



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular

**Análise da expressão de enterolobina em
sementes e calos vegetais de *Enterolobium
contortisiliquum***

Ana Carolina Melo Araújo

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Valle de Sousa

Brasília, maio de 2007

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”

(Albert Einstein)

Os principais valores da nossa vida são originados da família.

À minha família, por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades que Ele colocou em minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Valle de Sousa pela oportunidade concedida, pela confiança, incentivo e pelo conhecimento transmitido.

À minha família, em especial minha mãe, meus queridos tios: Nildete, Jorge e Maria Amélia, que com muito amor me incentivaram em cada passo durante todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao Fábio, meu namorado, amigo e companheiro de todas as horas por todo o apoio, incentivo, paciência e auxílio, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. À minha segunda família, Tia Edna e Tio Geraldo.

À professora Dr^a. Consuelo Rodrigues Lima, pelas conversas esclarecedoras e pela amizade sempre presente.

Aos professores Dr. Carlos André Ornelas Ricart, Dr. Ricardo Bastos Cunha, Msc. Pedro Portugal Zanotta, Dr^a. Maria Sousa Castro, Dr. Wagner Fontes por contribuírem na minha formação profissional e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Um agradecimento especial à Flávia Melissa, pelas orientações técnicas fornecidas com paciência e pela amizade.

Agradeço ao Dr. Sebastián Charneau pelo grande auxílio e presteza para solucionar todas as minhas dúvidas.

Aos professores Walter Handro e Eny Floh do BIOCEL/USP pela confiança no CBSP e pelo apoio para a produção deste trabalho.

Aos colegas e amigos do CBSP: Adriana, Alexandre, Aline, Anna, Camila, Carlos Garcia, Carlos Morris, Fábio, Flávia Melissa, Higor, Karina, Elaine, Lanuse, Leandro, Liz, Luciano, Luiz Felipe, Pollyana, Pedro Ivo, Perla, Rafael, Renan e Liudy por todos esses anos de convivência, pelos momentos divertidos, pelas discussões científicas e pela amizade.

Aos colegas da pós-graduação em Biologia Molecular pela motivação e solidariedade.

Aos meus queridos amigos Andrea Cajueiro, João Alexandre Zanon, Edna Manke, Daniela Palma, Sophia Lopes, que há anos se tornaram também a minha família, pelo carinho, estímulo e todos os momentos maravilhosos.

A todos os meus amigos, que mesmo não citando nomes sabem sua importância e que eles estão guardados no meu coração, o meu muito obrigada pelos momentos de diversão, conversas e apoio.

Aos funcionários Nuno Manuel Domingues, Fábio Coelho e Antônio Rufino por serem muito prestativos e pelo apoio técnico.

Agradeço também à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade de Brasília que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos durante a fase de execução deste trabalho; os meus profundos e sinceros agradecimentos.

RESUMO

Toxinas citolíticas são produzidas por uma grande variedade de organismos, particularmente bactérias, alguns insetos, répteis e alguns vertebrados marinhos. Muitas dessas toxinas formam poros nas membranas das células, aumentando a sua permeabilidade e levando à morte celular. Entretanto, poucos exemplos têm sido estudados em plantas. Enterolobina foi a primeira proteína citolítica vegetal descrita na literatura. É uma proteína formadora de poros em membranas extraída de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*. Este trabalho tem como objetivo verificar se calos de *E. contortisiliquum* são uma possível fonte para purificação da enterolobina, e comparar a expressão de proteínas em calos e sementes de *E. contortisiliquum*. Para produção de calos, sementes foram aleatoriamente selecionadas e escarificadas com lixa d'água em uma das faces e embebidas em água destilada *overnight*. Procedeu-se à desinfecção das sementes utilizando solução de hipoclorito de sódio a 30% e água destilada estéril. Inoculou-se uma semente para cada tubo de ensaio, contendo 20 mL de meio MS-61. Aguardou-se a germinação e desenvolvimento das plantas para seguir com os experimentos (aproximadamente 20 dias). Após esse período, foram realizados experimentos utilizando-se explantes de cotilédones, parte final dos cotilédones, hipocótilo e epicótilo, submetidos a 6 tipos de tratamentos em meio básico MS-61. Todas as culturas foram mantidas na luz (fotoperíodo: 16 horas luz/8 horas escuro) a $27 \pm ^\circ\text{C}$. Nos tratamentos com 2,4-diclorofenoxiacético (1mg/mL) e com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1mg/mL) e ácido abscísico (0.2 mg/mL) observou-se a formação de duas linhagens (verde e amarela, respectivamente) as quais foram utilizadas na preparação dos extratos de proteínas. Calos e sementes foram macerados em N_2 líquido e pó de vidro e precipitadas com solução de TCA/acetona seguida pela extração e solubilização em tampão 2-DE. A concentração de proteína foi determinada utilizando-se Plus One 2D QuantKit (GE Healthcare). As amostras foram submetidas à focalização isoeletrica utilizando-se géis de gradiente imobilizados de pH (IPG) na faixa de 3-10. Para confirmar a presença de enterolobina, foi realizado *immunoblotting* utilizando anticorpos de enterolobina produzidos em coelho. A análise comparativa dos mapas de 2-DE mostrou expressões diferenciadas entre sementes e calos. SDS-PAGE seguido de *immunoblotting* não indicou a presença de enterolobina nos extratos de calos. Em sementes, cinco isoformas de enterolobina foram encontradas com pI aproximado na faixa entre 5 e 6.

ABSTRACT

Cytolytic toxins are produced by a variety of living organisms, particularly bacteria, certain insects, poisonous reptiles and stinging marine invertebrates. Many of these toxins appear to function simply by forming pores in cell membranes, disrupting the permeability barrier and leading eventually to cell death. However, few examples have been studied in plants. Enterolobin was the first plant cytolytic protein described in the literature. It is a membrane pore-forming protein extracted from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. The current work aimed at assaying *E. contortisiliquum* callus as possible source material for enterolobin purification, and comparing protein expression in callus and seeds of *E. contortisiliquum*. For callus production, seeds were randomly selected and scarified, and then overnight incubated in distilled water. A solution of 30 % sodium hypochloride was used for seed decontamination. Each seed was placed into a tube containing 20 mL of MS-61 medium. Seed germination and development was allowed for twenty days. After this period, explants of cotyledons and hypocotyles were subjected to six different treatments containing MS-61 basic medium. The cultures were incubated at 27°C (16h light / 8h dark). Media with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1mg/mL) and with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (1mg/mL) plus abscisic acid (0.2 mg/mL) provided two callus lines (yellow and green, respectively) which were used for preparation of protein extracts. Callus and seeds were ground in liquid N₂ and glass powder, and the proteins precipitated with TCA/acetone solution followed by extraction and solubilization in 2-DE buffer. Protein concentrations were measured by using Plus One 2D QuantKit. The samples were submitted to 2-DE using immobilized pH gradient gels in the 3-10 pH range during isoelectric focusing. To confirm the presence of the cytotoxin in callus and seeds 2-DE gels, immunoblotting was made using enterolobin antibodies raised in rabbit. Comparative analysis of 2-DE maps showed different expression between seeds and callus. SDS-PAGE followed by immunoblotting did not indicate the presence of enterolobin in callus extracts. In seeds, enterolobin five isoforms were found within the 5 to 6 pI zone.

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell) Morong	1
1.2. Sementes	2
1.3. Enterolobina	4
1.4. Cultura de tecidos vegetais	9
1.5. Calos vegetais	12
1.6. Proteômica vegetal	14
2. Objetivos	18
3. Material e métodos	19
3.1. Estratégia de ação	19
3.2. Material vegetal	20
3.3. Extração e quantificação de proteínas	21
3.4. Obtenção da enterolobina pura	22
3.5. Produção do anticorpo	23
3.6. Eletroforese em condições subdesnaturantes (SDS-PAGE)	23
3.7. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida	24
3.8. Coloração dos géis com nitrato de prata	24
3.9. Análise de imagens	25
3.10. Eletrotransferência e imunodeteção	25
4. Resultados e Discussão	26
4.1 Material vegetal	26
4.2. Adequação do protocolo de extração de material vegetal	26
4.3. Dosagem de proteínas	27
4.4. Perfil unidimensional dos extratos de calos e semente de <i>E. contortisiliquum</i>	28
4.5. Padronização das condições da 2D-PAGE	29

4.6. Perfil Bidimensional do extrato de calos e semente de <i>E.contortisiliquum</i>	31
4.7. Imunodeteccão de enterlobina	36
5. Conclusões finais e perspectivas	44
6. Referências	47

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Concentrações de proteínas dos extratos de calos vegetais e sementes de <i>E.contortisiliquum</i>	27
--	----

Figuras

Figura 1. <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	2
Figura 2. Estrutura terciária da proaerolisina	7
Figura 3. Microscopia de Força Atômica da enterolobina	8
Figura 4. Formação de calos vegetais utilizando explantes de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	13
Figura 5. Fluxograma das etapas que foram realizadas neste trabalho.....	19
Figura 6. Fluxograma do procedimento de extração de proteína dos calos vegetais e sementes de <i>E.contortisiliquum</i>	21
Figura 7. Calos vegetais de <i>E. contortisiliquum</i>	26
Figura 8. Perfil Unidimensional dos extratos de semente e calos vegetais de <i>E.contortisiliquum</i>	29
Figura 9. Efeito da preparação da amostra no perfil bidimensional dos extratos de calo.	30

Figura 10. Mapa proteômico bidimensionais da semente de <i>E.contortisiliquum</i>	32
Figura 11. Mapas proteômicos bidimensionais de calos de <i>E,contortisiliquum</i>	33
Figura 12. Imunodeteccção da enterolobina no extrato de semente de <i>E.contortisiliquum</i>	37
Figura 13. Imunodeteccção da enterolobina no extrato de semente e calos vegetais de <i>E.contortisiliquum</i>	39
Figura 14. Imunodeteccção da enterolobina no extrato de semente de <i>E.contortisiliquum</i>	40
Figura 15. Mapa bidimensionail da enterolobina pura.	43

