

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SILVANA CRISTINA PANDO



Caracterização bioquímica de uma lectina e determinação da estrutura primária de um inibidor de serinoproteínases tipo Kunitz de sementes de *Delonix regia* (Flamboyant):
Estudo "in vitro" da ação inseticida do inibidor

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Silvana Cristina Pando
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Sérgio Marangoni

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Marangoni
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Vnicamp
	P 192 c
V	EX
TOMBO BC/	55621
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/09/03
Nº CPD	

CM00188920-4

Bibid 300094

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P192c

Pando, Silvana Cristina

Caracterização bioquímica de uma lectina e determinação da estrutura primária de uma inibidor de serinoproteínases tipo Kunitz de sementes de *Delonix regia* (Flamboyant): estudo do papel inseticida do inibidor em relação aos insetos *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera-Pyralidae)/Silvana Cristina Pando.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Sérgio Marangoni

Co-orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Lectinas. 2. Sementes. 3. Lepdoptero. I. Marangoni, Sérgio.
II. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. III Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

DATA DA DEFESA: 22/05/2003

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sérgio Marangoni (Orientador)

Sérgio Marangoni

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Stephen Hyslop

Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva

Maria Luiza Vilela Oliva

Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Fernanda R. Gadelha

Prof. Dr. José Camillo Novello

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

2000 329929



Delonix regia – Flamboyant
Leguminosae - Caesalpinioideae

Agradeço a Deus pela VIDA, SAÚDE e por mais esta
conquista!

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela oportunidade.

À Prof^a. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo pela co-orientação, pela valiosa ajuda, incentivo e amizade que tornou possível a realização desta conquista.

À Prof^a. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva pela atenção e valiosa colaboração que foi indispensável para a conclusão deste trabalho.

À Prof^a. Maria das Graças Machado Freire pelo companheirismo, pela ajuda e amizade, que foram muito importantes durante e realização deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos.

À minha irmã Luzia Pando pelo incansável apoio e dedicação.

Às amigas Adriana Moreira, Bayki Hussein Kassab, Daniela Beghini, Daniela Damico e Gláucia Coelho Mello, pelo apoio, companheirismo e ajuda que me foram indispensáveis durante a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Departamento de Bioquímica pelo carinho e companheirismo ao longo deste período de convivência.

Aos amigos, que no momento estão distantes, mas que jamais serão esquecidos, Daniela Diógenes de Carvalho e Evandro José de Lima Rego, obrigada pela ajuda e pelos momentos felizes.

Ao Paulinho Baldasso e ao Marino pelo apoio técnico, mas sobretudo pela amizade durante mais esta conquista, muito obrigada.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica, Andréia e Marina pelos esclarecimentos, atenção e ajuda ao longo desta conquista.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À MINHA FAMÍLIA

À minha mãe, Maria, às minhas irmãs Luzia e Solange e à minha inesquecível avó (*in memoriam*) agradeço pelo amor incondicional, dedicação e compreensão durante toda a minha vida, especialmente nos anos em que tive que me ausentar em busca da realização dos meus ideais e aprimoramento profissional.

AMO VOCÊS!!!!!!

Ao meu querido noivo, Rogério, pela incansável ajuda, dedicação e compreensão que me foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

ESTA CONQUISTA TAMBÉM É SUA!!!

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUÇÃO.....	6
Aspectos gerais das lectinas vegetais.....	6
Classificação das lectinas vegetais.....	9
Atividade biológica e aplicações das lectinas vegetais.....	12
Aspectos gerais dos inibidores de proteinases de origem vegetal.....	17
Classificação dos inibidores de serinoproteinases.....	18
Mecanismos de interação entre os inibidores e suas enzimas alvo.....	20
Atividade biológica e aplicações dos inibidores de proteinases.....	22
Aspectos gerais da biologia dos insetos <i>A. kuheniella</i> e <i>C. cephalonica</i> (Lepidoptera-Pyralidae).....	32
Aspectos do sistema digestório dos insetos.....	35
OBJETIVOS.....	41

CAPÍTULO 1: Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from <i>Delonix regia</i> seeds.....	42
CAPÍTULO 2: Biochemical characterization of a lectin from <i>Delonix regia</i> seeds.....	50
CAPÍTULO 3: <i>In vitro</i> effects of the Kunitz-type trypsin inhibitor from <i>Delonix regia</i> seeds on digestive proteases of <i>A. kuheniella</i> and <i>C. cephalonica</i> (Lepidoptera-Pyralidae).....	58
CONCLUSÕES GERAIS	81
PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
APÊNDICE 1: Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a Kunitz-type trypsin inhibitor from <i>Delonix regia</i> seeds.....	108
APÊNDICE 2: PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	112

Figura 1. Representação esquemática do processo de aglutinação causado por lectinas.....	7
Figura 2. Mecanismo de interação entre os inibidores e as proteinases.....	21
Figura 3. Mecanismo cinético das serinoproteinases.....	22
Figura 4. Vias de transdução de sinal intracelular e a indução da síntese de inibidores de proteinases na planta em resposta à injúria mecânica.....	26
Figura 5. Aspecto do inseto <i>A. kuehniella</i>	33
Figura 6. Aspecto do inseto <i>C. cephalonica</i>	35
Figura 7. (A). Esquema das subdivisões do sistema digestório dos insetos. (B). Esquema ilustrando o movimento de água e solutos dentro e fora do intestino.....	40

Os objetivos deste trabalho foram purificar e caracterizar bioquimicamente uma lectina e determinar a estrutura primária de um inibidor de serinoproteínases tipo Kunitz de sementes da espécie *D. regia* (Leguminosae-Caesalpinioideae) e também verificar o efeito *in vitro* do inibidor sobre a atividade das enzimas digestivas dos insetos lepidópteros *A. kuehniella* e *C. cephalonica*.

Para a purificação da lectina e do inibidor de serinoproteínases, as sementes foram trituradas e a farinha foi submetida a uma extração salina 10%. Após centrifugação, o sobrenadante (extrato total) foi dialisado, liofilizado e aplicado em colunas de exclusão molecular, troca iônica e coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC. As frações eluídas foram monitoradas a 280 nm de absorbância. A lectina e o inibidor purificados foram designados como DRL (*Delonix regia* lectin) e DrTI (*Delonix regia* trypsin inhibitor), respectivamente.

Após a identificação e purificação, a lectina foi analisada em SDS-PAGE 12,5%, revelando que esta proteína tem massa molecular aparente de 12 kDa sob condições redutoras (DTT 0,1M) e não redutoras. O gel nativo revelou que DRL é uma proteína constituída por apenas uma cadeia polipeptídica.

Os testes de inibição da atividade hemaglutinante foram realizados com eritrócitos de ratos, utilizando-se os seguintes açúcares: D-glicose, D-glicosamina, D-frutose, D-manose, D-sacarose, D-galactose, D-galactosamina, D-rafinose, D-lactose e D-maltose e verificamos que a atividade hemaglutinante de DRL foi inibida mais especificamente por glicose a uma concentração de 0,048 mM, indicando que esta lectina pertence ao grupo glicose-manose.

A composição de aminoácidos da lectina mostrou alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico e glicina, mas nenhum resíduo de cisteína foi observado. A determinação da região N-terminal da lectina revelou alta homologia com outras lectinas de leguminosas tais como, com A, lentilha e ervilha.

A faixa de pH para a atividade da lectina foi de 8-9 com perda total da sua atividade em faixa de pH ácido (2-4). Além disso, a lectina manteve sua atividade após tratamento térmico a 70°C, durante 30 minutos, com perda de 50% de sua atividade a 100°C.

DRL não necessitou de cálcio para sua atividade, mas é dependente de manganês, sugerindo que DRL é uma metaloproteína.

O tratamento de DRL com uréia resultou em perda total da AHE, enquanto que na presença do DTT, a lectina manteve sua atividade normal provavelmente devido à ausência de pontes dissulfeto na molécula.

A determinação da estrutura primária do DrTI, comprovou que este inibidor pertence à família Kunitz de inibidores de proteinases. A região do sítio reativo possui um resíduo de ácido glutâmico ao invés de arginina ou lisina, mas a molécula apresentou dois "loops" compostos por quatro resíduos de cisteína com alta similaridade com outros inibidores tipo Kunitz.

Os estudos de inibição *in vitro* mostraram que, numa concentração de apenas 5µg, o DrTI inibiu cerca de 92% da atividade das proteases dos insetos *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, indicando alta afinidade do inibidor por estas enzimas.

A digestibilidade *in vitro* do DrTI pelas proteases dos insetos foi analisada em SDS-PAGE 12,5% e revelou que o inibidor foi resistente à proteólise após 72h. Entretanto, a incubação do DrTI com a tripsina bovina resultou em clivagem nos primeiros 30 minutos de reação. A atividade residual máxima do inibidor, após estes ensaios de digestibilidade pelas proteases de *A. kuehniella*, *C. cephalonica* e tripsina bovina foi de 69,5%, 64,9% e 34,57%, respectivamente.

The aims of this work were to purify and to characterize biochemically a lectin and to determine the primary structure of a Kunitz-type serineproteinase inhibitor from seeds of *Delonix regia* specie (Leguminosae-Caesalpinioideae) and also to verify the *in vitro* effect of the inhibitor towards to digestive enzymes activities of the lepidoptera insects *A. kuehniella* and *C. cephalonica*.

For lectin and serine proteinase inhibitor purification, the seeds were triturated and the flour was submitted to saline extraction 10%. After centrifugation, the supernatant (total extract) was dialysed, lyophilized and applied in molecular exclusion, ion exchange and reverse phase C18 HPLC columns. The eluted fractions were monitored by absorbance at 280 nm. The lectin and the inhibitor purified were designated DRL (*Delonix regia* lectin) and DrTI (*Delonix regia* trypsin inhibitor), respectively.

After identification and purification, the lectin was analyzed in SDS-PAGE 12.5%, showing that this protein has an apparent molecular mass of 12 kDa under reduced (DTT 0.1M) and non reduced conditions. Analysis of native gel revealed that DRL is a protein constituted by only one polypeptide chain.

The inhibition tests of hemagglutinating activity were realized with rat erythrocytes, using the following sugars: D-glucose, D-glucosamine, D-fructose, D-mannose, D-sucrose, D-galactose, D-galactosamine, D-raffinose, D-lactose and D-maltose and we verified that hemagglutinating activity of DRL was more specifically inhibited by glucose at 0.048 mM concentration, indicating this lectin belongs to the glucose-mannose group.

The lectin aminoacid composition showed high content of aspartic acid, glutamic acid and glycine, but cysteine residue was not detected. The determination of the N-terminal region of the lectin revealed high homology with other leguminous lectins such as, con A, lentil and pea.

The pH range for the lectin activity was 8-9 and DRL lost activity totally in range of acid pH (2-4). Furthermore, the lectin maintained activity after thermal treatment to 70°C, during 30 minutes, with lost of 50% in activity at 100°C.

DRL does not require calcium for the activity but is manganese dependent, suggesting that DRL is a metalloprotein.

The treatment of DRL with urea resulted in total loss of hemagglutinating activity, while in the presence of DTT, the lectin maintained normal activity probably due absence disulfide bridges in the molecule.

The primary structure determination of DrTI, proved that this inhibitor belongs to the Kunitz family of proteinase inhibitors. The region of reactive site presented a glutamic acid residue instead of an arginine or lysine, but the molecule presented two "loops", composed by four cysteine residues, with high similarity with other Kunitz type inhibitors.

The in vitro inhibition studies with insect proteases from *A. kuehniella* and *C. cephalonica* showed at concentration of only 5 μ g, DrTI inhibited about of 92% of the proteases these insects, indicating high affinity of the inhibitor by these enzymes.

In vitro digestibility of DrTI by insect proteases was analyzed in SDS-PAGE 12.5% and revealed that the inhibitor was resistant to the proteolysis after 72h. However, the incubation of DrTI with bovine trypsin resulted in cleavage in the first 30 minutes of reaction. The maximal residual activity of the inhibitor, after these digestibility assays by proteases from *A. kuehniella*, *C. cephalonica* and bovine trypsin was 69.5%, 64.9% and 34.57%, respectively.

ABA - ácido abscísico
AHE – atividade hemaglutinante
ANOVA – análise de variância
BAPNA - benzoil-arginina-p-nitroanilida
ConA – concanavalina A
Def 1 - gene que regula a conversão de HPOTrE em 12-oxo-PDA
DIECA - ácido dietilditiocarbâmico
DTT – ditioneitol
EDTA – etileno diamino tetracético ácido
GEBP - proteína ligante de β -glucano elicitor
GNA – *Galanthus nivalis* aglutinina
HOTrE - 13-ácido hidroxilinolênico
HPLC - cromatografia líquida de alta pressão (high pressure liquid chromatography)
HPOTrE - 13-S-ácido hidroperoxilinolênico
IM – intestino médio
JA – ácido jasmônico (jasmonic acid)
NBD - norbornadiene
PCMBS - p-cloromercúrio benzeno sulfônico ácido
PDA - 12-oxo-ácido fitodienólico
pp34 - fosfoproteína de 34 kilo Dalton
RNA - ácido ribonucleico
SBP50 - proteína ligante de sistemina de 50 kilo Dalton
SHAM - ácido salicilhidroxâmico

ASPECTOS GERAIS DAS LECTINAS VEGETAIS

Em 1888, Hermann Stillmark descreveu, pela primeira vez, a ação de proteínas com atividade hemaglutinante em extratos vegetais e, a partir desta época, várias dessas proteínas foram isoladas e caracterizadas com relação à sua estrutura molecular, especificidade por carboidratos e propriedades bioquímicas.

Landsteiner & Raubitschek (1908) discutiram pela primeira vez a especificidade das lectinas e observaram que vários extratos de sementes de leguminosas apresentavam diferentes propriedades de hemaglutinação quando analisados com eritrócitos de diferentes espécies animais, provavelmente porque as lectinas de diferentes espécies vegetais, freqüentemente diferem na sua estrutura molecular e na sua especificidade.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de interagir especificamente com carboidratos, aglutinar células animais e/ou vegetais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos (Goldstein & Poretz, 1986; Jacobson & Doyle, 1996).

De acordo com Peumans & Van Damme (1995), esta definição implica que diferentes glicoconjugados, idênticos ou estruturalmente similares, podem agir como receptores para a mesma lectina e que a presença de no mínimo um domínio não catalítico, o qual liga-se reversivelmente a um carboidrato específico, é o único pré-requisito para uma proteína ser considerada lectina. A figura 1, ilustra o mecanismo de interação das lectinas com seus carboidratos específicos:

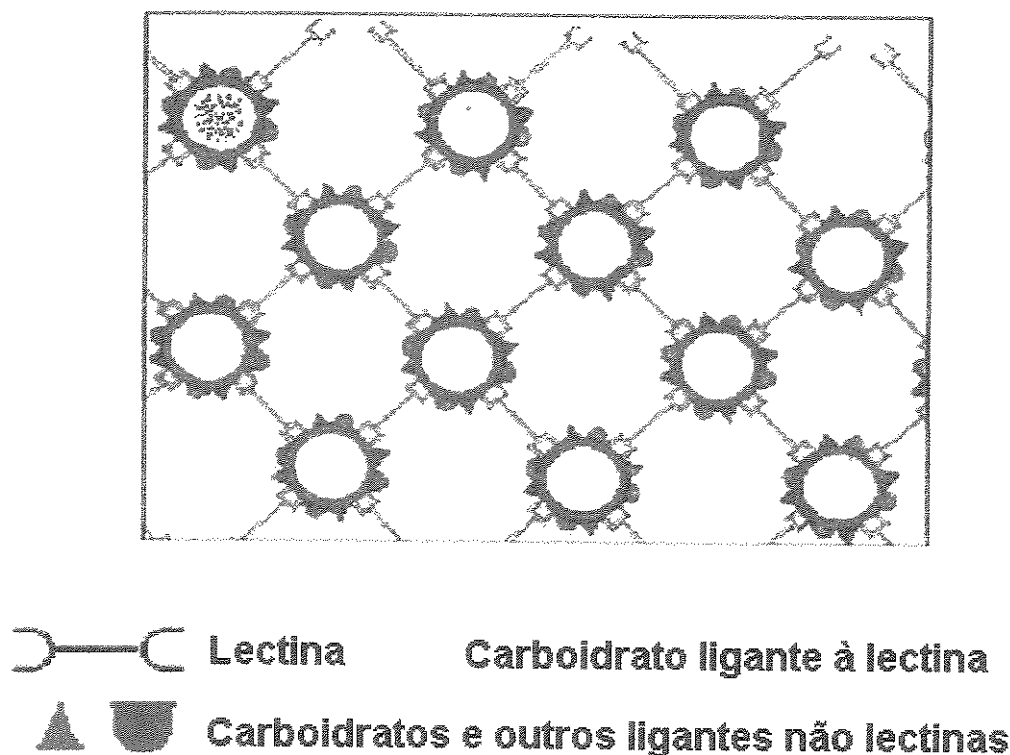


Figura 1. Representação esquemática do processo de aglutinação causado por lectinas (Kennedy *et al.*, 1995).

Segundo Kennedy *et al.* (1995) os sítios de ligação a carboidratos, presentes na molécula de lectina, interagem com o carboidrato específico através do mecanismo do tipo chave-fechadura, envolvendo pontes de hidrogênio, ligação metálica (devido à presença de íons metálicos na molécula), interações de van der Waals e interações hidrofóbicas.

De acordo com Sharon & Lis (1995), a especificidade das lectinas é determinada pela conformação exata dos sítios de ligação e da natureza dos resíduos de aminoácidos para os quais o carboidrato é ligado. Dessa forma, pequenas alterações na estrutura dos sítios de ligação, como por exemplo, a substituição de apenas um ou dois resíduos de aminoácidos, pode resultar em alterações significativas na especificidade da lectina sem, no entanto, afetar a estrutura tridimensional da proteína.

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas em animais, plantas, insetos e microorganismos (Kennedy *et al.*, 1995). Nas plantas, as lectinas podem ser encontradas em diferentes famílias e diferentes tecidos da mesma planta, sendo que, a maioria das lectinas investigadas, compreende aquelas da família Leguminosae, que forma um grupo grande de proteínas estruturalmente semelhantes com especificidades para diferentes carboidratos (Chrispeels & Raikhel, 1991).

As lectinas de legume são as proteínas vegetais mais estudadas, pois correspondem de 2 a 10% das proteínas solúveis de sementes maduras e centenas destas proteínas já foram isoladas e caracterizadas de acordo com suas propriedades químicas, físico-químicas, estruturais e biológicas (Gatehouse *et al.*, 1995; Van Damme *et al.*, 1998).

Peumans *et al.* (2001), descreveram as estruturas das lectinas como protômeros, sendo que um protômero é definido como uma subunidade madura ou a soma de subunidades maduras derivadas de produtos primários de tradução do RNA mensageiro que codifica as lectinas. Dependendo do número de protômeros, uma lectina é chamada de monômero, dímero, trímero, tetrâmero e assim sucessivamente. Quando um protômero consiste de dois polipeptídeos, uma lectina monomérica contém duas subunidades diferentes.

A massa molecular das subunidades da lectina de legume está em torno de 30 kDa, com a lectina completamente ativa, formando dímeros ou tetrâmeros com múltiplos sítios de ligação para carboidrato. A associação das subunidades da lectina pode ser estabelecida através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto (Rüdiger, 1998).

Geralmente as lectinas são degradadas durante o processamento do alimento, devido à perda de sua estrutura quaternária e terciária, resultando na produção de dímeros ou monômeros que podem possuir sítio de ligação para carboidrato, mas são incapazes de aglutinar membranas celulares (Loris *et al.*, 1998; Maenz *et al.*, 1999).

Apesar da diversidade observada em diferentes famílias de lectinas vegetais e, independente de sua organização tridimensional, a estrutura de folhas

β ocorre predominantemente em todas as proteínas caracterizadas como lectinas, sendo necessária para a atividade ligante de açúcar destas proteínas (Barre *et al.*, 2001).

É importante ressaltar que, apesar da grande similaridade entre as lectinas com relação à sequência de aminoácidos e estruturas terciárias, há uma grande variação em suas estruturas quaternárias. No entanto, a base molecular de variação na estrutura quaternária ainda não está bem esclarecida (Loris *et al.*, 1998).

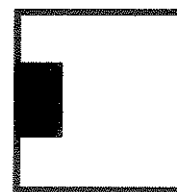
As espécies de plantas leguminosas contêm proteínas que são, evolutivamente, relacionadas às lectinas, mas que são destituídas de um sítio ligante de carboidrato, sendo as arcelinas e um inibidor de α -amilase de *Phaseolus vulgaris*, exemplos bem conhecidos deste grupo de proteínas (Mirkov *et al.*, 1994; Peumans *et al.*, 2001).

CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS

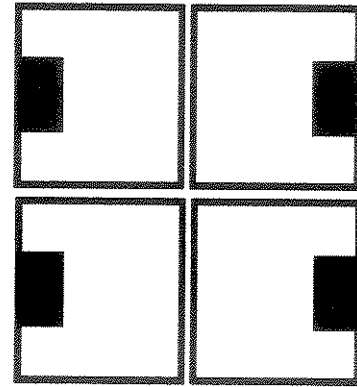
As lectinas podem ser classificadas em quatro tipos principais, de acordo com aspectos estruturais e a habilidade para reconhecer e ligar carboidratos (Peumans *et al.*, 2001):

- ♦ **Merolectinas:** são proteínas que consistem exclusivamente de um único domínio ligante de carboidrato e, por serem monovalentes, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Exemplo: pequenas proteínas ligantes de quitina compostas por apenas um domínio heveína. A heveína é uma proteína com cerca de 43 resíduos de aminoácidos isolada de *Hevea brasiliensis*.

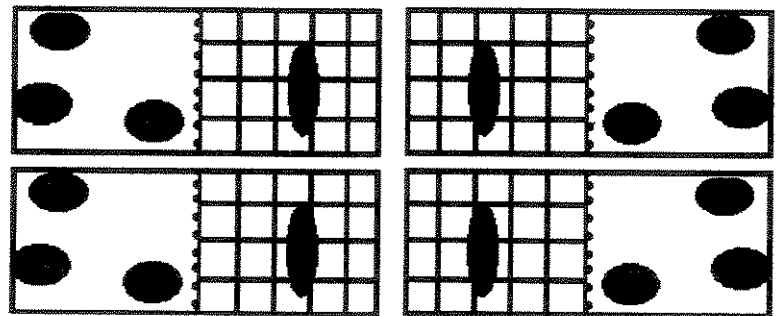
MEROLECTINAS



- ♦ **Hololectinas:** são proteínas formadas por dois ou mais domínios ligantes de carboidratos idênticos ou similares. Estas proteínas são di ou multivalentes, sendo capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Exemplo: a maioria das lectinas vegetais pertence a esta classe.

HOLOLECTINAS

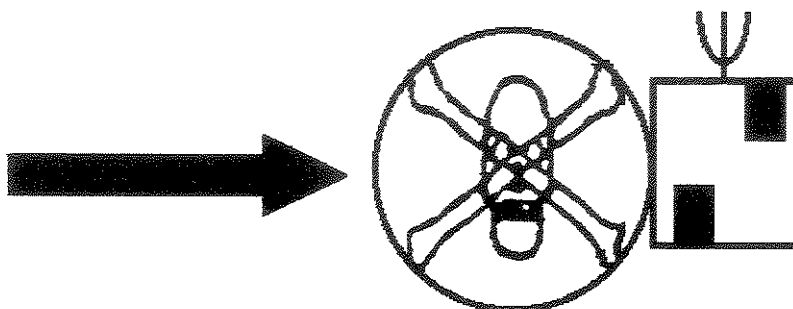
- ♦ **Superlectinas:** é uma classe especial de hololectinas que possui, no mínimo, dois domínios que se ligam a carboidratos. Estes domínios não são idênticos ou similares e reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. Exemplo: a lectina isolada de bulbo de tulipa apresenta dois domínios diferentes que são específicos para os açúcares manose e N-acetilgalactosamina.

SUPERLECTINAS

- ♦ **Quimerolectinas:** são proteínas que possuem um domínio de ligação para carboidratos, associado a outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, que atua independentemente do domínio ligante de açúcares. Dependendo do número de sítios ligantes de açúcares, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Exemplos : a lectina ricina, uma proteína citotóxica inativadora de ribossomo tipo 2 e as

lectinas isoladas de *Vigna radiata* e *Vicia faba* que possuem, além de um domínio catalítico com atividade de glicosidase capaz de clivar glicosídeos, um domínio ligante de galactose e glicose-manose, respectivamente (Pusztai, 1991).

QUIMEROLECTINAS



A maioria das lectinas vegetais ainda pode ser classificada em sete famílias, considerando as afinidades estruturais e evolutivas: a família amarantina, lectinas ligantes de quitina compostas por domínios heveína, lectinas isoladas de floemas de curcubitáceas, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de legume, lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose e proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2.

A família de lectinas vegetais é muito heterogênea com relação à especificidade de ligação a carboidratos e, de acordo com o tipo de carboidrato ligante, estas proteínas podem ser classificadas em oito grupos: manose/glicose; galactose/N-acetilgalactosamina; N-acetilglicosamina; fucose; ácido siálico, complexo oligossacarídico, lectinas ligantes de manose e galactose relacionadas à jacalina e lectinas da superfamília de monocotiledôneas ligantes de manose (Rüdiger, 1997; Peumans *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2000).

De acordo com Peumans *et al.* (2001), somente lectinas ligantes de manose e específicas para manose/maltose ainda não foram identificadas na família de plantas leguminosas. Por outro lado, até o momento, lectinas específicas para fucose e manose/glicose só têm sido encontradas exclusivamente na família das lectinas de legume. Convém ressaltar que a maioria das lectinas que são específicas para carboidratos complexos pertence à família das lectinas de legume.

As lectinas de gramíneas mostram ampla especificidade para açúcares e glicoconjugados. Por exemplo, WGA e a lectina de centeio (*Secale cereale*) reconhecem e interagem, preferencialmente, com N-acetilglicosamina (GlcNAc) e glicoconjugados contendo ácido siálico (Neu5Ac) (Kubaneck *et al.*, 1982). O arroz (*Oryza sativa*) apresenta lectinas específicas para GlcNAc e resíduos de manose, enquanto as lectinas do gênero *Amaranthus* são específicas para N-acetilgalactosamina (GalNAc) e glicanos O-glicosilados. Em coleóptile de milho (*Zea mays*), foi isolada uma lectina específica para galactose (Martínez-Cruz *et al.*, 2001).

ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DAS LECTINAS VEGETAIS

A ampla ocorrência das lectinas vegetais e a variedade de especificidade por carboidratos despertou o interesse para investigações das funções destas proteínas (Cavada *et al.*, 1993).

- Funções gerais:

As lectinas podem exercer suas funções endogenamente ou externamente na planta.

- **funções endógenas das lectinas:** podem atuar como proteínas de reserva (Peumans & van Damme, 1993); participar da regulação hormonal (Rüdiger, 1997); ativar fosfatase endógena, atuando como moléculas moduladoras da atividade enzimática (Aoyama *et al.*, 2001); na germinação e maturação da semente; na manutenção da dormência da semente; como mitógenos de células embrionárias vegetais e como receptores que desencadeiam o acúmulo de fitoalexina (Etzler, 1985). As lectinas que são produzidas nas raízes, podem contribuir para a simbiose entre as plantas leguminosas e as bactérias do gênero *Rhizobium*, que fixam o nitrogênio atmosférico essencial para o metabolismo da planta (Peumans & Van Damme, 1995).

- **funções exógenas das lectinas:** efeito antifúngico para as lectinas ligantes de quitina, um polímero de N-acetilglicosamina, constituinte da parede celular dos fungos (Chrispeels & Raikhel, 1991; Freire *et al.*, 2002); lectinas marcadas com digoxigenina podem ser usadas para estudos estruturais de carboidratos bem como para a distribuição de carboidratos em fungos patogênicos (Kennedy *et al.*, 1995); podem atuar como mitógenos de linfócitos; no isolamento e análise de carboidratos complexos; no estudo da arquitetura celular e na proteção contra bactérias, uma vez que as lectinas podem se fixar à parede celular da bactéria, estabelecendo relações simbióticas, saprofíticas ou patogênicas (Etzler, 1985).

As lectinas podem ser usadas também na tipagem de células sanguíneas e como matrizes de afinidade para purificar glicoproteínas e na transdução de sinais através da membrana celular (Mody *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2000).

- Interesse de lectinas na medicina

A maioria das superfícies celulares dos vertebrados é envolvida por um glicocálix, glicoproteínas, glicolípídeos e glicosaminoglicanos que, conjuntamente, são referidos como glicoconjugados (Schauer *et al.*, 1988). Devido à sua complexidade estrutural e variabilidade, os carboidratos de superfície celular servem como sinais de reconhecimento (Sharon & Lis, 1993). Esta diversidade estrutural transmite sinais que podem ser reconhecidos por lectinas e glicoproteínas, podendo atuar como “pontes” pela ligação a carboidratos entre células vizinhas e da matriz extracelular. Uma vez que a maioria das lectinas reage especificamente com açúcares não reduzidos de glicoproteínas e glicolípídeos da membrana celular, elas podem ser usadas para caracterizar estes glicoconjugados de superfície com base nos monossacarídeos que inibem a ligação (Mody *et al.*, 1995). As lectinas podem ser usadas ainda como sondas em técnicas bioquímicas, citoquímicas e histoquímicas para o estudo de mínimas diferenças em glicoconjugados de superfície de células normais e células cancerosas que, por outro lado, não são detectáveis com anticorpos monoclonais. As lectinas podem atuar como: marcadores associados a tumores, agentes adesivos, carreadores, imunomoduladores e agentes antitumorais. Mais de 100

lectinas vegetais diferentes foram usadas no estudo de tumores humanos e animais em vários órgãos e a habilidade que as lectinas possuem de ligar-se a carboidratos é o princípio para o reconhecimento e adesão celular (Damjanov, 1987; Walker, 1989; Moreira *et al.*, 1991). Vários estudos demonstraram que, em células cancerosas, há modificações dos carboidratos da superfície celular bem como alteração na expressão de proteínas endógenas, incluindo as lectinas (Rak *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1994; Mody *et al.*, 1995).

