J.C. and Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (7):2653-2658.
- Boulter, D. (1993). *Biochemistry*: 1453-1466.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Caldeira, W.; Dias, A.B.; Terra, W.R. and Ribeiro, A.F. (2007). Digestive Enzyme Compartmentalization and Recycling and Sites of Absorption and Secretion Along the Midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) Larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 64:1.18.
- Campos-Olivas, R.; Hörr, I.; Bormann, C.; Jung, B.; Gronenborn, A.M. (2001). Solution structure, backbone dynamics and chitin-binding of the antifungal protein from *Streptomyces tendae* TÜ901, *J. Mol. Biol.*, 308: 765– 782.
- Carlini, C.R.; Oliveira, A.E.A.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M.A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.*, 90: 340-348.
- Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.
- Ciopruga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L., Doyle, R.J., (1999). *Fusarium* sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428: 424-432.
- Coelho, M.B.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C. and Macedo, M.L.R. (2003). Purification and characterization of a lectin from *Annona coriacea* seeds. *Protein and Peptide Letters*, 10, 165-173.
- Chrispeels, M. J. & Raikhel, N. V. (1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.

- Down, R.E.; Fitches, E.C.; Duncan, P.W.; Corti, P.; Bell, H.A.; Gatehouse, J.A. and Edwards, J.P. (2006). Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Manag. Sci.*, 62: 77-85.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K. and Rebers, P.A. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-6.
- Duranti, M.; Gius, C. (1997). Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field. Crop. Res.*, 53: 31-45.
- Dutta, I. et al. (2005). The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol. J.* 3, 601–611.
- Fabre, C.; Causse, H.; Mourey, L.; Koninkx, J.; Riviere, M.; Puzo, G.; Samama, J.P.; Rougé, P. (1998). Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-1) seeds. *Biochem J.* 329: 551-560.
- Fernandes, K.V.S., Xavier Filho, J. (1998). The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 4: 241–245.
- Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E.C., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R., 2000. Proteolytic activation of Canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 162–171.
- Ferry, N.; Edwards, M.G.; Gatehouse, J.A. and Gatehouse, A.M.R., (2004). Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 155-161.
- Ferry, N. et al. (2006) Transgenic plants for insect pest control. A forward looking scientific perspective. *Transgenic Res.* 15, 13–19
- Fitches, E. et al. (2002) Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect control agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1653–1661
- Fitches, E. et al. (2004) Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *J. Insect Physiol.* 50, 61–71.
- Follmer, C., Barcellos, G.B.S., Zingali, R.B., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A., Carlini, C.R., (2001). Canatoxin, a toxic protein of jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360, 217–224.
- Follmer, C.; Wassermann, G.E.; Carlini, C.R. (2004). Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci.*; 167-241-246.
- Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S. and Macedo, M. L. R. (2002). Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 61-68.

- Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M.; Castagnaro, A.; Titarenko, E.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Piñeiro, M.; Diaz, I. (1996). Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops REs.*, 45: 79-84.
- Gatehouse, A.M.R.; Hilder, V.A.; Boulter, D. (1992). Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. *Biotechnology in Agriculture no. 7: Plant Genetic Manipulation for crop protection*. CAB Int., pp.155-181.
- Gatehouse, A.M.R.; Gatehouse, J.A. (1998). Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crop. *Pesticide Science*, 52: 165-175.
- Gomes, V.M., Mosqueda, M.-I., Blanco-Labra, Sales, A.M.P., Fernandes, K.V.S., Cordeiro, R.A., Xavier-Filho, J., (1997). Vicilin storage protein from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4110–4115.
- Gomes, V.M., Da Cunha, M., Miguens, F.C., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., (1998a). Ultrastructure and immunolabelling of fungi cells treated with *Vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins). *Plant Sci.* 138: 81–89.
- Gomes, V.M., Okorokov, L.A., Rose, T.L., Fernandes, K.V., Xavier-Filho, J., (1998b). Legume (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucosestimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 207–216.
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives and Biophys.*, 431: 145-159.
- Hall, A.E., Singh, B.B, Ehlers, J.D. (1997). Cowpea breeding. *Plant Breed. Rev.*, 15: 217-274.
- Henrikson, R.L.; Meredith, S.C. (1984). Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: pre-column derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 136, 65-71.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.S., Barker, R.S., Boulter, D.A. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160-163.
- Hilder, V.A. and Boulter, D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191.
- Imai, M.; Yamashita, Y.; Miyakawa, Y.; mayuimi, M. (1974). Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australian antigen. *Immunology*, 27, 871-878.
- James, C. (2005) Preview: Global Status of Commercialized Biotech/ GM Crops: 2005. ISAAA Briefs No 34. ISAAA
- Kay, D.E., (1979). Food legumes: cowpea (*Vigna unguiculata*). *Crop and Product Digest*, vol. 3. Tropical Products Institute, London.
- Koo, J.C., Lee, S.Y., Cheen, H.J., Cheong, Y.H., Choi, J.S., Kawabata, S., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Ha, K.S., Bae, D.W., Han, C., Lee, B.L., Cho, M.J., (1998). Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1383: 80-90.

- Koul, O., Daniewski, W.M., Multani, J.S., Gumulka, M., Singh, G. (2003). Antifeedant effects of the limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 7271-7275.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores Brasileiras-Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Harri Lorenzi (Ed), Editora Plantarum LTDA, 1: 325.
- Macedo, M.L.R.; Fernandes, K.V.S.; Sales, M.P.; Xavier-Filho, J. (1993). Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 105: 89-94.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2002). *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General subjects*, 1571 (2): 83-88.
- Macedo, M.L.R.; Damico, D.C.S.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Novello, J.C. (2003). Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Agric. Food Chem.* 51: 2980-2986.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Martins, L.T.D.; Martinez, D.S.; Gomes, V.M.; Smolka, M.B.; Toyama, M.H.; Marangoni, S.; Coelho, L.C.B.B. (2004). Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. Seeds homologue to Kunitz-Type trypsin inhibitor with lectin-like properties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52 (25): 7548-54.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Silva, M.B.R., Coelho, L.C.B.B. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 146 (4): 486-498.
- Machuka, J.S.; Okeola, O.G.; Chrispeels, M.J.; Jackai, L.E.N. (2000). African yam beans seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of legume pod borer. *Phytochemistry*, 53: 667-674.
- Mejía, E.G. and Prisecaru, V.L. (2005). Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:425-445.
- Michaud, D., Faye, L., Yalle, S. (1993). Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrilamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis* 14, 94-99.
- Mordue, L., Blackell, A.J., (1993). Azadirachtin: an update. *J. Chem. Ecol.* 15, 121-128.
- Ng, T.B., (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and nonleguminous origins. *Peptides* 25, 1215-1222.
- Ngai, P.H.K. & Ng, T. B. (2007). A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74: 366-371.

- Nicholson, G.M. (2007). Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* 49: 413–422
- Pacheco, I.A and De Paula, D.C. (1995). Insetos de grãos armazenados-identificação e biologia. São Paulo: Fundação Cargill, 229p.
- Paes, N.S., Gerhardt, I.R., Coutinho, M.V., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., Chrispeels, M.J., Grossi-de-Sa, M.F., (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *J. Insect Physiol.* 46, 393–402.
- Pandey, N.D.; Pal, K.; Pandey, S.; Tripathi, R.A.; Singh, Y.P. (1985). Use of neen, *Azadirachta indica* A. juss as seed protectants against rice moth, *Corcyra cephalonica* Stainton. *Bull. Grain Technol.* 23: 147-15
- Peters, W., (1992). Peritrophic membranes. Springer-Verlag, Berlin.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109, 345-352.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. (1998). Plant Lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15: 199-227.
- Popelka, J.C.; Terry, N.; Higgins, T.J.V. (2004). Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, 167-195-206.
- Powel, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Boonjawat, J., Horsham, K., Gatehouse, J.A. (1995). Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomol. Exp. Appl.* 75: 61-65.
- Powell, K S., Spence, J., Barathi, M., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. (1998). Immunohistochemical and development studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *J. Insect Physiol.*, 44: 529-539.
- Pusztai, A., Ewen, S.W.B., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Rubio, L., Bardocz, S. (1990). Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*, 46: 308-316.
- Raikhel, N.V., Lee, H.I., Broekaert, W.F. (1993). Structure and function of chitin-binding proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 591–615.
- Rao, K.V., Rathore, K.S., Hodges, T.K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D.P., Powell, K.S., Spence, J., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plant confers resistance to rice brown planthopper. *Plan J.*, 15: 469-477.
- Ribeiro, S.F.F., Agizzio, A.P.; Machado, O.L.T.; Neves-Ferreira, A.G.C.; Oliveira, M.A.; Fernandes, K.V.S.; Carvalho, A.O.; Perales, J.; Gomes, V.M. (2007). A new peptide of melon seeds which shows sequence homology with vicilin: Partial characterization and antifungal activity. *Scientia Horticulturae*, 111: 399–405.

- Rose, T.L., Gomes, V.M., Da Cunha, M., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J. (2003). Effect of sugars on the association between cowpea vicilin (7S storage proteins) and fungal cells. *Biocell* 27, 173–179.
- Rowe, G., Margaritis, A., (2004). Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki. *Biotechnol. & Bioeng.* 86, 378–388.
- Rüdiger, H. In H-J. Gabius and S. Gabius (1997). (Eds.): *Glycosciences, Status and perspectives (vol.2)* London, Champman & Hall, Weinheim, 415-438.
- Rüdiger, H. (1998). Plant Lectins-More than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.*, 161: 130-152.
- Sales, M.P., Gerhardt, I.R., Grossi-de-Sa', M.F., Xavier-Filho, J. (2000). Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *J. Plant Physiol.* 124, 515–522.
- Sales, M.P.; Andrade, L.B.S.; Ary, M.B.; Miranda, M.R.A.; Teixeira, F.M.; Oliveira, A.S.; Fernandes, K.V.S.; Xavier-Filho, J. (2005). Performance of bean bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship with trypsin inhibitor and vicilin excretion *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 142: 422 – 426.
- Sparvoli, L. L. F.; Galasso, I.; Lanave, C.; Bollini, R. (2003). Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor. Appl. Genet.* **107**: 814-822.
- Sauvion, N.; Nardonb, G.; Febvay, G.; Gatehouse, A.M.R; Rahbe, Y. (2004). Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *J. Insect Physiol.* 50: 1137-1150.
- Selitrennikoff, C.P. (2001). Antifungal proteins, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883–2894.
- Sétamou, M., Bernal, J.S., Legaspi, J.C., Mirkov, T.E. and Legaspi, B.C. (2002). Evaluation of lectin-expressing transgenic sugarcane against stalborers (Lepidoptera: Pyralidae): Effects on life history parameters. *J. Econ. Entomol.*, 95 (2): 469-477.
- Shelton, A.M., Tang, J.D., Roush, R.T., Metz, T.D., Earle, E.D., (2000). Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nat. Biotechnol.* 18, 339–342.
- Singh, S.R. and Rachie, K.O. (1985). *Cowpea, research, production and utilization.* John Wiley & Sons, Chichester.
- Scriber, J. M., Slansky Jr, F., 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Ann. Ver. Entomol.* 26, 183-211.
- Stoger, E., Williams, S., Christou, P., Down, R.E., Gatehouse, J.A. (1999). Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) in transgenic wheat plant: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Mol. Breed.*, 5: 65-73.
- Terra, W.R.; Ferreira, C. (1991). A digestão dos insetos. *Ciência Hoje*, 12: 31

- Terra, W.R. and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109 B (1): 1-62.
- Terra WR. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol* 47:47, 61.
- Terra WR, Ferreira C. 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert LI, Iatrov K, Gill SS, editors. *Comprehensive molecular insect science*, Vol. 4. Biochemistry and molecular biology. Oxford: Elsevier, p 171.224.
- Tellan, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P. (1999). Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 87-101.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta* 216, 193–202.
- Troncoso, M.F.; Zolezzi, P.C.; Hellman, U.; Wolfenstein-Todel, C. (2003). A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Archives Biochemistry and Biophysics.*, 411, 93-104.
- Uchôa, A.F., DaMatta, R.A., Retamal, C.A., Albuquerque-Cunha, J.M., Souza, S.M., Samuels, R.I., Silva, C.P., Xavier-Filho, J. (2006). Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology* 52: 169-178.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 575-692.
- Van den Bergh, K.P.B.; Proost, P.; Van Damme, J.; Coosemans, J.; Van Damme, E.J.M.; Peumans, W.J. (2002). Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.), *FEBS Lett.* 530 (2002) 181– 185.
- Van Dellen, K.; Ghosh, S.K. ; Robbins, P.W.; Loftus, B.; Samuelson, J. (2002). *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitinbinding domains, *Infect. Immun.*, 70: 3259– 3263.
- Van Parijz, J.; Broekaert, W.F.; Peumans, W.J.; Geuns, J.M.; Van Laere, A.J. (1992). Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Arch. Microbiol.*, 158, 19-25.
- Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* 44: 1737-1747.
- Volpicella, M.; Ceci, L.R.; Cordewener, J.; America, T.; Gallerani, R.; Wolfram, B.; Jonsgama, M.A.; Beekwilder, J. (2003). Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 270: 10-19.
- Wang, P. and Granados, R.R. (2001). 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.
- Wheeler, D.A., Isman, M.B. (2001). Antifeedant and toxic activity of *Trichilia Americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 9-16.