ABREVIATURAS

2,4-D ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2-DE eletroforese bidimensional

ABA ácido abscísico

ANA ácido naftaleno acético

AIA ácido indol acético

DAB 3,3- Diaminobenzidina

DEAE dietilaminoetil

DTT ditioneitol

FPLC “Fast liquid protein chromatography”

EDTA ácido etilenodiamino tetracético

ESI espectrometria de massa de ionização por eletropulverização *electrospray spectrometry ionization*

EST fragmentos de seqüências expressas

HPLC cromatografia líquida de alto desempenho

IEF focalização isoelétrica *isoelectric focusing*

IPG gradiente imobilizado de pH *immobilized pH gradient*

KDa kilodalton

LC-MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *liquid chromatography mass spectrometry*

MALDI-TOF espectrometria de massa por desorção e ionização a laser assistida por matriz *matrix-assisted laser desorption / ionization-time of flight*

MS-61 meio de cultura desenvolvido por Murashige; Skoog (1962)

MS/MS espectrometria de massa em seqüência *tandem mass spectrometry*

PFT toxina formadora de poros

PMF impressão digital da massa peptídica *peptide mass fingerprinting*

PMSF fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

TCA ácido tricloro acético

TEMED N,N,N',N' tetrametil etilendiamina

TLCK N- α -p-tosil-L lisina cloro metal cetona

TOF "*time-of-flight*", tempo de vôo

Tris tris-hidroximetilaminoetano

WPM meio de cultura desenvolvido por Lloyd; McCown (1981)

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong

Enterolobium, cujo nome é de origem grega, onde *enter* significa intestino e *lobion*, lóbulo, aludindo a forma dos seus frutos, pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Mimosoidae* (Lewis, 1987; Pereira, 1992).

Seus representantes são árvores de pequeno, médio e grande porte, com tronco apresentando até dois metros de diâmetro, com folhas penadas, flores pequenas com glomérulos esverdeados e legume enrolado como alça intestinal e achatada (Lewis, 1987; Pereira, 1992). Podem ser encontradas na Índia, América Central e América do Sul (Lewis, 1987).

As espécies *E. contortisiliquum*, *E. gummiferum*, *E. cyclocarpum* e *E. schomburgkii* são as mais citadas na literatura. Os textos que tratam destas espécies falam sobre as suas propriedades tóxicas, bem como, seu uso na pecuária como forrageira em pequenas quantidades (Rosales *et al.*, 1989; Navas *et al.*, 1992), na indústria madeireira e no reflorestamento de espécies nativas (Carvalho, 1994), marcando a regeneração de vegetação secundária da Mata Atlântica (Resolução nº 5 de 4 de Maio de 1994, Conselho Nacional do Meio Ambiente- CONAMA). *E. contortisiliquum* é uma árvore de tronco curto e grosso, copa ampla e ramificada, florescendo e frutificando na seca, largamente distribuída no Brasil. Identificada nos estados do Amazonas, Ceará, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso (Purisco e col., 1998; Pereira, 1992; Carvalho, 1994). É vulgarmente conhecido como orelha-de-macaco, timbó, tamboril, entre outros nomes. Apresenta legumes com formato que assemelham-se ao de alças intestinais e sementes, também um pouco achatadas. Com cores que variam em tons do marrom (Lorenzi, 1992).

Além do continente Americano, esta espécie de *Enterolobium* também já foi descrita no continente indiano (Oliveira, 2001). Sua madeira possui um alto valor econômico, sendo utilizada na fabricação de barcos, canoas, na construção civil e serralheria em geral (Lorenzi, 1992; Lêdo, 1977; Carvalho, 1994). A exploração intensiva dessa espécie tem contribuído para a redução de suas populações naturais (Alcalay e Amaral, 1982) chegando a colocar a planta na lista das espécies que correm perigo de extinção (Carvalho, 1994). Seu rápido crescimento torna-a potencialmente interessante para o uso no reflorestamento de áreas degradadas (Heringer, 1978).



Figura 1. *Enterolobium contortisiliquum*. A) Árvore; B) Folhas e flores; C) Tronco; D) Legumes.

1.2. Sementes

A semente é um conjunto formado pelo embrião e as estruturas que o rodeiam. É a unidade de propagação das fanerógamas (Haper, Lovel e Moore, 1970; Guimarães e col., 2002) ou ainda pode ser considerada o óvulo desenvolvido após a fecundação, contendo o embrião, com ou sem reserva nutritiva, protegido pelo tegumento (Vidal e Vidal, 2000). Portanto, a semente contém o embrião da nova planta e todos os mecanismos fisiológicos e estruturais a fim de torná-la independente e funcional durante o processo da atividade agrícola e, também, é reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por períodos longos de tempo (Guimarães e col, 2002).

A estrutura das sementes de angiospermas é tipicamente constituída por embrião, endosperma, perisperma, cotilédone e a testa ou tegumento. Na semente madura, as quantidades de perisperma e endosperma são variáveis para as diferentes espécies. O perisperma, o endosperma e o cotilédone são os tecidos de reserva da semente. A especialização destes é na biossíntese e no acúmulo de componentes de

reserva, que representam alguns dos principais eventos durante o desenvolvimento das sementes (Bewley and Black, 1978).

Podem-se definir funcionalmente três fases no desenvolvimento da semente: a primeira é a divisão celular, logo após a fecundação, que dará origem aos tecidos vegetativos que formarão a semente; a segunda fase prepara a semente para a germinação levando ao estoque de material orgânico e inorgânico nos tecidos de reserva, uma vez que a captação de nitrogênio, sais minerais e outros nutrientes é quase nula na semente madura; a terceira fase apresenta uma dramática redução na atividade metabólica, seguida de desidratação da semente, inclusive do tegumento. Posteriormente, a semente totalmente desenvolvida passa pela dispersão, que antecede a germinação. O metabolismo permanece inativo e isso é favorecido pelo baixo conteúdo de água, pela impermeabilidade do tegumento e pela possível ação de inibidores, embora a contribuição efetiva de cada fator seja variável (Bouter, 1981).

O embrião maduro das angiospermas consiste em um eixo contendo um ou dois cotilédones. Nas extremidades opostas do eixo embrionário estão os meristemas apicais do caule e da raiz. Em alguns embriões, somente o meristema apical ocorre acima do(s) cotilédone(s). Em outros, como ocorre no *E.contortisiliquum*, há um sistema caulinar embrionário, consistindo em um eixo semelhante ao caule, chamado epicótilo, que se localiza acima do(s) cotilédone(s). O eixo semelhante ao caule, abaixo do(s) cotilédone(s), é denominado hipocótilo (Raven, 2001).

Assim, no embrião totalmente desenvolvido tem-se as seguintes zonas:

- Radícula – raiz do embrião;
- Hipocótilo – parte do caulículo acima da raiz e abaixo da inserção dos cotilédones;
- Epicótilo – parte do caulículo acima da inserção dos cotilédones;
- Esboços foliares – primeiras folhas, também designados plúmula.

Neste trabalho analisamos o perfil protéico do extrato de sementes de *E.contortisiliquum*, assim como de calos vegetais provenientes de seus cotilédones, epicótilos e hipocótilos. As sementes pertencentes à espécie *E. contortisiliquum* são encontradas encerradas por legume indeiscente, preto quando maduro, recurvado, carnoso, semilenhoso, com formato característico que lembra a orelha humana ou a alça intestinal achatada (Lewis, 1987; Carvalho, 1994), contendo duas a doze sementes, cada fruto pesa de 8 a 15 g. As sementes são glabras, elipsóide, com

tegumento liso e duro, marrom, brilhante, medindo cerca de 10 a 15 cm de comprimento por 6 cm de diâmetro (Carvalho, 1994).

1.3. Enterolobina

Citolisinas são substâncias de diferentes naturezas e de distribuição ubíqua que causam a perda da integridade da membrana celular, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular. O mecanismo geral de ação das citolisinas envolve a interação entre a citolisina e a membrana plasmática, promovendo alterações na composição química ou na própria estrutura da membrana resultando em modificação na permeabilidade e conseqüente citólise (Thelestan & Molby, 1979)

Existe uma vasta literatura descrevendo essas substâncias, de naturezas químicas bastante diversas, com capacidade citolítica. Tais substâncias apresentam muitas diferenças em suas características físico-químicas, na capacidade e no mecanismo de lise. Essas toxinas são encontradas em bactérias, fungos, invertebrados marinhos, artrópodes, répteis, anfíbios e mamíferos (Sousa *et al.*, 1990). A natureza química das substâncias com capacidade citolítica é muito variável. Dentre elas podemos citar: saponinas, lisofosfolipídios, proteínas e peptídeos (Assa *et al.*, 1973; Thelestan e Mollby, 1979; Zalavsky *et al.*, 1979).

Thelestan e Mollby (1979) classificaram os agentes citolíticos em cinco grupos:

1. aqueles que atuam como detergente causando solubilização não específica dos componentes da membrana, como, por exemplo, hemolisinas de *Pseudomonas*;
2. moléculas que interagem apenas com alguns constituintes da membrana, causando solubilização ou degradação, como, por exemplo, fosfolipase C de *Bacillus cereus* e melitina;
3. citolisinas que interagem com receptores específicos na membrana celular, provocando lesões de tamanho limitado, como, por exemplo, aerolisinas, cereolisinas, listeriolisinas e fatores líticos de cobras;
4. agentes que induzem a formação de pequenos canais de tamanho definido, como, por exemplo, niastina, anfoterecina B e α -toxina;

5. proteínas que produzem apenas um aumento limitado na permeabilidade da membrana plasmática, como, por exemplo, fosfolipase D de *Corynebacterium ovis*, fosfolipase C de *Stafilococcus aureus* e streptolisina S.

Uma classificação geral e mais atual divide as citolisinas em dois grupos principais: as formadoras e as não-formadoras de poros. As proteínas formadoras de poros são classificadas em quarenta famílias distintas, entre elas a família da aerolisina, onde se encontra a enterolobina. De forma simplificada, as citolisinas formadoras de poros podem ser classificadas como α -PFTs (*pore forming toxins*), que formam poros utilizando grampos de α - hélices, e β - PFTs, as quais usam β - barris na formação de poros (Parker, 2003).