As lectinas de *Abrus precatorius*, *Ricinus communis* e *Viscum album*, são capazes de inibir, eficientemente, a síntese protéica atuando, portanto, como potentes citotoxinas (Mody *et al.*, 1995). O exemplo mais bem estudado é a ricina, lectina de *Ricinus communis*, que possui atividade N-glicosidase e é capaz de bloquear a síntese protéica devido à remoção de um resíduo de adenina de uma adenosina da subunidade 28S do RNA ribossômico, alterando a conformação do ribossomo e impedindo a ligação do aminoacil t-RNA (Endo, 1989). Várias outras lectinas vegetais tais como, isolectinas do gênero *Phaseolus* (PHA), com A, aglutinina de *Maclura pumifera* e *Pisum sativum*, são potentes mitógenos para linfócitos humanos (Serke, *et al.*, 1989). Este efeito estimulante causado pelas lectinas pode ser melhor entendido, tendo em vista que alguns dos fatores de crescimento/interleucinas reconhecem seus receptores via interação "lectina-like" (Yamaoka *et al.*, 1991). Além disso, algumas lectinas vegetais como a aglutinina de *V. album*, têm a capacidade de aumentar, inespecificamente, os mecanismos imunes de células hospedeiras e esta lectina também pode induzir apoptose em células leucêmicas humanas (Joshi *et al.*, 1994). A aglutinina de *Urtica dioica* também possui efeito imunomodulatório devido à sua atividade mitogênica em linfócitos T e por induzir a produção de interleucina-2 (Lerner & Raikhel, 1992).

As lectinas de superfícies microbianas servem como moléculas de adesão às células hospedeiras de vírus, bactérias e protozoários, um pré-requisito para o início da infecção. Então, quando há um bloqueio da adesão pela adição de carboidratos para os quais a lectina se liga, isto pode resultar em prevenção da infecção por estes microrganismos. As lectinas podem participar também no processo de inflamação, pois as interações mediadas por lectina-carboidratos

entre leucócitos e células endoteliais são o primeiro passo na recirculação de linfócitos e na migração de neutrófilos para os sítios de inflamação, sendo que tais interações podem resultar na formação de metástases. A elucidação destes processos podem ajudar no desenvolvimento de drogas anti-adesão, baseada em carboidratos específicos, para o tratamento de doenças inflamatórias bem como o câncer (Sharon & Lis, 1995).

Golard (1995), demonstrou que as lectinas vegetais, tais como, Con A e a lectina de *Lens culinaris*, podem modular os canais de cálcio e potássio em sistema nervoso de pintos envolvendo ou não a participação da proteína G e, conseqüentemente, modulam a transmissão sináptica. Além disso, pelo fato de estes canais serem glicosilados, algumas lectinas têm sido usadas para purificá-los.

- Lectinas como mecanismo de proteção das plantas contra o ataque de insetos

A maioria das lectinas vegetais é capaz de ligar-se a glicoconjugados da parede intestinal, ocasionando rompimento das microvilosidades (invasão de bactérias), redução na viabilidade das células epiteliais, aumento na produção de muco, desequilíbrio hormonal, hiperplasia e aumento no peso do tecido. Dessa forma atuam no mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de patógenos (Liener, 1994; Peumans & Van Damme, 1995).

As lectinas com a mesma especificidade para açúcares podem apresentar diferentes toxicidades e, se uma lectina for tóxica para uma espécie de inseto não implica que ela será tóxica para outra. Por exemplo, as lectinas isoladas de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Canavalia ensiformis* (Con A), são lectinas inibidas pelos açúcares manose e glicose-manose, respectivamente, porém enquanto GNA apresenta efeito tóxico para o inseto *Nilaparvata lugens*, a Con A não tem nenhum efeito tóxico sobre este inseto (Powell *et al.*, 1993). Esta diferença no grau de toxicidade é atribuída à fraca conservação dos resíduos de aminoácidos

nos sítios ligantes a carboidratos nas proteínas de diferentes espécies (Gatehouse *et al.*, 1995; Murdock *et al.*, 1990).

Além disso, já foi demonstrado que as lectinas específicas para manose possuem uma função de reconhecimento de glicanos, tipo manose, de microrganismos estranhos e predadores vegetais. É o caso da GNA, que é tóxica para insetos da ordem Lepidoptera e afídios. A alta toxicidade desta lectina é atribuída à sua especificidade por manose, uma vez que este carboidrato está presente em baixas concentrações nos tecidos da planta e não interfere na atividade da lectina contra os insetos (Gatehouse *et al.*, 1995; Barre, *et al.*, 2001).

Segundo Czapla & Lang (1990), as lectinas específicas para N-acetilglicosamina, galactose e N-acetilgalactosamina são as proteínas mais tóxicas para diferentes espécies de insetos. Existem basicamente quatro mecanismos para explicar o efeito tóxico das lectinas vegetais contra os insetos: a) alteração, próximo ao seu sítio ativo, da função de uma enzima glicosilada necessária para a digestão, b) pela ligação das lectinas a glicoconjugados expostos nas células epiteliais intestinais ao longo do trato digestório, c) pela ligação das lectinas à membrana peritrófica do inseto, a qual é rica em quitina, um polímero de N-acetilglicosamina e d) pela resistência da lectina à proteólise no intestino médio dos insetos (Fitches & Gatehouse, 1998; Macedo *et al.*, 2002a).

Eisemann *et al.* (1994), demonstraram que as lectinas de germen de trigo, lentilha e concanavalina A causaram redução no crescimento das larvas do inseto *Lucilia cuprina* e até mesmo a morte destas larvas em altas concentrações destas lectinas, devido ao bloqueio dos poros da membrana peritrófica e ligação das lectinas às células epiteliais do intestino médio. Harper *et al.* (1998) também comprovaram redução no peso das larvas do inseto *Ostrinia nubilalis* pela ação da lectina WGA devido às alterações na membrana peritrófica e nas células intestinais, dificultando a digestão e absorção de nutrientes.

Os genes de muitas lectinas vegetais que possuem atividade inseticida, como GNA, são utilizados para a produção de plantas geneticamente modificadas. Além disso, muitos trabalhos recentes relatando o efeito inseticida e antifúngico de outras lectinas vegetais, também poderão contribuir para a produção de plantas

resistentes ao ataque de patógenos (de Pater *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1995; Macedo *et al.*, 2002b; Freire *et al.*, 2002), dentre as quais destacam-se culturas economicamente importantes como milho, arroz, algodão e batata (Fitches *et al.*, 2001).

- Lectinas em parasitologia

Sharon & Lis (1989), descreveram que bactérias e vírus “reconhecem” suas células eucarióticas alvo através de interações entre as lectinas e seus carboidratos específicos.

Segundo Jacobson & Doyle (1996), as lectinas podem ser usadas, em cromatografia de afinidade, para a purificação e caracterização de glicoconjugados de parasitas, além de serem importantes para a discriminação entre parasitas patógenos e não-patógenos, contribuindo ainda para a elucidação dos ciclos de desenvolvimento destes microorganismos. De acordo com estes autores, o uso de lectinas vegetais é importante na identificação de espécies em estudos de infectividade e na composição do glicocálix.

ASPECTOS GERAIS DOS INIBIDORES DE PROTEINASES DE ORIGEM VEGETAL

Os inibidores de proteinases são polipeptídeos que formam complexos com proteases na razão molar de 1:1 ou 1:2, podendo resultar em redução da digestibilidade protéica e induzir à hipertrofia pancreática (Udedibie & Carlini, 1998; Datta *et al.*, 2001).

A ocorrência de inibidores de tripsina em sementes cruas de *Canavalia ensiformis*, foi confirmada, pela primeira vez, por Borches & Ackerson (1947) que também observaram que os inibidores de tripsina destas sementes são compostos termolábeis.

Os inibidores vegetais são proteínas regulatórias dos eventos proteolíticos, sendo ubíquas em todos os organismos vivos (plantas, animais e microorganismos). Estes inibidores têm sido isolados e caracterizados em muitas

espécies de plantas, sobretudo em leguminosas (Neurath, 1984; Macedo *et al.*, 2000; Pando *et al.*, 2001).

Esses inibidores são deficientes ou destituídos de resíduos de metionina, histidina, triptofano e possuem alto conteúdo de ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina (Kortt & Caldwell, 1990).

A massa molecular desses inibidores vegetais varia de 8 a 25 kDa, sendo moléculas extremamente estáveis, resistentes ao calor, a variações de pH e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes que também contribuem significativamente para a estabilidade dos inibidores (Belitz & Weder, 1990).

Apesar de haver diferenças na estrutura primária dos inibidores de proteinases, o mecanismo de catálise e a estrutura do sítio de reação destas moléculas são bastante conservados (Urwin *et al.*, 1995).

CLASSIFICAÇÃO DOS INIBIDORES DE SERINOPROTEINASES

As plantas contêm vários tipos de inibidores de serinoproteinases os quais estão divididos em 16 classes, sendo que os inibidores melhor estudados e caracterizados são aqueles pertencentes às famílias: tipo Kunitz, tipo Bowman-Birk e os inibidores de batata tipo I e II (Ryan, 1990; Mello *et al.*, 2003).

Os inibidores de serinoproteinases, presentes em plantas, são classificados em famílias através de características de homologia na estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e especificidade inibitória (Frokiaer *et al.*, 1994).

As sementes de leguminosas contêm vários inibidores de proteinases que podem ser divididos em duas famílias principais segundo Ceciliani *et al.* (1997):

- Inibidores tipo Kunitz

A localização do sítio reativo, determinado em inibidores do tipo Kunitz isolados de soja foi na posição Arg(63)-Ile(64) (Koide & Ikenaka, 1973; Yamamoto *et al.*, 1983; Richardson *et al.*, 1986; Joubert & Dowdle, 1987), enquanto que

inibidores isolados de *Acacia confusa* possuem os resíduos de Arg(64)-Ile(65) no seu sítio reativo (Wu & Lin, 1993). Os inibidores de tripsina tipo Kunitz, isolados de sementes de *Delonix regia* e *Swartzia pickellii* apresentaram uma particularidade na região do sítio reativo, uma vez que os resíduos de ácido glutâmico e asparagina, respectivamente, substituíram os resíduos de arginina e lisina comuns nesta classe de inibidores (Pando *et al.*, 2001; Cavalcanti *et al.*, 2002).

Os inibidores tipo Kunitz ocorrem predominantemente nas sementes de leguminosas, porém não estão restritos a essa fonte, pois já foram encontrados também em batatas e cereais (Richardson, 1991).

Entre as funções fisiológicas atribuídas a esse grupo de inibidores, uma delas seria a de proteína de defesa das sementes, por serem potentes inibidores de enzimas digestivas, como tripsina e quimotripsina, presentes no trato digestório de microrganismos, vertebrados e invertebrados (Jordão *et al.*, 1996). Além disso, também são atribuídas funções como proteínas de reserva ou no controle das proteases endógenas das sementes (Hartl *et al.*, 1986).

- Inibidores tipo Bowman-Birk

Os inibidores que compõem a família Bowman-Birk foram os primeiros inibidores de tripsina de sementes a terem sua sequência de aminoácidos determinada. Este tipo de inibidor é amplamente distribuído em sementes de leguminosas e em cereais, principalmente no milho e acredita-se que desempenham papel de proteínas de reserva, além de defesa contra o ataque de pragas (Richardson, 1991).

A presença de dois sítios reativos nesses inibidores os torna capazes de inibir simultaneamente duas moléculas de tripsina ou ainda uma molécula de tripsina e outra de quimotripsina, formando complexos 1:2 (inibidor:tripsina:tripsina) ou 1:1:1 (inibidor:tripsina:quimotripsina) (Tsunogae *et al.*, 1986). Entretanto, estudos recentes demonstraram que, alguns inibidores de proteinases tipo Bowman-Birk, podem apresentar três, quatro e oito sítios reativos, que podem ligar-se às enzimas tripsina ou quimotripsina. A ocorrência de números variáveis de sítios reativos pode explicar a complexidade da via de sinalização e

importância evolutiva dos inibidores de proteinases (Taylor *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000).

MECANISMO DE INTERAÇÃO ENTRE OS INIBIDORES E SUAS ENZIMAS ALVO

A determinação das constantes de inibição é uma das formas possíveis para estudar os meios de interação entre os inibidores e suas enzimas alvo (Bode & Huber, 1992). Os inibidores ligam-se mais firmemente às suas enzimas-alvo do que a molécula do substrato específica para a enzima, uma vez que a constante de associação pode atingir o valor de 10^{-14} M.

A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado, o qual sofre desnaturação. Os elementos envolvidos nas interações entre as cadeias do inibidor e das proteinases são: pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e pontes dissulfeto. O mecanismo de catálise, ilustrado na figura 2, é comum para as proteinases em geral e a estrutura foi bastante estudada por meio de técnicas de difração de raios-X. O modelo ilustra os elementos necessários para a catálise enzimática: a região específica S1 (tríade catalítica) e a fenda oxiânica, que é constituída por aminoácidos que estabelecem pontes de hidrogênio com o átomo de oxigênio do carbono carbonil (C1) do inibidor (Bode & Huber, 1992; Valueva & Mosolov, 1999).

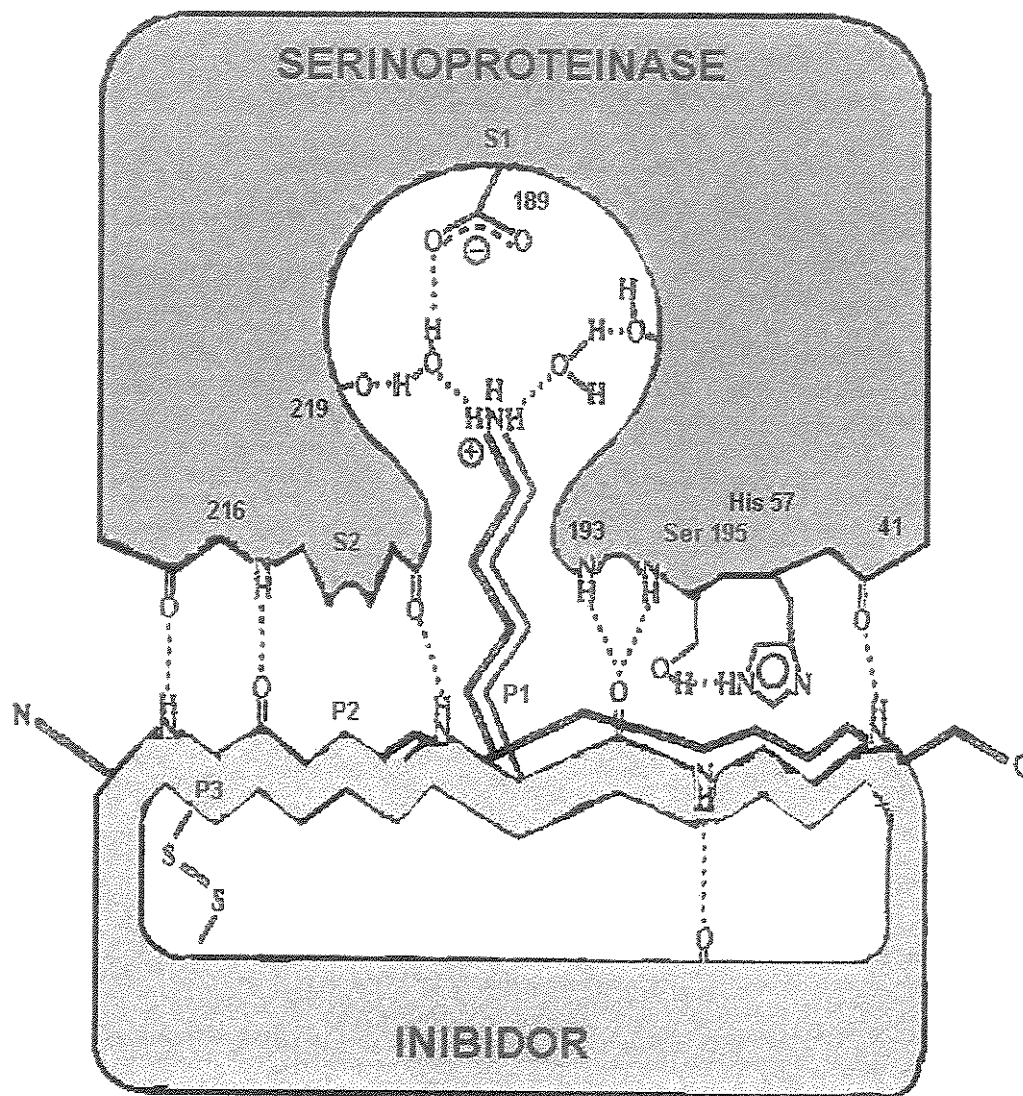
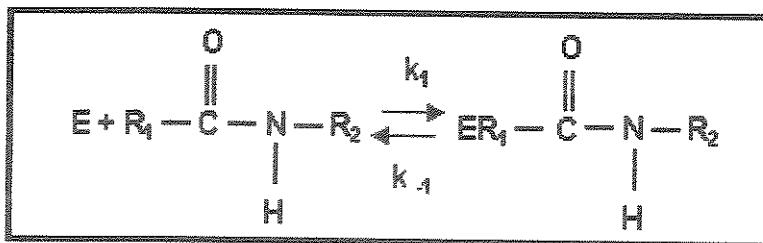
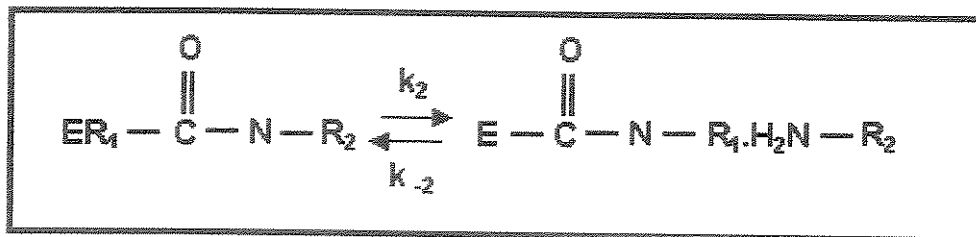


Figura 2. Mecanismo de interação entre os inibidores e as serinoproteases (Valueva & Mosolov, 1999).

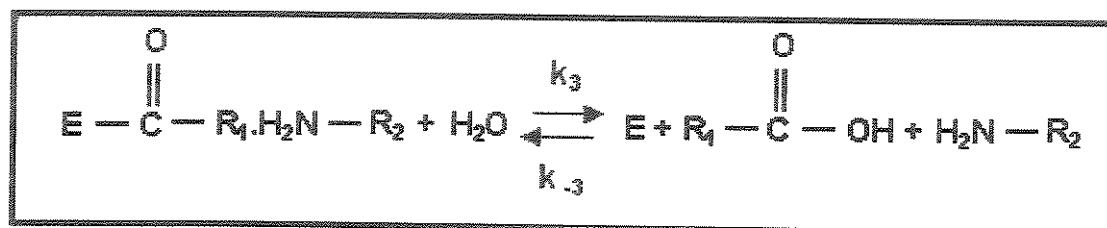
As serinoproteases clivam proteínas de acordo com o mecanismo cinético, apresentado na figura 3 (Radisky & Koshland Jr, 2002).



(Complexo Michaelis-Menten)



(Acil-enzima com resíduos peptídicos ligados não-covalentemente)



(Enzima livre e produtos)

Figura 3. Mecanismo cinético das serinoproteinases (Radisky & Koshland Jr, 2002).

A proteólise é um processo metabólico essencial necessário para o processamento e *turnover* de proteínas, porém a regulação extracelular e intracelular da proteólise, por inibidores endógenos, é de fundamental importância para a planta. Durante a germinação, as proteases participam da degradação de proteínas de reserva para fornecer nitrogênio para as vias de biossíntese, sendo importantes durante o desenvolvimento das plantas, além de atuarem como componentes na interação entre plantas e outros organismos (Koiwa *et al.*, 1997).

As proteases digestivas em animais e humanos são enzimas que catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos, facilitando a absorção. As proteases são denominadas endopeptidases ou proteinases quando hidrolisam ligações

peptídicas internas e exopeptidases quando hidrolisam ligações N-terminais ou C-terminais. O sistema de classificação das proteinases em: proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticos e metaloproteinases, baseou-se numa comparação entre os sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional destas enzimas (Jongsma & Bolter, 1997).

Quando o alimento entra no intestino, a tripsina liga-se à proteína da dieta e/ou aos inibidores de proteinases, permitindo a interação com o fator de liberação de colecistocinina (CCK-PF) e também com os receptores no intestino, desencadeando uma cascata de eventos que resultam na liberação de enzimas digestivas dentro do intestino (Liddle, 1995).

ATIVIDADE BIOLÓGICA E APLICAÇÕES DOS INIBIDORES DE PROTEINASES

Funções gerais dos inibidores de proteinases

Os inibidores de proteinases podem ser encontrados em órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos de muitas famílias de plantas. Estes inibidores de proteinases podem atuar como agentes anticarcinogênicos, como proteínas de reserva, como moduladores de proteinases endógenas, no mecanismo de transdução de sinal e no mecanismo de defesa da planta contra o ataque de insetos e fungos (Giudici *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002).

Interesse dos inibidores de proteinases na medicina

Os inibidores de proteinases são importantes no tratamento de distúrbios metabólicos associados às enzimas proteolíticas, como por exemplo, pancreatites, enfizemas, alergias, inflamação, hipertensão e certos cânceres (Richardson, 1991; Kennedy, 1998). Alguns estudos epidemiológicos verificaram que a ocorrência de câncer em humanos, especialmente de colon, mama e próstata, está ligada à dieta, sendo menor em populações que se alimentam de produtos com alta concentração de inibidores tipo Bowman-Birk, que são abundantes em alimentos como o milho, arroz e feijão. Estes inibidores são capazes de prevenir a

carcinogênese em diferentes sistemas modelo nas condições *in vitro* e *in vivo* (Correa, 1981; Kennedy, 1998).

A função de inibidores de proteases, derivados de plantas, como moléculas anticarcinogênicas já foi descrita anteriormente e sugere o envolvimento de enzimas na indução ou na expressão de transformações de fenótipos ou no processamento de proteínas celulares específicas envolvidas na transformação cancerígena (Fagan & Waxman, 1991; Fontham & Correa, 1993).

Mecanismos de indução da síntese de inibidores de proteinases na planta – proteção contra o ataque de insetos

Em muitas espécies de plantas, os inibidores de proteinases são acumulados em sementes e órgãos vegetativos de forma constitutiva ou induzida. A indução pode ocorrer devido a ferimentos causados por ataque de insetos, fungos, bactérias e também por certos hormônios vegetais (Koiwa *et al.*, 1997).

Os hormônios vegetais, ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico (JA), podem desencadear, rapidamente, uma indução sistêmica e local dos genes de inibidores de proteinases em plantas de tomate, batata e tabaco. Esta resposta é semelhante àquela que ocorre com as plantas que sofrem injúria mecânica (Farmer & Ryan, 1990; Pena-Cortes *et al.*, 1992).

Os intermediários da via de biossíntese do JA, tais como o ácido α -linolênico, 13-hidroperoxilinolênico e 12-oxo-fitodienólico também são capazes de induzir o acúmulo de RNA mensageiro de certos inibidores de proteinases em folhas de tomate, da mesma forma que ocorre quando uma planta sofre alguma injúria mecânica (Koiwa *et al.*, 1997).

Existem algumas moléculas que sinalizam o ferimento da planta tais como a sistemina, um peptídeo isolado primeiramente de folhas de tomate que sofreram injúria e que, conseqüentemente, induziram a expressão de genes de inibidores de proteinases, o ácido abscísico, sinais hidráulicos, sinais elétricos, ácido oligogalacturônico, quitosana e polissacarídeos (Malone & Alarcon, 1995; Bergey *et al.* 1999).

Segundo Koiwa *et al.* (1997), as etapas de regulação da expressão gênica dos inibidores de proteinases, em resposta ao ataque de insetos herbívoros, são:

- acúmulo dos inibidores e, portanto de proteínas, durante a maturação de sementes e tubérculos;
- indução da germinação da semente;
- expressão dos genes de proteases das sementes e a inibição da expressão gênica dos inibidores de proteinases pelas giberilinas;
- inibição da germinação da semente por ácido abscísico (ABA) e indução, concomitante, da expressão dos genes dos inibidores de proteinases.

As vias de transdução de sinais e a síntese dos inibidores vegetais estão apresentadas com detalhes na figura 4.

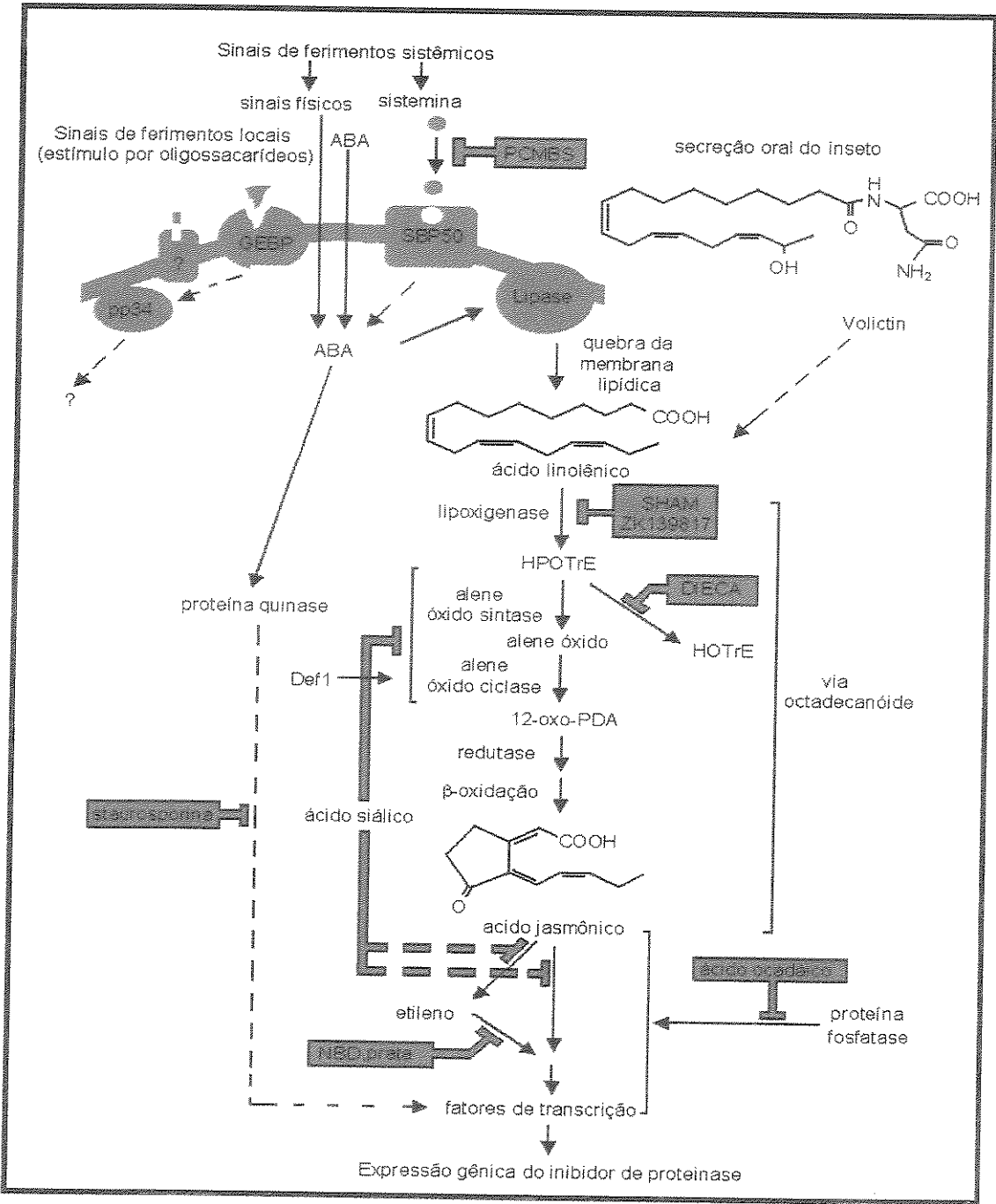


Figura 4. Vias de transdução de sinal intracelular e a indução da síntese de inibidores de proteinases na planta, em resposta à injúria mecânica (Koiwa *et al.* 1997). ➡ : indica o efeito dos inibidores.

A figura acima ilustra que, através de um conjunto de reações químicas (a via octadecanóide), ocorre a quebra do ácido linolênico e a formação de ácido jasmônico para induzir a expressão do gene dos inibidores de proteinases, bem como os mecanismos de controle, que ocorrem no ambiente intracelular das células vegetais, em resposta ao ataque de insetos herbívoros.

A via de transdução de sinal, que regula a síntese dos inibidores de proteinases, é fundamental para a resposta de defesa da planta induzida pelo ataque de patógenos herbívoros ou por injúria mecânica. Esta via é iniciada pela interação entre moléculas sinalizadoras locais e sistêmicas bem como por receptores na membrana plasmática. Mediante uma injúria mecânica, a resposta de defesa da planta pode ser expressa através da via de sinalização, no local do ferimento ou de maneira sistêmica, através de todos os tecidos da planta. Estes sinais sistêmicos podem ser transportados através do sistema vascular da planta via xilema e floema. A resposta de defesa pode incluir a expressão de múltiplos inibidores de proteinases que podem inibir uma ampla faixa das proteases digestivas dos insetos herbívoros (Koiwa *et al.*, 1997).