- Wititsuwannakul, R.; Wititsuwannakul, D.; Sakulborigu, C. (1998). A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 47: 183-187.
- Zhao, J.Z.; Cao, J.; Li, Y.; Collins, H.L.; Roush, R.; Earle, E.D.; Shelton, A.M. (2003). Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nat. Biotechnol.*, 21: 1493-1497.
- Zhu-Salzman, K; Shade, R.E.; Koiwa, H.; Salzman, R.A., Narasimhan, M.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. and Murdock, L.L. (1998). Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Proc. Natl. Sci. USA*, 95: 15123-15128.

Capítulo II

Atividade Citotóxica de Pouterin

1. Introdução

1.1. Morte Celular

As células realizam com eficiência todos os processos fisiológicos. Divisão celular, migração, e diferenciação são exemplos admiráveis que demonstram a eficiência dos processos biológicos realizados pelas células. Assim como os erros nestes processos são pouco comuns. Por isso, não é surpreendente que as células tenham desenvolvido um processo de morte celular programada eficiente, que ajuda a eliminar células mortas ou indesejáveis do nosso corpo (Bortner and Cidlowski, 2007).

A morte celular é parte integral da vida de organismos complexos, e tem sido observada por vários séculos em várias situações (Clarke and Clarke, 1996). A primeira descrição foi realizada por Vogt 1842, que observou que as células desapareciam durante o desenvolvimento normal em espécies de anfíbios. Um grande número de estudos morfológicos descrevem mudanças visíveis na morte celular, *in vivo* e *in vitro*, e estas mudanças morfológicas e o desaparecimento das células têm sido algumas vezes, somente a indicação de morte celular (Clarke and Clarke, 1996).

Kerr et al. em 1972, desenvolveram um conceito unificado para uma forma de morte celular com um instrumento de classificação das células desnecessárias durante o desenvolvimento embrionário, durante renovação das células normais na proliferação dos tecidos e em situações patológicas. Estudos ultraestruturais clássicos de Kerr e seus colaboradores produziram evidências que as células podem sofrer no mínimo dois tipos distintos de morte celular: necrose e morte celular programada (PCD), chamada de apoptose (**Figura 1**).

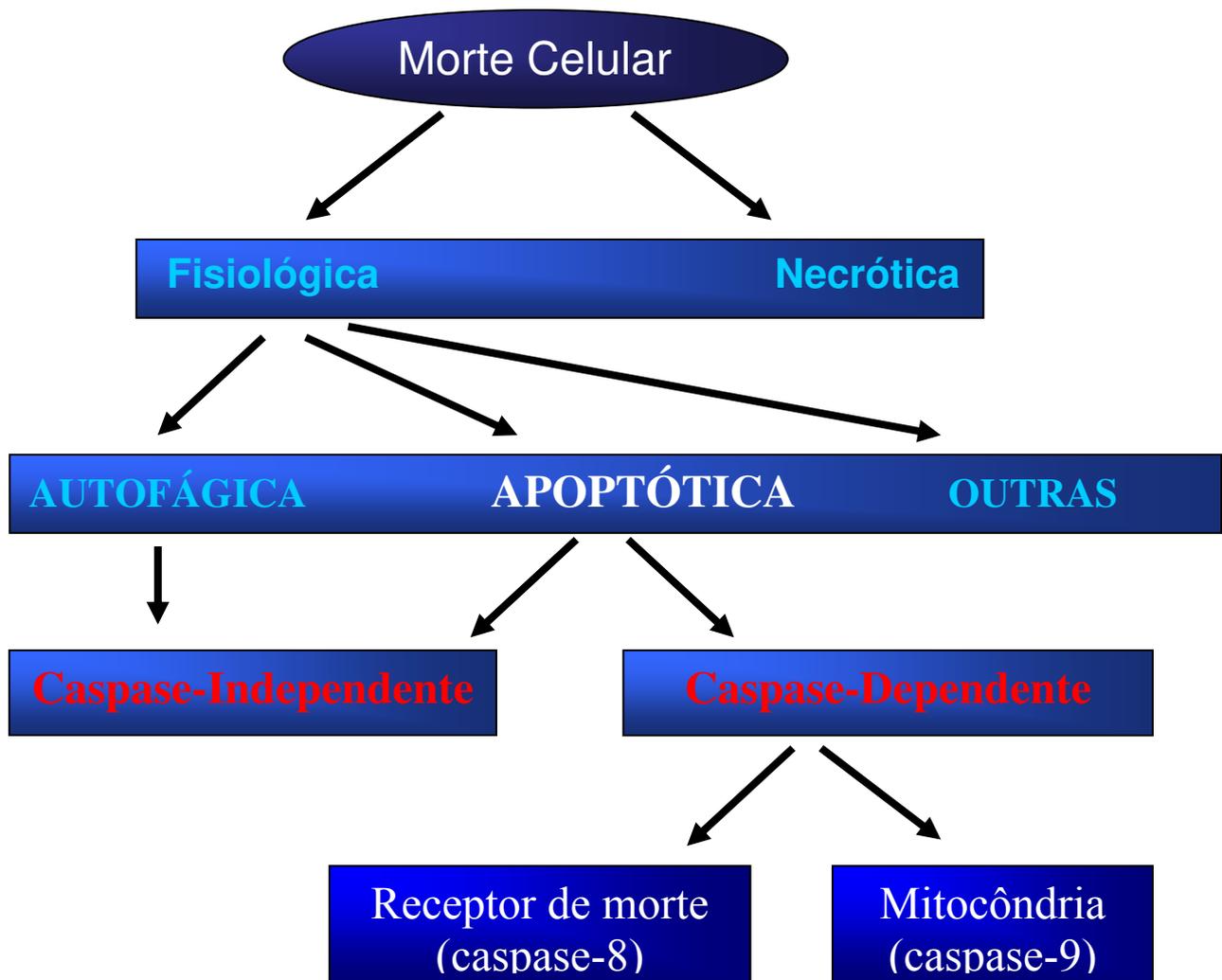


Figura 1: Diferentes tipos de Morte Celular (Adaptado Guimarães and Linden, 2004)

Necrose é a forma rápida e violenta de degeneração afetando extensivamente as populações celulares, caracterizadas pelo “inchaço” citoplasmático, destruição das organelas e rompimento da membrana plasmática, levando a liberação de conteúdos intracelulares e inflamação (Guimarães and Linden, 2004).

Ao contrário, *apoptose* ou *morte celular programada* envolve a ativação de uma maquinaria intracelular que requer energia, e é fortemente regulada e conservada ao longo da evolução (Vermeulen et al., 2005). Apoptose é destacada das células vizinhas, não havendo inflamação ou lesão do tecido. Está envolvida na morfogênese de tecidos embrionários bem como na homeostase de tecidos e órgãos adultos. A desregulação (inibição ou agravamento) da apoptose está envolvida em mecanismos patogênicos diversos, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer e AIDS (Arnould, 2006).

Células apoptóticas são identificadas por uma série de mudanças morfológicas características. Inicialmente, a integridade da membrana celular é mantida, enquanto mudanças sutis, como a exposição de fosfatidilserina ocorrem. Outras características como retração celular, fragmentação da membrana, condensações das cromatinas nucleares e fragmentações também são evidenciadas. Eventualmente, as quebras celulares dos fragmentos ao redor da membrana (corpos apoptóticos) são engolfadas *in vivo* pelos fagócitos (macrófagos e células dendríticas) (Vermeulen et al., 2005).

1.2. Vias de Sinalização da Apoptose

Todos os sinais típicos de apoptose são resultados finais de uma cascata de eventos bioquímicos complexos. Numerosas proteínas são ativadas em uma seqüência altamente regulada. O início do processo pode ser induzido por vários estímulos, como a interação de "ligantes" a receptores de superfície celular, injúrias à integridade do DNA por vários fatores de estresse (por exemplo: drogas), radiação ou grandes mudanças na homeostase celular. A principal via de transdução de muitos desses sinais ocorre através da oligomerização e interação de proteínas com domínios efetores de morte (DED) nos receptores de membrana (Tibbetts et al., 2003). Essas proteínas, com unidade de domínio de morte (DD) e de DED evolutivamente conservados, têm um número de diferentes funções na célula, incluindo, a conexão de receptores de membrana às caspases efetoras citosólicas (Thornberry et al., 1992).

A sinalização apoptótica converge principalmente para a ativação das caspases intracelulares, uma família de cisteíno-proteases que propagam a sinalização de morte pela clivagem de proteínas celulares chaves (Nicholson and Thornberry, 1997). Caspases são enzimas catabólicas cuja função é digerir outras proteínas e um número de proteínas estruturais podem ser substratos das caspases, como poly- (ADP-ribose) polymerase (PARP), uma proteína nuclear implicada no reparo do DNA; laminas cuja clivagem resulta na condensação da cromatina; e actina, cuja clivagem das proteínas do citoesqueleto de actina leva a reorganização citosólica (Vermeulen et al., 2005).

Caspases são sintetizadas em células normais como proenzimas inativas; e podem rapidamente ser ativadas pela clivagem autoproteolítica ou clivagem por outras caspases a resíduos de ácido aspártico (Asp) específicos (Hacker, 2000). Quando clivadas, em um resíduo de aspartato interno, as procaspases são convertidas em enzimas maduras com o aumento atividade enzimática (Thornberry et al., 1992). As caspases envolvidas

em morte celular podem ser divididas em dois subgrupos funcionais baseado nos papéis que desempenham durante o processo: caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7). Geralmente, caspases iniciadoras, uma vez ativadas, irão iniciar um processo em cascata que envolve, posteriormente, as caspases efetoras, que clivam os substratos intracelulares (Slee et al., 1999a,b). Finalmente, após recrutamento das caspases efetoras, desencadeia-se uma série de alterações bioquímicas e morfológicas características da morte apoptótica (Cohen, 1997). Três vias podem regular a atividade das caspases (**Figura 2**): Via receptor de morte, envolvendo caspase-8; Via mitocondrial, envolvendo caspase-9 e a via retículo endoplasmático, envolvendo a caspase-12 (Guimarães and Linden, 2004; Abraham and Shaham, 2004, Vermeulen et al., 2005).

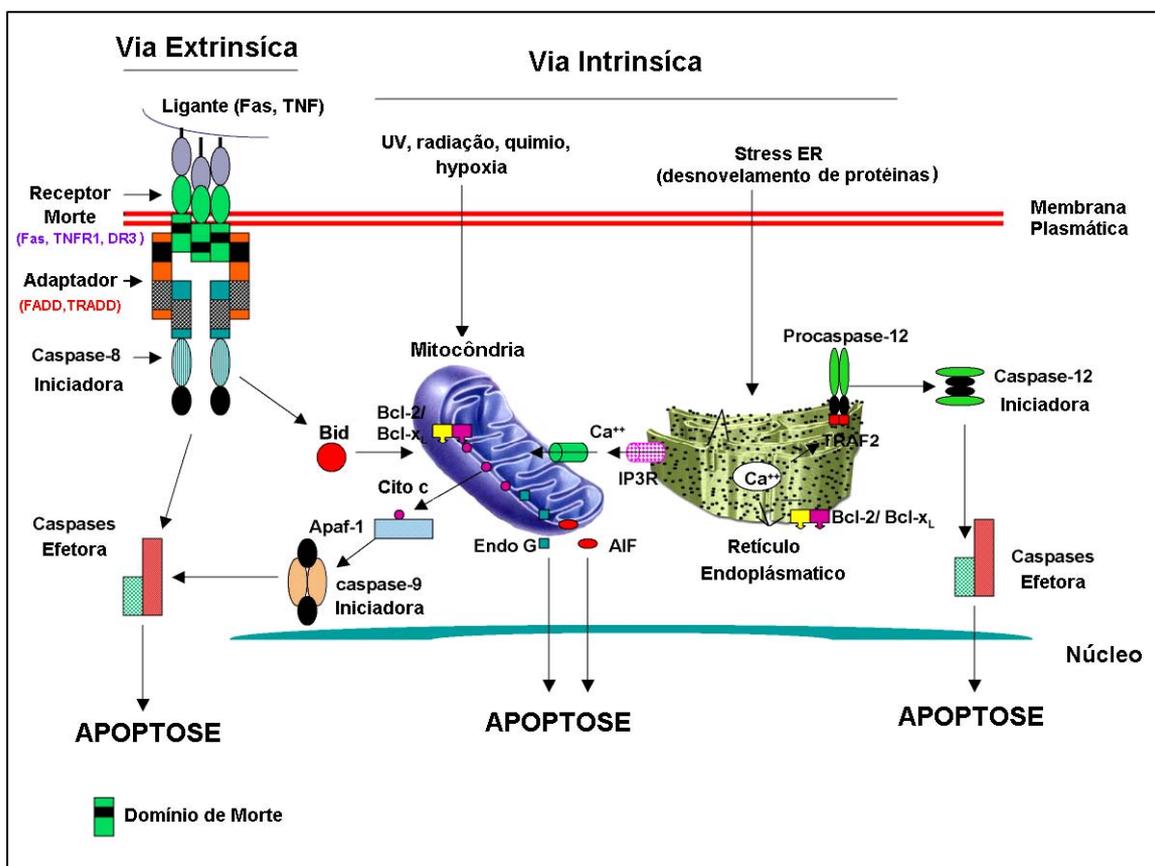


Figura 2: Vias de sinalização de apoptose. Três importantes vias de ativação das caspases, uma envolvendo receptores de morte, outra a mitocôndria e stress no retículo endoplasmático. (→) ativação