β -PFTs são liberadas como monômeros solúveis que se oligomerizam formando poros ativos. O último passo de inserção requer um “refolding” significativo de parte da estrutura, de modos que as subunidades formam um β -barril transmembrânico (Tilley and Saibil, 2006). Muitas toxinas dessas famílias têm sido encontradas em bactérias, mas homólogos estruturais foram descobertos em eucariotos. A enterolobina é um exemplo, assim como uma toxina encontrada do cogumelo *Laetiporus sulphureus* e uma família de hidralisinas de Cnidários pertencente à família “aerolysin-like” (Bittencourt, 2003; Mancheno, 2005; Sher, 2005).

Poucas proteínas e peptídeos com capacidade de lise celular em eritrócitos foram isolados e purificados de vegetais superiores. Podemos citar quatro ocorrências: uma tionina isolada de *Pyralia pubera* (Vernon *et al.*, 1985), a crotina isolada de sementes da Euphorbiaceae *Croton tiglium* (Banerjee e Sem, 1981), a gumeferina encontrada em sementes de *E. gummiferum* (Silva *et al.*, 1995) e a enterolobina isolada das sementes de *E. contortisiliquum* (Sousa e Morhy, 1989).

A tionina isolada de *P. pubera* é um peptídeo básico com massa molecular de 5.280 Da e 47 resíduos de aminoácidos sem atividade fosfolipásica, mas que atua sinergicamente com a fosfolipase A₂ de abelhas. É um peptídeo citolítico e neurotóxico com maior atividade contra células vermelhas humanas, seguida pela de coelhos, cobaias e suínos. Apresenta pouca ou nenhuma atividade contra eritrócitos de ovinos, equinos, bovinos e camundongos (Sousa, 1991; Sousa, Ricart and Morhy, 1990).

A crotina é uma lectina não tóxica extraída de *Croton tiglium* (Euphorbiaceae). Atua causando aglutinação em eritrócitos de humanos, eqüinos e caninos. Causa aglutinação e hemólise em eritrócitos de coelhos. A crotina foi purificada e

caracterizada por Banerjee e Sem (1981). Possui massa molecular de 55.000 Da e pode sofrer associações até atingir uma massa de 400.000 Da, com duas isoformas contendo pls de 5,1 e 5,4.

A enterolobina foi uma das primeiras proteínas citolíticas de origem vegetal descrita na literatura (Sousa,1988; Sousa & Morhy,1989). A gumeferina extraída de sementes de *E. gummiferum*, possui características semelhantes à enterolobina (Silva Jr., 1995). Ambas atuam sobre a membrana de eritrócitos e outros tipos celulares, formando poros e provocando a perda do conteúdo celular.

A enterolobina foi purificada pela primeira vez no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília (Sousa, 1988; Sousa e Morhy,1989) a partir da farinha obtida de sementes de *E. contortisiliquum*. A extração foi realizada com NaCl, seguida de precipitação com sulfato de amônio, adsorção em resina de DEAE celulose e cromatografia de filtração em gel. Posteriormente, Lima (1999), demonstrou a presença dessa proteína em todos os estágios do desenvolvimento da semente que passava pelo amadurecimento, germinação e estágios iniciais pós-germinativos.

A enterolobina possui uma massa de 55 kDa determinada por eletroforese desnaturante com SDS, de 59,8 kDa por gel filtração (Sephadex G-150) e 51,3 kDa por gel filtração em HPLC. Por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF a massa molecular acurada é de 52,9 kDa(Lima *et al*, 1999) . Apresenta ponto isoelétrico igual a 7,0. Através da análise de aminoácidos, verificou-se que é composta por grandes quantidades de aminoácidos asparagina, fenilalanina, serina e treonina (Sousa e Morhy, 1990).

A característica que destaca essa proteína vegetal é a capacidade de hemolisar eritrócitos humanos, independente do tipo sangüíneo, e de coelhos. Linfócitos não apresentam suscetibilidade à ação dessa toxina vegetal, sendo uma exceção dentre as células sangüíneas (Sousa *et al.*, 1999)

Fatores colaboram para a diminuição ou perda total da atividade citolítica da enterolobina. Através de ensaios, demonstrou-se uma redução considerável da capacidade de hemólise em soluções de pHs básicos extremos, como 10,8 e 11,6, e uma ausência completa de atividade hemolítica em casos de pH muito ácido. Em relação ao efeito da temperatura sobre essa citolisina observou-se que abaixo de 45°C a atividade hemolítica permanece inalterada. No entanto, em temperaturas mais

elevadas, ocorre uma redução drástica em sua atividade hemolítica (Sousa e Morhy, 1990).

Estudos utilizando microscopia ótica revelaram que a lise de eritrócitos pela enterolobina ocorre aparentemente em três estágios (Sousa, 1991). No primeiro, a enterolobina se liga à membrana celular. Posteriormente, ocorre aumento do volume dos eritrócitos, os quais devido a sua elasticidade são capazes de resistir a esta deformação durante alguns minutos. O último estágio é a lise da membrana celular. Observações feitas através de microscopia eletrônica evidenciaram a presença de poros que variavam de 40 a 300 nm, resultantes do choque osmótico sobre a membrana da célula desencadeado pela enterolobina (Sousa *et al.*, 1999) Esta observação foi confirmada pelo uso de enterolobina complexada a ouro coloidal visualizada ao redor dos poros formados.

Diversas características evidenciadas para a enterolobina levam à sugestão de que o modelo de estudo comparativo mais próximo a ela é a aerolisina, citolisina extraída e purificada a partir do sobrenadante de cultura de bactérias do gênero *Aeromonas* (Fig.2). Embora sejam provenientes de organismos muito distintos, as duas citolisinas possuem um grande número de características em comum.

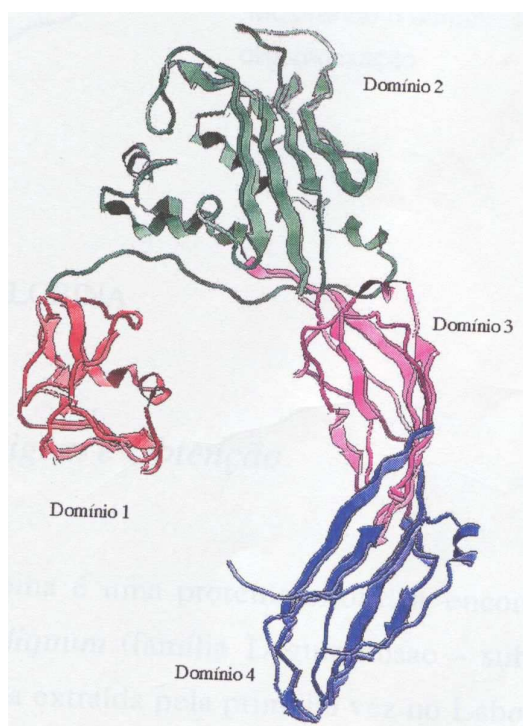


Figura 2. Estrutura terciária da proaerolisina. Em destaque os 4 domínios, as duas fitas β e a torção de 180 das fitas antiparalelas.

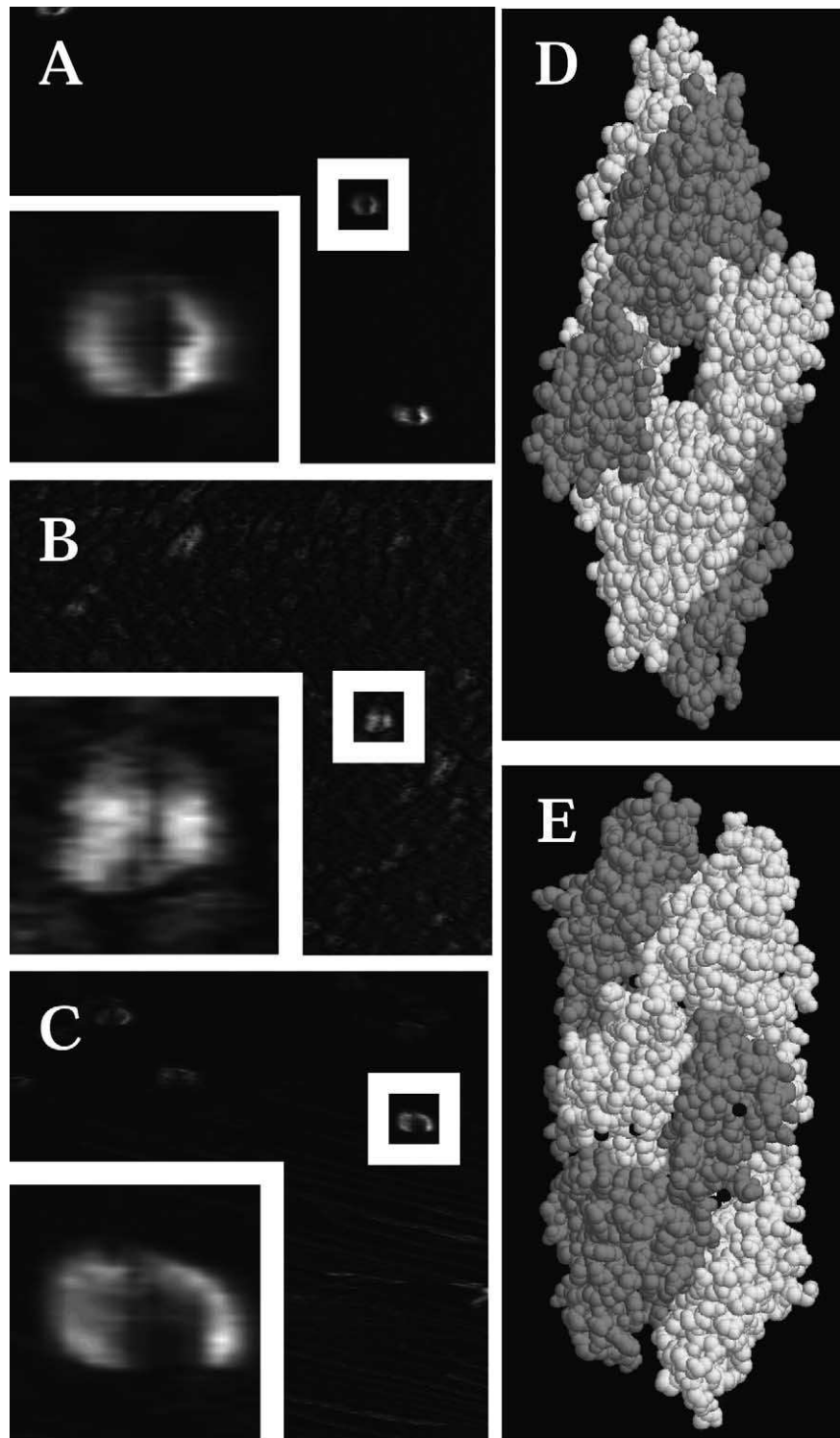


Figura 3. Microscopia de Força Atômica. Imagens da molécula de enterolobina colocada na água (A), 0.01% TFA (B) 300 mM KCl em 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (C). A representação molecular da estrutura dimérica da enterolobina (D) e o dímero de proaerolisina (E).