Já foi demonstrado que larvas de *Manduca sexta* (Lepidoptera), que ataca plantas de *Nicotiana attenuata*, se movem para longe dos tecidos cuja síntese de JA está aumentada (van Dam *et al.*, 2000). Entretanto, nesta espécie de planta, a concentração de inibidores de proteinases pode aumentar em até quatro vezes, mas somente após cinco dias, podendo favorecer o ataque de insetos (van Dam *et al.*, 2001).

Kim *et al.* (2001), estudaram o efeito de vários estímulos na expressão de inibidores de proteinases em plantas de pimenta *Capsicum annuum* (CaPI-2), que pertence à família Solanaceae, e verificaram que estímulos tais como ferimento, ácido abscísico (ABA), corrente elétrica e tratamento salino aumentaram a concentração de CaPI-2. Foi sugerido, neste trabalho, que os sinais de ferimentos locais e sistêmicos são transmitidos via ácido abscísico e subsequente ácido jasmônico, resultando no acúmulo de transcritos de CaPI-2.

Os inibidores de proteinases de origem vegetal são capazes de inibir, in vitro, proteinases do intestino médio de insetos herbívoros e, em alguns casos,

limitam a herbivoria (Broadway, 1996; 1997).

Vários pesquisadores demonstraram que a introdução de genes que codificam inibidores de proteinases, em uma variedade de plantas agrícolas, pode conferir resistência significativa ao ataque de insetos. Estas proteínas podem retardar o desenvolvimento larval do inseto quando incorporados em dietas artificiais (Johnson *et al.*, 1989; McManus *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 2002b).

McManus & Burgess (1995), encontraram que o inibidor de tripsina extraído de soja (SBTI), foi efetivo na inibição *in vitro* de enzimas tripsina-like, presentes no intestino das larvas de *Spodoptera litura*, pois somente cerca de 12% das enzimas permaneceram ativas. Neste trabalho foi descrito ainda que, durante os três primeiros dias, SBTI causou decréscimo no crescimento e no ganho de peso destas larvas. Estes resultados sugerem que, larvas neonatas podem ser mais suscetíveis aos efeitos dos inibidores de proteinases do que as larvas adultas. Em trabalhos anteriores, Broadway & Duffey (1986) já tinham comprovado que a ingestão de SBTI causava uma hiperprodução de tripsina, causando efeitos deletérios e até mesmo a morte do animal. Gran *et al.* (1993), também mostraram que a inibição do crescimento, em ratos alimentados com dietas contendo inibidores de proteinases ocorreu em animais jovens.

Ceciliani *et al.* (1997), verificaram que as enzimas digestivas tripsina-like, das larvas dos insetos lepidópteros *Adoxophyes orana*, *Hyphantria cunea*, *Lobesia botrana* e *Ostrinia nubilalis* foram claramente inibidas, *in vitro*, pelo inibidor de tripsina tipo Bowman-Birk obtido de sementes de *Medicago scutellata* (MsTI). Entretanto, os autores salientaram que experimentos *in vivo* e com outras enzimas diferentes da tripsina precisam ser feitos para comprovar de fato o efeito do inibidor e o possível uso deste em plantas transgênicas.

Urwin *et al.* (1995), verificaram que plantas transgênicas expressando inibidores de serino ou cisteinoproteinases, foram mais resistentes aos insetos predadores, sugerindo que estas proteínas são importantes no mecanismo de defesa da planta.

Já foi demonstrado que os inibidores de proteinases são proteínas efetivas contra o ataque de insetos, quando são geneticamente expressos a uma

concentração de 1% de proteína solúvel total (McManus *et al.*, 1994) ou numa concentração de 50 a 100µg do tecido da folha (Johnson *et al.*, 1989). Estes e outros estudos são muito relevantes tendo em vista que os insetos são responsáveis por enormes perdas da produção agrícola mundial (Jouanin *et al.*, 1998).

Vários inibidores de tripsina, com efeitos deletérios para o crescimento de insetos, têm sido isolados de plantas (Yeh *et al.*, 1997; Leo *et al.*, 2001).

O inseto *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) é a principal praga de sementes do feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.), causando perdas severas e prejudicando a qualidade do produto (Hall *et al.*, 1997). Macedo *et al.* (2002b) isolaram, de sementes de *Dimorphandra mollis*, um inibidor de tripsina que, em baixas concentrações, causou 50% de mortalidade e 50% de decréscimo no peso das larvas de *C. maculatus*.

O inibidor de α -amilase de *Phaseolus vulgaris* inibe a digestão do amido no intestino dos insetos bruquídeos, prejudicando o crescimento do inseto (Yamada *et al.*, 2001).

Mecanismos de adaptação dos insetos lepidópteros aos inibidores de proteinases (co-evolução inseto-planta)

Algumas espécies de insetos são capazes de superar o efeito tóxico dos inibidores de proteinases devido à síntese de enzimas, no caso a tripsina, que diferem em sua massa molecular e carga e que não são suscetíveis ao efeito dos inibidores (Broadway, 1996; 1997).

Os insetos lepidópteros *Spodoptera frugiperda* (broca da cana) e *Heliothis virescens* (lagarta da-maça-do-algodoeiro), conseguem ter várias plantas como hospedeiras porque são capazes de alterar a sua produção de enzimas de acordo com o alimento que ingerem e, além disso, as novas proteases secretadas em relação ao inibidor são ainda mais eficientes para degradar os inibidores de proteinases das plantas (Terra, 2001).

Segundo Broadway (1997), as alterações fisiológicas provocadas pelos inibidores de proteinases, quando administrados em dietas artificiais, podem ser:

alteração no número de moléculas de enzimas e aumento no nível de atividade de enzimas proteolíticas que não foram suscetíveis à inibição, resultando em degradação do inibidor e aumento no tempo de retenção do alimento no intestino médio até que as enzimas digestivas sejam secretadas para digerir as proteínas da dieta. O grau de aumento da atividade enzimática é diretamente influenciado pela dosagem e pelo tempo de exposição aos inibidores de proteinases, entretanto, nem todos os inibidores são capazes de induzir um aumento do nível de enzimas resistentes, mesmo que ocorra inibição de parte significativa da enzima.

Jongsma & Bolter (1997), verificaram que a incorporação de inibidores de tripsina de soja e de batata na dieta dos insetos *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera – Noctuidae), não causou alteração no crescimento destes insetos. Isto deve ao fato de que a atividade da tripsina não foi reduzida e, além disso, os ensaios com o material fecal mostraram que a mesma quantidade de proteína havia sido digerida pelos intestinos dos insetos alimentados com ou sem o inibidor.

As plantas de *Nicotiana tabacum*, expressando genes do inibidor de tripsina de cevada, também não interferiram no crescimento das larvas do inseto *S. exigua*. Houve apenas uma redução em 25% da atividade das enzimas tripsina-like, porém esta redução foi compensada pelo aumento significativo de enzimas aminopeptidases-like e carboxipeptidase A-like, enquanto que as enzimas quimotripsina-like, elastase-like e carboxipeptidase B-like não foram afetadas (Lara *et al.*, 2000).

De Leo & Gallerani (2002), verificaram que o inibidor de tripsina de mostarda expresso em plantas de tabaco, não causou nenhum efeito no desenvolvimento das larvas de *Spodoptera littoralis* e, após a primeira geração, nenhuma diferença foi observada na atividade das proteases do inseto.

Alarcón *et al.* (2002), estudaram as proteases digestivas de *Rhynchophorus ferrugineus* e sugeriram que a diminuição na atividade das enzimas pode estar relacionada com modificações anatômica e fisiológicas no intestino das larvas.

Alguns pesquisadores já demonstraram que os insetos são capazes de regular o pH do intestino de modo a fornecer condições ótimas para os processos digestivos (Biggs & McGregor, 1996; Felton *et al.*, 1992).

De acordo com Mazumdar-Leighton & Broadway (2001) e Volpicella *et al.* (2003), os insetos *Helicoverpa* spp. são capazes de se adaptarem facilmente às dietas contendo inibidores de proteinases. As larvas do inseto *Helicoverpa zea* bem como de *Agrotis ipsilon* podem apresentar tripsinas constitutivas, representadas por enzimas sensíveis aos inibidores de proteinases, que correspondem ao pool de RNA-m pré-existente e também tripsinas induzidas, que são transcricionalmente reguladas, de acordo com a ingestão de inibidores. Estas compreendem as enzimas insensíveis aos inibidores de proteinases. De fato, a ingestão de inibidores de proteinases de soja induziu uma modificação transcricional das enzimas digestivas presentes no intestino médio desses insetos, sendo que estas enzimas, por sua vez, não foram afetadas pelos inibidores.

O tratamento com inibidores metabólicos, actinomicina D e cicloheximidina, demonstrou que estas enzimas foram primeiramente reguladas a nível transcricional enquanto que a tradução parece ter sido um mecanismo secundário de regulação. Resultados similares foram obtidos para o mosquito *Aedes aegypti*, onde a produção da tripsina ocorre em duas fases celulares (Felix *et al.*, 1991). A primeira fase envolve a tradução do RNA-m pré-existente que codifica a tripsina (Noriega *et al.*, 1996). A segunda fase é afetada por actinomicina D e envolve a “síntese de novo” do RNA-m que codifica também a tripsina induzida (Barillas-Mury & Wells, 1993).

O inibidor de tripsina de soja (STI) pode bloquear a atividade da tripsina induzida ao nível de intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*, após a ingestão de sangue, devido à inibição da atividade da tripsina constitutiva a qual é parte de uma importante via de transdução de sinal responsável pela digestão do sangue e, conseqüentemente, síntese de tripsina induzida (Barillas-Murey *et al.*, 1995).

ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA DOS INSETOS *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* - (Lepidoptera – Pyralidae)

A ordem Lepidoptera agrupa as mariposas e borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas, que possuem aparato bucal mastigador. É a segunda maior ordem de insetos e é composta por espécies primariamente terrestres (Coulson & Witter, 1984).

As espécies pragas da família Pyralidae, que atacam produtos armazenados, estão agrupadas nas subfamílias: Galleriinae, Phycitinae e Pyralinae. Os membros da família Pyralidae são bastante pequenos, com hábitos noturnos e se comportam de maneira muito diversificada, pois são capazes de se adaptarem com facilidade a diferentes ambientes (Borror & DeLong, 1988; Pacheco & De Paula, 1995).

Os insetos lepidópteros possuem serinoproteínases no trato digestório e o pH do intestino médio destes insetos varia entre 8 e 11,5 para que estas enzimas possam ser efetivas (Terra & Ferreira, 1994).

***Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879)**

É uma espécie cosmopolita, predominante em zonas de clima temperado, sendo nativa da Europa. É também conhecida como *Ephestia kuehniella*.

A. kuehniella é um inseto de grande importância econômica, pois ataca grãos e farinha, sendo de ocorrência freqüente em moinhos de farinha. Poucos produtos vegetais secos e armazenados estão protegidos desta pequena traça voraz. Este inseto requer ambientes fechados e de alta temperatura ao longo do ano para obter pleno desenvolvimento. Este inseto possui envergadura de asas de 20 a 25 mm. As larvas medem 15-20 mm e são brancas, às vezes rosadas com a parte posterior da cabeça marron. A pupa mede em torno de 9 mm, em forma de fuso também de cor marrom, alojando-se num casulo. Durante o dia, repousam nas paredes e tetos e voam antes do escurecer. A fêmea deposita cerca de 200 a 300 ovos, mas dependendo da temperatura e umidade, uma fêmea pode depositar

até 562 ovos. A temperatura favorável é de 26°C e a temperatura limite para o desenvolvimento deste inseto é de 35°C. Já a umidade relativa ideal é de 70%. O ciclo de vida total dura em torno de 3 a 4 meses e, sob condições adequadas de temperatura e umidade, têm aproximadamente quatro gerações por ano. Quando adultos este inseto apresenta um tempo de vida curto, de aproximadamente 14 dias. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda, formando teias. Crescem e transformam-se em pupa no próprio alimento que estão infestando. Os adultos não se alimentam e têm o hábito de vôo próximo às estruturas de cobertura (Gallo *et al.*, 1970; Ferguson, 1991).

As larvas vivem na farinha, cereais moídos, fubás, nozes, chocolates, biscoitos, bolos, geléias, amendoim, doces e rações. Em moinhos, a farinha aglutinada muitas vezes obstrui o maquinário causando interrupção da moagem e em armazenagem a granel podem cobrir as paredes com teias que podem servir de abrigo para outros insetos (Pacheco & De Paula, 1995).

A figura 5 apresenta os aspectos do estágio larval e do inseto adulto.

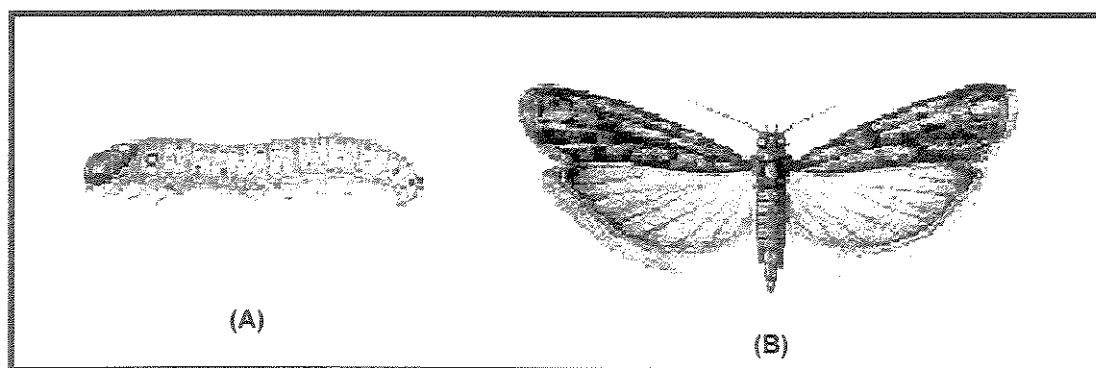


Figura 5. Aspecto do inseto *Anagasta kuehniella*. (A) estágio larval, (B) inseto adulto (Pacheco & De Paula, 1995).

***Corcyra cephalonica* (Staiton, 1865)**

Esta espécie é cosmopolita, comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, atacando um grande número de produtos armazenados como amendoim, sorgo, trigo, arroz, café, cacau, farinhas, frutos secos, chocolate e algodão. É popularmente conhecida com traça do arroz (Gallo *et al.*, 1988; Pacheco & De Paula, 1995).

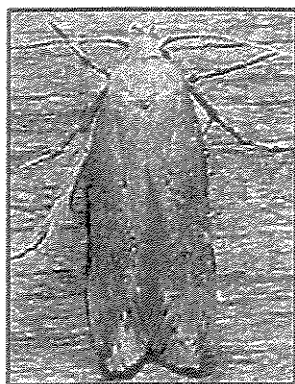
A lagarta de *C. cephalonica* mede até 15 mm de comprimento e apresenta-se nas cores branca ou creme. O corpo é coberto com pêlos finos. As lagartas, normalmente se escondem na própria teia ou entre os grãos. A traça de adulto é cinzenta, freqüentemente com padrões mais escuros nas asas. A envergadura da asa é de 20-23 mm. A traça, normalmente, é vista em números grandes em paredes, postes ou recipientes onde são armazenados (Pacheco & De Paula, 1995).

Os fazendeiros, freqüentemente, tentam limpar os grãos infestados pelo uso de peneiras, mas quando a infestação é muito severa, o grão estragado é usado para alimento de galinha. O ciclo biológico de *C. cephalonica* é muito rápido em produtos triturados como farinha, milho, cevada e trigo. Diferentes populações desta espécie pode apresentar habilidades diferentes para desenvolver-se em diferentes dietas (Cox *et al.*, 1981; Trematerra 1983).

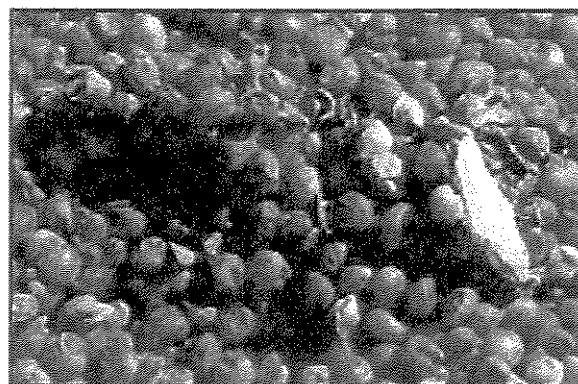
A atividade sexual pode iniciar-se logo após a emergência do adulto e as fêmeas aparentemente acasalam somente uma vez durante o período de 1 a 2 dias após a emergência. Após um período de pré-postura de 2 dias, inicia-se a oviposição, que ocorre predominantemente à noite. Os ovos são pegajosos e colocados em maior número no segundo e terceiro dias após a emergência, podendo a postura continuar após este período. Os ovos são colocados em pequenos grupos, dispersos sobre o produto ou nas paredes dos depósitos. Possuem coloração branco-pérola, variando quanto à forma. Logo após a eclosão, as lagartas procuram o alimento e abrem uma galeria sedosa nos grãos fendidos ou trincados. Em casos de intensa infestação, o produto (Gallo *et al.*, 1988).

A temperatura ideal para o desenvolvimento de *C. cephalonica* é de 30°C e umidade relativa de 60-80% (Shazali & Smith, 1986).

A figura 6 apresenta os aspectos do inseto adulto e a pupa infestando grãos de sorgo.



(A)



(B)

Figura 6. Aspecto do inseto *Corcyra cephalonica*. (A) inseto adulto e (B) pupa em semente de sorgo vermelho (Pacheco & De Paula, 1995).

ASPECTOS DO SISTEMA DIGESTÓRIO DOS INSETOS

Acredita-se que em insetos ancestrais, as células do intestino médio, estejam recobertas por um muco. Este muco gastrointestinal, em animais vertebrados, é uma substância semelhante a um gel composto de mucinas. É proposto que durante a evolução, a membrana peritrófica tenha derivado deste muco gastrointestinal de animais vertebrados. De acordo com esta hipótese, as mucinas deram origem às peritrofinas, proteínas da membrana peritrófica (Forstner & Forstner, 1986).

Ao longo da evolução, as células do intestino médio dos insetos passaram a secretar quitina (polímero de N-acetilglicosamina), fazendo com que a membrana peritrófica (MP) fosse envolvida por uma rede de quitina. Desse modo a MP pode ser definida como um arranjo de quitina em uma matriz de proteínas (peritrofinas) com outros componentes associados, como por exemplo, carboidratos. Com

exceção de algumas espécies de insetos da ordem Hemiptera e Thysanoptera, que apresentam uma membrana perimicrovilar envolvendo suas células intestinas ou alguns insetos adultos que não possuem membrana peritrófica, da ordem Lepidoptera e Hymenoptera, a maioria dos insetos possui membrana peritrófica (Silva *et al.*, 1995).

Os insetos que não possuem membrana peritrófica, ingerem alimentos de baixo peso molecular, cuja digestão luminal é desnecessária. A membrana peritrófica pode ser classificada em dois tipos, de acordo com Peters (1992):

- **Membrana peritrófica tipo I:** é formada por todo o epitélio do intestino médio ou parte dele (anterior e posterior). Está presente em baratas (Dictyoptera), gafanhotos (Orthoptera), besouros (Lepidoptera), abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera), em mariposas e borboletas (Lepidoptera) e mosquitos hematófagos adultos (Lepidoptera). Esta membrana é sintetizada somente após a ingestão do alimento sem afetar a sua eficiência na digestão, uma vez que é formada rapidamente devido à incorporação de um grande número de células, sendo capaz de se expandir para acomodar o alimento.
- **Membrana peritrófica tipo II:** é secretada por poucas colunas de células na entrada do intestino médio, normalmente encontrado em insetos sem restrição alimentar. Este tipo de membrana peritrófica é incapaz de expandir para acomodar o alimento ingerido.

De acordo com Terra (2001), as funções da membrana peritrófica são: compartimentalização dos eventos digestivos, onde a membrana funciona como uma barreira seletiva para enzimas digestivas e produtos da digestão, separando o conteúdo luminal do intestino médio em dois compartimentos distintos: o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico, que confere proteção mecânica e barreira contra microrganismos. A formação da membrana peritrófica ao longo de todo o epitélio intestinal, é característica de seres ancestrais, enquanto que, a falta desta membrana e sua substituição por gel peritrófico é o resultado do processo evolutivo, tal como ocorre em besouros, insetos pertencentes à ordem Coleoptera.

A presença de poros na membrana peritrófica confere permeabilidade a esta estrutura e facilita o fluído e a reciclagem de enzimas digestivas, cada qual

atuando em um compartimento específico, representado pelos espaços endoperitrófico ou ectoperitrófico ou ainda o lúmen das células epiteliais intestinais (Terra, 2001). Acredita-se que as enzimas amilase e tripsina sejam, inicialmente, proteínas integrais da membrana das células epiteliais intestinais que, posteriormente, tornam-se solúveis no interior de vesículas citoplasmáticas. Estas enzimas, quando solúveis, são liberadas dentro do lúmen do intestino médio quando as vesículas se fundem entre si ou com as microvilosidades intestinais. Uma parte das enzimas permanece ligada à membrana e são incorporadas à membrana peritrófica. A presença destas enzimas no espaço ectoperitrófico evidencia que há transporte das mesmas através da membrana peritrófica. Já as enzimas acetilglicosaminidase, que é secretada no espaço ectoperitrófico, não atravessa a membrana peritrófica das larvas de *Spodoptera frugiperda*. Por isso, um estudo comparativo entre os diâmetros de amilase, carboxipeptidase e tripsina com aquele de acetilglicosaminidase, pode ser utilizado como estimativa do tamanho dos poros da membrana peritrófica da larva de *S. frugiperda* (Ferreira *et al.*, 1994).

A permeabilidade da membrana pode ser alterada em função do pH, da concentração de íons e pela presença de calcoflúor (um inibidor de quitinase). Este aumento da permeabilidade pode resultar em aumento de infecção por baculovírus, comprometendo a reciclagem das enzimas digestivas, o que já foi demonstrado com enzimas do intestino médio de larvas de *S. frugiperda*, (Terra, 2001).

Os insetos utilizam serinoproteinases, cisteinoproteinases e proteinases aspárticas como as principais enzimas proteolíticas digestivas (Koiwa *et al.*, 1997).

As etapas da digestão em insetos podem ser classificadas, de acordo com Terra (2001), em:

- **Digestão inicial:** ocorre no interior da membrana peritrófica e as enzimas presentes são tripsina e amilase;
- **Digestão intermediária:** ocorre do externo da membrana peritrófica e as enzimas presentes são: amilase e aminopeptidase;

- **Digestão final:** ocorre na superfície das células do intestino médio (ceco) com participação das enzimas aminopeptidases e maltase.

As figuras 7A e 7B ilustram, respectivamente, as subdivisões do sistema digestório dos insetos e o processo de absorção dos alimentos.

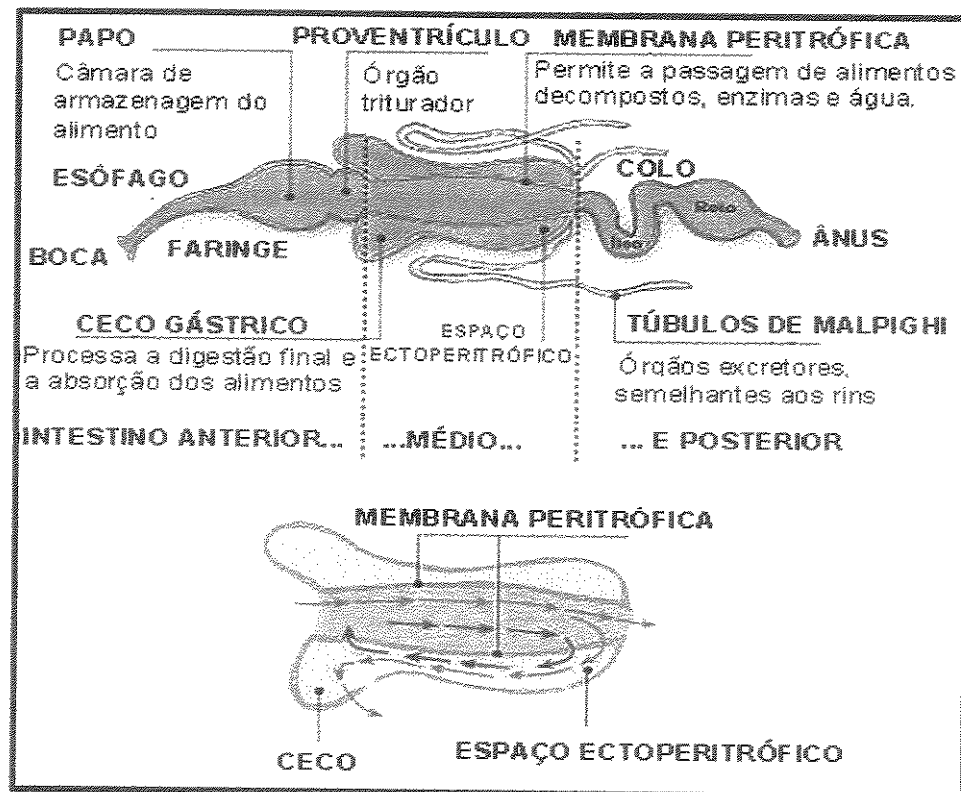
Em insetos mais evoluídos como os lepidópteros, a ação das enzimas limitada a compartimentos específicos e o contrafluxo de fluidos (figura 7A), ampliam a eficiência digestiva e o aproveitamento dos alimentos (Terra, 2001).

Os produtos da digestão são absorvidos no intestino médio, principalmente na parte anterior incluindo o ceco. A absorção também ocorre no intestino posterior, especialmente no reto, entretanto não há evidência de absorção no intestino anterior. As células relacionadas com a absorção são, em alguns casos, as mesmas que produzem enzimas para cada fase diferente do processo de digestão. A absorção pode ser um processo ativo ou passivo. A absorção ativa ocorre se o movimento de uma substância for contra um gradiente de concentração ou contra um gradiente de potencial elétrico. A absorção passiva envolve a difusão de uma substância de um local mais concentrado para outro menos concentrado. A absorção de carboidratos e proteínas depende da concentração destes compostos no intestino e na hemolinfa. Entretanto os produtos derivados da hidrólise de ácidos graxos são absorvidos na forma fosforilada seguida de desfosforilação ao nível do epitélio (Chapman, 1982).

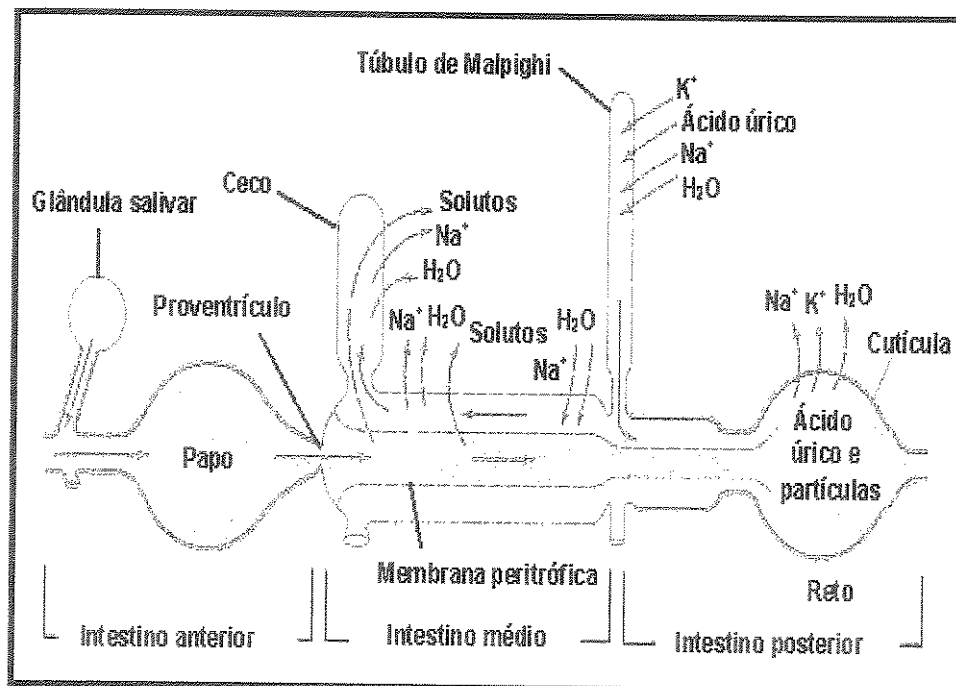
A água, como pode ser observado na figura 7B, é absorvida em várias regiões do intestino médio e esta absorção está relacionada à entrada de íons inorgânicos. O suprimento contínuo de íons é importante para manter a pressão osmótica nos espaços intercelulares. Estes íons podem ser derivados do lúmen intestinal, da reciclagem dentro do epitélio ou da hemolinfa. A figura 7B mostra um esquema geral do canal alimentar dos insetos, o qual é dividido em três regiões distintas: intestino anterior, médio e posterior. Em muitos insetos estas regiões são subdivididas em várias partes funcionais (Chapman, 1982):

- **intestino anterior:** faringe, esôfago, papo e proventrículo;
- **intestino médio:** ceco e ventrículo;

- **intestino posterior:** piloro (que origina as túbulos de Malpighi), íleo (pode funcionar como câmara de fermentação, para a digestão da celulose e serve para a comunicação com o reto), reto (importante para reabsorção de água, sais e aminoácidos provenientes da urina).