- *Via dependente de receptor de morte*

Receptores da membrana plasmática pertencentes à superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNF) disparam externamente a sinalização para apoptose. Dentre estes receptores o Fas (Apo-1 ou CD-95) e o TNF-R1 são os mais bem caracterizados. A ligação do Fas (FasL) induz a trimerização do receptor e recrutamento das proteínas adaptadoras específicas (Ashkenazi and Dixit, 1998). O receptor Fas contém o domínio de morte (DD) na região citoplasmática que interage com a proteína adaptadora, e o domínio de morte (FADD) associado ao Fas, forma um complexo de sinalização (DISC) (Garg and Aggarwal, 2002). Além de um DD, o FADD contém um domínio efetor de morte (DED) e este recruta procaspase-8 que contém DED dentro do DISC. A procaspase-8 pode ser ativada proteoliticamente para a enzima ativa caspase-8 (Thornberry and Lazebnik 1998).

- ***Via mitocondrial***

A via mitocondrial de morte também converge para a ativação de caspase-3. Caspase -3 pode clivar uma série de proteínas como PARP (enzima reparadora do DNA), laminas nucleares, gelsolina, e foldrina (Jiang and Chang, 2000). As duas vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, podem também ser ligadas através da "Bid", um proapoptótico membro da família Bcl-2 (Yin, 2000a,b). Bid é usualmente encontrada no citosol e é clivada pela caspase-8 para originar tBid, que é translocada para mitocôndria (Luo et al., 1998). Na mitocôndria tBid eficientemente ativa Bax que inicia a liberação de citocromo *c* e a disfunção mitocondrial. Essa alternativa é a maneira pela qual a via mediada pelo receptor se relaciona com a via mitocondrial amplificando a ativação de caspases necessária para apoptose (Haimovitz-Friedman, 1998).

- ***Stress no retículo Endoplasmático***

No retículo endoplasmático (RE), as proteínas obtêm suas conformações após modificações pós-transdacionais, enovelamento e oligomerização. O acúmulo de proteínas desnoveladas no RE ativa uma resposta à proteína desnovelada (UPR), uma via de sinalização conservada que leva ao reparo do enovelamento da proteína ou, em alguns casos leva a danos severos, o que dá início a apoptose. No lúmen do RE o Ca^{2+} é armazenado, e um distúrbio na sua homeostase dá início a apoptose (Jaattela, 2004). O envolvimento da mitocôndria na morte celular induzida pelo stress no ER tem sido mostrado pela liberação do citocromo *c* após a indução do stress (Breckenridge et al., 2003).

Membros de todas as classes Bcl-2 também estão localizados na membrana intracelular do ER e regula a homeostase do Ca^{2+} , provavelmente pela influência da permeabilidade da membrana. A liberação do Ca^{2+} pode induzir apoptose pela influência do poro de transição de permeabilidade (PTP) mitocondrial ou pela ativação da caspase-12 (Breckenridge et al., 2003). Esta caspase está localizada na membrana do RE e é especificamente ativada durante a apoptose induzida pelo stress no RE (Momoi, 2004). O mecanismo de ativação da caspase-12 não está bem esclarecido; provavelmente envolva a remoção dependente de calpaina do pro-domínio e sua clivagem (Breckenridge et al., 2003). Capainas são proteases citosólicas dependente de Ca^{2+} que podem também mediar apoptose independente de caspase (Goll et al., 2003). Além da caspase-12, outras moléculas pro-apoptóticas associadas ao RE têm sido descritas, um exemplo é Bap31, que é reguladora da caspase-8, assim como seu substrato (Vermeulen et al., 2005).

Grandes progressos têm sido feito nos últimos anos para compreender as estruturas e as funções das caspases. Existem algumas vias conhecidas de ativação de caspases, entretanto, não parecem ser as únicas, pois existem muitas outras nas quais vem sendo exploradas, como por exemplo, a caspase -2 como uma caspase iniciadora. Apesar das diversas possibilidades, já existe consenso que as diferentes vias não acontecem independentemente, mas que estão intimamente correlacionadas. (Lockshin and Zakeri, 2002; Lockshin and Zakeri, 2004).

Em geral, o modo de execução de morte e suas manifestações biológicas dependem do tipo celular, nível e metabolismo energético, via de sinalização, estímulos e ambiente. Dessa forma, existem várias formas intermediárias de morte celular que possuem características morfológicas apoptóticas como também necróticas, mas a base de como ocorre à ativação dessas vias infelizmente ainda não é compreendida. Células podem ainda desenvolver uma morte celular tipo apoptótica sem ativação de caspases, refletindo uma via alternativa onde proteases lisossômicas possuem papel crucial. Nesses casos, a condensação da cromatina é pouco evidente e a fragmentação nuclear usualmente não ocorre. Morte celular pode também ser iniciada por um programa de apoptose padrão, a qual depois é inibida (durante o estágio final de ativação das caspases) e é finalizada por necrose. Este fenótipo aponecrótico é caracterizado pela coexistência de núcleos fragmentados e degeneração de organelas (Formigli et al., 2000).

1.3. Vias de sinalização mediada pelo TNF- α

Outros receptores de morte ativam caspases de maneira similar. A ligação do TNF- α ao TNF-R1 leva a trimerização do TNF-R1 e ao recrutamento de proteínas adaptadoras TRADD (domínio de morte associado ao TNFR1) (**Figura 3**). O domínio de morte do TRADD interage com o domínio de morte do FADD, recrutando procaspase-8. A caspase-8 ativa leva a ativação da caspase-3 (Vermeulen et al., 2005). Entretanto, a ligação do TNF- α ao TNF-R1 raramente induz apoptose; através da ligação do TRADD ao TRAF2 (fator-2 associado ao receptor TNFR) ocorre o recrutamento inibidores celulares de apoptose c-IAP-1 e c-IAP-2, duas proteínas anti-apoptóticas. A ligação da proteína de interação ao receptor (RIP), uma terceira proteína capaz de interagir com o TRADD e TRAF2 na membrana citoplasmática, leva ao recrutamento e ativação de um complexo I κ B-quinase (IKK), incluindo quinases IKK α e IKK β , e um modulador essencial do NF κ B (NEMO, também chamado IKK γ). Uma vez ativado, o complexo IKK fosforila I κ B α nos resíduos de Ser32 e Ser36, e é subsequentemente ubiquinado e degradado via proteossomo, levando a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B (fator nuclear Kappa B), resultando na transcrição de genes anti-apoptóticos e promotores da sobrevivência celular (Vermeulen et al., 2005).

Fatores de transcrição tais como NF κ B têm sido implicados em ambos, carcinogênese e desenvolvimento de drogas resistentes a células tumorais (Hanahan et al., 2000). Durante a ativação do NF κ B pode haver a indução de apoptose em certas situações (Chuang et al., 2002), mas a maioria das descrições sugerem que o NF κ B medeia os sinais de sobrevivência celular, o que contrasta com a apoptose (Escárcega et al., 2007). A expressão dos genes que inibem a apoptose, como A20, IAPs, e TRAFs, provavelmente está envolvida na mediação (Barkett and Gilmore, 1999). A partir da ativação, o NF κ B dissocia-se do I κ B α inibitório e transloca-se do citoplasma para o núcleo, quando então liga-se para promover elementos e a expressão de genes trans-ativados. A fosforilação do RelA/p65 a certos resíduos serínicos também tem função crucial na trans-atividade do NF κ B. Quando o NF κ B é ativado intrinsecamente ou constitutivamente pode ser crucial no desenvolvimento de drogas resistentes as células tumorais; transitória, a ativação induzida do NF κ B pode ser tão importante mas não é bem estudada (Chuang et al., 2002). A prevenção da ativação do NF κ B, entretanto,

pode representar uma oportunidade promissora para a ampliação de terapêuticos na pesquisa contra câncer (Monks et al., 2004).

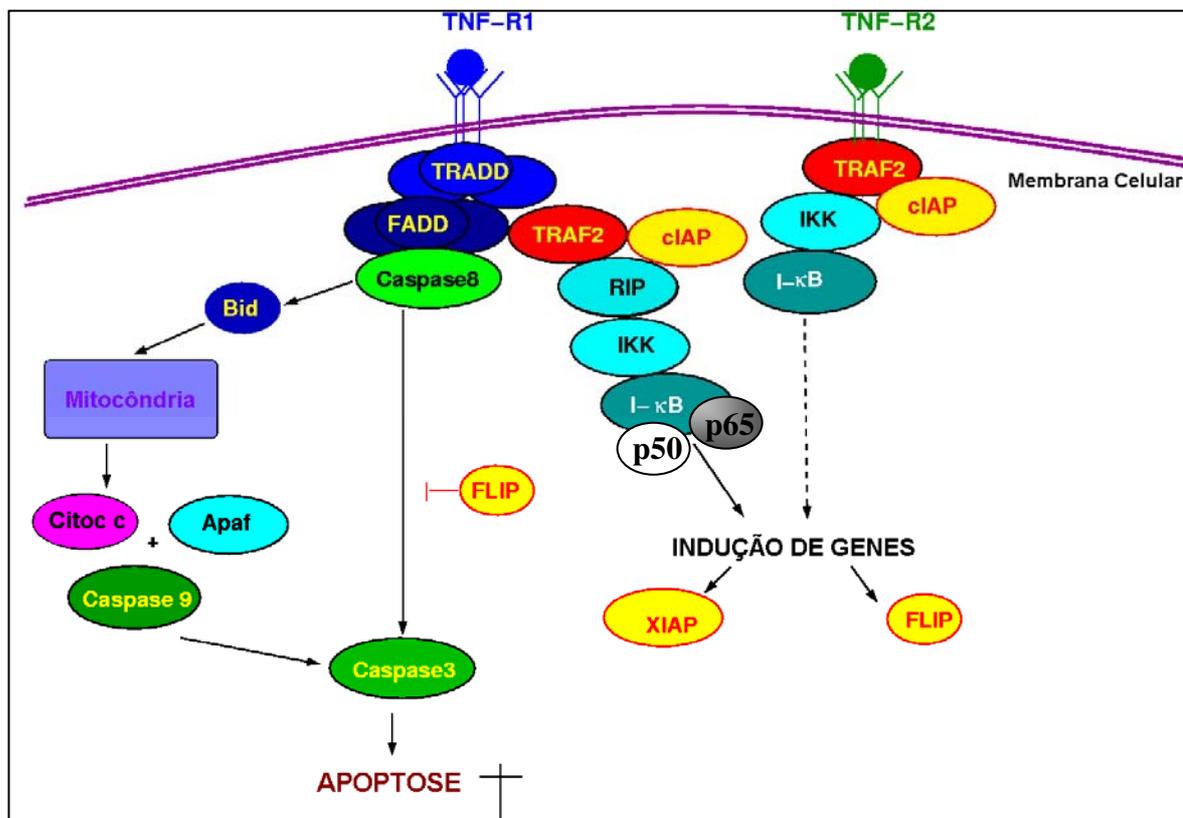


Figura 3: Via de morte e sobrevivência celular mediada pelo TNF α .

1.4. Proteínas Vegetais e Apoptose.

As plantas constituem uma importante fonte de componentes que podem induzir apoptose em uma variedade de linhagens celulares. Diversos estudos têm mostrado o envolvimento de proteínas vegetais, como lectinas, proteínas lectinas-like e inibidores de proteases, na indução de efeitos tóxicos diretos sobre células tumorais e não tumorais (Gastman et al., 2004, Rao et al., 2005, Troncoso et al., 2007, Wang et al., 2007). Algumas comunidades científicas têm aceitado que o câncer pode ser prevenido e/ou tratado por uma variedade de compostos presentes na natureza. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de dieta baseada em plantas está fortemente associado com a redução do desenvolvimento de certos tipos de câncer (Block et al., 1992). Isto pode estar relacionado ao fato das plantas possuírem numerosos componentes fisiologicamente ativos, ou fitoquímicos, que podem alterar as vias bioquímicas associadas a iniciação, promoção e progressão e do câncer (Mejía and Prisecaru, 2005). E, seguindo essa proposta, pesquisas têm sido desenvolvidas com

objetivo de elucidar o mecanismo pelo qual estas proteínas interagem com as células (tumoral e não-tumoral), assim como esclarecer detalhes do processo da morte celular induzida por elas. (Kim et al., 2003; Abuharbeid et al., 2004; Rao et al., 2005, Troncoso et al., 2007).