Através de buscas em bancos de dados, verificou-se que apesar de a enterolobina ser uma proteína vegetal, ela possui 45% de similaridade e 59% identidade com a aerolisina de *Aeromonas hydrophila* e outras espécies de *Aeromonas* (Sousa *et al.*, 1994; Fontes *et al.*, 1997). Além disso, aerolisina e enterolobina apresentam outras características em comum, tais como: massas moleculares próximas em torno de 52kDa (Fontes *et al.*, 1997), capacidade de oligomerização, lise de células pela formação de poros e susceptibilidade das células eucarióticas à ação de ambas as proteínas.

A enterolobina demonstrou toxicidade a insetos em ensaios realizados por Sousa, 1994. Bioensaios realizados com sementes artificiais, as quais continham enterolobina parcialmente purificada mostraram que esta citolisina é tóxica à larva de *Callosobruchus maculatus* (coleóptero), causando uma redução na sobrevivência de 95% em relação ao grupo controle na concentração de 0,25% (v/v), e com a concentração de 0,5% foi observada mortalidade total. Entretanto, esta citolisina demonstrou-se inócua à larva de *Spodoptera litoralis* (lepdóptero), observando-se um desenvolvimento e sobrevivência equivalente ao do grupo controle. Tal fato parece estar relacionado com a presença de enzimas proteolíticas no aparelho digestório da larva de lepdóptero, capazes de hidrolisar a enterolobina (Sousa e Morhy, 1990).

Apesar dos estudos realizados com a enterolobina, a sua função no vegetal ainda permanece obscura. Algumas conjecturas foram formuladas, propondo a essa proteína um papel defensivo (Sousa *et al.*, 1993; Lima, 1999), pois as plantas, em todas as fases do seu desenvolvimento, estão expostas ao ataque de vertebrados, microorganismos patogênicos, insetos predatórios e outros invertebrados. Devido a essa pressão ambiental, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção contra esses agentes agressores.

Para o estudo e desenvolvimento de aplicações dessa proteína, é necessário dispor de grande quantidade de material, o que, infelizmente, o método em uso não permite. O amadurecimento de frutos ocorre a partir de junho no Distrito Federal (Carvalho, 1994). A coleta de frutos maduros para extração de enterolobina de sementes é feita nos meses de setembro e outubro. Em alguns anos a produção de frutos é muito baixa, inviabilizando a obtenção da citolisina. Além de enterolobina, proteínas como inibidores de proteases (Oliva *et al.*, 1987 e 1988; Batista *et al.*, 1996; Batista *et al.*, 2001), endopeptidase (Silva *et al.*, 1994), arilamidase (Costa *et al.*, 1991) têm sido purificadas de sementes de *E. contortisiliquum*. Desta forma, fomos

motivados a desenvolver esse projeto com o propósito de identificar outra fonte para obtenção contínua da enterolobina, através de culturas de tecidos vegetais. Uma fonte com menos interferência das variações climáticas, viabilizando uma obtenção contínua e permanente.

1.4. Cultura de tecidos vegetais

Proteínas podem ser obtidas em grandes quantidades utilizando diversas estratégias ou metodologias. A partir da cultura de microorganismos, de células animais, de tecidos vegetais, animais transgênicos e plantas transgênicas. A escolha do método mais apropriado para a produção requer uma análise de cada caso. Um grande número de fatores deve ser considerado, incluindo o custo da produção, o volume, a eficácia, a segurança e a estabilidade do produto, e, se as proteínas específicas possuem propriedades bioquímicas e farmacológicas comparáveis com o material das fontes existentes. Os últimos 15-20 anos foram focalizados na cultura de células animais e de microorganismos; somente mais recentemente é que as culturas de tecidos vegetais estão sendo consideradas como sistemas de expressões viáveis e competitivos para produção de proteínas em larga escala (Doran, 2000).

A cultura de tecidos vegetais consiste no crescimento de células, como uma massa organizada, em um meio de ágar (cultura de calos) ou como suspensão de células livres em um meio líquido (cultura de suspensão). As culturas vegetais combinam o mérito de utilizar as vantagens do sistema celular dos vegetais em relação as culturas de microorganismos, além de já existir um protocolo estabelecido para a produção de alguns metabólitos (Hellwing, 2004).

Culturas vegetais, assim como a de microorganismos, têm baixo custo de manutenção e crescimento, sendo mantidas em meios sintéticos e simples. As células de culturas vegetais, por serem eucarióticas superiores, permitem mudanças pós-transdacionais. Assim como nas células animais, podem-se sintetizar proteínas multiméricas complexas e glicoproteínas, como as imunoglobulinas (Fischer, 1999) e interleucinas (Kwon, 2003). As culturas vegetais possuem outras vantagens, como serem intrinsicamente seguras, pois não são hospedeiras de patógenos humanos nem produzem endotoxinas (Hellwing, 2004).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são essenciais para muitos tipos de pesquisas, e são aplicadas em muitos estudos que utilizam plantas. No passado, as culturas de tecidos vegetais eram bastante utilizadas em pesquisas sobre totipotência e o papel de hormônios na citodiferenciação e organogênese. Atualmente, culturas vegetais têm sido geneticamente modificadas, gerando mais conhecimento em biologia molecular de plantas e regulação de genes. As técnicas também são centrais para novas áreas de aplicações de estudos em plantas, incluindo a biotecnologia vegetal e agricultura. Por exemplo, plantas selecionadas podem ser clonadas e cultivadas em suspensão celular, onde metabólitos secundários podem ser produzidos. Em adição, o manejo de células geneticamente modificadas para formar plantas transgênicas requer procedimentos de cultura de tecidos; os métodos de cultura de tecidos vegetais também são importantes na formação de embriões somáticos haplóides os quais podem gerar plantas homocigotas. Portanto, cultura de tecidos tem-se tornado essencial em pesquisas acadêmicas e aplicações nos estudos em plantas.

Técnicas de propagação de culturas vegetais foram desenvolvidas na década de 1950, quando foi constatado que tais culturas possuíam potencial para sintetizar uma grande variedade de moléculas de baixo peso molecular (Gamborg, 2002). Embora a utilização de culturas vegetais com o objetivo de produzir algumas moléculas esteja sendo estudada extensivamente, somente dois metabólitos secundários – shikonina e paclitaxel (Taxol) – vêm sendo produzido em escala comercial. Uma das razões está na dificuldade em alcançar uma produção significativa dos compostos de interesse, porém a grande variedade de espécies de plantas com propriedades medicinais tem estimulado o crescente interesse nas técnicas de produção de culturas (Vesporte, 2000). No cultivo de células de plantas *in vitro*, podem ser utilizados a derivação de raízes (Hilton, 1990), teratomas (Sharp, 2001), células imobilizadas (Archambault, 1991) e suspensão de cultura celulares (Kieran, 1997).

As aplicações biotecnológicas de cultura de plantas são vastas, como por exemplo, na regeneração de plantas, por oferecerem uma estratégia prática na clonagem de plantas, desde que os regenerantes da cultura sejam geneticamente idênticos. Técnicas de cultura de tecidos tornaram-se bastantes populares nas aplicações em propagação alternativa de plantas, produção em massa de moléculas de interesse e para estudos de engenharia genética e vias metabólicas (Pais, 1988).

1.5. Calos vegetais

Culturas vegetais são geralmente iniciadas de peças estéreis de qualquer parte da planta. Essas peças, chamadas de “explantes”, podem consistir de peças de órgãos, como folhas ou raízes, ou podem ser tipos celulares específicos, como pólen ou endosperma. Muitas características de explantes necessitam ser conhecidas, pois podem afetar a eficiência da iniciação da cultura. Geralmente, quanto mais jovens, mais rapidamente ocorre o crescimento do tecido. Diferentes tipos de culturas podem ser utilizados na transformação no estudo de plantas. Um dos mais utilizados, calos vegetais, será tratado aqui.

Os calos vegetais são culturas de tecidos vegetais específicos na qual se induz o crescimento asséptico em meio artificial, através do uso de hormônios e condições nutricionais propícias, resultando na formação de uma estrutura celular (Chawla, 2000). Os calos são tecidos indiferenciados obtidos pelo cultivo de explantes em meio sólido contendo uma mistura apropriada de hormônios vegetais para manter o seu estado indiferenciado (Murashige, 1962; Gamborg, 1976).

Durante a formação de calos existem graus de dediferenciação (as mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento e especializações são, em grande parte, revertidas), tanto em morfologia (calos possuem parênquima celular não especializado) quanto no metabolismo. Uma das maiores conseqüências dessa dediferenciação é a perda na habilidade de realizar fotossíntese. Devido às mudanças no perfil metabólico na cultura de calos, provavelmente esse não se equivale aos das plantas doadoras (Torbert, 1998).