(A)



(B)

Figura 7. (A): Esquema das subdivisões do sistema digestório dos insetos (Chapman, 1982; Terra & Ferreira, 1991). **(B):** Esquema ilustrando o movimento de água e solutos dentro e fora do intestino, (Chapman, 1982).

- A partir de identificação prévia da atividade hemaglutinante no extrato total de sementes de *D. regia*, surgiu o interesse em purificar e caracterizar bioquimicamente as frações de extrato total, correspondentes a esta atividade e foi constatado ser uma lectina. Os parâmetros considerados para a caracterização da lectina foram: determinação da massa molecular relativa através de SDS-PAGE, teste de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples, determinação da composição de aminoácidos e da sequência N-terminal, estabilidade térmica e de variação de pH, requerimentos de íons metálicos, tratamento da lectina com agentes desnaturantes (DTT e uréia) e tratamento com metaperiodato de sódio;
- Descrever a caracterização bioquímica completa do inibidor de serinoproteinases de sementes de *D. regia*, através da determinação da estrutura primária desta proteína;
- Comprovar o efeito inibitório *in vitro* de diferentes concentrações do inibidor sobre as enzimas digestivas do intestino médio das duas espécies de insetos lepidópteros;
- Caracterizar a digestibilidade *in vitro* do inibidor em relação às enzimas digestivas (trypsin-like) dos insetos lepidópteros *A. kuehniella* e *C. cephalonica* e também contra a tripsina, através de SDS-PAGE, após incubação em diferentes intervalos de tempo;
- Determinar a estabilidade *in vitro* do inibidor em relação às proteases digestivas (trypsin-like) dos insetos lepidópteros citados acima, através da hidrólise do substrato cromogênico DL-BAPNA, após incubação em diferentes intervalos de tempo;

Artigo publicado

“Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated
from *Delonix regia* seeds”

Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero, L.; Novello, J.C. and Marangoni, S. **Phytochemistry**, v. 57, p. 625-631, 2001.



Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds

Silvana C. Pando^a, Maria L.V. Oliva^{b,*}, Claudio A.M. Sampaio^b, Luciana Di Ciero^a, José C. Novello^a, Sérgio Marangoni^a

^aDepartment of Biochemistry, Institute of Biology, UNICAMP, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

^bDepartment of Biochemistry, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, 04044-900, São Paulo-SP, Brazil

Received 18 September 2000; received in revised form 23 January 2001

Abstract

A serine proteinase inhibitor was purified from *Delonix regia* seeds a Leguminosae tree of the Caesalpinioideae subfamily. The inhibitor named DrTI, inactivated trypsin and human plasma kallikrein with K_i values 2.19×10^{-8} M and 5.25 nM, respectively. Its analysis by SDS-PAGE 10–20% showed that the inhibitor is a protein with a single polypeptide chain of M_r 22 kDa. The primary sequence of the inhibitor was determined by Edman degradation, thus indicating that it contained 185 amino acids and showed that it belongs to the Kunitz type family; however, its reactive site did not contain Arg or Lys at the putative reactive site (position 63, SbTI numbering) or it was displaced when compared to other Kunitz-type inhibitors. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Delonix regia*; Leguminosae; Kunitz inhibitor; Serine proteinase; Trypsin; Human plasma kallikrein

1. Introduction

Serine proteinase inhibitors are found in animal tissues, micro-organisms as well as plant tissues. The inhibitors occur in large quantities in legume seeds and in smaller amounts in cereals, cucurbits, potatoes and other tubers (Richardson, 1991). Two families of plant serine proteinase inhibitors are well characterized, Kunitz-type inhibitors with M_r of 18,000–22,000 Da, a low cystine content and one reactive site; Bowman-Birk-type are proteins with relative molecular mass of 8000–10,000 Da, high cystine content and two reactive sites (Birk, 1985).

The presence of proteinase inhibitors in living tissues seems to be essential for natural regulatory processes, for example, plants protecting themselves against insect predation (Garcia-Carreño, 1996). The stability of proteinase inhibitors towards enzymes as well as the large quantities present in seeds indicates the importance of

protease inhibitors as storage proteins (Ryan, 1973). Besides their biological function, proteinase inhibitors are useful tools in biochemical and physiological studies of proteinase functions (Oliva et al., 1999b); for purification of proteolytic enzymes by affinity chromatography (Sampaio et al., 1974) and for understanding the role of proteolytic enzymes in blood clotting (Hayashi et al., 1994; Oliva et al., 2000a). As a consequence, many aspects of these inhibitors such as occurrence, tissue localization, inhibition specificity, molecular and structural properties, possible regulatory and/or protective function and nutritional significance have been investigated (Bode and Huber, 1992).

Delonix regia (Leguminosae-Caesalpinioideae) is distributed in the north and western parts of Madagascar and is widely cultivated in many tropical countries. The trees of the genus *Delonix* are used as ornamental trees and the seeds of many species are crushed and eaten raw (Puy et al., 1995). The description of a potent inhibitor isolated from *Delonix regia* may contribute to a thorough understanding of a plasma kallikrein action and eventually to the development of synthetic inhibitors based on its structural properties. In the present work we describe the purification, the primary structure and inhibitory

* Corresponding author. Tel.: +55-11-5576-44-44; fax: +55-11-5572-30-06.

E-mail address: maysa.bioq@epm.br (M.L.V. Oliva).

characteristics of the serine proteinase inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds.

2. Results

The inhibitory fraction eluted from a DEAE Sephadex A-50 column was gel filtered on a Sephadex G-75 column and it emerged in the main peak, indicated by "Pool 2" (Fig. 1a). This fraction was further purified on a C-18 μ Bondapak reversed phase column and then purified further using other reversed phase columns (Fig. 1b). Electrophoretic analysis showed that the inhibitor is constituted by a single polypeptide chain in both its native and reduced conditions and the single protein peak eluted from the column corresponds to the inhibitor. The M_r of inhibitor, estimated by SDS-PAGE10–20%, was ca 22 kDa (inset Fig. 1b). The homogenous form of the inhibitor from reversed phase chromatography in HPLC was used for primary structure determination.

The N-terminal region sequence protein, up to residue 50 was established by automated Edman degradation of the protein. Peptide fragments produced by Lys-C, Glu-C and Asp-N cleavage of 4-vinyl pyridine reduced protein, were sequenced following the isolation by reversed phase chromatography. Enough overlaps were obtained to define the primary sequence (Fig. 2). DrTI is related to the Kunitz inhibitor family, the four cysteines residues are conserved, however, in the putative reactive site a glutamic acid was found in the P_1 position instead of Arg or Lys as in most Kunitz inhibitors (Fig. 3).

DrTI inhibited trypsin (K_i 2.19×10^{-8} M) following the slow-tight binding mechanism (Morrison, 1982). Besides trypsin, the inhibitory effect was also assayed on human plasma kallikrein, chymotrypsin, plasmin, factor Xa, tissue kallikrein and thrombin. The inhibitor presented higher affinity toward of human plasma kallikrein (K_i 5.25 nM) with 1:1 stoichiometry. The inhibitory effect of DrTI on trypsin and human plasma kallikrein can be seen in Fig. 4A and B respectively. DrTI did not inhibited factor Xa, plasmin, chymotrypsin, tissue kallikrein and thrombin.

3. Discussion

The purification procedure used to obtain the protein, which show trypsin inhibitor properties, is satisfactory since the products exhibited a single band in SDS-PAGE under reductive conditions, indicating no dimerization of the native inhibitor. DrTI showed M_r of ca 22 kDa, similar to proteinase inhibitors of the Kunitz-type (Richardson, 1991) and the primary structure confirmed this inhibitor as a member of the Kunitz family. The two loops composed by the four half-cysteine show high similarity to other Kunitz inhibitors. This result confirmed the preliminary crystallographic study of DrTI (Polikarpov et al., 1999). An interesting peculiarity of DrTI is that a glutamic acid was found in the expected position for the reactive site (residue 63, SbTI numbering) instead of an Arg or Lys, usually present in other Kunitz inhibitors. The other possibility would be the interaction

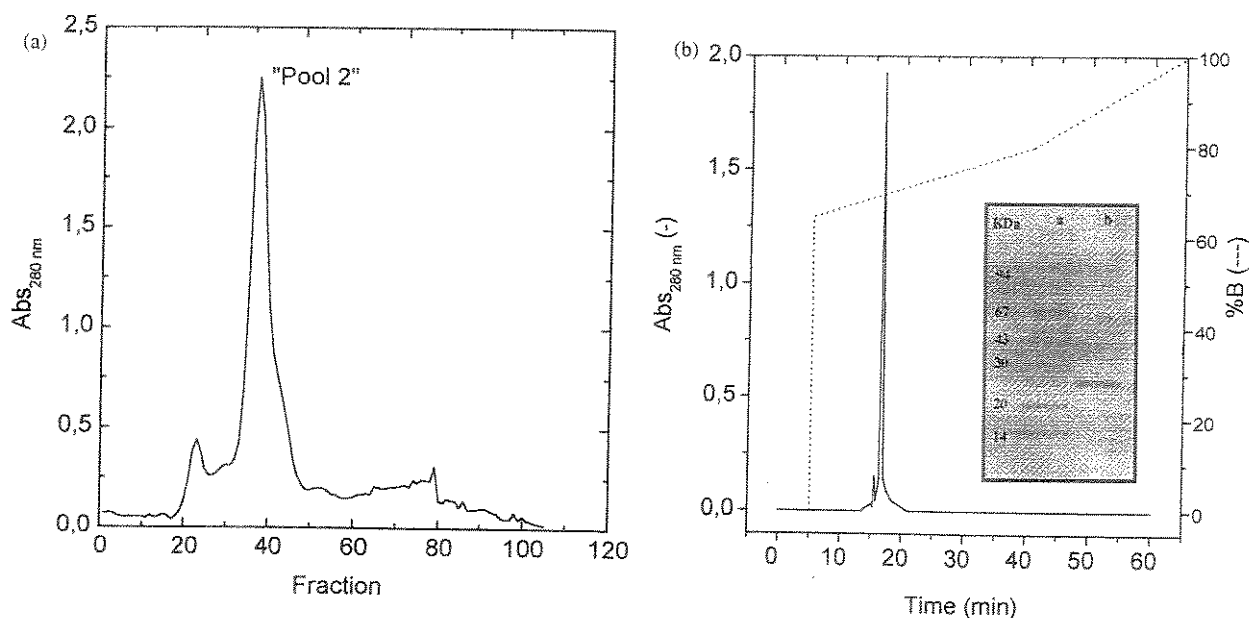


Fig. 1. (a) Gel filtration chromatography profile on Sephadex G-75 column of the DrTI eluted from DEAE Sephadex column. Eluting buffer: 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl. Flow rate: 12 ml h⁻¹. "Pool 2" indicates antitrypsin activity fraction. (b) Repurification by reversed phase HPLC [C-18 μ Bondapak column 3.9×300 mm]. Sample: 2.5 mg of the inhibitor eluted from C-18 μ Bondapak column (7.8×300 mm), using a 0–100% linear gradient of solvent B. Solvent A: 0.1% TFA (ml/ml); solvent B: 60% (ml/ml) acetonitrile in solvent A. Flow rate: 1 ml min⁻¹.

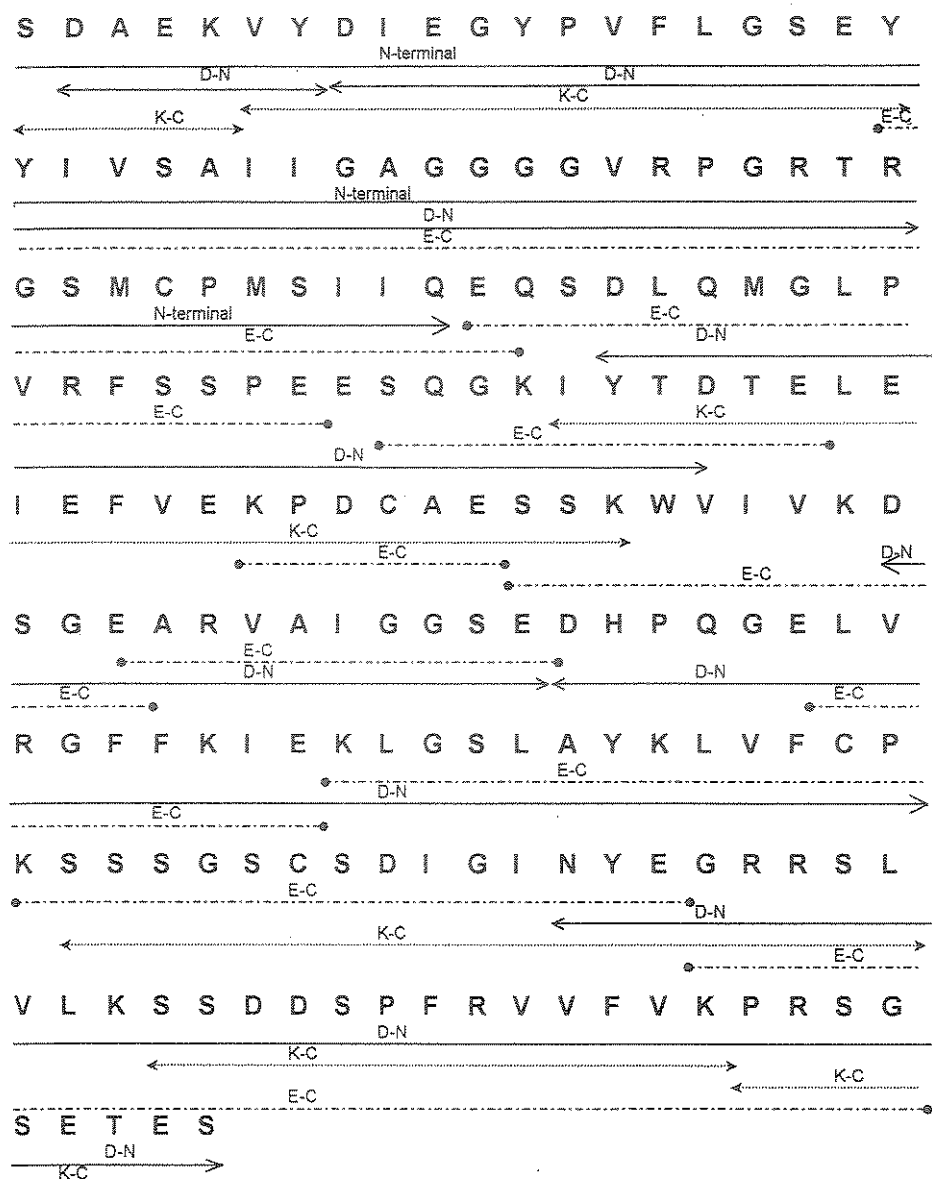


Fig. 2. Amino acid sequence of DrTI. The peptides obtained after fragmentation by enzyme digestion with trypsin, endoproteases Lys-C, Glu-C and Asp-N, are indicated.

of Ser⁶⁴ with the pocket for Arg or Lys found in trypsin and other related proteases. The inhibitor isolated from *Swartzia pickellii* (SwTI) contain a glutamine in the P1 position for the reactive site (Cavalcanti et al., 2001).

Caesalpinia pulcherrima, which also belongs to the subfamily Caesalpinioideae, as well as the *Delonix regia* species, contained only inhibitors of the Kunitz-type, this species is considered to be the most primitive while the species of the subfamily Papilionoideae had only inhibitors of Bowman–Birk type. These facts suggest that there is some relationship between the families of the inhibitors found in leguminous seeds and the evolution of these plants (Norioka and Ikenaka, 1983).

The Bowman Birk-type inhibitors from legume seeds have been found to inhibit both trypsin and chymo-

trypsin at independent reactive sites. On the other hand, the inhibitory activity characteristics of the Kunitz-type proteinase inhibitor are varied. A few inhibitors are reported to be specific for chymotrypsin and do not inhibit trypsin (Joulbert et al., 1981). Some Kunitz-type inhibitors are potent inhibitors for trypsin but they also inhibit chymotrypsin to varying degrees (Odani et al., 1979). DrTI inhibited trypsin but not chymotrypsin.

There are many physiological inhibitors, such as α -2-macroglobulin and the C1 inhibitor, that efficiently act in control of the cascade of proteins during blood clotting (Travis and Salvesen, 1983). However there are vegetable inhibitors that are relatively easy to obtain and which are also efficient for the study of many properties of those proteins (Sampaio et al., 1990).

	1		50
DrTI	SDAEKVYDIE	GYPVFL.GSE	YYIVSAIIGA GGGGVRPGRT RGSMPMSII
SbTI	.. .DFVLDNE	GNPLEN.GGT	YYILSDITAF GG..IRAAPT GNERPLTVV
SwTI	... EFVLDTD	GEPLRN.GGS	YYIVSAIRGA GGGGVKLAKT GNETPLTVV
LlTI	QLVLDL	GDPLYN.GMS	YYILPVARGK GGG.LELART GSES.PRTVV
EcTI	... KELLDS	GDILRN.GGT	YYILPALRGK GGG.LELAKT GDETPLNVV
BvTI-3c	...DTLLD	TD GEVVRN	SSGGR YYIIPAFRGN GGG.KTLS.T GWES.PRTVV
	51		100
DrTI	QEQLDLMGL	PVRFSSPEES	QGKIYTDTEL EIEFVEK... PD.A.ESSKW
SbTI	QSRNELDKGI	GTIISSPYRI	R.FIAEGHPL SLKFDSFAVI MLEVGIPTW
SwTI	QARSDDLGYK	PVRISSPYQI	A.YIYDILIL NLAFAES...V PTEANTPSEW
LlTI	QTRSETSRGL	PARLASPYRI	..LIGSNIPL TIEFQPK.P YSCHGHSSRS
EcTI	QARGETKRGR	PAIIWTPPRI	A.ILTPAFYL NIEFQTKD.L PAALREYSR.
BvTI-3c	QA.NETSDGL	PRLIWTTSRI	L.FIPTGFEL I..FFVEA.V PPNGKPSLW
	101		150
DrTI	VIVKDSGEAR	VAIGGSEDHP	QGELVRGFFK IEKLGSLAYK LVF.PKSSS.
SbTI	SVVEDLPEGP	AVKIGENKDA	MDGWFRLELV SDDEFN.NYK LVF.PQQAED
SwTI	TVVDEQGL.K	SLKITGYNDP	LPGWFRIEKS SLE..S.AYK LMFSPHSGVT
LlTI	LQWKVEKT.Q	MVKIASSDEE	QRLFGPFQIQ PYR..N.HYK LVE.ESES
EcTI	LPREEEQH.S	EVKLAPK.EE	AAAFGXKELK PYR..D.DYK IVY.EGGSDD
BvTI-3c	TKVEGESE.G	SVKIGASDSK	EPFL..FRIK SPE..D.TYK LMY.PONS..
	151		200
DrTI	..GS.SDIGI	NY...EGRRS	LVLKSSDDSP FRVVFVKPRS GSETES....
SbTI	.. DK.SDIGI	SIDHDDGTRR	LVVS..KNKP LVVQFQKLDK ESL
SwTI	.. S..GNVAI	EVD.DEGYRR	LVVTDDKDRA FHVVFVKADS
LlTI	HHDD.SDLGI	SID.DQONRL	LVVKN..GDP LVVQFAKANR GGDDDD....
EcTI	..DS.SDLGI	SID.DENNRR	LVVKD..GDP LAVRFVKAHR RG.....
BvTI-3c	..DT.SDLGI	SID..EGNRR	LVVTD..DNP LTVRFKKADR S.....

Fig. 3. Comparative sequences of related Kunitz inhibitors. 1, DrTI (*Delonix regia* trypsin inhibitor); 2, SbTI (soybean trypsin inhibitor, Koide and Ikenaka, 1973); 3, SwTI (*Swartzia pickellii* trypsin inhibitor, Cavalcanti et al., 2001); 4, LlTI (*Leucaena leucocephala* trypsin inhibitor, Oliva et al., 2000b); 5, EcTI (*Enterolobium contortisiliquum* trypsin inhibitor, Batista et al., 1996); 6, BvTI-3c (*Bauhinia variegata*, var. *candida* trypsin inhibitor, Di Ciero et al., 1998). Reactive sites are in the box and the cysteine residues are indicated by the gray color. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering (Corpet et al., 1998).

DrTI does not inhibit plasmin, tissue kallikrein, factor Xa and thrombin but it is an effective inhibitor of human plasma kallikrein (K_i 5.25 nM) and trypsin (K_i 2.19×10^{-8} M). It is of interest that proteases such as plasmin, tissue kallikrein, factor Xa and thrombin require special structural features of plant inhibitors to suit these enzymes. For example, either Kunitz-type or Bowman-Birk type inhibitors do not inhibit tissue kallikrein, factor Xa and thrombin. Plasma kallikrein, which is not inhibited by Bowman-Birk inhibitors such as lima bean trypsin inhibitor, is usually inhibited by Kunitz-type trypsin inhibitors (Oliva et al., 1999a,b) but not by a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor (Souza et al., 1995).

The selectivity of the inhibitor for different proteases, in opposition to SwTI (Cavalcanti et al., 2001), was changed by the presence of Glu⁶³ at the putative reactive site.

The *Delonix regia* trypsin inhibitor (DrTI) may, therefore, be useful as a tool to investigate the catalytic mechanism of plasma kallikrein. Clinical application of

the plant inhibitors might be feasible in the future (Hayaishi et al., 1994). Furthermore, as the role of inhibitors in plant seeds is not fully understood, further knowledge concerning trypsin inhibitors in plant seeds such as *Delonix regia* may contribute to the understanding of the interactions between plant protease inhibitors and endogenous animal proteases (Xavier-Filho et al., 1989).

4. General experimental procedures

4.1. Enzymes

Human plasma kallikrein (EC 3.4.21.34) was purified by a previous procedure (Oliva et al., 1982). Tissue kallikrein (EC 3.4.21.35) was from Bayer; Bovine trypsin (EC 3.4.21.4), factor Xa (EC 3.4.21.6), human thrombin (EC 3.4.31.5) and chymotrypsin (EC 3.4.21.1) were Sigma products.

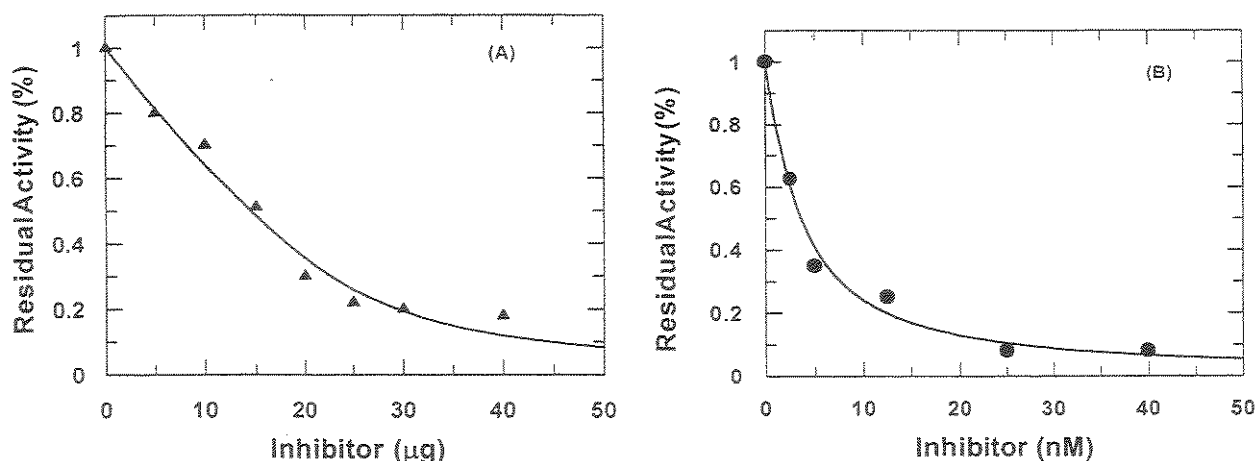


Fig. 4. Curves of trypsin and human plasma kallikrein inhibition by DrTI. (A) trypsin (5 μ g) was preincubated (10 min, 37°C, 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) with increasing concentration of the inhibitor. The residual trypsin activity was assayed on DL- Bz-Arg-pNan (0.1 M) as substrate, as described in Experimental. (B) HuPK (40 nM) was preincubated (10 min, 37°C, 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) with increasing amounts of inhibitor. The residual HuPK activity was assayed on Ac-Phe-Arg-pNan (0.8 mM) as substrate, as described in the Experimental.

4.2. Substrates

H-D-Phe-L-Pip-L-Arg-pNan, DL-Bz-Arg-pNan, Bz-Tyr-pNan and Suc-Phe-pNan were from Sigma Chemical Company; *p*-nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate (NPGb) was from Merck; H-Pro-Phe-Arg-pNan and MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNan were from Calbiochem; Ac-Phe-Arg-pNan was a gift of Dr Maria Juliano, UNIFESP, Brazil.

4.3. Inhibitor purification

Mature seeds of *Delonix regia* (70 g) were milled to a fine powder and submitted to agitation for 1 h at room temperature with 0.15 M NaCl (10%, wt/ml). The suspension was clarified by centrifugation (3000 g, 20 min), the ppt. was eliminated and the supernatant was used for inhibitor purification. Proteins were precipitated with 80% (ml/ml) aqueous acetone with stirring at 4°C. The acetone-dried powder was dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 and centrifuged 3000 g, 20 min. The clear supernatant solution was applied to a DEAE Sephadex A-50 column (27×1.8 cm), equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, at a flow rate 30 ml h⁻¹. Fractions of 3 ml were collected. The active material from the previous step was submitted to gel filtration on a Sephadex G-75 column (102×1.9cm), equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.15 M NaCl at a flow rate 12 ml h⁻¹. The fractions with inhibitory activity were combined, dialyzed against distilled water, lyophilized then applied to a C-18 μ Bondapak reversed phase column (Waters System, 7.8×300 mm). A linear gradient of 0–100% of solvent B (60% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, ml/ml) at a flow rate of 2 ml min⁻¹ was used. The inhibitor was repurified on a C-18 μ Bon-

dapak reversed phase HPLC column (3.9×300 mm) at a flow rate 1 ml min⁻¹. The absorbance at 280 nm was used to follow protein elution. Bovine trypsin inhibitory activity was verified as described in the Experimental.

4.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE was carried out according to (Laemmli, 1970), using 10–20% polyacrylamide as separation gel and 5% as stacking gel. Samples containing 10 μ g of the purified inhibitor, under reducing conditions, were dissolved in 0.08 M Tris-HCl buffer, 2% SDS, 10% glycerol (wt/ml) and 0.02% bromophenol blue, adjusted to pH 6.8 with HCl. Protein bands were stained by Coomassie Brilliant Blue. The M_r standards (Pharmacia) used were phosphorylase B (M_r 94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20100 Da) and α -lactalbumin (14.4 kDa).

4.5. Sequence determination

DrTI reduction with S-4-pyridylethylation was performed as described by (Friedman et al., 1970).

4.6. Endopeptidase Asp-N, Glu-C and Lys-C cleavage

Samples of S-pyridinethylated-DrTI (20 nmol) were incubated with endopeptidase Asp-N and with endopeptidase Glu-C in 0.05 M ammonium acetate buffer, pH 6.5 and pH 4.0 respectively, for 14 h at 37°C, using an enzyme: DrTI ratio of 1:20. The reaction was terminated by adjusting the pH to pH 2.0 and the produced peptides were separated as described by (Oliva et al., 2000a).

4.7. Sequence analysis and mass spectrometry

Edman degradation was performed with a gas-phase sequence equipment (Shimadzu and 473 Applied Biosystem) using the conditions recommended by the manufacturer.

4.8. Sequence comparison

The database from Max Planck Institute for Biochemistry at Martinsried, Germany, was searched using the Lipmann and Pearson fast protein-searching algorithm FASRP (Lipmann and Pearson, 1985). Alignments were optimized using a computer program (Corpet et al., 1998).

4.9. Trypsin inhibition

The concentration of the inhibitor was determined by its absorbance at 280 nm and the extinction coefficient was determined by experimental determination. The inhibitory activity of DrTI on trypsin was determined by measuring the hydrolysis of DL-Bz-Arg-pNan at pH 8.0, according to (Erlanger et al., 1961). The inhibitor was pre-incubated in different concentrations with enzymes (5 µg) prior to substrate addition in 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 8.0, for 10 min at 37°C in 1 ml final volume. The reaction was interrupted by addition of 500 µl of 30% acetic acid (ml/ml). The substrate hydrolysis was followed by absorbance of released *p*-nitroaniline at 405 nm.

4.10. Inhibitory activity on other serine proteinases

The inhibitory activities on human plasma Kallikrein, tissue kallikrein, chymotrypsin, plasmin and thrombin were determined by measuring remaining hydrolytic activity towards synthetic specific substrates after pre-incubation with DrTI. Enzymes or enzyme-inhibitor mixtures (20 µl) were added to a solution containing 1 mM substrate in 0.05 M Tris–HCl buffer, pH 8.0, 37°C, in 200 µl final volume. The reaction was followed for 15–30 min and stopped by addition of 50 µl of 30% acetic acid and the substrate hydrolysis was followed by absorbance at 405 nm in an ELISA reader.

4.11. K_i Determination

The dissociation constants of the enzyme-inhibitor complexes were measured following the procedure described by (Morrison, 1982) and the inhibition constants (K_i) were calculated using a graphite program (Knight, 1986).

4.12. Active site titration

Both trypsin and kallikrein site concentration was determined by *p*-nitrophenyl-*p*-guanidinobenzoate (NPGb) titration, as described previously (Sampaio et al., 1984).

Acknowledgements

This work was partially supported by FAPESP, CAPES, CNPq, SFB 4697 and VW Foundation. We thank the technical assistance of Lucimeire Santana, Reini Mentele and Sonia Andrade for performing the coagulation tests.