As proteínas ligantes de carboidratos apresentam uma função chave no controle de processos normais e patológicos em vários organismos vivos, participando de muitas reações celulares como crescimento e divisão celular (Marty-Detraves et al., 2004). Estudos têm mostrado que as lectinas, assim como proteínas com atividade de lectinas-like disparam vários efeitos biológicos. Algumas lectinas tal como PHA, ConA são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T. Estas proteínas ligam a porção carboidrato do receptor da célula T, levando a sua ativação e estimulação da proliferação de linfócitos T (Hubbard et al., 1986). Outras lectinas, como aglutinina de germe de trigo (WGA), ricina, abrina, mistletoe, bem como Con A e PHA, são altamente citotóxicas e são capazes de matar células normais e malignas em concentrações relativamente baixas (Sharon and Lis, 1989, Kim et al., 1993, Bussing et al., 1996).

Recentemente foi demonstrado que ambos os inibidores de tripsina presentes em sementes de *Peltophorum dubium* (PDTI) e sementes de soja (SBTI), com atividade de lectina-like, causaram apoptose em células de linfoma de rato (Nb2) (Troncoso et al., 2003). SBTI e PDTI também mostraram induzir apoptose em células leucêmicas Jukart, mostrando uma diminuição da viabilidade acompanhada por fragmentação de DNA e nenhuma alteração no perfil do ciclo celular. Assim como foi verificado que a apoptose foi mediada via receptor, pela ativação da caspase-8 (Troncoso et al., 2007).

Os exatos mecanismos molecular do efeito antitumoral de lectinas e proteínas lectina-like de plantas ainda não estão bem esclarecido, embora diversas hipóteses tenham sido reportadas. Muitos desses efeitos provocados por lectinas de plantas são mediados por receptores de superfície celular, mas outros mecanismos podem também estar envolvidos. Um mecanismo geral que foi inicialmente proposto para explicar o efeito dessas proteínas é a diferença na estrutura da superfície da membrana celular entre células tumorais e células normais (Sharon and Lis, 1995). Os padrões de ligação da lectina são, em alguns casos, específicos para cada linhagem de célula e isso pode refletir nas diferentes maneiras de progressão do efeito de uma lectina e proteínas glicosiladas sobre diferentes linhagens de células (Remani et al., 1994).

Outros mecanismos da ação tóxica de lectinas e proteínas lectina-like que culminam com a morte celular têm sido propostos. Assim como drogas anti-tumorais, estudos têm demonstrado que lectinas de plantas induzem apoptose com fragmentação do DNA. Esses dados permitem concluir que a apoptose pode controlar a resposta das células após a interação estas proteínas.

2. Objetivos

Estudar a ação da proteína lectina-like de sementes de *Pouteria torta* (Pouterin) sobre linhagem de células tumorais e não-tumoral em cultura;

- Avaliar a atividade citotóxica de Pouterin e a sua capacidade de causar morte celular;
- Caracterizar as alterações morfológicas e intracelulares induzidas por Pouterin;
- Determinar a possível via de sinalização envolvida no processo de morte celular.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Anticorpos contra fator-2 associado ao receptor (TRAF2), Bax, receptor 1 de fator de necrose tumoral (TNFR1), domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD), tipo 1 de proteína inibitória de apoptose (IAP1) e p21 foram adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anticorpo policlonal contra fator nuclear kappa B (NFκB) p65, e anticorpos conjugados com peroxidase anti-coelho e anti-camundongo foram obtidos do Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Faloídina marcada com isotiocianato foram obtidos Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), e Kit de detecção de morte celular in situ (ApopTag) e Kit de detecção de citotoxicidade colorimétrico (LDH) foram obtidos da Roche Applied Science (Mannheim, Germany).

3.2. Cultura celular

Células HeLa (câncer cervical humano), Vero (fibroblástica do rim de macaco verde africano), Hep-2 (câncer epitelial alveolar humano) and HT-29 (câncer do colo humano) (gentilmente cedidas pela Dra. Maria Silvia V. Gatti, Laboratório de Cultura de Célula, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP) foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) com sal de Earle (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com soro fetal bovino 10 % (FBS, Sigma, St. Louis, MO, USA), penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (250 µg/mL). As células foram incubadas em 5 % CO₂ atmosféricos a 37°C. Após a formação de uma monocamada confluenta, as células foram tripsinizadas com uma solução de Tripsina-Versene para dispersão das células e ressuspensas em meio MEM contendo 10 % de SFB e 1 % e, posteriormente, distribuídas em placas de cultura de células (96 ou 24 orifícios) em uma densidade (nº de células/mL) de acordo com a necessidade de cada ensaio.

3.3. Ensaio de Viabilidade Celular.

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados de acordo com Mosman, (1983), baseado na redução enzimática do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) para formar cristais de formazan pela mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. As células foram cultivadas em (1,5 x 10⁶ células/poços) em placas de cultura de tecido de 24 poços e expostas a várias

concentrações de pouterin por 24 h. Após a incubação, o meio de cultura contendo pouterin foi removido e as células foram lavadas com 0.1 mL de PBS 0,1 M, pH 7,4 a 37 °C, seguido pela adição de 300 µL of MTT (Sigma) (1:1 mg/L em meio Eagle) e incubado por 3 h a 37 °C. As células foram tratadas com isopropanol (Isofar, Jacare', RJ, Brazil). As placas foram agitadas delicadamente em um agitador orbital por 15 min, à temperatura ambiente, para solubilizar os cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis. As placas foram lidas em um espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância das células tratadas com pouterin foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle, sem tratamento.

3.4. Dosagem de Lactato Desidrogenase

As atividades de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas de células foram medidas colorimetricamente como um índice dos danos da membrana plasmática e perda da integridade da membrana, usando Kit de detecção de citotoxicidade (LDH) (Roche applied science). Os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para a variação do tempo a duração do tratamento para LDH foi de 24 h.

3.5. Estudo das Alterações Morfológicas induzidas por Pouterin

As alterações morfológicas em monocamadas confluentes de células HeLa tratadas e não tratadas cultivadas sob lamínulas em placas de 24 poços foram examinadas em microscopia de luz. Células foram tratadas com pouterin (5 µg/mL) por 2 e 4 h a 37°C em 5 % CO₂ atmosférico. Células não tratadas e tratadas com pouterin foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 1% em PBS por 10 min, e então lavadas com água destilada e coradas com azul de toluidina 0,025 % em tampão McIlvaine, pH 4,0 (Melo and Vidal, 1980). As lamínulas foram então montadas sob lâminas usando Entelan e examinadas em microscopia de Luz (Nikon Eclipse E800 microscope).

3.6. Marcação do Citoesqueleto de Actina

Células HeLa foram cultivadas sob lamínulas e foram tratadas com pouterin (5 µg/mL) por 4 h. Células tratadas e não tratadas foram fixadas com paraformaldeído em PBS por 10 min e permeabilizadas em Triton X-100 0,1% em PBS por 5 min. Após três

lavagens em PBS, as lamínulas foram incubadas com uma solução de Faloidina-FITC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma Chemical) em PBS por 30 min e na ausência de luz. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS, e montadas sobre lâminas com o uso de glicerol/PBS (9:1, v/v) e examinadas por microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse E800 microscope).

3.7. Fragmentação do DNA pelo Ensaio de TUNEL (terminal dUTP nick-end labeling)

As células HeLa foram cultivadas em placas de 24 orifícios contendo lamínulas, em estufa a 5 % de CO_2 , 37°C, até formação de uma monocamada confluenta. Em seguida, as células foram tratadas com pouterin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 e 4 horas. A fragmentação do DNA foi detectada através do uso de um Kit para marcação de células apoptóticas (ApoTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Intergen Company, Purchase, NY) que tem como princípio a adição de nucleotídeos conjugados a digoxigenina nas terminações 3'OH livres em células cujo DNA encontra-se fragmentado. A metodologia foi aplicada de acordo com instruções do fabricante.

Após o tratamento com pouterin, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% em PBS 0,01 M (pH 7,4) durante 10 min e pós-fixadas com etanol/ácido acético (2:1) por 5 min. Em seguida, as células foram tratadas com um tampão de equilíbrio durante 10 segundos a temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionada uma solução que continha a enzima TdT e deoxinucleotídeos trifosfato conjugados à digoxigenina (dNTP-Digoxigenina) durante 1 h a 37°C. Após esse procedimento, as células foram tratadas com um tampão de bloqueio durante 25 segundos (sendo os 15 segundos iniciais sob agitação) a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS durante 1 min e incubadas com uma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina conjugada a rodamina (Anti-Digoxigenina-TRITC) durante 30 min, a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e montadas sob lâminas de vidro utilizando-se glicerol-PBS (9:1). As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência.

3.8. Western blotting

Células HeLa com 80 % de confluência foram tratadas com pouterin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), após 1 e 2 h de incubação células tratadas e não tratadas foram lisadas em 200 mL de

tampão de lise [Tris-HCl 50 mM, pH 7,4), Tween 20 a 1 %, deoxicolato de sódio 0,25 %, NaCl 150 mM, (EGTA) 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, e inibidores de proteinases (aprotinina 1 mg/mL, leupeptin 10 µg/mL e 1 mM de 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride] por 2 horas em gelo. Extratos de proteína foram purificados por centrifugação e as concentrações de proteína foram determinadas usando o método de Lowry et al (Hartree, 1972). Um volume igual de tampão de amostra (2 x) [Tris-HCl 100 mM, pH 6,8, dithiothreitol 200 mM (DTT), SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, e glicerol 20 %] foram adicionados as amostras, que foram subsequentemente fervidas por 10 min.

Posteriormente, os extratos das células foram resolvidos em gel de poliacrilamida contendo SDS (12 %) e transferidos para membrana de PVDF (Polyvinylidene Difluoride, Millipore, Bedford, MA, USA). As membranas foram bloqueadas com leite em pó livre de gordura 1 % ou albumina de soro bovino (2 %) em TBS-Tween 20 a 0,05 % e incubadas overnight a 4 °C com os anticorpos primários apropriados a uma diluição 1:1000. Após a lavagem com TBS-Tween 20 (0,05%), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anticoelho ou anti-rato conjugado com peroxidase, a uma diluição 1:2000, e bloqueado com tampão por 1 h. Detecção foi realizada usando quimioluminescente.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística dos dados experimentais foi determinada através do Student's *t*-test. Valores de $p \leq \pm 0,05$ foram considerados significativos, e os resultados foram expressos como média SD das triplicatas. Cada experimento foi realizado, pelo menos, três vezes.

4. Resultados

4.1. Citotoxicidade induzida por Pouterin

A citotoxicidade de pouterin foi determinada através do MTT. Células aderentes foram incubadas em concentrações crescentes (1-20 $\mu\text{g/mL}$) de pouterin em placas de tecido de 24 poços por 24 h. Como mostrado na **Figura 4**, as células HeLa, Hep-2, HT-29 foram altamente sensíveis a citotoxicidade de pouterin, e seu efeito foi de maneira dose-dependente. Entretanto, as células Vero, uma linhagem celular não tumorigênica, foram relativamente resistentes a citotoxicidade de pouterin, e nenhum efeito significativo de pouterin foi observado nas concentrações de 1-20 $\mu\text{g/mL}$.

Como observado na **Figura 4**, houve pouca diferença na citotoxicidade de pouterin entre as linhagens. Entretanto, dentre as linhagens tumorais, a célula HeLa, foi a linhagem que sofreu maior efeito citotóxico. Pouterin a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a viabilidade das células HeLa a 48 %, enquanto os efeitos de pouterin sob HT-29 e Hep-2 foram menos pronunciados, exibindo valores de IC_{50} por volta de 6,0 e 6,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O IC_{50} de pouterin em células HeLa foi determinado em 5 $\mu\text{g/mL}$ e em todos os experimentos subsequentes, esta mesma concentração foi usada.