A formação de calos tem se tornado importante para muitas investigações e aplicações em pesquisas científicas. Calos podem ser multiplicados e depois utilizados como clones de plantas. Adicionalmente, vários protocolos com modificações genéticas empregam os procedimentos de iniciação de calos depois de organismos terem sido inseridos em células vegetais; plantas transgênicas são regeneradas de calos transformados. Em outros protocolos os calos são utilizados em procedimentos biotecnológicos na forma de cultura de células em suspensão das quais produtos secundários podem ser produzidos.

Explantes de diversas partes da planta podem ser utilizados para formar calos, de preferência tecidos jovens de um ou poucos tipos celulares (Fig. 4).

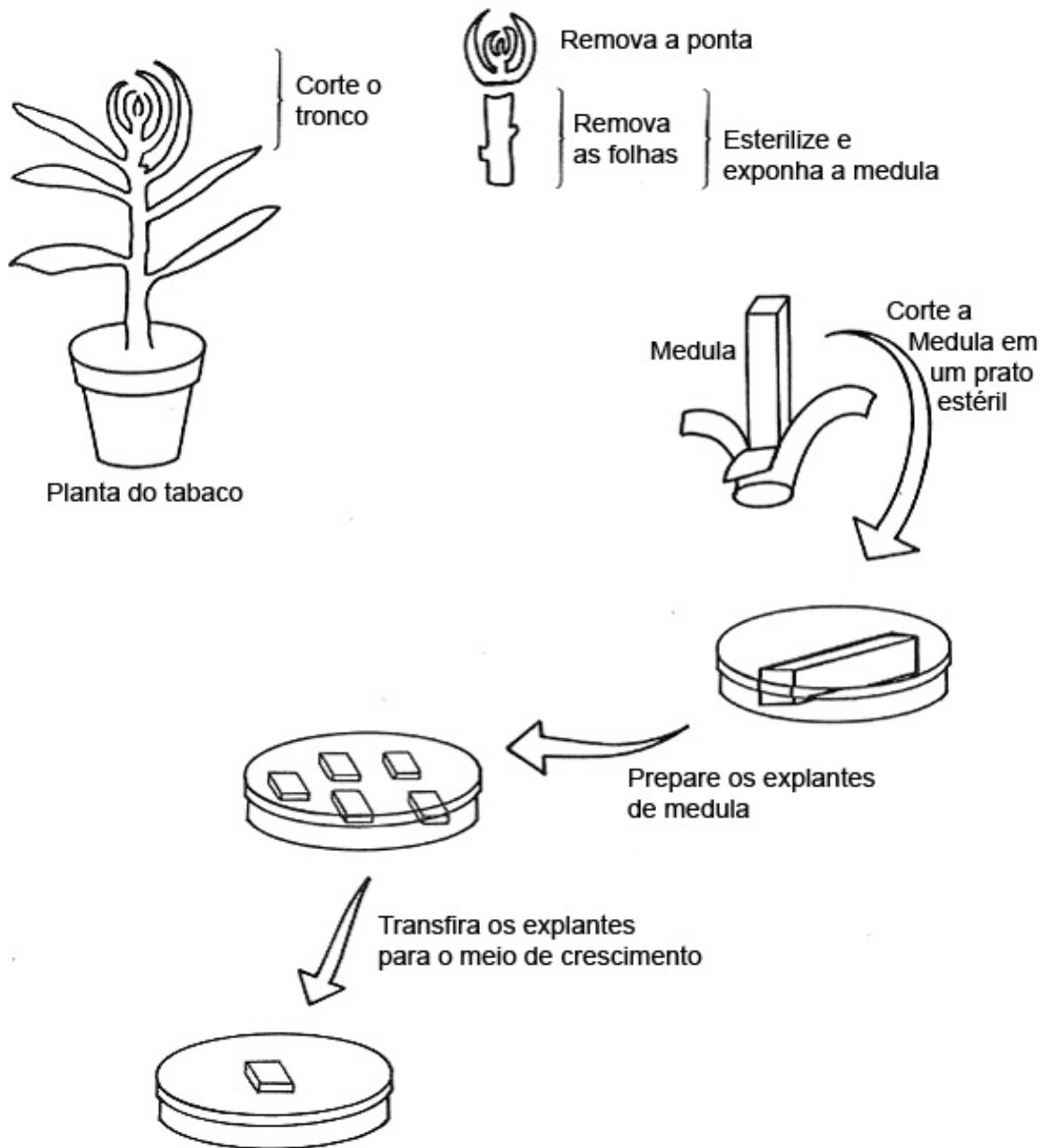


Figura 4. Formação de calos vegetais utilizando explantes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Adaptado de Bottino, 1981).

Inicialmente, as células se proliferam sem diferenciação, mas eventualmente ocorre a diferenciação em uma massa de tecido. A extensão da diferenciação usualmente depende do balanço hormonal no meio de suporte e do estado fisiológico do tecido. O crescimento de calos pode ser iniciado em meio de cultura com um balanço fisiológico de citocininas e auxinas. Depois que a biomassa de calos aumenta de 2 a 4 vezes (geralmente com 2-4 semanas de crescimento), calos são divididos e

colocados em um meio para sua multiplicação. Esse processo de multiplicação pode ser repetido várias vezes até atingir o tamanho da cultura desejado (Dodds, 1995).

Nos últimos anos vimos surgir na literatura trabalhos com culturas vegetais, onde se utiliza diversas partes da planta para produção de calos. Toker (2003) utilizou a cultura de raiz, fruto, caule e a semente de *Ecballium elaterium* a fim de estudar uma substância presente nesse vegetal utilizada no tratamento de sinusite.

Sarin (2004), utilizando a cultura de semente de *Tagetes erecta* como fonte para cultura de calos, conseguiu mostrar a potencialidade dessa cultura para produzir ácido ascórbico assim como o inseticida piretino. Ribossomos inativantes de proteínas (RIPs) foram isolados da cultura de calos produzidos dos explantes da semente de *Abrus pulchellus* (Silva, 2003).

Analisando estes e outros estudos que vêm surgindo, nota-se que tecidos de plantas e culturas celulares podem ser uma alternativa para uma fonte contínua de material, assim como uma ferramenta importante para estudos de regulação e biossíntese de proteínas e outros compostos. Dessa forma, cultura de calos pode representar um sistema conveniente para obter e purificar quantidades consideráveis de material para aplicações biotecnológicas.

1.6. Proteômica Vegetal

A proteômica é a expressão das proteínas de um genoma em um ponto específico num determinado tempo (Wasinger *et al.*, 1995). Os últimos 3 anos do século 21 tem sido de grande impacto na proteômica de plantas (Agrawal *et al.*, 2005), porém esta ainda está em um estágio inicial quando comparada com a análise de proteomas de procariotos e humanos. Isto se dá parcialmente pela carência na seqüência completa do genoma ou cDNA das plantas. No entanto, a proteômica vegetal vem conquistando espaço, e está caminhando para se tornar a maior área de pesquisa e desenvolvimento no campo de biologia de plantas (para revisões, Thiellement *et al.*, 1999; Rossignol, 2001; Van Wijk, 2000; Van Wijk, 2001; Kersten, 2002; Mathesius, 2004; Canovas, 2004). Como foi declarado por Watson e colaboradores “para procurarmos entender melhor a função de genes e para estudar a biologia holística dos sistemas, é inevitável que estudemos o proteoma” (Watson *et al.*, 2003).

O progresso feito no seqüenciamento do genoma tem aberto novas e excitantes possibilidades para analisar sistemas biológicos e seus complexos funcionais em diferentes níveis. Em paralelo à acumulação de dados de ácidos nucléicos, desenvolvimentos tecnológicos têm permitido o estabelecimento de sistemas para análises multiparalelas de transcritos, assim como em níveis protéicos. A implementação de métodos rápidos e sensíveis na identificação de proteínas e o seu contínuo aperfeiçoamento têm transformado a análise de resultados nos estudos em plantas. Juntamente com as limitações gerais das tecnologias disponíveis, a proteômica de plantas aproxima-se agressivamente para desafios específicos (Cánovas *et al.*, 2004).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma técnica quantitativa poderosa e efetiva, mesmo com suas limitações, e é considerada a forma mais adequada para analisar proteomas de espécies cujos genomas não estão seqüenciados. Em plantas, a preparação da amostra é um passo crítico e essencial para uma boa resolução. Muitos tecidos de plantas não provêm uma boa fonte de proteínas e então requerem preparações especiais. A parede celular e o vacúolo são responsáveis por grande parte da massa celular, com o citosol representando 1-2% do volume celular total. Comparativamente, os tecidos vegetais possuem um baixo conteúdo de proteínas/volume em relação a bactérias ou tecidos de animais. A parede celular e o vacúolo estão associados com substâncias responsáveis por irreprodutibilidade e resultados inferiores como quebras proteolíticas, cargas elétricas heterogêneas em proteínas que resulta em listras horizontais nos géis. Substâncias interferentes muito comuns são os compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenos, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos (Carpentier *et al.*, 2005). Compostos fenólicos combinam-se reversivelmente com proteínas por pontes de hidrogênio e irreversivelmente por oxidação seguida por condensação covalente (Loomis and Bataille, 1966), levando à heterogeneidade de cargas e linhas horizontais no gel. Os carboidratos podem bloquear os poros do gel causando precipitação e aumentando o tempo de focalização e também terpenos, pigmentos, lipídios e o desenvolvimento de polímeros tipo lipídios que produzem linhas e cargas heterogêneas.

A proteômica de plantas possui limitações de análises, mas está sendo beneficiada pelo desenvolvimento rápido das metodologias correntes. Proteínas são física e quimicamente mais diversas que ácidos nucléicos, o que atrasa análises

quantitativas de amostras protéicas complexas. Em adição, devido aos diferentes *splicing* e modificações pós-transducionais, é esperado que para um dado organismo o número de proteínas exceda em sete vezes o número de genes. O nível de complexidade aumenta quando consideramos o número potencial de interações proteína-proteína que são modificadas em um organismo devido aos eventos do desenvolvimento e limitações fisiológicas (Van Wijk, 2001).