References

- Batista, I.F.C., Oliva, M.L.V., Araujo, M.S., Sampaio, M.U., Richardson, M., Fritz, H., Sampaio, C.A.M., 1996. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry* 41, 1017–1022.
- Birk, Y., 1985. The Bowman–Birk inhibitor. *International Journal of Peptide and Protein Research* 25, 113–131.
- Bode, W., Huber, R., 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry* 204, 433–441.
- Cavalcanti, M.S.M., Oliva, M.L.V., Torquato, R.J., Auerswald, E., Coelho, L.C.B.B., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 2001. Determination of the primary structure of a Kunitz-type inhibitor from *Swartzia pickellii* with only one disulfide bridge and one N-glycosylation site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, submitted.
- Corpet, F., Gouzy, J., Kahn, D., 1998. The ProDom database of protein domain families. *Nucleic Acids Research* 26 (1), 323–326.
- Di Ciero, L., Oliva, M.L.V., Torquato, R., Köhler, P., Weder, J.K.P., Novello, J.C., Sampaio, C.A.M., Oliveira, B., Marangoni, S., 1998. The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds. *Journal of Protein Chemistry* 17, 827–834.
- Erlanger, B.F., Kolowsky, N., Cohen, N., 1961. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271–278.
- Friedman, M., Krull, L.H., Cavins, J.F., 1970. The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as S-beta-(4-pyridylethyl) cysteine. *Journal of Biological Chemistry* 245, 3868–3871.
- García-Carreño, F.L., 1996. Proteinase inhibitors. *Trends in Food Science Technology* 7, 197–204.
- Hayashi, K., Takehisa, T., Hamato, N., Takano, R., Hara, S., Miyata, T., Kato, H., 1994. Inhibition of serine proteinases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *Journal of Biochemistry* 116, 1013–1018.
- Joulbert, F.J., Carlsson, F.H., Haylett, T., 1981. Purification and some properties of two proteinase inhibitors (DE-1 and DE-3) from *Erythrina latissima* (Broad leaved *Erythrina* seed). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* 362, 531–538.
- Knight, C.G., 1986. The characterization of enzyme inhibition. In: Barret, A.J., Salvesen, G. (Eds.), *Proteinase Inhibitors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 23–51.
- Koide, T., Ikenaka, T., 1973. Studies on soybean trypsin inhibitor: amino acid sequence of the carboxyl terminal region and the complete amino acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *European Journal of Biochemistry* 32, 417–431.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lipmann, D.J., Pearson, W.R., 1985. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 85, 2444–2448.
- Morrison, J.F., 1982. The slow-binding and slow tight-binding inhibition of enzyme catalyzed reactions. *Trends in Biochemical Science* 7, 102–105.

- Norioka, S., Ikenaka, T., 1983. Amino acid sequences of trypsin-chymotrypsin inhibitors (A-I, A-II, B-I and B-II) from peanut (*Arachis hypogaea*): a discussion on the molecular evolution of legume Bowman-Birk type inhibitors. *Journal of Biochemistry* 94, 589–599.
- Odani, S., Ono, T., Ikenaka, T., 1979. Proteinase inhibitors from Mimosoideae Legume, *Albizia julibrissin*. *Journal of Biochemistry* 86, 1795–1805.
- Oliva, M.L.V., Andrade, S., Batista, I.F.C., Sampaio, M.U., Juliano, M., Fritz, H., Auerswald, E.A., Sampaio, C.A.M., 1999a. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. *Immunopharmacology* 45, 141–149.
- Oliva, M.L.V., Grisolia, D., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 1982. Properties of highly purified human plasma kallikrein. *Agents and Actions* 9, 52–57.
- Oliva, M.L.V., Mendes, C.R., Juliano, M.A., Chagas, J.R., Rosa, J.C., Greene, L.J., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 1999b. Characterization of a tissue kallikrein inhibitor isolated from *Bauhinia bauhinoides* seeds: inhibition of the hydrolysis of kininogen related substrates. *Immunopharmacology* 45, 163–169.
- Oliva, M.L.V., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F.C., Araujo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 2000a. Effect of a serine proteinase inhibitor from *Leucaena leucocephala* on plasma kallikrein and plasmin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 1–2.
- Oliva, M.L.V., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F.C., Araujo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 2000b. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 64–74.
- Polikarpov, I., Golubev, A.M., Perles, L., Pando, S.C., Novello, J.C., Marangoni, S., 1999. Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds. *Acta Crystallographica Section D* 55, 1611–1613.
- Puy, D.J.Du., Phillipson, P.B., Rabevohitra, R., 1995. The genus *Delonix* (Leguminosae-Caesalpinioideae) in Madagascar. *Kew Bulletin* 50, 445–475.
- Richardson, M., 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 259–305.
- Ryan, C.A., 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 173–196.
- Sampaio, C.A.M., Sampaio, M.U., Prado, E.S., 1984. Active titration of horse urinary kallikrein. *Hoppe-Seyler Physiologische Chemie* 365, 297–302.
- Sampaio, M.U., Tanaka, A.S., Oliva, M.L.V., Batista, I.F.C., Motta, G., Stella, R.C.R., Sampaio, C.A.M., 1990. Plant proteinase inhibitors. Action on blood clotting contact phase enzymes. In: Filho, B.O., Sgarbieri, V. (Eds.), *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*. Unicamp, Campinas, pp. 57–65.
- Sampaio, C., Wong, S.C., Shaw, E.N., 1974. Human plasma kallikrein. Purification and preliminary characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 165, 133–139.
- Souza, E.M.T., Mizuta, K., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., 1995. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *Phytochemistry* 39, 521–525.
- Travis, J., Salvesen, G.S., 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Annual Review of Biochemistry* 52, 655–709.
- Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P., Ary, M.B., Silva, C.P., Carvalho, M.M.M., Macedo, M.L.R., Lemos, F.J.A., Grant, G., 1989. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 37, 1139–1143.

Artigo publicado

**"Biochemical characterization of a lectin
from *Delonix regia* seeds"**

**Pando, S.C.; Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Novello, J.C. and
Marangoni, S. *Journal of Protein Chemistry*, v. 21, p. 279-285, 2002.**

Biochemical Characterization of a Lectin from *Delonix regia* Seeds

S. C. Pando,^{1,3} M. L. R. Macedo,² M. G. M. Freire,¹ M. H. Toyama,¹ J. C. Novello,¹ and S. Marangoni¹

Received December 26, 2001

A lectin from *Delonix regia* (DRL) seeds was purified by gel filtration on Sephadex G-100 followed by ion-exchange chromatography on diethylaminoethyl-Sephadex and reverse-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. Hemagglutinating activity was monitored using rat erythrocytes. DRL showed no specificity for human erythrocytes of ABO blood groups. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) revealed a single protein in the presence of 0.1 M of dithiothreitol (DTT) and in nonreducing conditions. Native-PAGE showed that DRL is a monomer with a molecular mass of about 12 kDa, as determined by denaturing gel electrophoresis and gel filtration chromatography. An amino acid composition revealed the absence of cysteine residues, the presence of 1 mol methionine/mol protein and a high proportion of acidic amino acids and glycine. The N-terminal sequence of DRL was determined by Edman degradation, and up to 16 amino acid residues showed more than 90% homology with other lectins from the Leguminosae family. The optimal pH range for lectin activity was between pH 8.0 and 9.0, and the lectin was active up to 60°C. The lectin required Mn^{2+} for hemagglutinating activity and remained active after reduction with 0.1 M of DTT, but lost activity in the presence of 8 M of urea. Sodium metaperiodate had no effect on the activity of DRL.

KEY WORDS: *Delonix regia*; glucose/mannose lectin; Leguminosae seeds; N-terminal sequence.

1. INTRODUCTION

Goldstein and Poretz (1986) defined lectins as proteins or glycoproteins of nonimmune origin capable of interacting specifically with carbohydrates to agglutinate vegetable and/or animal cells and to precipitate polysaccharides, glycoproteins, or glycolipids. According to Peumans and Van Dame (1995), this definition implies that different glycoconjugates with identical or structurally similar carbohydrates can act as receptors for the same lectin.

Lectins are widely distributed in nature and are ubiquitous in animals, plants, insects, and microorganisms (Rini, 1995). The most investigated lectins are those from plants, in particular from the family Leguminosae, which form a large group of structurally similar proteins with different carbohydrate specificities (Crispeels *et al.*, 1991).

Legume lectins are the most studied plant proteins. Hundreds of these proteins have been isolated and their chemical, physicochemical, structural, and biological properties characterized (Gatehouse *et al.*, 1995). Several

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Naturais, Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, CEUL, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS, Brasil.

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: scpando@unicamp.br

⁴ Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DEAE, diethylaminoethyl; DRL, *Delonix regia* lectin; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylene diamine tetracetic acid; EGTA, ethylene glycol tetracetic acid; HCl, hydrochloric acid; HPLC, high-performance liquid chromatography; kDa, kilo Dalton; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PTC, phenylthiocyanate; PTH, phenylthiohydantoin; SDS, sodium dodecyl sulfate; TFA, trifluoroacetic acid; Tris, hydroxymethyl aminomethane; BGL, *Vigna mungo* lectin.

legume species contain proteins that are clearly related to the lectins but are devoid of carbohydrate-binding activity. Well-known examples of this group of proteins are the *Phaseolus vulgaris* arcelins and the α -amylase inhibitor (Mirkov *et al.*, 1994). Legume lectins account for from 2% to 10% of the soluble proteins of mature seeds from which they are generally isolated (Osborn *et al.*, 1985).

The molecular mass of legume lectin subunits is around 30 kDa, with the fully active lectin forming either dimers or tetramers (Rüdiger, 1998).

To protect their storage organs against attack by parasites or predators, plants have developed efficient defense mechanisms, some of which are based on morphological adaptations, physical barriers, or the accumulation of toxic low molecular weight compounds (saponins, alkaloids, glycosides, and antibiotics). Many of the proteinaceous toxins that protect plant storage organs include ribosome-inactivating proteins, antifungal proteins, proteinase inhibitors, and lectins. Most plant lectins are designed to bind foreign glycoconjugates and may thus play a role in plant defense mechanisms (Peumans and Van Damme, 1995).

The specific recognition of carbohydrates by lectins is critical for cell-cell interactions such as those required during fertilization, embryogenesis, lymphocyte-homing, tissue development and host-pathogen interactions (Bookbinder *et al.*, 1995; Sharon and Lis, 1995). Hence, understanding lectin-carbohydrate interactions at the molecular level (Rini, 1995; Sharon, 1993) has implications for interactions in several areas of biology and medicine (Beuth *et al.*, 1995). Furthermore such studies may contribute toward the elucidation of the interaction between proteins and carbohydrates and may reveal novel approaches for the purification and characterization of glycoconjugates.

This article describes the purification and biochemical characterization of a lectin from *Delonix regia*⁴ seeds, a specie belonging to the Leguminosae-Caesalpinioideae family that is distributed in the north and western parts of Madagascar. *Delonix regia* is widely cultivated in many tropical countries; as with many species *Delonix*, the seeds may be crushed and eaten raw (Puy *et al.*, 1995).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Purification of *Delonix regia* lectin

Whole *Delonix regia* lectin (DRL)⁴ seeds were finely ground in a blender, and a fine powder was obtained. The powder was stirred into a saline solution (0.15 M of NaCl, 10% w/v) for 2 hr at room temperature. The homogenate was then centrifuged (20 min, 5000 g). The

resulting clear supernatant was filtered, dialyzed with distilled water, and lyophilized. This material (450 mg) was dissolved in 0.05 M of hydromethyl aminomethane (Tris)-HCl, 0.15 M of NaCl buffer, and applied to a column of Sephadex G-100 (1.9 $\times$ 80 cm), equilibrated with 0.05 M of Tris-HCl buffer, containing 0.15 M of NaCl, pH 8.0, at a 17-ml/hr flow rate. Fractions containing hemagglutinating activity (65 mg) were further purified by ion-exchange chromatography on a diethylaminoethyl (DEAE)-Sephacrose column (1.8 $\times$ 27 cm), equilibrated with 0.05 M of Tris-HCl buffer, pH 8.0, at a 30-ml/hr flow rate, resulting in 13.5 mg of lectin. A fraction of this material was submitted to reverse-phase chromatography on a μ -Bondapak C-18 column (3.9 $\times$ 300 mm) coupled to a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. A linear gradient of 0% to 100% solvent B (66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), v/v) at a 1-ml/min flow rate was used. The protein elution profiles were monitored at 280 nm.

2.2. Preparation of Erythrocytes

Blood was collected from rats and immediately mixed with Alsever solution (2.05% glucose, 0.8% sodium citrate, 0.42% NaCl). The pH of this solution was adjusted to 6.1 using citrate. After centrifugation at 1000 g for 10 min, the packed erythrocytes were washed four times with 0.15 M NaCl. The pellet was finally resuspended in the same solution to give a 2% suspension.

2.3. Hemagglutination Assay

Hemagglutinating activity was measured in V-bottomed 96-well plates in a final volume of 150 μ l containing 50 μ l of 2% rat erythrocytes, 50 μ l of 0.15 M NaCl, and 50 μ l of purified lectin in serial twofold dilutions. Agglutination was visually recorded after 1 hr at room temperature. Activity was expressed as the titer, which corresponded to the reciprocal of the highest dilution producing hemagglutination. The hemagglutinating activity was also assayed using human erythrocytes (A, B, and O), as described above. The protocol of hemagglutination assay also was used as a standard procedure to determine the biochemical characterization of DRL.

2.4. Inhibition of Hemagglutination

A solution of 50 μ l of lectin (45 μ g) was preincubated with an equal volume of serial dilutions of 0.1 M of monosaccharides and disaccharides (50 μ l per well) followed by the addition of 50 μ l of 0.15 M NaCl. The

mixture was allowed to interact for 20 min at room temperature. Rat erythrocyte suspension (2%) was added to each well (50 μ l), and the plates were again incubated for 1 hr at room temperature before examination. The minimum concentration of carbohydrate showing inhibition of hemagglutination was recorded.

2.5. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out according to Laemmli (1970), using 12.5% separating and 5% stacking gels, under reducing and nonreducing conditions. The Native PAGE was done using a similar method but without SDS. Protein bands were detected by silver staining. The molecular mass standards (Pharmacia) used were: phosphorylase B (94 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa).

2.6. Amino Acid Analysis

Amino acid analysis was carried out on a Pico-Tag amino acid analyzer (Waters System) as described by Henrikson and Meredith (1984). One nanomole of DRL was hydrolyzed in 6 M of HCl 1% phenol at 106°C for 24 hr. The hydrolyzate reacted with 20 ml of fresh derivatization solution (methanol:triethylamine:water:phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) for 1 hr at room temperature. After precolumn derivatization, phenylthiocyanate (PTC) amino acids were identified on a reverse-phase HPLC column by comparing their retention times to those of standard PTC amino acids (Pierce). Cysteine residues were quantified as cysteic acid.

2.7. N-terminal Amino Acid Sequence

The N-terminal amino acid sequence of DRL was determined by direct sequencing using automated Edman degradation in a PROCISE amino acid sequencer (Applied Biosystems, USA). The PTH amino acids were identified in a 140C microgradient phenylthiohydantoin (PTH) amino acid analyzer model, based on their retention times.

2.8. Effect of pH

In order to determine the stability of DRL, buffers with a pH ranging from 2 to 10 were used as follows: 0.1-M sodium citrate buffer (pH 2.0–5.0), 0.1-M sodium

monobasic phosphate buffer (pH 6.0–8.0), and 0.1-M sodium bicarbonate buffer (pH 9.0–10.0). A volume of 50- μ l lectin solution (45 μ g) was incubated with 50 μ l of buffer for 1 hr at 37°C. The samples were adjusted to a pH of 8.0 and assayed for hemagglutination assay.

2.9. Effect of Temperature

Inactivation of DRL was studied by incubating samples at various temperatures. A lectin solution (45 μ g) was dissolved in saline solution (0.15 M NaCl) and heated for 30 min at 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, and 100°C. Aliquots of 50 μ l of heated lectin solution were rapidly cooled on ice and assayed for hemagglutination assay.

2.10. Treatment with Dithiothreitol and Urea

A solution of dithiothreitol (DTT) (10 mM) and urea (8 M) was prepared by adding 1 ml of 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0 buffer, with each containing 0.15 M of NaCl. The purified lectin (45 μ g) was then added to the solution, and the mixture was incubated overnight at 25°C with an equal volume of this solution. The pH was adjusted to 7.0 and the residual hemagglutinating activity was monitored.

2.11. Treatment with Metaperiodate

Lectin (45 μ g) was dissolved in 1 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, and incubated with metaperiodate (10 mM) for 10 min in the dark at room temperature. This mixture was dialyzed against 0.15 M of NaCl for 24 hr. After the dialysis the pH was adjusted to 7.0 with 0.1 N of NaOH, and hemagglutinating activity was verified.

2.12. Effect of Ethylene Diamine Tetracetic Acid and Divalent Cations on Hemagglutinating Activity

Purified lectin (5 mg) was dissolved in and dialyzed exhaustively (48 hr) against 0.025 M of ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), followed by dialysis against 0.15 M of NaCl (24 hr). The hemagglutinating activity was assayed before and after the addition of 0.01 M of CaCl_2 and MnCl_2 . The hemagglutinating activity was determined as described in Materials and Methods.

2.13. Protein Quantification

Protein concentration was determined according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The crude extract obtained from *Delonix regia* seeds was submitted to gel filtration, ion exchange, and reverse-phase HPLC chromatography. The hemagglutinating activity of the eluted fractions, in each step, was assayed using rat erythrocytes. Following gel filtration on Sephadex G-100, DRL eluted in pool 3 (Fig. 1). The main lectin peak in ion exchange chromatography was eluted with 0.25 M of NaCl (Fig. 2). Reverse-phase HPLC of this fraction (Fig. 3) resulted in a protein that eluted as a single peak with a linear gradient of 66% acetonitrile in 0.1% TFA.

Electrophoretic analysis showed that DRL is a monomer with a molecular mass of about 12 kDa, as determined by denaturing gel electrophoresis (SDS-PAGE). In both reducing (0.1 M of DTT) and nonreducing conditions, DRL migrated as a single polypeptide band in SDS-PAGE. In Native PAGE, DRL also showed a single protein band after silver staining (Fig. 4), confirming the homogeneity of the protein. Only a limited number of lectins consist of a single polypeptide chain (Suvachittanout and Peutpaiboon, 1992; Utarabhand and Akkayanont, 1995; Ray and Chatterjee, 1995).

The presence of lectins can be detected by incubation with human or animal erythrocytes (Ohsawa *et al.*, 1990; Ozeki *et al.*, 1991). The sensitivity of cells to lectin agglutination can be increased by enzymatic

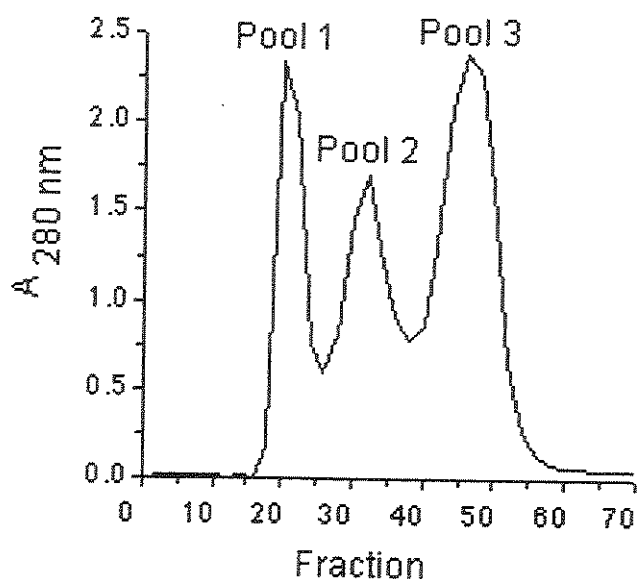


Fig. 1. Gel filtration chromatography of a crude extract of *Delonix regia* seeds on a Sephadex G-100 column (1.9 × 80 cm). Buffer: 0.05 M of Tris-HCl, 0.15 M of NaCl, pH 8.0. Sample: 300 mg of crude extract from *Delonix regia* seeds. Pool 3: Hemagglutinating activity of DRL. Fractions (2.0 ml/tube) were collected at a 17-ml/hr flow rate. The elution profile was monitored at 280 nm.

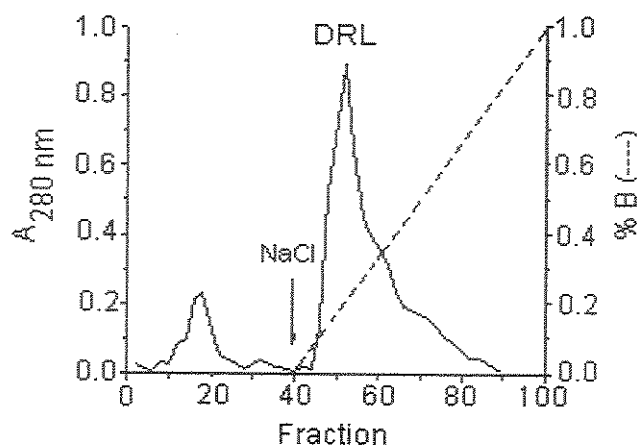


Fig. 2. Ion exchange chromatography of *Delonix regia* lectin (DRL) on a DEAE-Sephacrose column (1.8 cm × 27 cm). Buffer A: 0.05 M of Tris-HCl, pH 8.0. Buffer B: 0.05 M of Tris-HCl, 0.2 M to 1 M of NaCl, pH 8.0. Sample: 65 mg of DRL eluted by gel filtration chromatography. Fractions (2.5 ml/tube) were collected at a 30-ml/hr flow rate. The absorbance was monitored at 280 nm.

(trypsin, papain, or neuraminidase) or chemical (glutaraldehyde or formaldehyde) treatments (Sharon and Lis, 1972). Other methods can also be used to identify lectin activity, such as a photometric assay (Teichberg *et al.*, 1988) and affinity electrophoresis (Goldstein and Hayes, 1978).

Table I shows that DRL was inhibited specifically by 0.048 mM of glucose, indicating that DRL belongs to the group of mannose/glucose plant lectins. This lectin is nonspecific toward human blood groups, thus resembling the lectins from peas and lentils (Baumann *et al.*, 1982).

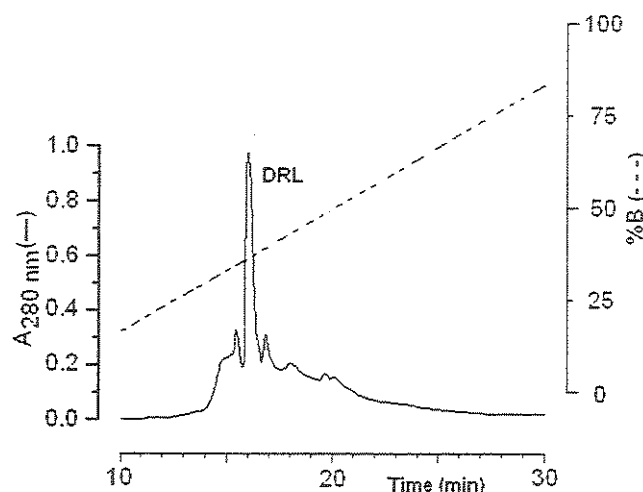


Fig. 3. Reverse-phase HPLC on a μBondapak C18 column (3.9 × 300 mm). Buffer A: 0.1% TFA. Buffer B: 66% acetonitrile in 0.1% TFA (v/v). Sample: 1 mg of the DRL peak eluted from the DEAE-Sephacrose column. Flow rate: 1 ml/min. The elution profile of DRL was monitored at 280 nm.

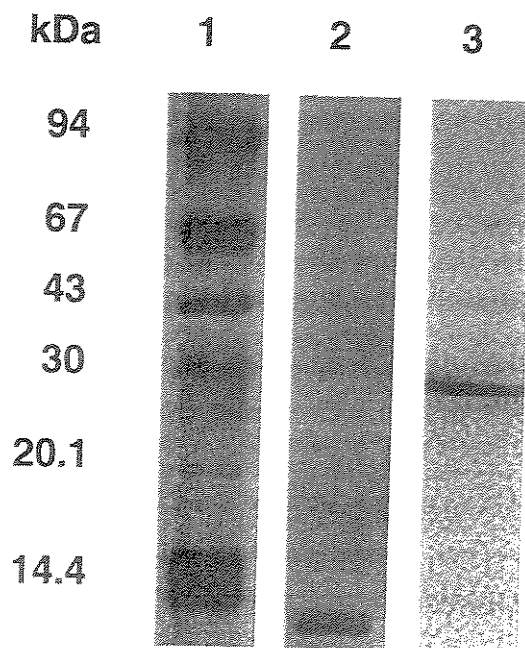


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of DRL. Lane 1, molecular weight markers from Pharmacia. Lane 2, 30 μ g of DRL in the presence of SDS. Lane 3, 30 μ g of DRL in native PAGE. The gels were silver stained.

Lectins nonspecific for A, B, and O blood types may exhibit monosaccharide and/or oligosaccharide specificity (Atta *et al.*, 1990). The lectins from peas, lentils, and broad beans also bind α -glycosides of glucose and mannose and resemble the lectin from *Vicia cracca* with the same carbohydrate specificity (Rüdiger, 1998). Lectins from the Leguminosae family are the most thoroughly investigated group of plant sugar-binding proteins. The amino acid composition of DRL showed a high content of aspartic acid, glutamic acid, and glycine but only one methionine residue. Cysteine residues were not detected, as follows: Asp 8, Glu 24, Ser 5, Gly 15, His 3, Arg 7,

Table I. Inhibition of the Hemagglutinating Activity of DRL, Using Rat Erythrocyte Suspension (2%, v/v)

Sugar	IC ₅₀ (mM) ^a
D - Lactose	50
D - Galactose	50
D - Raffinose	50
D - Maltose	50
D - Sucrose	25
D - Glucose	0.048
D - Fructose	50
D - Mannose	50
D - Galactosamine	50
D - Glucosamine	25

^aConcentration required to inhibit the hemagglutinating activity by 50%. The amount of DRL used was 45 μ g.

Thr 5, Ala 9, Pro 5, Tyr 2, Val 4, Met 1, Cys 0, Ile 2, Leu 2, Phe 1, and Lys 8 (Table II). Similar results were reported for the amino acid composition of a lectin from *Dioclea lehmanni* seeds (Perez, 1998). Despite their relatively conserved primary structures, legume lectins exhibit considerable diversity in their glycan-binding specificities (Elgavish and Shaanan, 1997). These lectins are generally rich in glutamic acid, glutamine, and aspartic acid, but poor in sulfur amino acids (Rüdiger, 1997).

Figure 5 shows the N-terminal amino acid sequence of DRL and indicates that DRL has a high identity with the lectins of the others legumes, such as lentils (Foriers *et al.*, 1981), as well as with the lectin pea A (Rini *et al.*, 1993), concanavalin A (Carrington *et al.*, 1985), isolectin β 1 (Wright, 1989), flavin (Hopp *et al.*, 1982), and man-nose lectin (Van Damme *et al.*, 1993).

The pH dependence of DRL was determined by incubating the protein in different buffers, such as 0.1 M of sodium citrate buffer (pH 2.0–5.0), 0.1 M of sodium monobasic phosphate buffer (pH 6.0–8.0), and 0.1 M of sodium bicarbonate buffer (pH 9.0–10.0). The lectin was active between a pH of 8 and 9. A further increase in pH of the buffer (beyond pH 10) reduced the hemagglutinating activity of DRL by 40% (Fig. 6). Similar results were reported for the lectin from *Parkia javanica* beans (Utarabhand and Akkayanont, 1995). DRL was inactivated at pH 2 to 3. However, the optimum pH for agglutination by the *Vigna mungo* lectin (BGL) was between 4 and 5, with a large loss of activity (about 90%) at pH 8. Lectins from species of Amaryllidaceae and Alliaceae are stable over a pH range of 2 to 13 and are heat-resistant up to 80°C. DRL retained 70% of its hemagglutinating activity after 30 min at 100°C (Fig. 7), whereas BGL lost 50% of its hemagglutinating activity within 10 min at 45°C (Suseelan *et al.*, 1997). A general property of most proteins involved in plant defense mechanisms is their marked heat stability (Peumans and Van Damme, 1995).

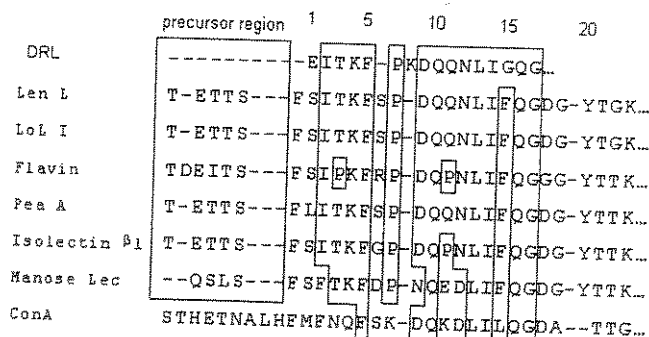


Fig. 5. Comparison of the N-terminal sequence of DRL with other legume lectins. Conserved residues are boxed.