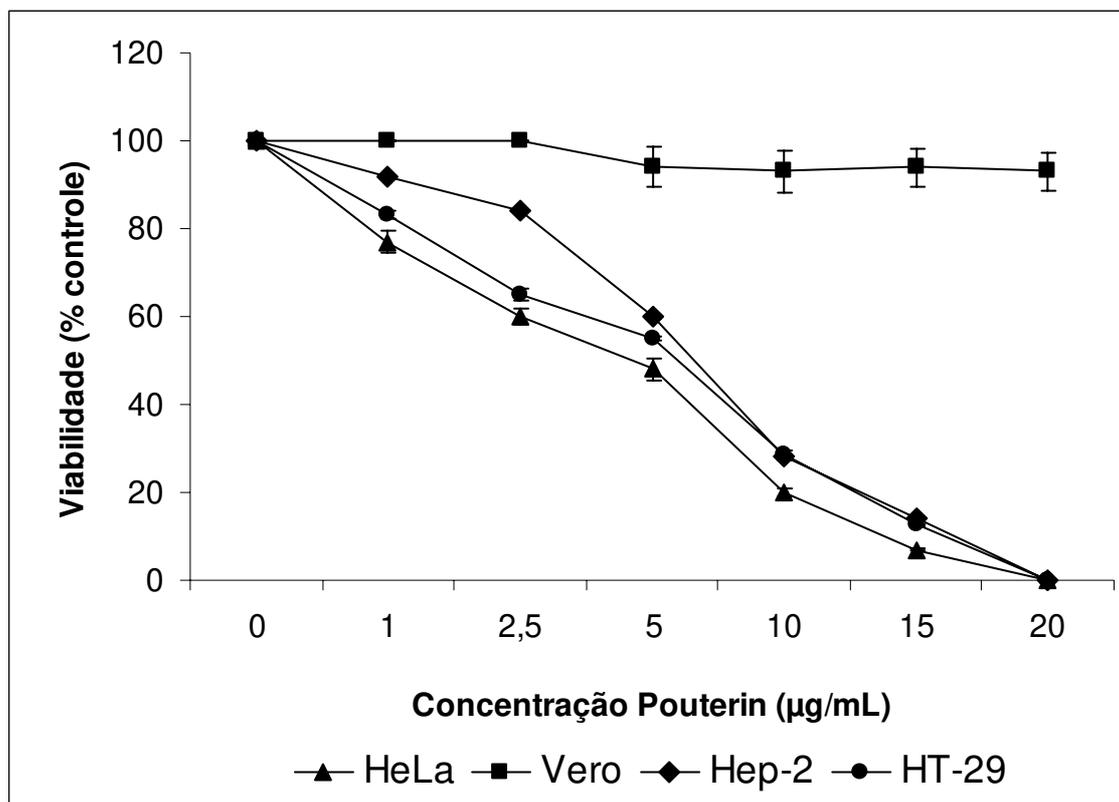


Figura 4: Efeito de Pouterin na viabilidade celular das linhagens HeLa (triângulo), Vero (quadrado), Hep-2 (losango) e HT-29 (círculo). As células foram tratadas com diferentes concentrações de pouterin (1-20 µg/mL) por 24 h, e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Os dados representam a média \pm S.D de determinações em triplicatas.

4.2. Efeito tempo-dependente de Pouterin sobre células HeLa

A citotoxicidade induzida por pouterin foi avaliada variando o tempo e a viabilidade foi determinada através do MTT, assim como a dosagem intracelular de LDH (**Fig. 5A e B**). Mudanças significativas na viabilidade celular após 2 h de tratamento foram observadas. Como mostrado na **Figura 5A**, ocorreu uma redução de aproximadamente 45 % na viabilidade por 6 h. Com 12 h de tratamento poucas células aderidas puderam ser observadas e muitas delas estavam destacadas.

O perfil da viabilidade pela dosagem de LDH do sobrenadante das culturas de células HeLa estão correlacionados com os resultados obtidos com MTT (**Fig. 5B**). Onde podemos observar um aumento tempo-dependente na dosagem de LDH após 4 h de incubação, alcançando um pico máximo de atividade com 12 h de tratamento.

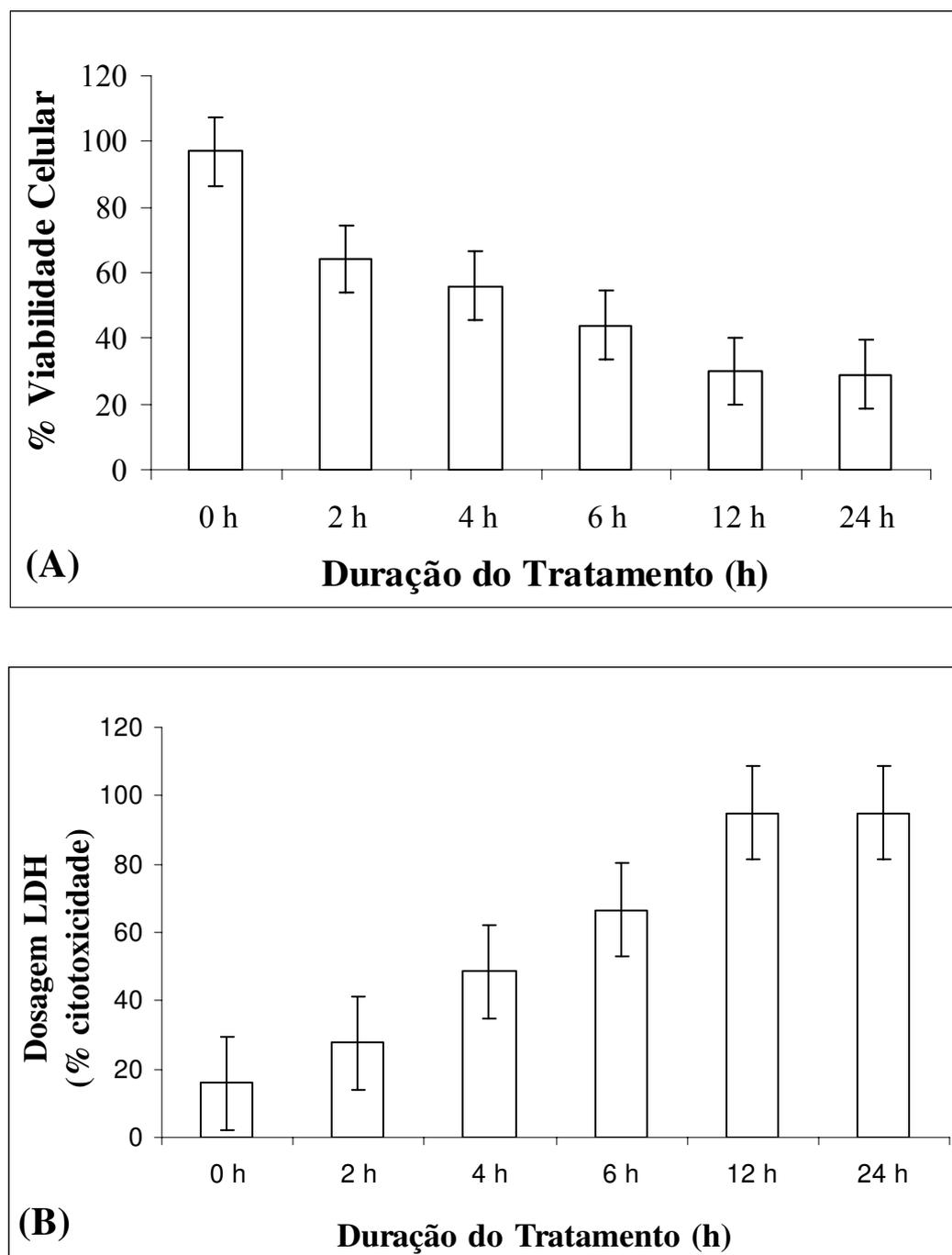


Figura 5: Efeito time-course da IC₅₀ de pouterin (5 µg/mL) sob a viabilidade das células HeLa pelo método do MTT (A) e dosagem de LDH (B) do sobrenadante do cultivar celular. Os dados representam a média ± S.D de determinações em triplicatas.

4.3. Efeito de Pouterin na morfologia das células HeLa

O tratamento das células HeLa com pouterin resultou em alterações citoplasmáticas e nucleares (**Fig. 6**). Células controle apresentaram núcleo com cromatina dispersa e nucléolos bem definidos (**Fig. 6A**). Células tratadas com pouterin por 2 h mostraram retração, condensação da cromatina e núcleo com diferentes níveis de compactação, núcleo picnótico (**Fig. 6B**). Fragmentação da membrana também foram observados em células tratadas com pouterin (**Fig. 6C**). A incubação com pouterin disparou significativa vacuolização citoplasmática (**Fig. 6D**). Fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e uma elevada desorganização citoplasmática (**Fig. 6E**) foram observadas após 4 h de exposição a pouterin. Coletivamente, estes dados microscópicos observados em células tratadas com pouterin mostraram alterações morfológicas classicamente associadas com células apoptóticas.

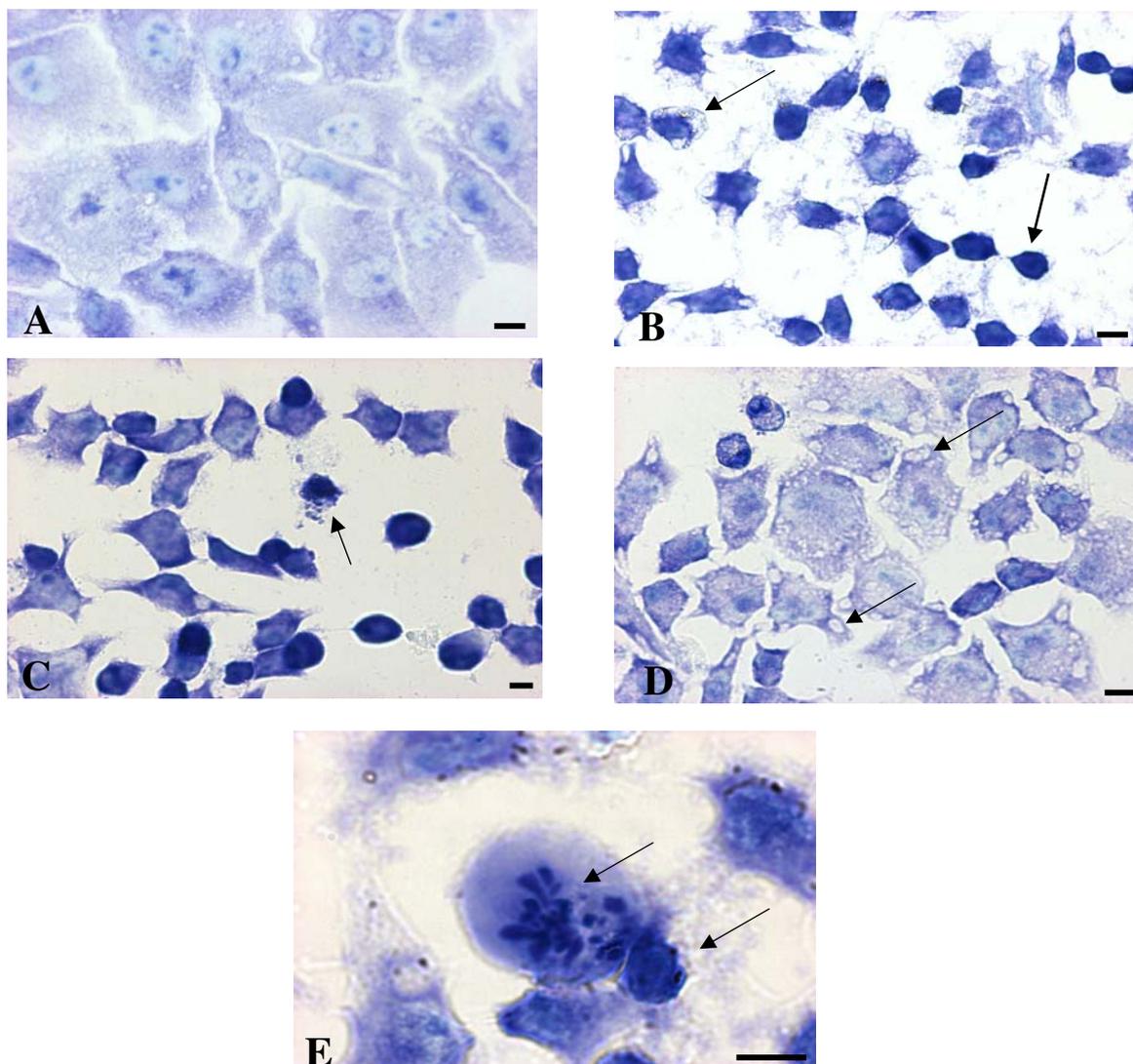


Figura 6: Alterações morfológicas induzidas por pouterin em células Hela (A-E). (A) Micrografia das células controle coradas com azul de toluidina mostrando núcleo e nucléolos normais. (B) Células tratadas com pouterin após 2 h mostraram retração celular, condensação da cromatina e núcleos picnóticos (setas). (C) Células tratadas com pouterin mostraram blebbing na membrana plasmática (setas). (D) Células mostraram vacuolização citoplasmática (setas). (E) Células tratadas após 4 h mostraram núcleos fragmentados e corpos apoptóticos (setas). Bars: 10 μm

4.4. Alterações induzidas por Pouterin no citoesqueleto de actina

Microscopia de fluorescência revelou mudanças dramáticas no arranjo dos filamentos de actina em células HeLa tratadas com pouterin (**Fig. 7**). Como evidenciado na **Figura 7A**, células controle mostraram filamentos de actina organizados normalmente. Após 4 h de tratamento com pouterin os arranjos nos filamentos de actina foram rompidos completamente e intensos spots de actina fluorescente foram vistos dispersos no citoplasma (**Fig. 7B**).