Com o seqüenciamento completo dos 25.000 genes do genoma de *Arabidopsis thaliana* (Agrawal *et al.*, 2005) e de outras plantas e a obtenção de dados EST, acredita-se que em pouco tempo a proteômica vegetal tornar-se-á um campo bastante explorado. A análise proteômica em plantas foi iniciada com milho (*Zea mays*) (Touzet *et al.*, 1996) e *A. thaliana* (Sahnoun *et al.*, 1998), mas a primeira revisão em proteômica vegetal foi publicada somente em 1999 (Thiellement *et al.*), à qual se seguiram mais algumas outras. A maioria destes estudos baseava-se na comparação dos níveis de expressão sem a atual identificação das proteínas e tinham como objetivo a identificação de marcadores para diferentes situações. Além dessas plantas, estudos têm sido realizados em outras espécies de dicotiledôneas tais como feijão, uva, linho, ervilha, papoula, batata, tabaco, tomate, espinafre, etc. Estes estudos têm fornecido um grande número de aplicações de novas tecnologias para a preparação da amostra, e proteomas de materiais vegetais de diferentes estágios do desenvolvimento passando por estresses ambientais e interações planta-micróbio (Agrawal *et al.*, 2005). Atualmente, com o desenvolvimento e surgimento de novas técnicas, vários estudos têm sido realizados objetivando-se a determinação de proteomas sub-celulares ou complexos protéicos como proteínas de membrana, núcleo, mitocôndria e cloroplastos (Van Wijk, 2001) para se diminuir a complexidade da amostra. Isto é conseqüência do grande número de proteínas celulares presentes em níveis variáveis de abundância e diversidade de *pI*, hidrofobicidade e massa. Além disso, esse tipo de abordagem fornece a caracterização de organelas individuais e a localização da proteína relacionando-a a sua função. Espécies florestais também têm sido objetos de estudo (Cánovas, 2004), onde o estabelecimento de bancos de dados de ESTs de espécies arbóreas tem propiciado análises globais para se avaliar e estudar mudanças na expressão gênica associada a processos importantes nas espécies arbóreas como a diferenciação do xilema, embriogênese e o crescimento.

Uma boa preparação da amostra - “extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo” (Wilkins *et al.*, 1996) – é o mais

importante passo para a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas. A preparação de amostras de material vegetal é reconhecidamente mais difícil devido à rigidez das paredes celulares e ao acúmulo de uma ampla gama de metabólitos secundários no vacúolo central. A prevalência destes compostos possivelmente representa o problema mais significativo associado com a análise de proteomas vegetais (Rose *et al.*, 2004). A baixa concentração de proteína neste material também representa outro obstáculo. Um protocolo de extração ideal reproduziria a captura e solubilização do total de proteínas em uma dada amostra, minimizando artefatos pós-extração e contaminantes não protéicos (Rose *et al.*, 2004).

Vários métodos de preparação estão disponíveis para diferentes materiais vegetais (Rabilloud, 1996). Um dos métodos mais comuns é o que utiliza ácido tricloroacético (TCA) e acetona (TCA/acetona) para a precipitação direta da proteína (Granier, 1988). Uma vantagem é a precipitação imediata das proteínas e a inativação simultânea de componentes envolvidos na degradação protéica, como as proteases. Entretanto, este método também envolve a precipitação de outras substâncias (sais, pigmentos e polifenóis) que interferem com a focalização isoelétrica (IEF) das proteínas.

Este trabalho utiliza uma espécie nativa, *E. contortisiliquum*, como fonte de material vegetal. Desde o aparecimento do artigo de revisão de Cánovas *et al.* (2004), ocorreu um aumento significativo do número de artigos focados no estudo de proteômica vegetal (Rossignol *et al.*, 2006). Entretanto, os trabalhos tem se concentrado no estudo de espécies vegetais comerciais, como o arroz (*Oryza sativa*) ou utilizando modelos como *Arabidopsis thaliana*. A importância desse trabalho está no fato de ser uma análise pioneira, a qual utiliza uma espécie sem valor comercial e até o momento esta não havia sido estudada com o enfoque utilizado nos estudos aqui realizados.

2. OBJETIVOS

Neste trabalho temos como objetivos:

- Padronizar as condições para separação de proteomas de sementes e de calos vegetais oriundos de sementes de *E. contortisiliquum* por eletroforese bidimensional;
- Construir e comparar mapas proteômicos de sementes e de calos vegetais;
- Verificar a presença de enterolobina em calo vegetais;
- Verificar a presença de isoformas de enterolobina em sementes e calos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estratégia de Ação

A estratégia para a análise comparativa do proteoma de calos e semente está resumida no fluxograma apresentado na figura 3.

Primeiramente é realizada a extração das proteínas, seguida pela separação das mesmas com o uso de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE), sua digitalização e análise. Concomitantemente, será realizada a detecção de enterolobina em géis unidimensionais da proteína de calos e da semente e, também a verificação da presença de isoformas de enterolobina em géis bidimensionais. Nos calos, não foi realizada a imunodeteção em géis bidimensionais pois a proteína enterolobina não foi encontrada na análise de géis unidimensionais.

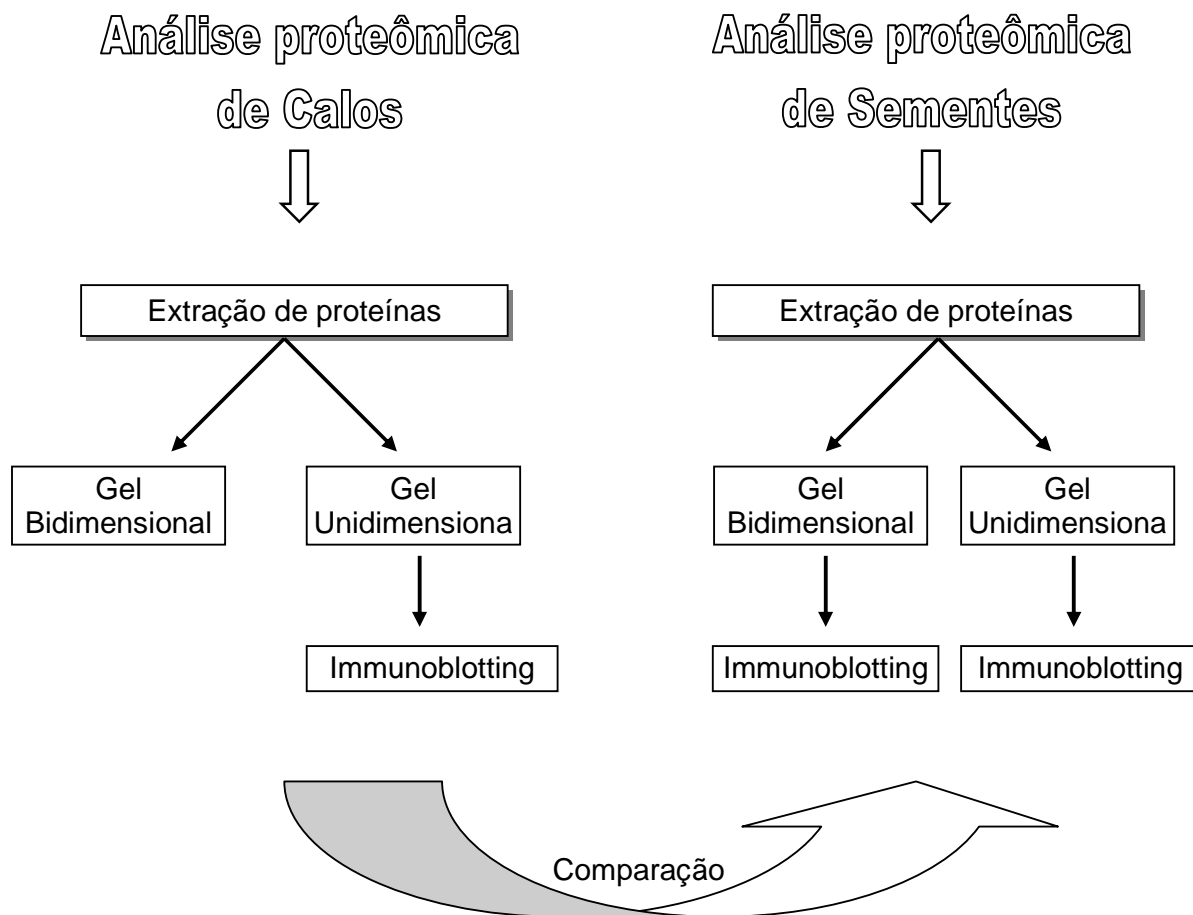


Figura 5. Fluxograma das etapas que foram realizadas neste trabalho

3.2. Material Vegetal

Este trabalho foi realizado em colaboração com a equipe dos professores Walter Handro e Eny Floh do Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). Desta forma, a produção dos calos vegetais foi realizada por esta equipe e os materiais enviados para análise no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas / Centro Brasileiro de Pesquisas em Proteínas (LBQP/CBSP) da Universidade de Brasília (UnB).

Sementes maduras de *E. contortisiliquum* foram obtidas a partir dos legumes coletados na sede campestre do Clube do Congresso de Brasília e estocadas em câmara fria a 8 °C.

Os calos foram produzidos pelo Laboratório de Biologia Celular de Plantas, IB, USP a partir de sementes maduras de *E. contortisiliquum*. Sementes foram aleatoriamente selecionadas e escarificadas mecanicamente com lixa d'água em uma das faces e embebidas em água destilada *overnight*. Procedeu-se à desinfecção das sementes utilizando solução de hipoclorito de sódio a 30% e água destilada estéril. Inoculou-se uma semente para cada tubo de ensaio, contendo 20 mL de meio MS-61. Aguardou-se a germinação e desenvolvimento das plantas para seguir com os experimentos (aproximadamente 20 dias). Foram realizados experimentos utilizando-se explantes de cotilédones, parte final dos cotilédones, hipocótilo e epicótilo, submetidos a 6 tipos de tratamentos em meio básico MS-61, sendo: 1- 2,4-D (1mg/L), 2- ANA (1 mg/L), 3- 2,4-D (1mg/L) + ABA (0,2 mg/L), 4- ANA (1mg/L) + ABA (0,2 mg/L), 5- AIA (1mg/L) + BA (0,2 mg/L), 6- AIA (1 mg/L). Para cada tratamento utilizaram-se 4 tubos com explantes de cotilédones, 2 tubos com explantes de parte final de cotilédones, 2 tubos com explantes de hipocótilo e 2 tubos com explantes de epicótilo, totalizando 10 tubos/tratamento. Todas as culturas foram mantidas na luz (fotoperíodo: 16 horas luz/8horas escuro) à $27 \pm ^\circ\text{C}$. Após a obtenção de calos, estes foram repicados nos mesmos meios de cultura.