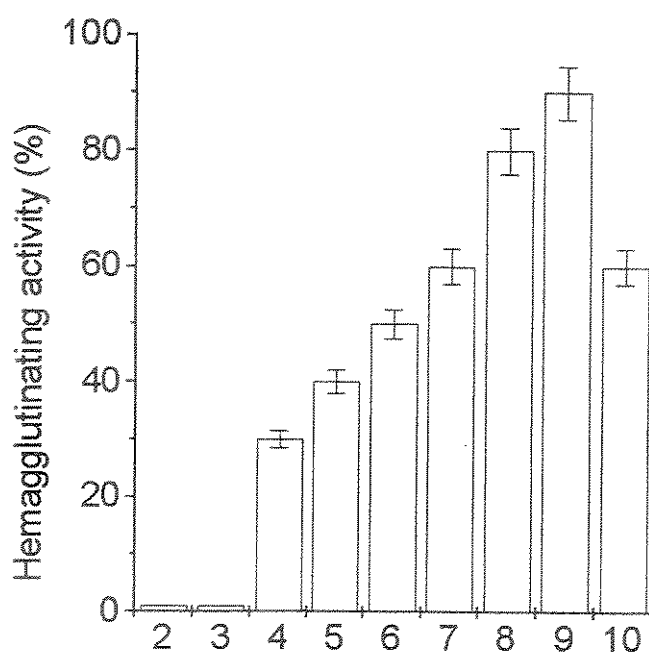


Fig. 6. pH stability of the hemagglutinating activity of DRL. The bars represent the mean of four assays.

The treatment with EDTA decreased the activity of DRL, but when 0.01 M of Mn^{2+} was added to the mixture, about 50% of the hemagglutinating activity was recovered. These results suggest that DRL required Mn^{2+} for full hemagglutinating activity but did not require calcium. The lectin isolated from *Artocarpus incisa* seeds did not need divalent ions (Ca^{2+} and Mn^{2+}) for activity (Moreira *et al.*, 1998). However, *Cajanus cajan* lectin required one Ca^{2+} and one Mn^{2+} ion per mole for full ac-

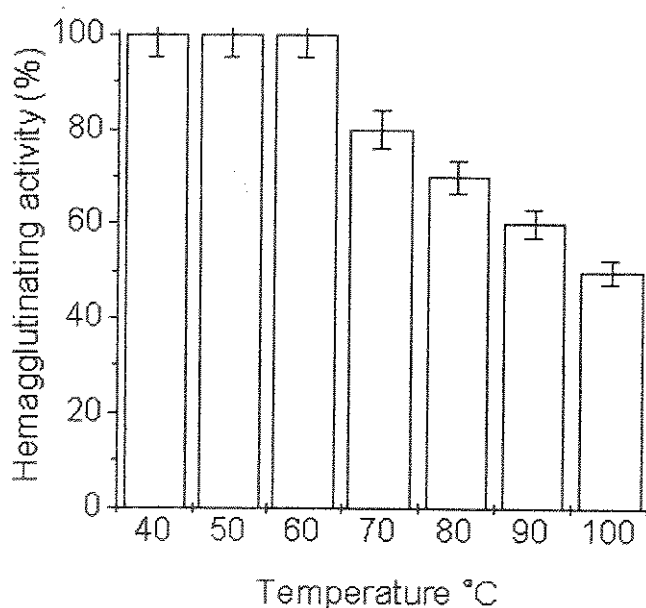


Fig. 7. Heat stability of the hemagglutinating activity of DRL. The bars represent the mean of four assays.

Table II. Amino Acid Composition of DRL

Amino acid	% Amino acid/Mol
Asp	8
Glu	24
Ser	5
Gly	15
His	3
Arg	7
Thr	5
Ala	9
Pro	5
Tyr	2
Val	4
Met	1
Cys	0
Ile	2
Leu	2
Phe	1
Lys	8

tivity (Ahmad *et al.*, 1999). The *P. javanica* lectin was not affected by EDTA or ethylene glycol tetracetic acid (EGTA) at 0.04 M, since metal ions bind strongly to this lectin (Utarabhand and Akkayanont, 1995). The carbohydrate binding activity of legume lectins depends on the simultaneous presence of calcium and a transition metal ion. These metal binding sites are extremely well conserved in all legume lectins (Loris *et al.*, 1998).

The hemagglutination activity of DRL was fully preserved after reduction with 0.01 M of DTT, indicating the absence of cysteine residues in this protein. Urea completely eliminated DRL activity, suggesting that hydrophobic interactions contribute to the stabilization of the protein binding site. Urea is commonly used as a denaturing agent for proteins because it can affect both hydrogen and hydrophobic bonds (Wang *et al.*, 2000). Whereas the treatment with sodium metaperiodate, a selective oxidant for compounds with carbohydrates, had no effect on the hemagglutinating activity of DRL, the chemical oxidation of the carbohydrates of the glycoproteins from *Taenia solium* reduced the antigenicity of the molecules to variable extents (Obregón-Henao *et al.*, 2001).

in the targeting of cells and soluble components, fertilization, cancer metastasis, and growth and differentiation. Legume lectins are the model system of choice to study the molecular basis of these recognition events because they are easy to purify in large quantities and ex-

hibit a wide variety of carbohydrate specificities, despite their marked sequence conservation (Rüdiger, 1997).

Plant lectins may be used as analytical or preparative tools in glycoconjugate purification and as bioactive proteins for the induction of particular processes in cells or organisms. Plant lectin research that deals with the structure, specificity, and functional relationships of the different lectin groups is important for the complete understanding of these proteins (Peumans and Van Damme, 1998).

REFERENCES

- Ahmad, S., Khan, R. H., and Ahmad, A. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* **1427**, 378–384.
- Animashaun, T., Togun, R. A., and Hughes, R. C. (1994). *Glycoconj. J.* **11**, 299–303.
- Atta, A. M., Menezes, E. P., Peixinho, S., and Souza-Atta, M. L. B. (1990). *Braz. J. Biol. Res.* **23**, 191–194.
- Baumann, C. M., Strosberg, A. D., and Rüdiger, H. (1982). *Int. Eur. J. Biochem.* **122**, 105–110.
- Beuth, J., Ko, H. I., Pulverer, G., Uhlenbruck, G., and Pichlmaier, H. (1995). *Glycoconj. J.* **12**, 1–6.
- Bookbinder, L. H., Cheng, A., and Bleil, J. D. (1995). *Science* **269**, 86–89.
- Carrington, D. M., Auffret, A., and Hanke, D. E. (1985). *Nature* **313**, 64–67.
- Crispeels, M. J. and Raikhel, N. V. (1991). *Plant Cell* **3**, 1–9.
- Elgavish, S. and Shaanan, B. (1997). *Trends Biochem. Sci.* **22**, 462–467.
- Foriers, A., Lebrun, E., Van Rapenbusch, R., De Neve, R., and Strosberg, A. D. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 5550–5560.
- Gatehouse, A. M. R., Powell, K. S., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., and Gatehouse, J. A. (1995). In: *Lectins: Biochemistry Perspectives* (Pusztai, A. and Bardocz, S., eds). Taylor and Francis, London, pp. 35–57.
- Goldstein, I. J. and Hayes, C. E. (1978). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **37**, 127–340.
- Goldstein, I. J. and Poretz, R. D. (1986). In: *The Lectins* (Liener, I. E. and Sharon, N., eds), Academic Press, New York, pp. 33–247.
- Henrikson, R. L. and Meredith, S. C. (1984). *Anal. Biochem.* **136**, 65–71.
- Hopp, T. P., Hemperly, J. J., and Cunningham, B. A. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 4473–4483.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680–685.
- Loris, R., Hamelryck, J., Bouckaert, J., and Wyns, L. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* **1383**, 9–36.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Fars, A. L., and Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 165–275.
- Mirkov, T. E., Wahlstrom, J. M., Hagiwara, K., Finardi-Filho, F., Kjemtrup, S., and Crispels, M. J. (1994). *Plant Mol. Biol.* **26**, 1103–1113.
- Moreira, R. A., Castelo-Branco, C. C., Monteiro, A. C. O., Tavares, R. O., and Beltramini, L. M. (1998). *Phytochemistry* **47**, 1183–1188.
- Obregón-Henao, A., Gil, D. L., Gómez, D. I., Sanzón, F., Teale, J. M., and Restrepo, B. I. (2001). *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**, 209–215.
- Ohsawa, F., Hirano, F., and Natori, S. (1990). *J. Biochem.* **107**, 431–434.
- Osborn, T. C., Brown, J. W. S., and Bliss, F. A. (1985). *Theoret. Appl. Genet.* **70**, 22–31.
- Ozeki, Y., Matsui, T., Nita, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., and Titani, K. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 407–413.
- Perez, G. (1998). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 843–853.
- Peumans, W. L. and Van Damme, E. J. M. (1995). *Plant Physiol.* **109**, 347–352.
- Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M. (1998). *Biotechnol. Genetic Eng. Rev.* **15**, 199–228.
- Puy, D. J., Du., Phillipson, P. B., and Rabevohitra, R. (1995). *Kew Bull.* **50**, 445–475.
- Ray, S. and Chatterjee, B. P. (1995). *Phytochemistry* **40**, 643–649.
- Rini, J. M., Hardman, K. D., Einspahr, H., Suddath, F. L., and Carver, J. P. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 10126–10132.
- Rini, J. M. (1995). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 551–577.
- Rüdiger, H. (1997). In *Glycosciences: Status and Perspectives* (Gabijs, H. J. and Gabijs, S., eds), Chapman & Hall, Weinheim, pp. 415–438.
- Rüdiger, H. (1998). *Acta Anat.* **161**, 130–152.
- Sharon, N. and Lis, H. (1972). *Science* **177**, 949–959.
- Sharon, N. (1993). *Trends Biol. Sci.* **18**, 221–226.
- Sharon, N. and Lis, H. (1995). *Essays Biochem.* **30**, 59–75.
- Susselan, K. N., Bhatia, C. R., and Mitra, R. (1997). *J. Biosci.* **22**, 439–455.
- Suvachittanout, W. and Peutpaiboon, A. (1992). *Phytochemistry* **31**, 4065–4070.
- Teichberg, V. I., Aberdam, D., Ers, V., and Pinelli, E. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 14086–14092.
- Utarabhand, P. and Akkayanont, P. (1995). *Phytochemistry* **38**, 281–285.
- Van Damme, J. M., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Peumans, W. J. (1993). *Eur. J. Biochem.* **217**, 123–129.
- Wang, G. F., Cao, Z. F., Zhou, A. M., and Zhao, Y. R. (2000). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 873–878.
- Wright, C. S. (1989). *J. Mol. Biol.* **209**, 475–487.

Artigo a ser submetido

"In vitro effects of the Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds on digestive proteases of *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera – Pyralidae)

Pando, S.C.; Macedo, M.L.R.; Novello, J.C. and Marangoni, S.

***In vitro* effects of the Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds
on digestive proteases of *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica*
(Lepidoptera: Pyralidae)**

Pando, S.C.¹; Macedo, M.L.R.^{2*}; Novello, J.C.¹ and Marangoni, S.¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

² Departamento de Ciências Naturais, Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Avenida Capitão Olinto Mancini, 1662 – Colinos, 79603-011, Cx. Postal: 210, Três Lagoas, MS, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55-67-521-34-44 ; Fax: +55-67-521-12-28

E-mail address: bioplant@terra.com.br

ABSTRACT

DrTI was assayed *in vitro* against proteases with trypsin-like activity present in the digestive tract of *A. kuehniella* and *C. cephalonica* larvae, two important crop pests belonging to the Lepidoptera order. The enzymes were clearly inhibited by increasing concentration of DrTI. At low concentrations, DrTI inhibited trypsin-like enzymes from the midgut of the two species by about 92% and statistical analysis showed that there was a significant difference among treatments.

In vitro assays of digestibility carried out by 12.5% SDS-PAGE revealed that this inhibitor was not digested by proteases but was digested by bovine trypsin, suggesting a high affinity of DrTI for the digestive enzymes from the two insect species studied. Furthermore, after trypsin digestion, the inhibitor still inhibited bovine trypsin by approximately 34.57% over a period of 16 h.

The resistance of DrTI after incubation with digestive enzymes was monitored by hydrolysis of DL-BAPNA with bovine trypsin at 37°C. This assay revealed that, after 12h of treatment, DrTI presented a maximal residual inhibitory activity of 39.8% for *A. kuehniella* and of 60.8% for *C. cephalonica*.

Key words: Lepidoptera - Pyralidae, seeds, Leguminosae, Kunitz inhibitor, serineproteinase, *Delonix regia*.

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DrTI, *Delonix regia* trypsin inhibitor, kDa, kilo Dalton; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SBTI, soybean Kunitz trypsin inhibitor; SDS, sodium dodecyl sulfate; DL-BAPNA, N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide; Tris, hydroxymethyl aminomethane

INTRODUCTION

Lepidoptera are insects that often attack a wide range of crops, causing high economic losses (Christeller, et al., 1992). Nevertheless, transgenic plants expressing single gene resistance elements, such as protease inhibitors, seem to be an encouraging model for the reduction of insecticide use, since they control the viability of some lepidopteran larvae (Johnson et al., 1990; Bernardi et al., 1996).

Seeds, especially of the Leguminosae family, contain large amounts of inhibitors which belong to two main inhibitor families: the Kunitz trypsin inhibitor and the Bowman-Birk proteinase inhibitor (Richardson, 1991). Recently, some Bowman-Birk type protease inhibitors have been reported to contain three (Balandin et al., 1995), four (Miller et al., 2000) and eight (Choi et al., 2000) reactive sites, which possess anti-trypsin or chymotrypsin activities in each repeated domain. The plant inhibitors can act as storage proteins during seed dormancy, in the control of endogenous proteases and as a part of the plant defensive mechanism via inhibition of proteolytic enzymes (Ryan, 1990). In many plant species, protease inhibitors accumulate in seeds and vegetative organs in a constitutive or induced way. The induction can happen due to wounds inflicted by insect, fungal or bacterial attack, and also by certain plant hormones (Koiwa et al., 1997). Plant hormones such as abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) are able to trigger a local or systemic induction of protease inhibitor genes in potatoes, tomatoes and tobacco, similar to that occurring when a plant suffers some mechanical injury (Pena-Cortes et al., 1992; Farmer et al., 1992). The plant protease inhibitors can inhibit the proteases of insects' midgut *in vitro*, in some cases limiting the herbivory (Broadway, 1996; 1997). According to Tschardt et al. (2001), changes in leaf chemistry after herbivory include increased levels of the activity of oxidative enzymes and proteinase inhibitors.

When insects attack plants, both trophic levels in the interaction alter their chemical and physiological phenotypes in ways that influence the outcome of the interaction (Karban and Baldwin, 1997). Rapid deployment of defensive secondary metabolites such as protease inhibitors and alkaloids are known to increase a

plant's resistance to subsequent attack (van Dam et al., 2000). Furthermore, ingestion of Kunitz soybean trypsin inhibitor (STI) had a profound effect on insect digestive physiology, resulting in prolonged retention of food in the digestive tract (Broadway, 1997).

In general, three approaches have been used to evaluate the biological activity of protease inhibitors against insect pests. The most direct approach measures the ability of protease inhibitors to inhibit enzyme activity from the gut of a given species, *in vitro* (Coppedge et al., 1994; Rymerson and Bodnaryk, 1995). The second approach measures the target organism's response to protease inhibitors added to artificial diets (Kuroda et al., 1996; Macedo et al., 2002). A third approach is to evaluate the response of insects to protease inhibitors in planta (Cloutier et al., 1999).

At least two models have been proposed to explain the effects of protease inhibitors on predators growth and development: the first mechanism suggests that the inhibition of gut proteases reduces the digestion of dietary protein, thereby reducing the availability of essential amino acids; the second mechanism consist of growth depression due to a hyperactive pancreas which responds to the inhibition of proteases by synthesizing large amounts of the sensitive protease in a compensatory fashion to the detriment of other essential proteins (Jongsma & Bolter, 1997).

This paper reports the inhibitory activity of DrTI on trypsin-like enzymes from the midgut of two species of Lepidoptera insects and its resistance to hydrolysis by these enzymes.

MATERIALS AND METHODS

1. DrTI purification

DrTI was purified as described by Pando et al. (2001).

2. Maintenance of the insect colony

The larvae were maintained in a rearing room at a temperature of $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 65-70% relative humidity. An artificial diet was prepared with a mixture of integral wheat, wheat germ, wheat bran and yeast (8/2/1.9/0.1). For each generation, new colonies were infested with eggs of a day of oviposition.

The insect colony was maintained in the Laboratory of Protein Purification and Biological Function (DCN/UFMS).

3. Preparation of gut extract homogenates

Midguts of 4th instar larvae were immobilized in ice for some minutes. Next, with the aid of a stereoscopic microscopic and tweezers, the guts were dissected in a cooled solution containing 125 mM NaCl. For each sample ten midguts were homogenized in 1.0 ml of water and then centrifuged at $20,000 \times g$ at 4°C for 30 min, as described by Macedo et al. (2002).

The supernatant containing digestive proteases was used immediately for the tests or frozen at -20°C .

4. Protein determination and hydrolase assays

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using BSA (1 mg/ml) as standard.

Trypsin activity was determined using a colorimetric assay. In this assay, 0.83 mM DL-BAPNA was used as substrate at 30°C and activity was measured by monitoring the change at 410 nm (Erlanger et al., 1964).

5. Inhibition studies

The ability of DrTI to inhibit the trypsin-like activities from insect larvae was determined by pre-incubation a mixture of midgut extracts with different concentration of DrTI (12.5 nM) diluted 1:8 in 0.05M Tris/HCl buffer, pH 8.0. The final volume of the assay was 1.5 ml. Incubation was performed in five replicates and the reaction was stopped by the addition of 30% acetic acid and the residual enzymatic activity and residual inhibitory activity were calculated.

6. Electrophoretic analysis

SDS-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli (1970), in a discontinuous system with 12.5% separating gel, pH 8.8, and 5% stacking gel, pH 6.8, with brilliant Coomassie blue R250 staining (Sigma). Molecular weight standards from Pharmacia were used.

7. Resistance test and *in vitro* digestibility of DrTI by digestive enzymes from *A. kuehniella* and *C. cephalonica* and by bovine trypsin

DrTI (12.5 nM) was dissolved in 0.05 M Tris/HCl buffer, pH 8.0. The final volume of pre-incubation was 300 µl for each aliquot, i.e., 3, 6 and 12h, with 50 µl of homogenized midgut, 50 µl DrTI solution and 200 µl (1 mM) Tris/HCl, pH 8.0. Pre-incubation was carried out for 15 min at 37°C for both insect preparations (Materials and Methods, section 3) and after BAPNA addition, incubation was carried out for 30 min for *A. kuehniella* and for 35 min for *C. cephalonica*.

The reactions were stopped by heating for 2 min. After 50 μ l of reaction products, from each aliquot, were submitted to the inhibitory activity resistance test according to Erlanger et al. (1964) and analysis by 12.5% SDS-PAGE, at a protein concentration of 40 μ g.

The *in vitro* digestibility of DrTI also was monitored after incubation with bovine trypsin. The DrTI fraction was dissolved in 0.05M Tris/HCl, pH 8.0 buffer and added to bovine trypsin solution (0.2 mg/ml), previously dissolved in 0.0025M HCl. The final incubation volume was 1.3 ml, containing 1 mM DL-BAPNA and 15 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0. The assay was carried out over 30 min and 1, 2, 4, 8 and 16 h at 37°C.

The reactions were stopped by heating for 2 min and the reaction products were analyzed by 12.5% SDS-PAGE at a protein concentration of 40 μ g.

8. Statistical analysis

Data sets were analyzed for significant differences using the Winstat program.

RESULTS

1. Inhibition studies

Figure 1 shows the effects of five different doses of DrTI on the *in vitro* activity levels of digestive proteases from the two insect species studied. Statistical analysis by ANOVA followed by the Tukey test indicated a significant difference among treatments, with a dose-dependent reduction in the enzymes activities. The inhibitory activity of 5 µg DrTI against midgut proteases of *A. kuehniella* and *C. cephalonica* was 92.6% and 91.7%, respectively.

2. Resistance test and *in vitro* digestibility of DrTI by digestive enzymes from *A. kuehniella* and *C. cephalonica* and by bovine trypsin

In vitro DrTI digestibility with the intestinal extracts from *A. kuehniella* and *C. cephalonica* as well as with bovine trypsin was monitored by 12.5% SDS-PAGE and the protein band profile is presented in figures 2A, 2B and 2C, respectively. In contrast to the action of digestive enzymes from *A. kuehniella* and *C. cephalonica*, the action of bovine trypsin was very efficient in the hydrolysis of DrTI during the first 30 minutes of reaction, as shown by the appearance of a protein band of about 20,000 Da in all treatments when compared with the DrTI control. However, after digestion DrTI continued to keep its inhibitory action at 34.57% up to 16 h (data not shown).

The digestibility assay showed that DrTI was resistant to degradation by the midgut proteases of the two insects, with the inhibitor remaining undigested even over longer periods of incubation up to 72 h. This result is confirmed by the fact that DrTI was able to inhibit bovine trypsin when this activity was monitored by hydrolysis of DL-BAPNA as substrate at 37° C. This inhibition reached maximal values of 39.8% and 60.8% for *A. kuehniella* and *C. cephalonica*, respectively, indicating that DrTI recovered its activity as soon as the proteases were denatured.

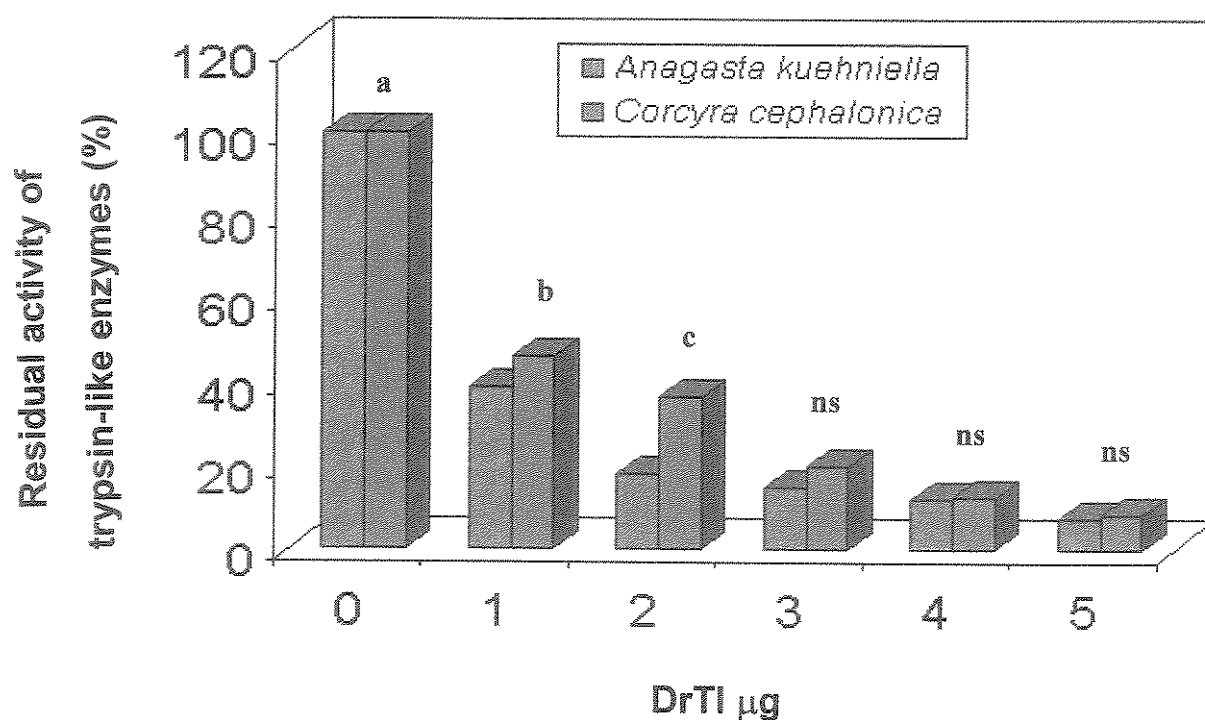


Figure 1. Effect of different concentration of DrTI in the trypsin-like enzymes activity from midgut *A. kuehniella* and *C. cephalonica* larvae. The residual activity was determined by DL-BAPNA hydrolysis (1mM), after incubation during 30 minutes. Each value indicates the mean of five repetition. Different letters indicate significant difference ($P<0.01$) and ($P<0.001$), for *A. kuehniella* and *C. cephalonica*, respectively, when the values are compared among them and with control. ns: no significance. (ANOVA, Tukey's test).

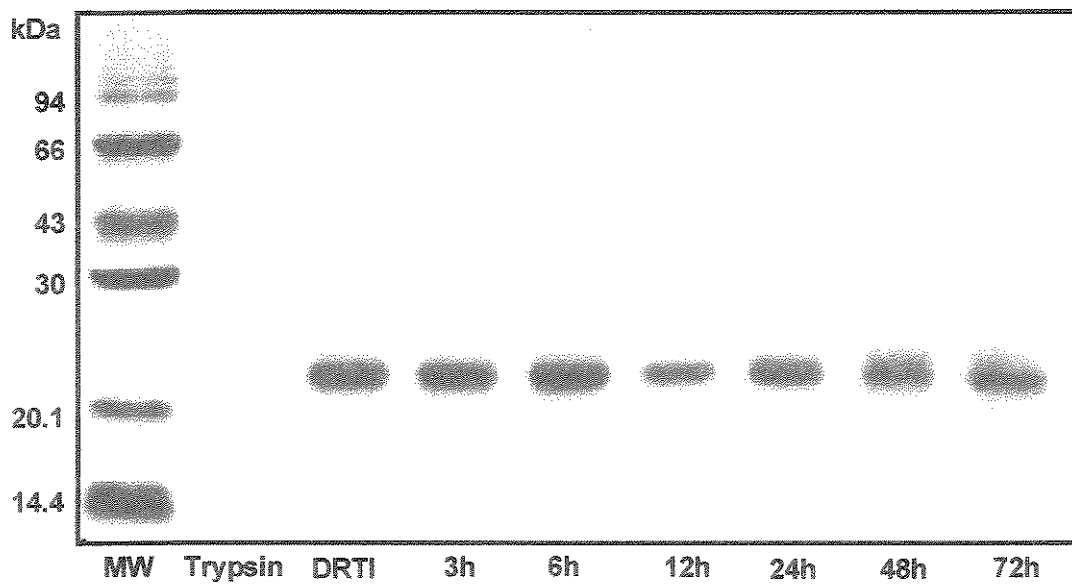


Figure 2A

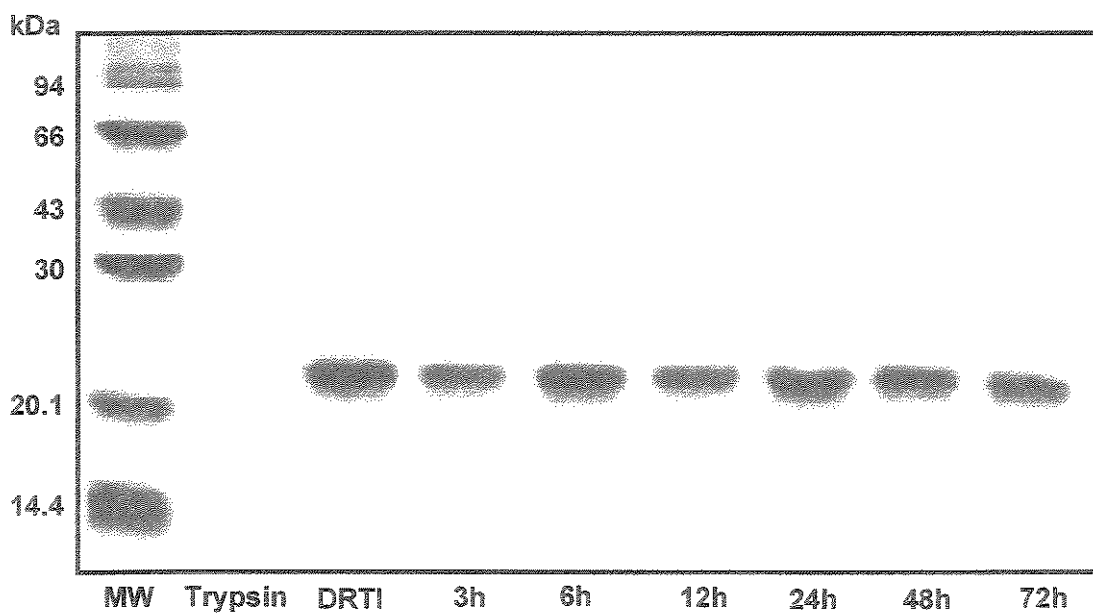


Figure 2B

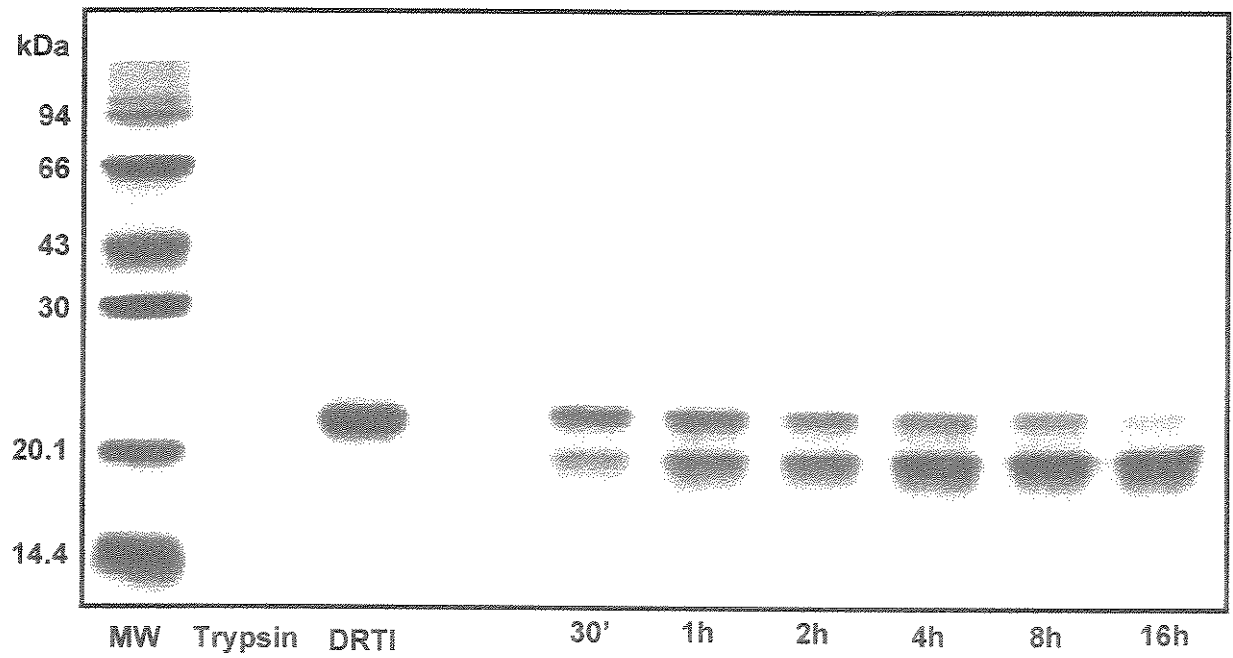


Figure 2C

Figure 2. Electrophoretic analysis in SDS-PAGE 12.5% of *in vitro* digestibility of DRTI by trypsin-like enzymes from midgut larvae **(A)**: *A. kuehniella*; **(B)**: *C. cephalonica* and **(C)**: bovine trypsin. Sample: DRTI: 40 μ g; Trypsin: 17 μ g.