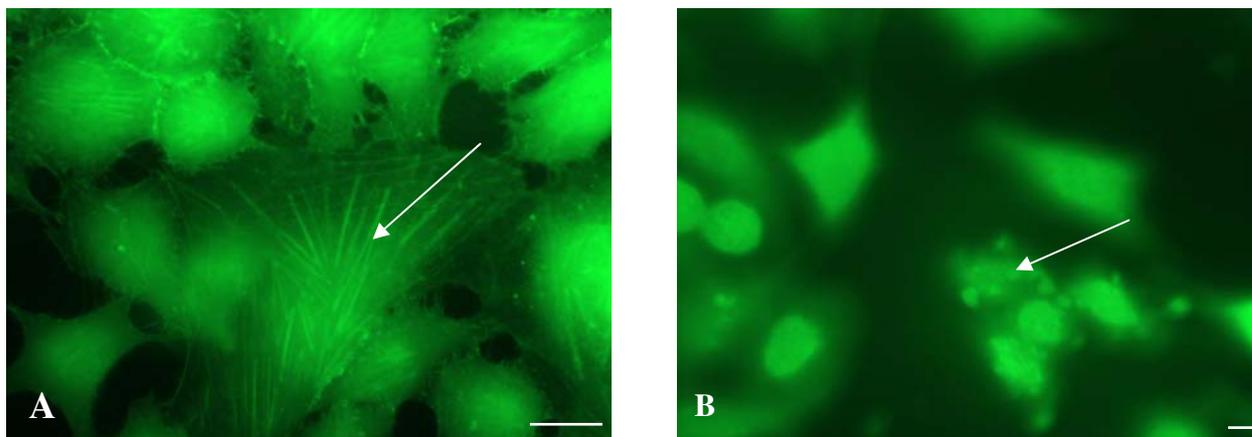


Figura 7: Marcação do citoesqueleto de actina em células HeLa após 4 h de incubação. (A) Células HeLa controle mostraram os filamentos de actina normais no citoplasma (setas). (B) Células tratadas com pouterin mostraram rompimento do arranjo dos filamentos de actina e intenso “spots” de actina fluorescentes (setas). Bars: 10 μ m

4.5. Fragmentação do DNA em células HeLa tratadas com Pouterin

A fragmentação do DNA foi detectada pelo TUNEL, o qual mostra uma forma distintiva de coramento nuclear (**Fig. 8**). Como observado células não tratadas mostraram pouca ou nenhuma marcação (**Fig. 8A**), ao contrário, Intensa marcação foi observada em células HeLa tratadas com pouterin após 2 h (**Fig. 8B**) e 4 h (**Fig. 8D**) de tratamento. Consistente com as observações realizadas com microscopia de luz, fragmentação nuclear também foi observada após coramento com TUNEL (**Fig. 8C**).

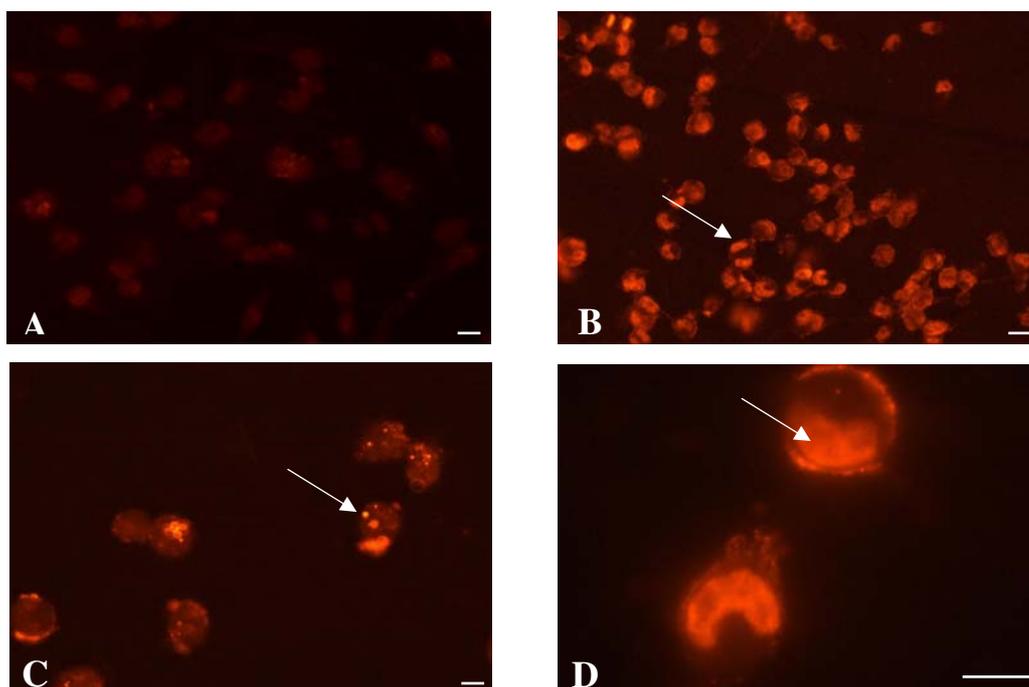


Figura 8: Efeito de pouterin na fragmentação de DNA após coramento com TUNEL (A-D). (A) células controles mostraram pouco ou nenhuma marcação. Células HeLa tratadas com pouterin mostraram coramento intenso dos núcleos condensados após 2 h (B) e 4 h (D) de tratamento, respectivamente (setas). Fragmentação nuclear foi observada nas células tratadas com pouterin após 4 h (C) (setas). Bars: 10 μ m

4.6. Pouterin up regula TNFR1 em células HeLa

Para obtermos mais informações sobre o mecanismo molecular mediado pela morte celular induzida por pouterin, avaliamos o envolvimento de proteínas associadas com as vias de sinalização de apoptose e sobrevivência celular (**Figura 9**). Análise de imunoblotting dos extratos totais de células HeLa tratadas com o veiculo ou 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pouterin por diferentes tempos nos revelou um aumento dose-dependente no nível de TNFR1 (**Fig. 9A**). Para avaliar se pouterin afetava a expressão de outros componentes do complexo de sinalização TNFR1, nos analisamos a expressão do TRADD e TRAF2 em células HeLa tratadas e controle. Enquanto somente uma tendência fraca para down regulação na expressão de TRADD foi observada após 2 h de tratamento, TRAF2 foi up regulada de maneira tempo-dependente sob o tratamento com pouterin (**Fig. 9B e C**).

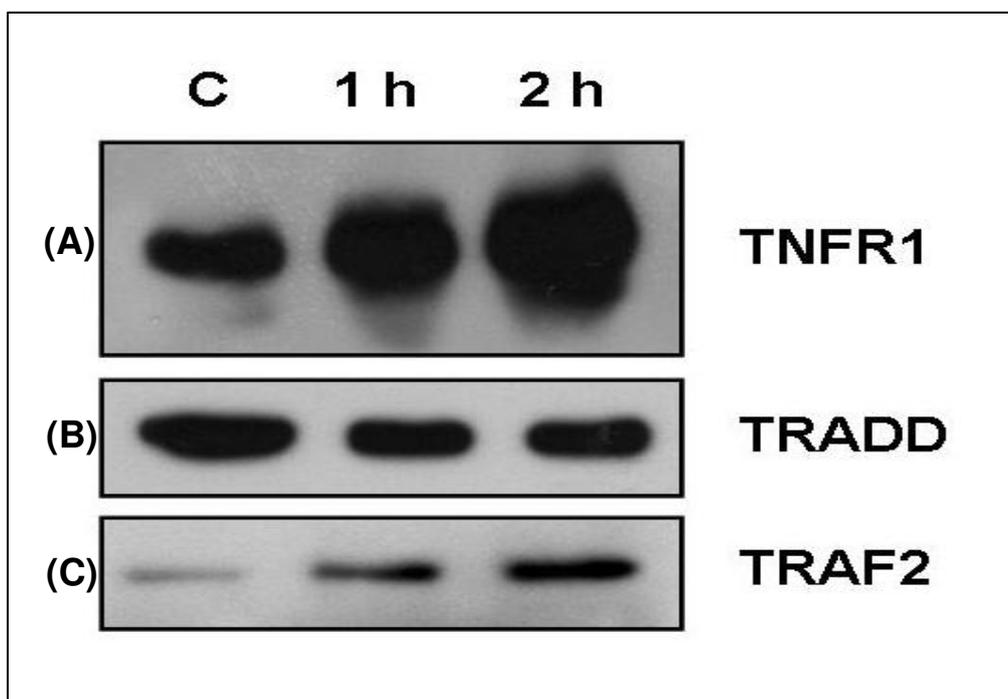


Figura 9: Efeito de pouterin na expressão de TNFR1, TRAF2 e TRADD em células HeLa. Após a incubação de 1 ou 2 h com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pouterin, quantidades iguais de proteína (50 μg) de células totais lisadas foram analisadas em imunoblot com TNFR1 (A), TRAF2 (B), e TRADD (C).

4.7. Pouterin modula a sinalização do NFκB em células HeLa

Um aspecto característico dos membros da sinalização do TNFR é a ativação NFκB, um fator de transcrição que tem sido implicado na supressão da apoptose através do TRAF2 (Nakanishi and Toi, 2005). Análise de western blot demonstrou que o tratamento das células HeLa com pouterin (5.0 μg/mL) induziu uma redução de maneira tempo-dependente na expressão da subunidade NFκB p65 (**Fig. 10A**). NFκB promove a sobrevivência celular através da expressão de genes que codificam proteínas anti-apoptóticas, como IAP1 e IAP2, que bloqueiam a ativação da caspase. Como mostrado na **Figura 10B**, células HeLa tratadas com pouterin reduziram a expressão da IAP1 de maneira tempo-dependente

De modo interessante, o nível de Bax, uma proteína pro-apoptótica que antagoniza os efeitos do Bcl-2, foi reduzida pelo tratamento com pouterin (**Fig. 10C**). Com base neste resultado, poderíamos especular que a via apoptótica intrínseca pode não estar primariamente envolvida na morte celular causada por pouterin. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer esta função na morte celular induzida por pouterin.

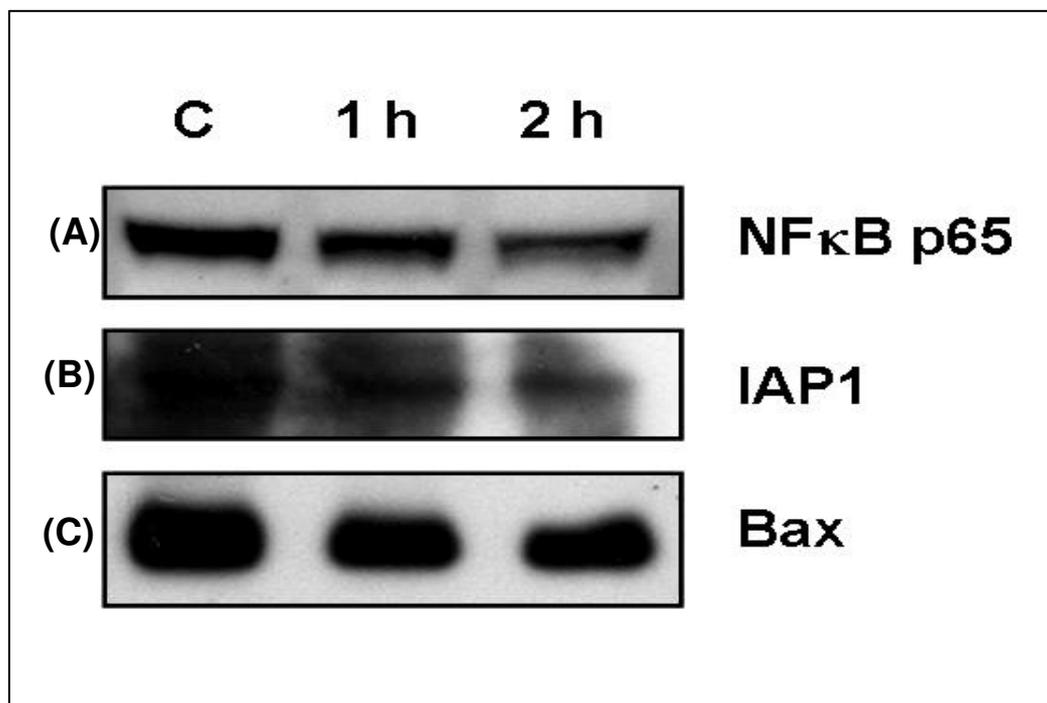


Figura 10: Efeito de pouterin na expressão de NFκB p65, IAP1 e Bax em células HeLa. Após a incubação de 1 ou 2 h com 5 μg/mL pouterin, quantidades iguais de proteína (50 μg) de células totais lisadas foram analisadas em imunoblot com NFκB p65 (A), IAP1 (B) e Bax (C)

4.8. Efeitos de pouterin sobre proteínas do ciclo celular em células HeLa

Em adição aos efeitos na apoptose, NF κ B pode ativar ciclo celular em células cancerígenas através da trans-ativação do gene que codifica ciclinas D1 ou c-myc (Bours et al., 2000). Assim, nosso próximo passo foi investigar se pouterin afetava a expressão das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Análise em western blotting mostrou um aumento marcante no nível de expressão da proteína p21 (**Fig. 11A**), enquanto nenhuma mudança na expressão de c-myc foi detectada (**Fig. 11B**). Assim, nós concluímos que o aumento na expressão de p21 seja provavelmente pelo bloqueio da progressão do ciclo celular, contribuindo assim para processo apoptótico induzido por pouterin.