3.3. Extração e quantificação de proteínas

Foram utilizados dois procedimentos para a extração das proteínas do material vegetal. O primeiro procedimento foi o método descrito por Lima (1999). Este método consistiu na maceração de amostras de tecidos em nitrogênio líquido na proporção de 1g/8 mL (tecido vegetal/ tampão). A extração feita por 30 min, a 4 °C, sob agitação, em PBS, pH 7.2, contendo EDTA (20 mM de NaH₂PO₄, 0.13 M de NaCl, 1mM de EDTA). Inibidores de proteases (1 mM de PMSF, 1mM de TLCK), DTT (1mM) foram acrescentados no momento da extração. A seguir, cada extrato foi centrifugado 40.000 x g, por 1 h, a 4 °C.

O segundo procedimento utilizado para a extração de proteínas consistiu na utilização de 1 g de amostra dos calos e da semente. O procedimento para extração foi adaptado de Imin *et al.* (2001) e consistiu na maceração, utilizando-se um cadinho, das amostras em nitrogênio líquido e na presença de pó de vidro. Após a maceração, adicionou-se 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% em acetona contendo 0,07% de ditioneitol (DTT) (-20°C), seguido de incubação a -20°C durante 1 h e centrifugação a 30.000 xg durante 20 min. Cada sedimento foi ressuspensão em 4mLs de acetona contendo 0,07% de DTT, seguido de incubação a -20°C durante 30 min e centrifugação a 12.000 xg durante 15 min, procedimento que foi repetido 2 vezes para a lavagem do sedimento e remoção de resíduos de TCA. Após a centrifugação, os sedimentos foram secos em *Speed-vac* e as suas massas foram estimadas. Para a solubilização, adicionou-se tampão de reidratação para 2-DE (Paba *et al.*, 2004) constituído de 7M uréia, 2M tiouréia, DTT a 1% (p/v), anfólitos a 5% (v/v) (Pharmalyte), Triton X-100 a 2% (v/v) e traços de azul de bromofenol na proporção de 50 µL de tampão para cada miligrama de *pellet*. Após a adição do tampão de reidratação, o material foi submetido à sonificação por 20 minutos, com intervalos de 30 segundos de agitação a cada 1,5 min de banho sonicador. Em seguida, realizou-se a centrifugação final a 12.000 xg durante 15 min à temperatura ambiente e retirada do sobrenadante, fração solúvel em tampão de reidratação. Para a estimativa do conteúdo de proteína utilizou-se o método Plus One 2D Quant-Kit (Amersham Pharmacia) usando-se albumina de soro bovino como padrão.

Durante este estudo, utilizamos o segundo método de extração, pois este se mostrou com maior reprodutibilidade.

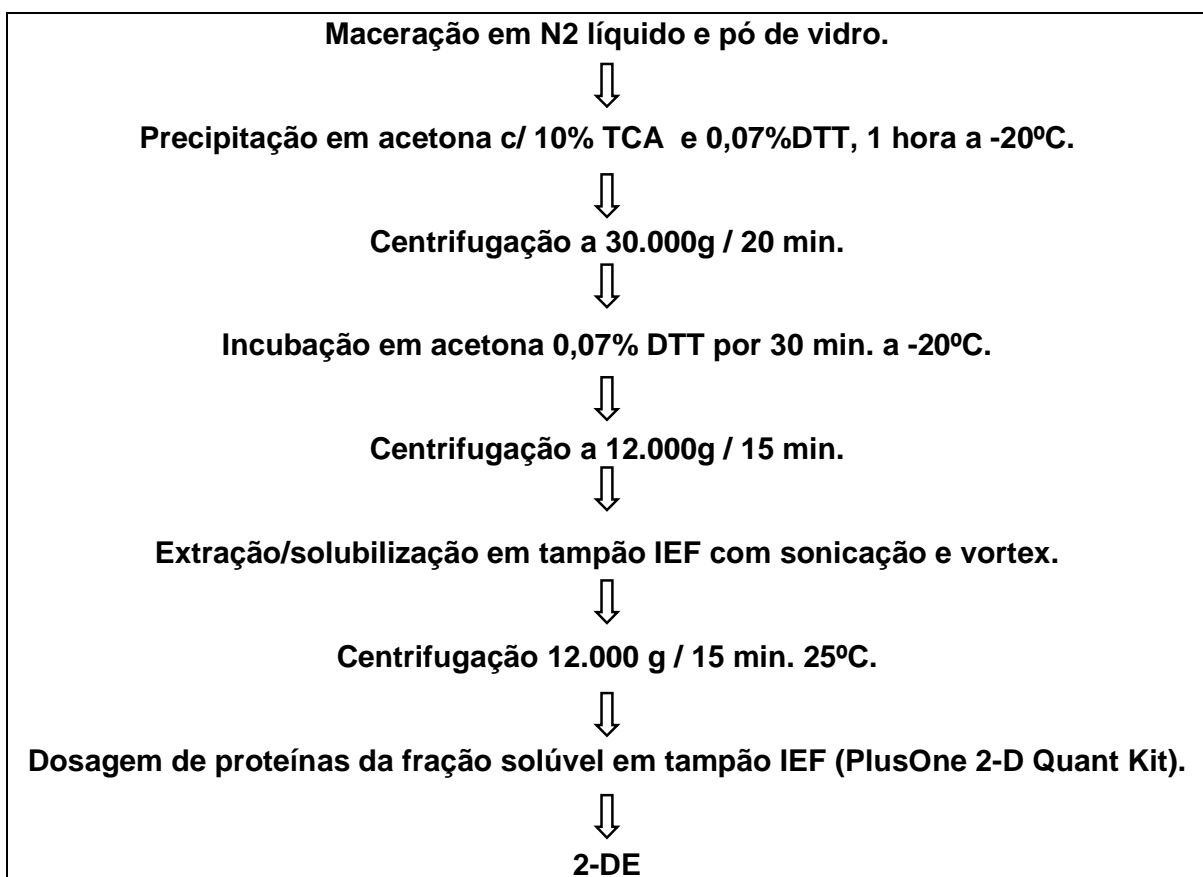


Figura 6. Fluxograma do procedimento de extração de proteína dos calos vegetais e sementes de *E.contortisiliquum*

3.4. Obtenção da enterolobina pura

A purificação da enterolobina foi feita a partir de sementes maduras de *E. contortisiliquum* utilizando, basicamente, o método previamente descrito por Sousa *et al.* (1994). As sementes moídas foram delipidadas com acetona a -20 °C por 30 s sob agitação em Omni Mixer, e secas em temperatura ambiente. O material delipidado foi extraído em solução salina 0,15 mol/L, o extrato foi filtrado e em seguida, centrifugado por 30 min. O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio nas faixa de 25- 40% de saturação. O precipitado foi submetido à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. As frações originadas dessa extração foram dissolvidas em Tris 50mM, 1 mM EDTA, pH 8,9 e submetidas a cromatografia de troca iônica, que foram realizadas em uma coluna Resource Q (Pharmacia Biotech) acoplada a FPLC. O fluxo foi 6 mL/min e a leitura de absorbância se deu em 280 nm. As frações foram coletadas manualmente e, em seguida, liofilizadas e submetidas à cromatografia de filtração em

gel, utilizando um FPLC adaptado a uma coluna Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão: 50 mM Na-fosfato, pH 7.0 contendo 0,15 M de NaCl. Após a coleta, as frações dos materiais de picos protéicos foram submetidas a testes de hemólise, confirmando-se a presença de atividade dos mesmos.

3.5. Produção do anticorpo

Os anticorpos utilizados foram cedidos pela Dra. Consuelo Medeiros Rodrigues de Lima. Anticorpos policlonais contra a enterolobina foram obtidos por meio da imunização de um coelho com enterolobina purificada. Foram injetadas, intraperitonealmente, duas doses de enterolobina (200 µg cada) dissolvidas em adjuvante completo de Freund, com intervalo de um mês entre as aplicações. Uma semana após a última aplicação, o sangue do coelho foi drenado por punção cardíaca; o anti-soro obtido foi dividido em alíquotas e armazenado a – 20 °C.

3.6. Eletroforese em condições subdesnaturantes (SDS-PAGE)

A metodologia eletroforética foi basicamente a descrita por Laemmli (1970). O gel separador foi preparado a 10% e o gel concentrador a 4%. Amostras de 15,0 µL de calo e semente extraídos em tampão desnaturante, foram diluídas em tampão de eletroforese 2X [Tris 0,125 M, pH 8,8, SDS a 4% (p/v), sacarose a 20% (p/v), DTT a 100mM e azul de bromofenol a 0,01%], aplicadas no gel. A separação de proteínas foi realizada em sistema Hoefer de eletroforese vertical, sob corrente constante (35 mA). Os padrões utilizados foram 5µL do padrão de massa molecular da Pharmacia e 10µL de enterolobina purificada. O tampão de corrida foi preparado 10X (0,25 M de Tris, 1,92 M de glicina, 1% (p/v) de SDS, pH 8,8) e diluído na hora do uso. O gel foi fixado (metanol a 50% / ácido acético a 10%) e corado com nitrato de prata.