The results of DrTI resistance for *A. kuehniella* and *C. cephalonica* are shown in figure 3.

Statistical analysis, using nonparametric ANOVA Kruskal-Wallis test, not showed significant difference among the treatments.

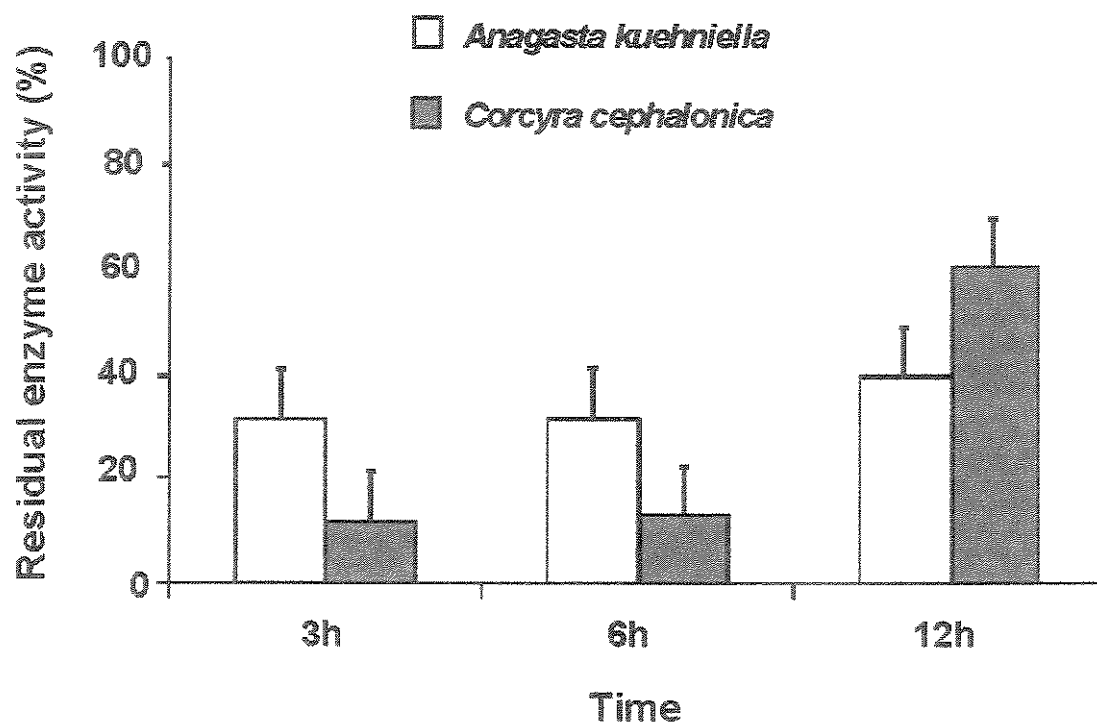


Figure 3. Resistance test of DrTI after pre-incubation with trypsin-like enzymes from midgut *A. kuehniella* and *C. cephalonica* larvae, in different time intervals. The assay was monitored by DL-BAPNA hydrolysis, using bovine trypsin. Each value indicates the mean of four repetition. No significant difference was verified among the treatments ($P < 0.05$) when compared among them. (Nonparametric ANOVA, Kruskal-Wallis test).

DISCUSSION

The properties of the digestive enzymes of some lepidopteran insects such as acetylglucosaminidases, aminopeptidases, amylases, carboxypeptidases, cellobiase, maltase, trehalase and trypsin have been studied in detail in some Lepidoptera species (Santos & Terra, 1986). However, serineproteinases are the main enzymes present in the midgut of lepidopterans, and are important for their proteolytic digestion, and for this reason phytophagous lepidopterans have been used as model insects (Applebaum, 1985; Ceciliani et al. 1997).

Several workers have demonstrated that plant protease inhibitors can reduce proteolytic enzyme activity *in vitro* for a number of insect species (Christeller et al., 1990; Michaud et al., 1993; McManus & Burgess 1995; Macedo et al., 2002). Moreover, serine protease inhibitors have been shown to be effective against some lepidopterans, including *Ostrinia nubilalis* (Larocque & Houseman, 1990), *Manduca sexta* (Shukle & Murdock, 1983), *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua* (Broadway & Duffey, 1986).

Similar effects of different doses of DrTI on the *in vitro* activity of midgut proteases were obtained by Jongsma & Bolter (1997) in *in vitro* assays. Using protease inhibitors from soybean and potato against digestive enzymes of *H. zea* e *S. exigua*, these investigators detected an 80% reduction in enzyme activity. Ceciliani et al. (1997) also reported that an inhibitor from *Medicago scutellata* seeds inhibited proteases from four species of lepidopteran insect pests.

McManus & Burgess (1995) found that extracts from the digestive tract of final instar larvae of *Spodoptera litura* (lepidoptera) contain trypsin-like activity and *in vitro* assays revealed that SBTI was effective in retarding this activity. This inhibitor was also effective against the midgut proteases of *M. sexta* (Miller et al., 1974).

In vitro digestibility assays of DrTI revealed that this protein was not digested by proteases from lepidopteran insects, in agreement with Harsulkar et al. (1999), who demonstrated the potential of the three non-host plant protease inhibitors in inhibiting the gut proteases and larval growth of *Helicoverpa armigera*

under *in vitro* and *in vivo* conditions, suggesting that the inhibitors were not digested by the gut proteases. In contrast, in *in vitro* assays, Harsulkar et al. (1998) demonstrated the presence of six isoproteinases possessing diverse specificity in the gut of *H. armigera*, which were responsible for the degradation of chickpea trypsin inhibitor.

Plant protease inhibitors can differ in their inhibitory activity on the digestive enzymes of some insects, depending on whether the assay is performed *in vitro* or *in vivo* because the insects possess complex mechanisms of synthesis regulation of the gut proteases (Wu et al., 1997; Harsulkar et al., 1999).

However, the digestive enzymes of some insect species can be inhibited *in vitro* by certain protease inhibitors but ingestion of the protease inhibitors cannot affect the growth and/or the development of these insects. Little is known about the physiology of the adaptation to protease inhibitors (Broadway and Villani, 1995; Jongsma & Bolter, 1997).

Patankar et al. (2001) conducted a comparative study of the diversity and specificity of *H. armigera* gut proteases of larvae growing on four different host plants, viz. chickpea, pigeonpea, cotton and okra, using specific substrates and chemical inhibitors and visualizing the isozymes on electrophoretic gels.

Many authors have described the characteristics of trypsin-like enzymes among partially purified gut proteases from the Lepidopteran order, with specific reference to their pH-dependent activity (Bernardi et al., 1996).

DrTI hydrolysis by bovine trypsin may be due to the fact that this inhibitor probably has more affinity for the proteases of the insects tested than for bovine trypsin. In contrast, the inhibitor isolated from the *Dimorphandra mollis* species was not hydrolyzed by bovine trypsin when tested under the same conditions (Macedo et al., 2002).

Plant protease inhibitors have the potential to protect plants against herbivorous insects. However, some insect species are able to overcome the toxicant effect of the protease inhibitors due to the synthesis of enzymes, for example trypsin, that differ in molecular mass and charge and that are not a target of the effect of the inhibitors (Broadway, 1996; 1997).

This preliminary study is important because plant protease inhibitors, including DrTI, can retard insect larval development when incorporated into artificial diets, acting as insect pest resistance factors. The possibility of future evaluations of antimetabolites as potential insect defensive compounds depends on a reliable insect bioassay system and as in other insects pests, artificial diets provide a powerful tool for testing these compounds. The present results can contribute to subsequent work to be carried out to increase data concerning the mechanism of plant defense by inducing the expression of protease inhibitor genes and the resistance of DrTI and other plant inhibitors to digestion by proteases from the midgut of insects. In addition, *in vitro* studies are important for understanding the resistance of plant protease inhibitors and the nature of gut protease activity, as well as for the elucidation of the insect defense mechanisms against plant inhibitors and the determination of the primary effects of ingestion of trypsin inhibitors in insects.

REFERENCES

- Applebaum SW. 1985. Biochemistry of digestion. In: Kerkut GA and Gilbert LI, editors. Comparative Physiology, Biochemistry and Pharmacology of Insects. Pergamon: Oxford. p 279-311.
- Balandin T, Does CVD, Albert JM, Bol JF, Linthorst HJ. 1995. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of tobacco. Plant Mol Biol 27: 1197-1204.
- Bernardi R, Tedeschi G, Ronchi S, Palmieri S. 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzymes from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera- Pyralidae). Insect Biochem Mol Biol 26: 883-889.
- Broadway RM. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. Arch Insect Biochem Physiol 32: 39-53.
- Broadway RM. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. J Insec Physiol 43: 855-874.
- Broadway RM, Duffey SS. 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanisms of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. J Insect Physiol 32: 827-833.
- Broadway RM, Villani MG. 1995. Does host range influence susceptibility of herbivorous insects to non-host plant proteinase inhibitors? Entomol Exp et Appl 76: 303-312.
- Cecilian F, Tava A, Iori R, Mortarino M, Odoard, M, Ronchi S. 1997. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. Phytochemistry 3: 393-398.

Choi, D.; Park, J.; Seo, Y.S.; Chun, Y.J. & Kim, W.T. (2000). Structure and stress-related expression of two cDNAs encoding proteinase inhibitor II of *Nicotiana glutinosa* L. *Biochim Biophys Acta* 1492: 211-215.

Christeller JT, Laing WA, Shaw BD, Burgess EPJ. 1990. Characterization and partial purification of the digestive proteases of the black field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker): elastase is a major component. *Insect Biochem* 20: 157-164.

Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, Burgess EPJ. 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 22: 735-746.

Cloutier C, Fournier M, Jean C, Yelle S, Michaud D. 1999. Growth compensation and faster development of colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. *Arch Insect Mol Physiol* 40: 69-79.

Coppedge BR, Jones JM, Felton GW, Stephen FM. 1994. Examination of midgut proteases of the adult southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae). *J Entomol Sci* 29: 457-465.

Dam NM van, Hadwich K, Baldwin IT. 2000. Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia* 122: 371-379.

Erlanger BF, Kokowesky N, Cohen W. 1964. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95: 271-278.

Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol* 98: 995-1002.

Harsulkar AM, Giri AP, Gupta VS, Sainani MN, Deshpande VV, Patankar AG, Ranjekar PK. 1998. Characterization of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and their interaction with proteinase inhibitors using gel-X-ray film contact print technique. Electrophoresis 19: 1397-1402.

Harsulkar AM, Giri AP, Patanakar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK, Deshpande VV. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. Plant Physiol 121: 497-506.

Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan CA. 1990. Expression of proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc Natl Acad Sci USA 86: 691-697.

Jongsma MA, Bolter C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. J Insect Physiology 43: 885-895.

Karban R, Baldwin IT. 1997. Induced responses to herbivory. Chicago: Chicago University Press.

Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci 2: 379-384.

Kuroda M, Ishimoto M, Suzuki K, Kondo H, Abe K, Kitamura K, Arai S. 1996. Oryzacystatins exhibits growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insects pest, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). Biosci Biotechnol Biochem 60: 209-212.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

- Larocque AM, Houseman JG. 1990. Effect of ingested soybean ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Physiol* 36: 691-697.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 165-275.
- Macedo MLR, Mello GC, Freire MGM, Novello JC, Marangoni S, Matos, DGG. 2002. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol Biochem* 40: 891-898.
- McManus MT, Burgess EP. 1995. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *J Insect Physiol* 41: 731-738.
- Michaud D, Nguyen-Quoc B, Yelle S. 1993. Selective inhibition of Colorado potato beetle cathepsin H by oryzacystatins I and II. *Fed Eur Biochem Soc* 331: 173-176.
- Miller EA, Lee MC, Atkinson AH, Anderson MA. 2000. Identification of a novel four domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmans of *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol* 42: 329-333.
- Miller JW, Kramer KJ, Law JH. 1974. Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). *Comp Biochem Physiol* 48B: 117-129.
- Pando SC, Oliva MLV, Sampaio CAM, Di Ciero L, Novello JC, Marangoni S. 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry* 57: 625-631.

- Patankar AG, Giri AP, Harsulkar AM, Sainani MN, Deshpande V V, Ranjekar PK, Gupta VS. 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 453-464.
- Pena-Cortes H, Liu X, Sanchez-Serran J, Schmid R, Willmitzer L. 1992. Factors affecting gene expression of patatin and proteinase inhibitor-II gene families in detached potato leaves: implications for their co-expression in developing tubers. *Planta* 186: 495-502.
- Richardson M. 1991. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Dey PM and Harborne JB, editors. *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press, v. 5, p. 259-305.
- Ryan CA. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28: 425-449.
- Rymerson RT, Bodnaryk, RP. 1995. Gut protease activity in insect pests of canola. *Can. Entomol* 127: 41-48.
- Santos CD, Terra WR. 1986. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. *Insect Biochem* 16: 691-700.
- Shukle RH, Murdock LL. 1983. Lipxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environ Ecol* 12: 787-791.

- Tscharntke T, Thiessen S, Dolch R, Boland W. 2001. Herbivory, induced resistance and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochem System Ecol* 29: 1025-1047.
- Wu Y, Llewellyn D, Mathews A, Dennis ES. 1997. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. *Mol Breeding* 3: 371-380.

Os resultados obtidos com este trabalho permitiram concluir que:

1. As lectinas podem ser identificadas, em extratos totais, através de ensaio de hemaglutinação de eritrócitos e pela inibição da AHE, sendo que, algumas vezes, é preciso realizar tratamentos químicos ou enzimáticos, para aumentar a sensibilidade dos eritrócitos (Sharon & Lis, 1972). Entretanto, neste estudo, não foi preciso realizar tais tratamentos, visto que os eritrócitos de ratos, para os quais DRL apresentou maior especificidade, podem sofrer hemólise (de Carvalho *et al.* 2002).
2. O perfil eletroforético de DRL também se assemelhou com a lectina *Phaeolepiota aurea* (Kawagishi *et al.*, 1996), ou seja, em condições reduzidas (DTT) e não-reduzidas, a lectina migrou como uma banda polipeptídica única de baixa massa molecular e a análise eletroforética, em gel nativo, permitiu concluir ainda que DRL possui apenas uma subunidade. Em 1995, Ray & Chatterjee, também purificaram uma lectina de apenas uma subunidade;
3. A composição de aminoácidos revelou que DRL, semelhante a outras lectinas de leguminosas (Rüdiger, 1997), é rica em aminoácidos ácidos (ácido glutâmico, ácido aspártico), pobre em aminoácidos contendo enxofre e sem resíduo de cisteína, similar à lectina isolada de sementes de *Dioclea virgata* (Cavada *et al.*, 1996). É suposto que a manutenção da AHE de DRL, após redução com 0,01M de DTT, esteja relacionada à ausência de resíduos de cisteína na molécula.
4. A lectina de sementes de *Delonix regia* (DRL), pertence ao grupo ligante de glicose-manose, sendo inibida mais especificamente por glicose. A lectina foi mais específica para hemaglutinar eritrócitos de ratos e não apresentou especificidade por eritrócitos humanos (Freire *et al.* 2002). Alguns estudos revelaram que as lectinas que não são específicas para o

sistema ABO, exibem especificidade para mono ou oligossacarídeos (Kennedy *et al.*, 1995; Freire *et al.*, 2002).

5. A lectina foi estável após tratamento com TFA 0,1% e acetonitrila 0,66%, durante os passos de purificação em coluna analítica C18 em HPLC, semelhante à lectina *Phaeolepiota aurea* caracterizada por Kawagishi *et al.* (1996).
6. DRL apresentou alta homologia com outras lectinas de sementes de leguminosas já bem caracterizadas e que também são ligantes de glicosemanose, tais como: Con A, pea, favin e lentilha (Cunningham, *et al.* 1979; Edelman, *et al.* 1972; Foriers, *et al.* 1981; Higgins, *et al.* 1983). Estudos de comparação das estruturas das lectinas vegetais revelaram extensa homologia entre lectinas da mesma tribo e que, estas lectinas têm sido conservadas durante o processo evolutivo das plantas leguminosas. Deste modo, a homologia da região amino terminal reflete as afinidades taxonômicas das plantas nesta família (Foriers *et al.*, 1977).
7. DRL foi completamente ativa em pH básico (8,0 - 9,0) e inativa em pH ácido (2,0 - 3,0). Com relação à temperatura, esta lectina apresentou-se termoestável, pois manteve 70% de sua AHE após 30 minutos de incubação a 80°C. Freire *et al.* (2002) purificaram uma lectina de *Talisia esculenta* (Sapindaceae) e verificaram que esta proteína permanece ativa numa ampla faixa de pH (5,0-9,0) e com uma temperatura acima de 70°C, embora haja um pequeno decréscimo na AHE entre 70°C-90°C;
8. DRL requer a presença do íon metálico Mn^{2+} para sua atividade biológica, pois o tratamento com EDTA, um agente quelante, reduziu a AHE desta lectina, mas a adição de Mn^{2+} ao meio fez com que DRL recuperasse cerca de 50% de sua atividade. Já o íon Ca^{2+} foi indiferente para a atividade da lectina. Ao contrário, as duas lectinas descritas por Kawagishi *et al.* (1996),

não foram afetadas pelo tratamento com o EDTA, ou seja, não requerem íon metálico para sua atividade;

9. O inibidor de tripsina isolado das sementes de *D. regia*, pertence à família de inibidores vegetais do tipo Kunitz, apresentando apenas um único sítio reativo o qual reage especificamente com a tripsina e com enzimas tripsina-like, mas não inibe a quimotripsina. WbTI, um inibidor isolado de *Psophocarpus tetragonolobus*, também inibiu somente a tripsina, mas diferente do DrTI, a sequência N-terminal deste inibidor não apresentou homologia com nenhum outro inibidor de protease da mesma família (Datta *et al.*, 2001). DrTI apresentou um resíduo de ácido glutâmico na posição 63, região do sítio reativo, onde para a maioria dos inibidores tipo Kunitz seria esperado um resíduo de arginina ou lisina. Assim como o DRTI, o inibidor de *Swartzia pickellii* (SwTI), também apresentou uma particularidade, pois um resíduo de glutamina foi determinado na região do sítio reativo (Cavalcanti *et al.*, 2002). Os dois "loops" do DrTI, compostos por quatro resíduos de meia cistina, apresentaram alta similaridade com outros inibidores tipo Kunitz. Este resultado foi confirmado por estudos cristalográficos preliminares do inibidor (Polikarpov *et al.*, 1999).
10. Os ensaios *in vitro* mostraram que o DrTI é uma molécula resistente às proteases do intestino médio dos lepidópteros *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, sugerindo o possível efeito protetivo deste inibidor contra os insetos popularmente conhecidos como a traça da farinha e do arroz, respectivamente. Resultados similares, com outros insetos lepidópteros, foram encontrados por Harsulkar *et al.* (1999).
11. A tripsina bovina clivou o DrTI nos primeiros 30 minutos de digestão, pois foi possível observar uma banda de proteína de aproximadamente 20 kDa, comparando-se com o perfil eletroforético do inibidor controle, constituído

apenas por uma banda de 22 kDa, porém mesmo após a proteólise, o DrTI manteve sua atividade inibitória em 34,57%.

12. A análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa, na redução da atividade do DrTI, durante os diferentes tempos de incubação com as enzimas do intestino médio de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*.
13. Após 3h e 6h de incubação com as proteases de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, a atividade residual do DRTI manteve-se praticamente constante.
14. A recuperação da atividade do DrTI teve início após 12h de incubação com as enzimas dos dois insetos estudados, sugerindo perda simultânea da atividade das proteases.
15. A recuperação da atividade do inibidor foi maior após a incubação com as enzimas do intestino médio de *C. cephalonica* comparando-se com os valores obtidos após incubação com as enzimas de *A. kuehniella*, porém estes valores não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

1. Determinar a estrutura primária completa da lectina de *D. regia*;
2. Analisar o efeito inseticida *in vivo* do DrTI, através da incorporação de diferentes concentrações do inibidor em dietas artificiais oferecidas aos insetos *A. kuehniella* e *C. cephalonica*;
3. Elucidar os mecanismos de ação do inibidor com relação aos insetos estudados;
4. Determinar o modelo cristalográfico completo do DrTI a partir da seqüência de aminoácidos.

ALARCON, F.J.; MARTÍNEZ, T.F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DIAZ, M. & MOYANO, F.J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, p. 265-274, 2002.

AOYAMA, H.; CAVAGIS, A.D.M.; TAGA, E.M. & FERREIRA, C.V. Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase. **Phytochem.**, v.58, p. 221-225, 2001.

BARILLAS-MURY, C. & WELLS, M. A. Cloning and sequencing of the blood meal-induced later trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. **Insect Mol. Biol.**, v.2, n.1, p.7-12, 1993.

BARILLAS-MURY, C.; NORIEGA, F.G. & WELLS, M. A. Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.25, p.241-246, 1995.

BARRE, A.; BOURNE, Y.; VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J. & ROUGÉ, P. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. **Biochimie**, v. 83, p. 645-651, 2001.

BELITZ, H.D. & WEDER, J.K.P. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. **Food Ver. Int.**, v.6, p.151-211, 1990.

BERGEY, D.R.; OROZCO-CARDENAS, M.; DE MOURA, D.S. & RYAN, C.A. A wound and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.96, p.1756-1760, 1999.

BIGGS, D.R. & MCGREGOR, P.G. Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*; Coleoptera: Scarabidae) as a basis for selecting inhibitors. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 69-75, 1996.

BIRK, Y. The Bowman-Birk Inhibitor. **Int. J. Pep. Prot. Res.**, v.25, p.113- 131, 1985.

BODE, W. & HUBER, R. Proteinase-protein inhibitor interaction. **Biomed. Biochim. Acta**, v. 50, p.437-446, 1992.

BORCHES, R. & ACKERSON, C. W. Trypsin inhibitor IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.13, p.291-293, 1947.

BORROR, D.J. & DeLONG, D.M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1988. 653p.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter compliment of midgut proteases. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.32, p.39-53, 1996.

BROADWAY, R. M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **J. Insec Physiol.**, v.43, p.855-874, 1997.

BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **J. Insect Physiol.**, v.32, p.827-833, 1986.

- CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. & GRANGEIRO, T.B. Primary structure and functions of plant lectins. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**; v. 5, p. 193-201, 1993.
- CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; GRANGEIRO, T.B.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.F.U. & MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**; v. 8, p. 37-42, 1996.
- CAVALCANTI, M.S.M.; OLIVA, M.L.V.; FRITZ, H.; JOCHUM, M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; COELHO, L.; BATISTA, I.F.C.; SAMPAIO, C.A.M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 291, p. 635-639, 2002.
- CECILIANI, F.; TAVA, A.; IORI, R.; MORTARINO, M.; ODOARDI, M. & RONCHI, S. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. **Phytochemistry.**, v.3, p.393-398, 1997.
- CHAPMAN, R.F. **The insects - Structure and function**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1982. 919p.
- CHOI, D.; PARK, J.; SEO, Y.S.; CHUN, Y.J. & KIM, W.T. Structure and stress-related expression of two cDNAs encoding proteinase inhibitor II of *Nicotiana glutinosa* L. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1492, p.211-215, 2000.
- CHRISPEELS, M.J. & RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

CHURELLA, H.R.; YAO, B.C. & THOMSON, W.A.B. Soybean trypsin activity of soy infant formulas and its nutritional significance for the rat. **J. Agric. Food. Chem.**, v.24, p.393-396, 1976.

CORREA, P. Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. **Cancer Res.**, v.41, p.3685-3690, 1981.

COULSON, R.N. & WITTER, J.A. **Forest Entomology: Ecology and Management**. Copyright, 1984. 669p.

COX, P.D.; CRAWFORD, L.A.; GJESTRUD, G.; BELL, C.H. & BOWLEY, C.R. The influence of temperature and humidity on the life-cycle of *C. cephalonica* (Stainton) (Lepidoptera-Pyralidae). **Bull. Entomol. Res.**, v.71, p.171-181, 1981.

CUNNINGHAM, B.A.; HEMPERLY, J.J.; HOPP, T.P. & EDELMAN, G.M. Favin versus concanavalin A: circularly permuted amino acid sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p.3218-3222, 1979.

CZAPLA, T.H. & LANG, B.A. Effect of pant lectins on the development larval of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.** v. 83, p. 2480-2485, 1990.

DAM, N.M. van; HADWICH, K. & BALDWIN, I.T. Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. **Oecologia**, v.122, p.371-379, 2000.

DAM, N.M. van; HORN, M.; MARRES, M & BALDWIN, I.T. Characterization of constitutive and inducible proteinase inhibitor activities in *Nicotiana attenuata*. **J. Chem. Ecol.**, v.27, p.547-568, 2001.

- DAMJANOV, I. & BLACK, P. Lectin binding sites on the luminal surface of ependymal cells of the rat spinal cord. **Neurosurgery**, v.20, p.722-725, 1987.
- DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S.K. & SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiol. Biochem.**, v.39, p.949-959, 2001.
- DE CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S. & NOVELLO, J.C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J. Protein Chem.**, v. 21, p. 43-50, 2002.
- DE LEO, F. & GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 5, p. 489-496, 2002.
- DE PATER, S.; PHAM, K.; KLITSIE, I. & KIJNE, J. The 22-bp W1 element in the pea lectin promoter is necessary and as a multimer, sufficient for high gene expression in tobacco seeds. **Plant Mol. Biol.**, v. 32, p. 515-523, 1996.
- DOBIE, P.; HAINES, C.P.; HODGES, R.J. & PREVETT, P.F. **Insects and arachnids of tropical stored products, their biology and identification: a training manual**. UK, Tropical Development and Research Institute, 1984. 273p.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N. JR.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J. & WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v.69, p.2580-2584, 1972.
- EISEMANN, C.H.; DONALDSON, R.A.; PEARSON, R.D.; CADAGON, L.C.; VUOCOLO, T. & TELLAM, R.L. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanisms of action. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 72, p. 1-11, 1994.

ENDO, Y. Mechanism of action of ricin and related toxic lectins on the inactivation of eukaryotic ribosomes. In: FRANZ, H. KASAI, K.I. & KOCOUREK, J. **Adv. Lectin Res.**, Berlin: veb Verlag Volk unn Gesundheit, v.2, p.60-73, 1989.

ETZLER, M.E. Plant lectins: Molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.36, p.209-234, 1985.

FAGAN, J.M. & WAXMAN, L. Identification of a soluble enzyme from C3H/10T1/2 cells which is inhibited by Bowman-Birk proteinase inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.178, p.856-861, 1991.

FARMER, E.E. & RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.7713-7716, 1990.

FELIX, C.R.; BETSCHART, B.; BILLINGSLEY, P.F. & FREYVOGEL, T.A. Post-feeding induction of trypsin in the midgut of *Aedes aegypti* L. is separable into two cellular phases. **Insect Biochem.**, v. 21, n. 2, p. 197-203, 1991.

FELTON, G.W.; WORKMAN, J. & DUFFEY, S.S. Avoidance of antinutritive plant defense: role of midgut pH in Colorado potato beetle. **J. Chem. Ecol.**, v. 18, p. 571-583, 1992.

FERGUSON, D.C. Adult moths (Lepidoptera). In: GORHAM, J.R. **Insect and mite pests in food: an illustrated key**. United States, Washington DC, 1991. p. 231-244.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R. & TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.107a, p.631-640, 1994.

FITCHES, E. & GATEHOUSE, J.A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **J. Insect Physiol.**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.

FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P. & GATEHOUSE, J.A. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **J. Insect Physiol.**, v. 47, p. 777-787, 2001.

FONTHAM, E. & CORREA, P. The epidemiologic approach to the study of protease inhibitors. In: TROLL, W. & KENNEDY, A. **Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents**. New York and London: Plenum Publishing Corporation, 1993. p.1-8.

FORIERS, A.; LEBRUN, E.; VAN RAPPENBUSCH, R.; DENEVE, R.; & STROSBERG, A.D. The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin. Amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure. **J. Biol. Chem.**, v.256, p.5550-5560, 1981.

FORIERS, A.; WUILMART, C.; SHARON, N.; & STROSBERG, A.D. Extensive sequence homologies among lectins from leguminous plants. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.75, p.980-986, 1977.

FORSTNER, G.G. & FORSTNER, J.F. Structure and function of the gastrointestinal fluid. In: DESNUELLE, P., SJOSTRO, H. & NOREN, O. **Molecular and cellular basis of digestion**. Ámsterdam: Elsevier, 1986. p.125-143.