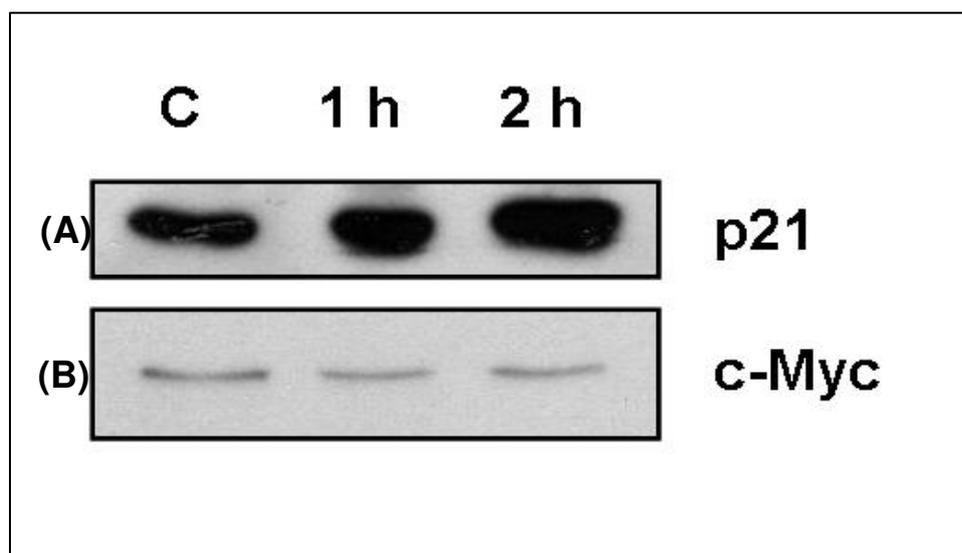


Figura 11: Efeito de pouterin na expressão de p21 e c-myc em células HeLa. Após a incubação de 1 ou 2 h com 5 μ g/mL pouterin, quantidades iguais de proteína (50 μ g) de células totais lisadas foram analisadas em imunoblot com p21 (A) e c-myc (B).

5. Discussão

Apoptose é um mecanismo primário da ação de diversas drogas antitumorais, e proteínas bioativas, incluindo lectinas e proteínas lectina-like, (Kim et al., 1993; Bantel et al., 1999; Park et al., 2000; Miyoshi et al., 2001; Troncoso et al., 2003, 2007, Ohba et al., 2004; Rao et al., 2005). No presente estudo, nós demonstramos que pouterin, uma proteína com atividade lectin-like, presente em sementes de *Pouteria torta*, foi altamente citotóxica contra células tumorais de mamíferos; e de acordo com os nossos resultados podemos evidenciar que esta inibição do crescimento foi causada pela atividade de induzir apoptose.

Dentre as linhagens celulares testadas, HeLa, Hep-2 e HT-29 foram as linhagens que apresentaram maior susceptibilidade a citotoxicidade de pouterin, enquanto células Vero, uma linhagem fibroblástica não tumorigênica, foram altamente resistentes. O valor de IC₅₀ para a célula tumoral mais sensível (HeLa) foi de 5 µg/mL. Pouterin induziu uma diminuição tempo-dependente na viabilidade celular de HeLa, que foi consistente com o aumento de LDH observado no mesmo período de tempo. Uma diminuição drástica na viabilidade juntamente com a dosagem de LDH foi observada por 12-24 h de tratamento das culturas de HeLa. Essa perda da integridade da membrana, detectada pela presença de LDH, ocorreu antes das alterações morfológicas e dos danos ao DNA das células. Durante a morte celular programada a perda da integridade da membrana é um fenômeno observado e acontece, de uma maneira geral, antecedendo ou de forma concomitante aos episódios de mudanças citoplasmáticas e nucleares (Häcker, 2000; Cristea and Esposti, 2004).

Nós mostramos previamente que a atividade de lectina-like de pouterin foi inibida pelas glicoproteínas como fetuina, asialofetuina, heparina, orosomucoide e ovoalbumina, com 50 % de concentrações inibitórias da atividade hemaglutinante de pouterin (Boleti et al., 2007). Neste presente estudo, nós verificamos que fetuina, ovoalbumina e heparina, a 1mg/mL não tiveram nenhum efeito na citotoxicidade de pouterin (dado não mostrado). Estes resultados foram similares com os resultados obtidos por Troncoso et al. (2003), onde mostrou que PDTI, um inibidor tipo Kunitz, com atividade de lectin-like, na presença de glicoproteínas não apresentou nenhum efeito citotóxico em linhagem celulares de linfoma T (Nb2). Embora estes dados

sugiram que a atividade citotóxica de pouterin não envolva sua interação com as glicoproteínas, esta possibilidade é especulativa e necessita de mais estudos.

Alterações morfológicas altamente conservadas, incluindo condensação da cromatina, blebbing na membrana e retração celular, têm sido usadas como critérios morfológicos para identificar morte celular apoptótica (Abraham et al., 2004). Tratamento de células HeLa com pouterin resultou em alterações morfológicas significantes semelhantes aquelas das células apoptóticas. Retração celular, fragmentação da membrana plasmática e condensação nuclear podem ser observados logo após a incubação das células HeLa com pouterin. Além disso, fragmentação nuclear, um evento associado com apoptose, foi evidenciada após 4 h de tratamento. Observações semelhantes foram demonstradas para ricina, uma potente toxina isolada de sementes de feijão castor (*Ricinus communis*) (Rao et al., 2005).

Além das mudanças nucleares e na membrana, a reorganização do citoesqueleto também é uma característica de apoptose, que é seguida pelas mudanças morfológicas e fragmentação celular descrita acima (Brancolini et al., 1995). O envolvimento dos microfilamentos nas mudanças morfológicas da apoptose tem sido sugerido por alguns estudos (Cotter et al. 1992). O citoesqueleto de actina é conhecido por ser crucial na mediação de respostas celulares, tanto em sinais internos e quanto externos. Fundamental para sua função é uma estrutura dinâmica e sua habilidade de ser reorganizado dentro de estruturas distintas é adequado para tarefas particulares dentro da célula. Defeitos na sua habilidade em regular os dinamismos da actina, podem ter efeitos deletérios na função celular (Gourlay et al., 2005), interferindo com o transporte vesicular dos precursores de proteínas e, conseqüentemente, contribuindo para morte celular (Hesketh and Pryme, 1991).

Nós investigamos a possibilidade das alterações morfológicas causadas por pouterin estarem associadas com o rearranjo do citoesqueleto de actina. O efeito de pouterin no citoesqueleto foi confirmado pela indução de mudanças dramáticas (e mais precisamente o rompimento da actina) na organização do citoesqueleto de actina das células HeLa, onde pequenos pontos fluorescentes foram observados. Alterações no citoesqueleto têm sido descritos para indução de apoptose em uma variedade de modelos. Similar a pouterin, Kulkarni and MacCulloch (1995) mostraram que Con A rompeu o citoesqueleto de actina em fibroblastos gengivais humanos (HGF). Estudos prévios também mostram que mediadores de apoptose são responsáveis pela degradação

de uma variedade de proteínas, incluindo proteínas do citoesqueleto, tais como vimentina, paxilina e actina (Brown et al., 1997; Mashima et al., 1999; Lavastre et al., 2002). Consecutivamente, estes resultados indicam que anormalidade no citoesqueleto de actina induzidos por pouterin podem contribuir, no mínimo em parte, para as mudanças morfológicas apoptóticas em células HeLa.

Em quase todas as circunstâncias de apoptose bem caracterizadas morfológicamente, a clivagem do DNA nuclear é a maior característica (Bortner et al., 1995). A morte das células HeLa resultou em fragmentos de DNA oligonucleossomal que foram detectados pelas marcações dos terminais 3'-OH livres do DNA pela ação da enzima transferase deoxinucleotidil terminal, a qual catalisa a adição dos deoxinucleotídeos a essas terminações (ensaio TUNEL) (Collins et al., 1997). O aumento significativo do número de perfis corados pelo TUNEL associados com as alterações morfológicas em células HeLa tratadas com pouterin confirmaram a ocorrência de morte celular apoptótica clássica.

Apoptose pode ser induzida por diferentes estímulos, incluído radiação ultravioleta e a ativação dos receptores de morte, como TNFR1 e Fas. Já é conhecido que o TNF α é um indutor fraco de apoptose, mas apresenta uma importante função na mediação das respostas inflamatória e imune (Poppelmann et al., 2005). TNFR1 dispara duas diferentes vias sobre a ligação do TNF α , pro ou anti-apoptótica. Ambas as vias coexistem em certo balanço, e cada uma pode ser promovida dependendo das condições fisiológicas. O recrutamento do FADD leva a indução da apoptose, ou o recrutamento de um fator associado ao receptor de morte (TRAF) resulta na ativação do fator de transcrição NF κ B, que medeia a via de sobrevivência celular, proliferação, e resistência de agentes quimioterápicos (Wang et al., 1998; Nakanishi and Toi, 2005).

Os principais genes alvo anti-apoptóticos regulados pelo NF κ B incluem aqueles codificados pelo TRAF1 e TRAF2, IAP1 e IAP2 e proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, tal com Bcl-X_L (Wang et al., 1998; Bours et al., 2000; Viatour et al., 2005). A associação do TRAF2 com TRADD recrutam IAP1 e IAP2, duas proteínas capazes de impedir a apoptose induzida pelas caspases (Vermeulen et al., 2005). Liu et al. (1996) mostraram que a inibição da ativação do NF κ B e/ou expressão de seus componentes, incluindo a p65 (RelA), aumentaram bastante a sensibilidade das células HeLa para apoptose induzida pelo TNF. Além disso, embriões de camundongos nocaute

deficientes na subunidade p65 (RelA) do NF κ B exibiram aumento da apoptose no fígado (Beg et al., 1995). Ao contrário, a ativação deliberada do NF κ B protege contra apoptose induzida pelo TNF.

No presente estudo, a upregulação do TNFR1 e TRAF2 por pouterin foi contrastada com a down regulação do TRADD. Além disso, a supressão da expressão da subunidade NF κ B p65 e IAP1 foi detectada em células tratadas com pouterin. Estes resultados associados com as mudanças morfológicas observadas em microscopia de luz e fragmentos nucleares marcados observados após coramento com TUNEL indicam que o tratamento das células HeLa com pouterin muda claramente o balanço entre a inibição da morte e os sinais de promoções de morte em favor do aumento da apoptose. Estudos têm mostrado que a habilidade das lectinas tal como Con A e VAA em induzir mudanças no citoesqueleto e perda de proteínas anti-apoptóticas pode causar apoptose devido em parte à inibição da síntese de proteínas (Kulkarni and McCulloch, 1995; Lavastre et al., 2002).

Análise em western blot também revelou que pouterin causa aumento da expressão da p21, assim indicando parada do ciclo celular. A p21 é um inibidor da atividade quinase do complexo quinase dependente de ciclina/ciclina, e é conhecida por regular as transições do ciclo celular, G₁/S e G₂/M (Niculescu et al., 1998), que são requeridas na progressão do ciclo celular. Similar a pouterin outras proteínas, como ricina (Keppler-Hafkemeyer et al., 1998), Con A (Desrivieres et al, 1997) e WGA (Liu et al., 2004) pararam o ciclo celular antes de induzir apoptose.

Em sumário, os resultados demonstram que pouterin é um potente indutor de apoptose. Conseqüentemente, seria interessante investigar se pouterin pode superar a resistência de células tumorais que são imunes a drogas. Além disso, a capacidade de pouterin inibir a ativação do NF κ B pode ter implicações clínicas que precisam de mais investigações.

6. Conclusões

- A proteína lectin-like isolada de sementes de *Pouteria torta* (Pouterin) é tóxica para células tumorais (células Hela, Hep-2 e HT-29).
- Das linhagens de células tumorais testadas, a linhagem de células de câncer cervical humano (células Hela) foi a mais sensível à ação tóxica induzida por pouterin.
- A citotoxicidade induzida por pouterin nas células Hela, envolve a perda da integridade da membrana.
- A morte celular induzida por pouterin nas células Hela é dependente do tempo e leva as alterações morfológicas e intracelulares, tais como contração celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, as quais são classicamente descritas para morte celular apoptótica.
- Nas células Hela, pouterin leva a uma desorganização do citoesqueleto de actina.
- Pouterin causou aumento na expressão da p21, sugerindo parada do ciclo celular.
- Estudos subsequêntes indicam que a apoptose, promovida por pouterin pode ser explicada parcialmente pela ativação do TNFR1.
- O diminuição na expressão da subunidade do NF κ B p65 concomitantemente com a down regulação da IAP1, sugerem que a apoptose mediada pelo TNFR é a via predominante induzida por pouterin em células HeLa.

7. Referências Bibliográficas

- Abraham, M.C. and Shaham, S., 2004. Death without caspases, caspases without death. *TRENDS in Cell Biology*. 14 (4), 184-193.
- Abuharbeid, S.; Apel, J.; Sander, M.; Fiedler, B.; Langer, M.; Zuzarte, M-L.; Czubyko, F.; Aigner A., 2004. Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 321: 403-12.
- Arnould, D., 2006. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 17: 6-12.
- Ashkenazi, A.; Dixit, V. M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-8.
- Baker, S.J. and Reddy, E.P., 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 17, 3261-3270.
- Bantel, H.; Engels, I.H.; Voelter, W.; Schulze-Osthoff, K. and Wesselborg, S., 1999. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res*. 59, 2083-2090.
- Barkett, M.; Gilmore, T.D., 1999. Control of apoptosis by Rel/ NF κ B transcription factors. *Oncogene*, 18: 6910-24.
- Beg, A.A.; Sha, W.C.; Bronson, R.T.; Ghosh, S. and Baltimore, D., 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*. 376, 167-170.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A., 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*, 18 :1-29.
- Boleti, A.P.A.; Freire, M.G.M.; Coelho, M.B.; Silva, W.; Baldasso, P.A.; Gomes, V.M.; Marangoni, S.; Novello, J.C. and Macedo, M.L.R., 2007. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (7):2653-2658.
- Bortner, C.D.; Oldenburg, N.B.E. and Cidrowski, J.A., 1995 The role of DNA fragmentation in apoptosis. *TRENDS in cell biology*. 5, 21-26.
- Bortner, C.D. and Cidrowski, J. A., 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: Role in apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (in press).
- Bours, V.; Bentires-Alj, M.; Hellin, A.-C.; Viatour, P.; Robe, P.; Delhalle, S.; Benoit, V. and Merville, M.P., 2000. Nuclear factor- κ B, cancer, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1085-1090.
- Brancolini, C.; Lazarevic, D.; Rodriguez, J. and Schneider, C., 1995. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol.* 139, 759-71.
- Breckenridge, D.G.; Germain, M.; Mathai, J.P.; Nguyen, M.; Shore, G.C., 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22: 8608-8618.

- Brown, S.B.; Bailey, K.; Savil, J., 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem. J.* 323, 233-237.
- Büssing, A., 1996. Induction of apoptosis by the mistletoe lectins. A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L. *Apoptosis* 1. 25-32.
- Clarke, P.G.; Clarke, S., 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol (Berl)* 193: 81-99.
- Chuang, S.E.; Yeh, P.Y.; Lu, Y.L.; Lai, G.M.; Liao, C.M.; Gao, M.; Cheng, A.L., 2002. Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappa B (NFκB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 63: 1709-1716.
- Cohen, G. M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 326: 1-16.
- Collins, J.A.; Schandl, C.A.; Young, K.K.; Vesely, J.; Willingham, M.C., 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 923-934.
- Cotter, T.G.; Lennon, S.V.; Glynn, J.M. and Green, D.R., 1992. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 52, 997-1005.
- Cristea, I.M.; Degli Esposti, M., 2004. Membrane lipids and cell death: an overview. *Chem. Phys. Lipids*, 129:133-160.
- Desrivières, S.; Volarević, S.; Merćep, L. and Ferrari, S., 1997. Evidence for different mechanisms of growth inhibition of T-cell lymphoma by phorbol esters and concanavalin A. *J Biol Chem.* 272, 2470-2476.
- Deveraux, Q.L. and Reed, J.C., 1999. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 13, 239-252.
- Escárcega, R.O.; Fuentes-Alexandro, S.; Garcia-Carrasco, M.; Gatica, A.; Zamora, A., 2007. The transcription factor nuclear factor-kappa B and câncer. *Clinical Oncology*, 19: 154-161.
- Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini S. Z., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.*, 182: 41-9.
- Garg, A. K.; Aggarwal, B. B., 2002. Reactive oxygen intermediates in TNF signaling. *Mol Immunol*, 39: 509-17.
- Gastman, B.; Wang. K.; Han, J.; Zhu, Z. Y.; Huang, X.; Wang, G. Q.; Rabinowich, H.; Gorelik, E., 2004. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 316: 263-71.
- Goll, D.E.; Thompson, V.F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83: 731-801.
- Gourlay, C.W. and Ayscough, K.R., 2005. A role for actin in aging and apoptosis. *Biochemical Society Transactions.* 33 (6), 1260- 1264
- Guimarães, C.A. and Linden, R., 2004. Programmed cell death. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1638-50.

- Grub, S.; Persohn, E.; Trommer, W.; Wolf, A., 2000. Mechanisms of cyclosporine-A induced apoptosis in rat hepatocytes primary cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163, 365-372.
- Hacker, G., 2000. The morphology of apoptosis. *Cell. Tissue Res.* 301: 5-17.
- Haimovitz-Friedman, A., 1998. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res.*, 150: S102-8.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Hajtó, T.; Berki T; Boldizsar F. and Nemeth P., 2003. Galactoside-specific plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo, *Immunol Lett.* 86 (1), 23-7.
- Hartree, E. F., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48: 422.
- Hesketh, J.E.; Pryme, I.F., 1991. Interaction between mRNA, ribosomes and the cytoskeleton. *Biochem J.* 277.
- Hubbard, S.C.; Kranz, D.M.; Longmore, G.D.; Sitkovsky, M.V., Eisen, H.N., 1986. Glycosylation of the T-cell antigen-specific receptor and its potential role in lectin-mediated cytotoxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1852-56.
- Jaattela, M., 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*, 23: 2746-56.
- Jiang, X.; Chang, X., 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.*, 275: 31199-203.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Braz. J. Cancer*, 26: 239-57.
- Kim, M.; Rao, M.V.; Tweardy, D.J.; Prakash, M.; Galili, U.; and Gorelik, E., 1993. Lectin-induced apoptosis of tumor cells. *Glycobiology*. 3, 447-453.
- Kim, M. S.; Lee, J.; Lee, K. M.; Yang, S. H.; Choi, S.; Chung, S. Y.; Kim, T. Y.; Jeong, W. H.; Park, R., 2003. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci.*, 73: 1231-43.
- Keppler-Hafkemeyer A.; Brinkmann U.; Pastan I., 1998. Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Biochemistry* 37:16934-16942.
- Kulkarni, G.V. and McCulloch., 1995. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: The role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. *Journal of Cellular Physiology.* 165, 119-133.
- Laemmli, V.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lavastre, V.; Pelletier M.; Saller R.; Hostanska K.; Girard D., 2002. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerate the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol.* 168 (3), 1419-27.

- Liu, Z.G.; Hsu, H.; Goeddel, D.V. and Karin, M., 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell*, 87, 565-576.
- Liu, W.K.; Sze, S.C.W.; Ho, J.C.K.; Liu, B.P.L.; and Yu, M.C., 2004. Wheat Germ Lectin Induces G2/M Arrest in Mouse L929 Fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 91:1159–1173
- Lockshin, R. A.; Zakeri, Z., 2002. Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol*, 14: 727-33.
- Lockshin, R. A.; Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2405-19.
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-90.
- Mashima, T.; Naito, M. and Tsuruo, T., 1999. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene*. 18, 2423-2430.
- Marty-Detraves, C.; Francis, F.; Baricault, L.; Fournier, D.; Paquereau, L., 2004. Inhibitory action of a lectin from *Xerocomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Mol. Cell. Biochem.*, 258 :49-55.
- Mello, M. L.; Vidal, B., 1980. *Práticas em Biologia Celular*, Edgard Blucher, 71, R.J.
- Mejía, E.G. and Prisecaru, V.L., 2005. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:425–445.
- Miyoshi, N.; Koyama, Y.; Katsuno, Y.; Hayakawa, S.; Mita, T.; Ohta, T.; Kaji, K. and Isemura, M., 2001. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. *J Biochem*. 130, 799-805.
- Momoi, T., 2004. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J. Chem. Neuroanat.*, 28: 101-105.
- Monks, N.R.; Biswas, D.K.; Pardee, A.B., 2004. Blocking anti-apoptosis as a strategy for cancer chemotherapy. NF κ B as a target. *J. Cell Biochem.*, 92: 646-650.
- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65 :55-63.
- Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A., 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 22: 299-306.
- Ohba, H.; Moriwaki, S.; Bakalova, R.; Yasuda, S.; and Yamasaki, N., 2004. Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 195, 182-193.
- Park, R.; Kim, M.S.; So, H.S.; Jung, B.H.; Moon, S.R.; Chung, S.Y.; Ko, C.B.; Kim, B.R. and Chung, H.T., 2000. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem Pharmacol*. 60, 1685-1691.
- Pöppelmann, B.; Klimmek, K.; Strozyk, E.; Voss, R.; Schwarz, T. and Kulms, D., 2005. NF κ B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated

- proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *The journal of Biological Chemistry*, 280: 15635-43.
- Rao, P.V.L.; Jayaraj, R.; Bhaskar, A.S.B; Kumar, O.; Bhattacharya, R.; Saxena, P.; Dash, P.K.; Vijayaraghavan., 2005. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 69, 885-865.
- Remani, P.; Pillai, K. R.; Haseenabeevi, V. M.; Ankathil, R.; Bhattathiri, V. N.; Nair, M. K.; Vijayakumar, T., 1994. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, 41: 39-42.
- Sharon N. and Lis H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246: 227-234.
- Sharon, N.; Lis, H., 1995. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. *Essays Biochem.*, 30: 59-75.
- Schwarz, R.E.; Wojciechowicz, D.C.; Picon, A.I.; Schwarz, M.A. and Paty, P.B., 1999. Wheat germ agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*. 80, 1754-1762.
- Slee, E. A.; Adrain, C.; Martin S. J., 1999a. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6: 1067-74.
- Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R.; Martin, S. J., 1999b. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.*, 144: 281-92.
- Tartaglia, L.A.; Pennica, D. and Goeddel, D.V., 1993. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem*. 268, 18542-1858.
- Thornberry, N. A.; Bull, H. G.; Calaycay, J. R.; Chapman, K. T.; Howard, A. D.; Kostura, M. J.; Miller, D.K.; Molineaux, S. M.; Weidner, J. R.; Aunins, J. et al, 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356: 768-74.
- Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312-6.
- Tibbetts, M. D.; Zheng, L.; Lenardo, M. J., 2003. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol*, 4: 404-9.
- Troncoso, M.F.; Zolezzi, P.C.; Hellman, U.; Wolfenstein-Todel, C., 2003 A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 411, 93-104.
- Troncoso, M.F.; Biron, V.A.; Longhi, S.A.; Retegui, L.A.; Wolfenstein-Todel, C., 2007. *Peltophorum dubium* and soybean Kunitz-type trypsin inhibitors induce human Jurkat cell apoptosis. *International Immunopharmacology* ,7: 625–636
- Vermeulen, K.; Bockstaele, D.R.V.; Berneman, Z.N., 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol*. 84: 627-639.
- Viatour, P.; Merville, M.P.; Bours, V. and Chariot, A., 2005. Phosphorylation of NFκB and IκB proteins: implications in cancer and inflammation. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30:43-52.

- Vogt, C., 1842. Untersuchungen über die Entwicklungsbiologie der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent und Gassmann, Solothurn, Switzerland.
- Wallach, D.; Varfolomeev, E.E.; Malinin, N.L.; Goltsev, Y.N.; Kovalenko, A.V. and Boldin, M.P., 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331-367.
- Wang, C.Y.; Mayo, M.W.; Korneluk, R.G.; Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S.Jr., 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 281, 1680-1683.
- Wang, Z.H.; Gao, L.; Li, Y.Y.; Zhang, Z.; Yuan, J.M.; Wang, H.W.; Zhang, L. and Zhu, L. (2007). Induction of apoptosis by buckwheat trypsin inhibitor in chronic myeloid leukemia K 562 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 30 (4): 783-786.
- Yin, X. M., 2000a. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med*, 78: 203-11.
- Yin, X. M., 2000b. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res*, 10: 161-7.