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. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 61-68, 2002.

FROKIAER, H.; HORLYCK, L.; SORENSEN, S. & SORENSEN, H. Immunoaffinity chromatography purification and characterization of pea trypsin inhibitors. **J. Sci. Food Agric.**, v.66, p.61-69, 1994.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ALVES, S.B. & VENDRAMIN, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1988. 649p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; WIENDL, F.; SILVEIRA NETO, S. & CARVALHO, R.P.L. **Manual de entomologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1970. 858p.

GATEHOUSE, A.M.R.; POWELL, K.S.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. & GATEHOUSE, J.A. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: PUSZTAI, A. and BARDOZ, S. **Lectins: Biomedical Perspectives**. London: Francis & Taylor, 1995. p. 35-57.

GIUDICI, A.M.; REGENTE, M.C. & DE LA CANAL, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiol.**, v.38, p.881-888, 2000.

GOLARD, A. Lectins modulate calcium channels in chick sympathetic ganglia. **Neuroscience**, v.69, p.331-337, 1995.

GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate –binding specificity of lectins. In: SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J. **The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. Liemer, Orlando, Florida: Academic Press, 1986. p. 33-248.

GRAHAM, J.; McNICOL, R.J. & GREIG, K. Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor. **Ann. Appl. Biol.**, v. 127, p. 163-173, 1995.

GRAN, G.; DORWARD, P.M. & PUSZTAI, A. Pancreatic enlargement is evident in rats fed diets containing raw soybeans (*Glycine max*) or cowpeas (*Vigna unguiculata*) for 800 days but not in those fed kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) or lupinseed (*Lupinus angustifolius*). **J. Nutr.**, v. 123, p. 2207-2215, 1993.

HALL, A.E.; SINGH, B.B. & EHLERS, J.D. Cowpea breeding. **Plant Breed. Rev.**, v. 15, p. 217-274, 1997.

HARPER, M.S.; HOPKINS, T.L. & CZAPLA, T.H. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. **Tissue & Cell**, v. 30, p. 166-176, 1998.

HARSULKAR, A.M.; GIRI, A.P.; PATANAKAR, A.G.; GUPTA, V.S.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P.K. & DESHPANDE, V.V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. **Plant Physiol**, v.121, p.497-506, 1999.

HARTL, P. M.; TAN-WILSON, A. L. & WILSON, K. A. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor during germination. **Phytochem.**, v.25, p.23-26, 1986.

HIGGINS, T.J.V.; CHANDLER, P.M.; ZURAWSKI, G.; BUTTON, S.C. & SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.258, p.9544-9549, 1983.

JACOBSON, R.L. & DOYLE, R.J. Lectin-parasite interactions, **Parasitol.**, v.12, p.55-61, 1996.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G. & RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 9871-9875, 1989.

JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J. Insect Physiol.**, v. 43, p. 885-895, 1997.

JORDÃO, B.P.; LEHANE, M.J.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, A.F. & FERREIRA, C. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.25, p.445-453, 1996.

JOSHI, S.S.; TOMES, D.J.; PIRRUCCELLO, S.J. & GABIUS, H.J. Galactoside specific VAA lectin-induced apoptosis in human leukemia cells. **Proc. Am. Assn. Cancer Res.**, v.35, p.6, 1994.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G. & GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Sci.**, v. 131, p. 1-11, 1998.

- JOUBERT, F.J. & DOWDLE, E.B.D. The primary structure of the inhibitor of tissue plasminogen activator found in the seeds of *Erythrina caffra*. **Thromb. Haemost.**, v.57, p.356-360, 1987.
- KAWAGISHI, H.; WASA, T.; MURATA, T.; USUI, T.; KIMURA, A. & CHIBA, S. Two N-acetyl-D-galactosamine-specific lectins from *Phaeolepiota aurea*. **Phytochem.**, v.4, p.1013-1016, 1996.
- KENNEDY, A.R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, v.78, n.3, p.167-209, 1998.
- KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M. & COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.219-230, 1995.
- KIM, M.S.; SO, H.S.; LEE, K.M.; PARK, J.S.; LEE, J.H.; MOON, S.K.; RYU, D.G.; CHUNG, S.Y.; JUNG, B.H.; KIM, Y.K.; MOON, G. & PARK, R. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Gen. Pharmacol.**, v.34, p.349-355, 2000.
- KIM, S.; HONG, Y.N.; NA, C.S. & LEE, K.W. Expression characteristics of serine proteinase inhibitor II under variable environmental stresses in hot pepper. **Plant Sci.**, v.161, p.27-33, 2001.
- KOIDE, T. & IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. Fragmentation of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) by limited proteolysis and by chemical cleavage. **Eur. J. Biochem.**, v.32, p.401-407, 1973.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A. & HASEGAWA, P.M. Regulation of proteases inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v.2, p.379-384, 1997.

KORTT, A. A & CALDWELL, J.B. Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. **Phytochem.**, v.9, p.2805-2810, 1990.

KUBANEK, J.; ENTLICHER, G. & KOCOUREK, J. Studies on lectins. Isolation and characterization of the lectin from rye germ (*Secale cereale* L.). **Acta Biol. Med. Ger.**, v. 41, p. 771-780, 1982.

LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. (1908). In: PUSZTAI, A. **Plant lectin** Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991. 263p.

LARA, P.; ORTEGO, F.; GONZALEZ,-HIDALGO, F.; CASTANERA, P.; CARBONERO, P. & DIAZ, I. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Transgenic Res.**, v. 9, n. 3, p. 169-178, 2000.

LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; RUGGIERO, L.; CECI, L.R.; GALLERANI, R. & JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidoptera pests. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 31, p. 593-602, 2001.

LERNER, D.R. & RAIKHEL, N.V. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and chitinase. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.11085-11091, 1992.

LIDDLE, R.A. Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. **American J. Physiol.**, v.269, p.319-327, 1995.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.34, p.31-67, 1994.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J & WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1383, p.9-36, 1998.

LU, Y.; PELLING, J.C. & CHANEY, W. Tumor cell surface beta 1-6-branched oligosaccharides and lung metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**, v.12, n1, p.47-54, 1994.

MACEDO, M.L.R.; DE MATOS, D.G.G.; MACHADO, O.L.T. & MARANGONI, S. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochem.**, v.54, p.553-558, 2000.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C. & MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1571, p. 83-88, 2002a.

MACEDO, M.L.R.; MELLO, G.C.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. & MATOS, D.G.G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobrochus maculatus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 891-898, 2002b.

MAENZ, D.D.; IRISH, G.G. & CLASSEN, H.L. Carbohydrate-binding and agglutinating lectins in raw and processed soybean meals. **Animal Feed Sci. Technol.**, v.76, p.335-343, 1999.

MALONE, M. & ALARCON, J.J. Only xylem-borne factors can account for systematic wound signaling in the tomato plant. **Planta**, v.196, p.740-746, 1995.

MARTÍNEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E. & CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1568, p. 37-44, 2001.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S. & BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.31, p.645-657, 2001.

McMANUS, M.T. & BURGESS, E.P. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **J. Insect Physiol.**, v.41, p.731-738, 1995.

McMANUS, M.T. WHITE, D.W.R. & MCGREGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgen. Res.**, v. 3, p. 50-58, 1994.

MELLO, M.O.; TANAKA, A.S. & SILVA-FILHO, M.C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Mol. Phylogen. Evol.**, v. 27, p. 103-112, 2003.

MILLER, E.A.; LEE, M.C.; ATKINSON, A.H. & ANDERSON, M.A. Identification of a novel four domain member of the proteinase inhibitor II family from the stigmans of *Nicotiana glauca*. **Plant Mol. Biol.**, v.42, p.329-333, 2000.

MIRKOV, T.E.; WAHLSTROM, J.M.; HAGIWARA, K.; FINARDI-FILHO, F.; KJEMTRUP, S. & CHRISPEELS, M.J. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, p. 1103-1113, 1994.

MODY, R.; JOSHI, S. & CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, v.33, p.1-10, 1995.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A & CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, suppl. 2, p. 211-218, 1991.

MURDOCK, L.L; HUESTING, J.E.; NIELSEN, S.S.; PRATT, R.C. & SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochem.**, v. 29, p. 85-89, 1990.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v.224, p.350-357, 1984.

NORIEGA, F.; PENNINGTON, J.; BARILLAS-MURY, C.;WANG, W. & WELLS, M. *Aedes aegypti* midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding. **Insect Mol. Biol.**, v.5, n.1, p.25-29, 1996.

PACHECO, I.A. & DE PAULA, D.C. **Insetos de grãos armazenados – identificação e biologia**. São Paulo: Fundação Cargill, 1995. 229p.

PAN, Z.; CAMARA, B.; GARDNER, H.W. & BACKHAUS, R.A. Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450, allene oxide syntase, resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.18139-18145, 1998.

PANDO, S.C.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, C.A.M.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J.C. & MARANGONI, S. Primary sequence determination of Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochem.**, v. 57, p. 625-631, 2001.

PENA-CORTES, H.; LIU, X.; SANCHEZ-SERRAN, J.; SCHMID, R. & WILLMITZER, L. Factors affecting gene expression of patatin and proteinase inhibitor-II gene families in detached potato leaves: implications for their co-expression in developing tubers. **Planta**, v.186, p.495-502, 1992.

PETERS, W. **Peritrophic membranes**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 238p.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. In: BASU, J.; KUNDU, M. & CHAKRABARTI, P.). **Plant lectins: storage proteins with a defensive role**. New Delhi: Wiley Eastern Ltda, 1993. v. 9, p.27-34.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnol. Genetic Eng. Rev.**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B. & VAN DAMME, E.J.M. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Letters**, v. 477, p. 186-192, 2000.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A. & ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionarily related proteins. **Mol. Immunol. Compl. Carb.**, p. 27-54, 2001.

POLIKARPOV, I.; GOLUBEV, A.M.; PERLES, L.A.; PANDO, S.C.; NOVELLO, J.C. & MARANGONI, S. Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Acta Crystall. Section D**, v. 55, p. 1611-1613, 1999.

POWELL, K.S.; GETEHOUSE, A.M.R.; HILDER, V.A. & GETEHOUSE, J.A. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cincitepa*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 66, p. 119-126, 1993.

RADISKY, E.S. & KOSHLAND JR, D.E. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. **Biochem.**, v.99, n.16, p.10316-10321, 2002.

RAK, J.W.; MCEACHERN, D. & MILLER, F.R. Sequential alteration of peanut agglutinin binding-glycoprotein expression during progression of murine mammary neoplasia. **Br. J. Cancer**, v.65, p.641-648, 1992.

RAY, S. & CHATTERJEE, B.P. Saracin: a lectin from *Saraca indica* seeds integument recognizes complex carbohydrates. **Phytochem.**, v.40, p. 643-649, 1995.

RICHARDS, A.G. & RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. **Ann. Rev. Entomol.**, v.22, p.219-240, 1977.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. **Methods of Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. v. 5. p. 259-305.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, v.16, p.159-169, 1977.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M.L.R.; MAIA, G.M.C. & YARWOOD, A. The amino acid sequence and reative (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian

caroline tree (*Adenanthera pavonina* L.). **Biochim. Biophys. Acta**, v.872, p.134 – 140, 1986.

RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p. 130-152, 1998.

RÜDIGER, H. Structure and function of plant lectins. In: GABIUS, H.J. AND GABIUS S. **Glycosciences: Status and perspectives**. New York: Chapman & Hall – Weinhein, 1997. p. 415-438.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 28, p. 425-449, 1990.

SAMPAIO, C.A.M.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, M.U.; BATISTA, I.F.C.; BUENO, N. R.; TANAKA, A.S.; AUERSWALD, A. & FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacol.**, v.32, p.62-66, 1996.

SCHAUER, R.; FISCHER, C.; LEE, H.; RUCH, B. & KELM, S. Sialic acid as regulators of molecular and cellular interactions. In: GABIUS, H.J. and NAGEL, G.A. **Lectins and Glycoconjugates in Oncology**, New York: Springer-Verlag, 1988. p. 5-24.

SERKE, S.; NEUBAUER, A. & VAN LESSEN, A. Binding of mitogenic plant lectins to human lymphocytes: Flow cytometric analysis. **J. Immunol. Meth.**, v.121, n.2, p.231-235, 1989.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, v.30, p.59-75, 1995.

SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v.268, n.1, p.82-89, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.

SHARON, N. & LIS, H. Lectin: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHAZALI, M.E.H. & SMITH, R.H. Life history studies of externally feeding pests of stored sorghum: *Corcyra cephalonica* (Staiton) and *Tribolium castaneum* (Hbst.). **J. Stored Prod. Res.**, v. 22, n. 2, p.55-61, 1986.

SILVA, C.P.; RIBEIRO, A.F.; GULBENKIAN, S. & TERRA, W.R. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvainus* (Hemiptera) midgut cells. **J. Insect Physiol.**, v.41, p.1093-1103, 1995.

STILLMARK, H. (1888). In: PUSZTAI, A. **Plant lectin** Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991. 263p.

TAYLOR, B.H.; YOUNG, R.J. & SCHEURING, C.F. Induction of a proteinase inhibitor II-class gene by auxin in tomato roots. **Plant Mol. Biol.**, v.23, p.1005-1014, 1993.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Revista Ciência Hoje**, v.12, n. 70, p.31, 1991.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.109B, p.1-62, 1994.

TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v.47, p.47-61, 2001.

TREMATERRA, P. Biologia e preferenze alimentari di *Corcyra cephalonica* (Stainton). **Industrie Alimentari**, v.34, p.540-548, 1983.

TSUNOGAE, Y.; TANAKA, I.; YAMANE, T.; KIKKAWA, J.; ASHIDA, T.; ISHIKAWA, C.; WATANABE, K.; NAKAMURA, S. & TAKAHASHI, K. Structure of the trypsin-binding domain of Bowman-Birk type protease inhibitor and its interaction with trypsin. **J. Biochem.**, v.100, p.1637-1643, 1986.

UDEDIBIE, A.B.I. & CARLINI, C.R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds – A review. **Animal Feed Sci. Technol.**, v.74, p.95-106, 1998.

URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J.; WALLER, D.A. & MCPHERSON, M.J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **Plant Journal**, v.8, p.121-131, 1995.

VALUEVA, T.A. & MOSOLOV, V.V. Protein inhibitors of proteinase in seeds: I classification, distribution, structure and properties. **Russian J. Plant Physiol.**, v. 46, p. 307-321, 1999.

VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; CORDEWENWE, J.; AMERICA, T. GALLERANI, R.; JONGSMA, M.A. & BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea* adapt to proteinase inhibitors. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 1, p. 10-19, 2003.

WALKER, R.A. The use of lectins in histopathology. **Pathol. Res. Pract.**, v.185, p.826-835, 1989.

WRIGHT, L.M.; REYNOLDS, C.D.; RIZKALLAH, P.J.; ALLEN, A.K.; VAN DAMME, E.J.M.; DONOVAN, M.J. & PEUMANS, W.J. Structural characterization of the native fetuin-binding protein *Scilla campanulata* agglutinin: a novel two-domain lectin. **FEBS Letters**, v. 468, p. 19-22, 2000.

WU, H.C. & LIN, J.Y. The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. **J. Biochem.**, v.113, p.258-263, 1993.

YAMADA, T., HATTORI, K & ISHIMOTO, M. Purification and characterization of two α -amylase inhibitors from seeds of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Phytochem.**, v. 58, p. 59-66, 2001.

YAMAMOTO, M.; HARA, S. & IKENAKA, T. Aminoacids sequences of two trypsin inhibitors from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus*) (L) (DC.). **J. Biochem.**, v.94, p.849-863, 1983.

YAMAOKA, K.; OHNO, S.; KAWASAKI, H. & SUZUKI, K. Over expression of a β -galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.179, p.271-279, 1991.

YEH, K.W.; LIN, M.L.; TUAN, S.J.; CHEN, Y.M.; LIN, Y.M. & KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomea batata*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Rep.**, v. 16, p. 696-699, 1997.

Artigo publicado

“Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds”

Polikarpov, I.; Golubev, A.M.; Perles, L.A.; **Pando, S.C.**; Novello, J.C. and Marangoni, S. **Acta Crystallographica Section D**, v. 55, p. 1611-1613, 1999.

Purification, crystallization and preliminary crystallographic study of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Delonix regia* seeds

I. Polikarpov,^{a*} A. M. Golubev,^{a,b} L. A. Perles,^a S. C. Pando,^c J. C. Novello^c and S. Marangoni^c

^aLaboratório Nacional de Luz Síncrotron, Caixa Postal 6192, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, ^bPetersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, St Petersburg, 188350, Russia, and ^cDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Caixa Postal 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Correspondence e-mail: igor@lnls.br

The Kunitz-type trypsin inhibitor from seeds of Flamboyant (*Delonix regia*) has been purified to homogeneity and plate-like crystals suitable for X-ray analysis have been grown by the hanging-drop method using PEG 6000 as a precipitant. The crystals belong to space group $P2_12_12_1$ with unit-cell parameters $a = 32.15$, $b = 69.39$, $c = 72.54$ Å. X-ray diffraction data have been collected to 2.95 Å resolution. The structure has been solved by molecular replacement using the known structures of trypsin inhibitors from *Erythrina caffra* seeds (PDB code 1tie) and from soya beans (*Glycine max*; PDB code 1ba7) as search models.

Received 15 August 1998

Accepted 5 July 1999

1. Introduction

Plant serine-proteinase inhibitors have been classified in different families according to the class of the enzyme inhibited, the sequence homology and the number of cysteine residues (for reviews, see Ryan & Walker-Simons, 1981; Rackis *et al.*, 1986; Richardson, 1991; Anderson & Wolf, 1995). Among the most important are the Kunitz and the Bowman-Birk proteinase-inhibitor families, which have been studied in great detail (Ryan & Walker-Simons, 1981; Odani *et al.*, 1986; Richardson, 1991; Tanaka *et al.*, 1997). The Bowman-Birk proteinase inhibitors have molecular weights of 8–10 kDa and a high cystine content (usually seven disulfides). The Kunitz-type proteinase inhibitors have molecular weights of ~20 kDa and normally only two disulfide bridges. The Kunitz soybean trypsin inhibitor (Koide & Ikenaka, 1973), the inhibitors from *Erythrina caffra* (Joubert & Dowdle, 1987), winged bean (*Psophocarpus tetraganobolus*; Yamamoto *et al.*, 1983), the seeds of *Albizia jubibrissin* (Odani *et al.*, 1979), *Erythrina latissima* (Joubert *et al.*, 1981) and *Acacia elata* (Kortt & Jermyn, 1981) are members of this family.

The presence of proteinase inhibitors in living tissues seems to be essential for natural regulatory processes; for example, plants protecting themselves against insect predation (Garcia-Carreño, 1996). The stability of proteinase inhibitors towards enzymes as well as the large quantities present in seeds indicate the importance of protease inhibitors as storage proteins (Ryan, 1973). The enzyme inhibitors encountered in seeds can cause nutritional disorders and toxic effects when ingested by animals and humans as components of plant foods. Furthermore, there is an interest in the possible pharmacological use of plant inhibitors in the treatment of a wide

range of metabolic disorders associated with enhanced proteolytic activity (pancreatitis, emphysema, allergy, inflammation and certain cancers; Richardson, 1991).

The Flamboyant (*Delonix regia*) tree is distributed in the northern and western parts of Madagascar and is widely cultivated in many tropical countries. Trees of the order *Delonix* (Leguminosae/Caesalpinioideae) are used as ornamental trees and the seeds of some species are crushed and eaten raw as a snack in south Madagascar (Puy *et al.*, 1995). We have used the seeds of Flamboyant as a source of the trypsin inhibitor DrTi, which was purified and used for crystallographic studies.

2. Experimental

2.1. Protein purification

70 g of *D. regia* seeds were milled to a fine powder, homogenized with 150 mM NaCl [10% (w/v)] solution and agitated for 1 h at room temperature. The method for isolation of DrTi was similar to that described by Tanaka *et al.* (1997). Proteins from the crude extract were precipitated at 277 K by slow addition of acetone to a final concentration of 80% (v/v) and the precipitate was collected by centrifugation (350g, 20 min, 277 K). The precipitate was dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 (buffer A), loaded on a DEAE Sephadex A-50 column (1.5 × 30 cm) equilibrated with the same buffer and eluted with a linear gradient of NaCl (0–0.5 M) in buffer A. The inhibitor-containing fractions were pooled, dialysed against two 2 l changes of 5 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. This lyophilized powder was dissolved in 0.15 M NaCl in buffer A and applied to a Sephadex G-75 column (1.5 × 100 cm) equilibrated with the same solution. Fractions which contained inhibitor activity

were pooled and, finally, DrTi was purified on a DEAE 5 PW column (4.5 × 75 mm, Waters), equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer in a linear gradient (0.05–0.5 M, 60 min) of NaCl at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The purified inhibitor was dialysed against 5 mM ammonium bicarbonate and lyophilized. Protein elution was monitored at 280 nm. The biological activity of the inhibitor was detected using bovine trypsin and *N*- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) as described by Gaertner & Puigserver (1992). The purity of DrTi was estimated to be 95% by SDS-PAGE in gradient gel (10–20%). The identity of the protein has been confirmed by N-terminal amino-acid sequencing.

2.2. Crystallization

DrTi was crystallized by vapour diffusion in hanging drops at 291 K (McPherson, 1982). The inhibitor was dissolved in 25 mM potassium phosphate buffer to a final concentration of 22 mg ml⁻¹. 10 μ l of this solution was mixed with an equal amount of 7.5% PEG 6000 in 12 mM potassium phosphate buffer in the pH range 5.4–6.3. After centrifugation (4000g, 5 min), 18 μ l drops of the resulting solution were equilibrated against 1 ml of reservoir solution containing 15% PEG 6000 in 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.0. Crystals of DrTi appeared after about one month and had average dimensions of 0.1 × 0.1 × 0.05 mm.

2.3. Data collection and processing

X-ray data from a single native crystal were collected at room temperature at the protein crystallography beamline (Polikarpov, Oliva *et al.*, 1998; Polikarpov, Perles *et al.*, 1998) of the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil) using a 345 mm MAR Research imaging-plate detector and monochromatic X-ray radiation of wavelength 1.38 Å. 96 oscillation images were collected, with an angular step of 1° and an exposure of 30000 dose units per image. The DrTi crystal, which initially diffracted beyond 2.5 Å resolution, showed significant radiation decay during data collection. Data were processed with *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski, 1993) and final processing was limited to 2.95 Å resolution.

3. Results and discussion

DrTi crystals belong to the orthorhombic space group *P*₂₁₂₁₂, with unit-cell dimensions *a* = 32.15, *b* = 69.39, *c* = 72.54 Å. The final data set is 89.3% complete between 13

and 2.95 Å resolution, with an overall *R*_{merge} of 8.2% (*R*_{merge} in the last resolution shell between 2.95 and 3.0 Å is 29.8%). Completeness within the last resolution shell is 96.0%. A total of 8199 reflections have been collected, out of which 3326 reflections were unique.

Assuming a molecular weight of 21.1 kDa and a single DrTi molecule per asymmetric unit cell, the Matthews *V*_m value is 1.92 Å³ Da⁻¹ (Matthews, 1968). Based on this value, estimates of the solvent content of the crystal and the crystal density are 36% and 1.2 g cm⁻³, respectively (Drenth, 1994). This information indicated the presence of a single DrTi molecule in the asymmetric unit, which was confirmed by the molecular-replacement structure solution.

The DrTi structure was solved by the molecular-replacement method with the program *AMoRe* (Navaza, 1994), using existing crystallographic models of Kunitz-type trypsin inhibitors from soya beans (STI: De Meester *et al.*, 1988) and from *Erythrina caffra* seeds (ETI: Onesti *et al.*, 1991).

The rotation function calculated for the STI search model (PDB code 1ba7), using diffraction data in the resolution range 10–2.95 Å and a Patterson radius of 20 Å, resulted in a first solution with a correlation coefficient (CC) of 21.5%, whereas the second and third solutions had CCs of 14.2 and 14.1%, respectively. A translation search performed with the same program, using the Crowther & Blow (1967) translation function, resulted in a clear solution with a CC of 48.7% and an *R* factor of 50.6%. The second translation-function solution had a CC of 39.4% and an *R* factor of 53.4%, and the third had a CC of 39.2% and an *R* factor of 54.0%. The model was finally subjected to rigid-body refinement in the resolution range 10–2.95 Å, which slightly improved both the *R* factor and the correlation coefficient. The resulting CC was 48.9% and the *R* factor was 50.3%.

An equally clear solution was found using the 2.5 Å resolution structure of the trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds (PDB code 1tie). The same resolution range and Patterson radius were used in the calculations. The rotation peak corresponding to the correct solution was the highest (correlation coefficient of 23.4%). The second and the third solutions had correlation coefficients of 12 and 11.7%, respectively. The first solution of the translation search had a CC of 43.0% and an *R* factor of 52.7%. The second translation function solution had a CC of 35.5% and an *R* factor of 55.2%, and the third had a CC of 35.3% and an *R* factor of 55.3%. The model was finally subjected to

rigid-body refinement in the resolution range 10–2.95 Å, which slightly improved both the *R* factor and the correlation coefficient. The resulting CC was 44.1% and the *R* factor was 52.3%. Both search models resulted in essentially the same structure solution.

Preliminary refinement of both the ETI and STI models was undertaken using the program *REFMAC* from the CCP4 suite of programs (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). After 15 cycles of positional and overall *B*-factor refinement of the final molecular-replacement solutions, electron-density maps were calculated and averaged, with the objective of minimizing the phase errors associated with model bias and the incomplete amino-acid sequence. The model has been rebuilt to match the averaged electron density. The primary sequence has been mutated according to the available DrTi partial primary sequence (Tanaka *et al.*, 1997). Further steps of positional and isotropic *B*-factor refinement have been undertaken. The current *R* and *R*_{free} are 29.3 and 39.4%, respectively. The complete primary sequence of DrTi is currently being determined by amino-acid sequencing. Further work on model rebuilding and refinement is under way.

This work was supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and from Research Support Foundation of São Paulo State (FAPESP, #96/2285–5), Brazil.

References

- Anderson, R. L. & Wolf, W. J. (1995). *J. Nutr.* **125**, 581S–588S.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Crowther, R. A. & Blow, D. M. (1967). *Acta Cryst.* **23**, 544–549.
- De Meester, P., Brick, P., Lloyd, L. F., Blow, D. M. & Onesti, S. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 589–597.
- Drenth, J. (1994). *Principles of Protein Crystallography*, p. 72. New York: Springer-Verlag.
- Gaertner, H. F. & Puigserver, A. J. (1992). *Enzymol. Microb. Technol.* **14**, 150–155.
- Garcia-Carreño, F. L. (1996). *Trends Food Sci. Technol.* **7**, 197–204.
- Joubert, F. J., Carlsson, F. H. H. & Haylett, T. (1981). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 531–538.
- Joubert, F. J. & Dowdle, E. B. (1987). *Thromb. Haemost.* **57**, 356–360.
- Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). *Eur. J. Biochem.* **32**, 417–431.
- Kortt, A. A. & Jermyn, M. N. (1981). *Eur. J. Biochem.* **115**, 551–557.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. New York: John Wiley.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Navaza, J. (1994). *Acta Cryst.* **A50**, 157–163.
- Odani, S., Koide, T. & Ono, T. (1986). *J. Biochem.* **100**, 975–983.

- Odani, S., Odani, S., Ono, T. & Ikenaka, T. (1979). *J. Biochem. (Tokyo)*, **86**, 1795–1805.
- Onesti, S., Brick, P. & Blow, D. M. (1991). *J. Mol. Biol.* **217**, 153–176.
- Otwinowski, Z. (1993). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend. Data Collection and Processing*, edited by L. Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 56–62. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R., Arruda, P., Leite, A. & Craievich, A. (1998). *Nucl. Instrum. Methods A*, **405**, 159–164.
- Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. & Craievich, A. (1998). *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72–76.
- Puy, D. J. du, Phillipson, P. B. & Rabevohitra, R. (1995). *Kew Bull.*, **50**, 445–475.
- Rackis, J. J., Wolf, W. J. & Baker, E. C. (1986). *Adv. Exp. Med. Biol.* **199**, 299–347.
- Richardson, M. (1991). *Methods Plant Biochem.* **5**, 259–305.
- Ryan, C. A. (1973). *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **24**, 173–196.
- Ryan, C. A. & Walker-Simons, M. (1981). *Plant Proteinases in The Biochemistry of Plants*, Vol. 6, edited by E. Marcus, pp. 351–370. New York: Academic Press.
- Tanaka, A. S., Sampaio, M. U., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J. C., Oliva, M. L. V., Fink, E. & Sampaio, C. A. (1997). *Biol. Chem.* **378**, 273–281.
- Yamamoto, M., Hara, S. & Ikenaka, T. (1983). *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 849–863.

PUBLICAÇÕES EM CONGRESSOS

- **Pando, S.C.,** Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C. and Marangoni, S. Partial purification and characterization of a lectin from *Delonix regia* seeds. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Período: 27 a 30 de Maio de 2000.
- **Pando, S.C.,** Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero, L.; Novello, J.C. and Marangoni, S. Primary structure determination of a Kunitz inhibitor purified from *Delonix regia* seeds. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Período: 19 a 22 de Maio de 2001.
- **Pando, S.C.,** Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C. and Marangoni, S. Purificação e caracterização físico-química de uma lectina de sementes de *Delonix regia*. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). Período: 29 de Agosto a 1de Setembro de 2001.
- **Pando, S.C.,** Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Toyama, M.H.; Novello, J.C. and Marangoni, S. *Delonix regia* seeds lectin: structural aspects. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Período: 18 a 21 de Maio de 2002.