3.7. Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida

Os mapas bidimensionais foram feitos de acordo com a metodologia estabelecida por Görg *et al.* (1985 e 1988). Amostras precipitadas em acetona /TCA (80µg) e extraídas no tampão de reidratação composto por uréia 7M, tiouréia 2M, DTT 1% (p/v), anfólitos 0,5% (v/v), Triton X-100 2% (v/v) foram adicionadas a 370 µL do mesmo tampão de reidratação contendo traços de azul de bromofenol. Para a focalização isoeletrica (IEF), géis de 18 cm com gradiente imobilizado (IPG) de pH 3-10 não lineares (*Immobiline Drystrip*, Amersham Biosciences), foram reidratados com as amostras durante 12 h (Sanchez *et al.*, 1997), e submetidos à IEF em aparelho IPGphor (Amersham Biosciences) em quatro passos sucesivos: 67 Vh, 500 Vh, 1000 Vh e 36000 Vh. Após a focalização, os géis foram submetidos à redução/alquilação por incubação durante 20 min em solução de equilíbrio (3 mL) contendo 50 mM tris pH 8,8, 6M uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS e 125 mM DTT, seguido de 20 min na mesma solução de equilíbrio sem DTT, contendo 125 mM de iodoacetamida. Em seguida, procedeu-se a lavagem por 3 min em tampão Tris-HCl 0,0375 mol/L com glicina 0,3 mol/L e SDS 0,1 mol/L.

A segunda dimensão foi realizada por eletroforese desnaturante em poliacrilamida usando o sistema Bio Rad PROTEAN II xi Cel. O gel separador foi feito a 10% e o gel concentrador a 5%. A eletroforese foi realizada a 25 mA até 500V a 20 °C. Utilizou-se tampão de amostra com Tris-HCl 0,125 mol/L pH 8,8, sacarose 20%, SDS 4%, DTT 100mM e traços de azul de bromofenol.

3.8. Coloração dos Géis com Nitrato de Prata

As proteínas foram visualizadas utilizando coloração de prata (Blum, 1987) ou Coomassie Blue. Para coloração com prata, os géis foram fixados overnight com metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), formaldeído 0,05% (v/v) por 20 min, em seguida foram incubados com álcool etílico 50% (v/v) por 20 minutos, sensibilizados em tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) por 1 min, seguido de 3 lavagens com água Milli Q. Posteriormente os géis foram impregnados com nitrato de prata 0,2% (p/v) e formaldeído 0,075% (v/v), lavados com água Milli Q durante 40 s e revelados com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v). A reação foi parada com metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Para coloração com Coomassie Blue R 250 (CBB

R 250) os géis foram incubados em solução contendo metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e de CBB R 250 0,1% (p/v) por 18 hs; após esse tempo o gel foi descorado por lavagens com ácido acético 10% (v/v). Terminada a coloração os géis foram armazenados em ácido acético 1% (v/v) à temperatura ambiente.

3.9. Análise de Imagens

Os géis corados com prata foram digitalizados usando-se um *scanner* (*ImageScanner* – Amershan Biosciences) em modo transparência com resolução de 300 dpi (*dotch per inch*) e as imagens geradas em formato *tif*, foram analisadas usando-se o programa computacional *ImageMaster Platinum v.5* (Amershan Biosciences). A detecção de cada *spot* de proteína foi validada por inspeção manual e editada quando necessário. O programa forneceu o número de *spots*.

3.10. Eletrotransferência e imunodeteção

As proteínas dos extratos de semente e calo de *E. contortisiliquum* previamente separadas por 2-DE, foram eletrotransferidas em uma membrana de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979) usando o aparelho Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). A eletrotransferência foi transcorrida *overnight* a 100mA.

Após a transferência a membrana de nitrocelulose foi submetida à imunodeteção utilizando-se soro anti-enterolobina, bloqueando-se a membrana com PBS-Tween (NaCl 0,15M, 0,1% Tween, pH 7.2-7.4) e 5% de leite em pó desnatado durante 1 hora. Em seguida, lavou-se a membrana para retirar o excesso de leite. Adicionou-se anti-soro diluído em PBS-Tween e incubou-se por 1 h sob agitação constante, com 3 lavagens de 5 min cada. Adicionou-se o conjugado anti-anticorpo ligado a peroxidase (1:1000) e incubou-se por 1 h, com 3 lavagens de 5 min cada. Por fim, adicionou-se à solução de revelação (10mg de diaminobenzidina, 33mL PBS-Tween e 333 µL H₂O₂ a 3%). Após a revelação, lavou-se a membrana com água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal

Observou-se a formação de duas linhagens características em calos resultantes de explantes de epicótilo, hipocótilo e cotilédone do tratamento 1 (meio básico MS-61 com 2,4-D (1mg/l)). Essas linhagens apresentaram coloração típica, sendo uma verde e outra amarela. Realizou-se novo repique separando-se calos verdes e calos amarelos, os calos inoculados em meio com tratamento 1, após 3 meses do repique, começaram a liberar células, iniciando-se assim uma cultura de suspensão celular.

Neste trabalho utilizamos a linhagem verde dos calos vegetais devido a maior quantidade de material produzida em relação à linhagem amarela. Desta, também, possuíamos os calos provenientes do epicótilo, hipocótilo e cotilédone da semente produzidos no mesmo dia.

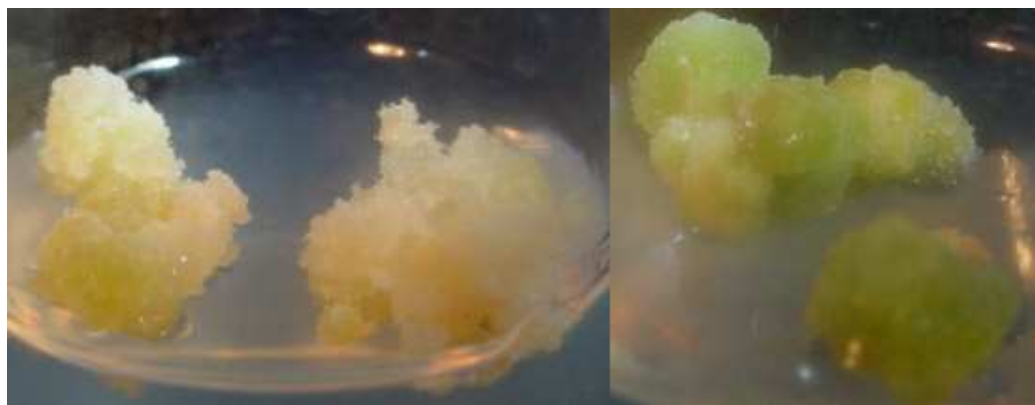


Figura 7. Calos vegetais de *E. contortisiliquum*

4.2. Adequação do protocolo de extração de material vegetal.

Inicialmente o método de extração foi o mesmo utilizado por Lima (1999) para extração de enterolobina em sementes. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e então liofilizadas. Seguiu-se com extração PBS pH 7.2, contendo coquetel de inibidores de proteases na concentração de 1mM (PMSF, TLCK, TPCK, pepstatina e EDTA), a 4°C durante 30 minutos. Os extratos foram centrifugados a 10.000 xg durante 10 min e o sobrenadante, armazenado a -20°C. Utilizando essa extração, observou-se no perfil eletroforético, principalmente em calos vegetais, a presença de uma grande

quantidade de proteínas de baixa massa molecular, indicando uma intensa ação de proteases (Fig. 9A).

Em plantas, sabe-se que a preparação de amostras é um passo crítico e absolutamente essencial para um bom resultado. Então, avaliamos outro método de extração. Este utiliza, anterior à extração com tampão de reidratação, um passo de precipitação com acetona e TCA. Com esse método observou-se maior reprodutibilidade e diminuição na perda de proteínas como observado na Fig.9B. O TCA/acetona é precipitante efetivo (Damerval,1986), eliminando proteases e outras enzimas modificantes. Além disso, a precipitação é importante para concentrar as proteínas e separar compostos interferentes, como carboidratos, lipídios e outros compostos presentes em plantas.

4.3. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas dos extratos de sementes e calos de *E. contortisiliquum* foi realizada utilizando-se o *Plus One 2D QuantKit* (Amersham Pharmacia) tendo a albumina sérica bovina como padrão. A concentração de proteínas da semente se apresentou maior do que nos calos vegetais, conquanto amostras provenientes do hipocótilo e do epicótilo não apresentaram concentrações protéicas significativamente diferentes, maiores por sua vez que aquela de calo cotiledonar. Uma vez que foi utilizada a mesma relação tecido/volume na extração, estes valores podem ser explicados pelo maior grau de hidratação dos calos, principalmente no estágio cotiledonar.

Tabela 1. Concentrações de proteínas dos extratos de calos vegetais e sementes de *E. contortisiliquum*.

Semente / Calos*	Concentração de proteína (mg/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
semente	1,13	0,001	0,12
epicótilo	0,94	0,009	1,52
hipocótilo	0,86	0,004	0,59
cotilédone	0,56	0,020	5,11

4.4. Perfil Unidimensional dos extratos de calos e semente de *E. contortisiliquum*

Foram realizadas eletroforeses desnaturantes (SDS-PAGE) para a análise inicial dos perfis protéicos. A quantidade de proteínas foi de 15 µg. Os géis possuíam espessura de 0,75 mm e concentração de 10% de poliacrilamida. Utilizou-se o sistema Hoeffer SE-600 (Pharmacia Biotech) conectado ao resfriador MultitempII (Amersham). A separação eletroforética foi realizada a 20°C e corrente constante de 35 mA.

Primeiramente, realizou-se um teste para avaliar se uma segunda precipitação com TCA/acetona da amostra já extraída de acordo com Imin *et al.* (2001) iria auxiliar ainda mais na retirada de interferentes presentes na amostra. Vimos que houve diminuição significativa da quantidade de proteínas (dados não mostrados), principalmente as de baixa massa, e perda de algumas bandas. Com esse resultado, preferiu-se aplicar as amostras diretamente do tampão de reidratação, o mesmo utilizado para eletroforese bidimensional.

Nas análises iniciais utilizando-se a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) observaram-se diferenças nos perfis dos extratos de semente e calo de *E. contortisiliquum* (Fig.8). O extrato da semente apresentou uma quantidade maior de proteínas, evidenciada pelo grande número de bandas de proteínas na região de alta massa molecular diferentemente do que ocorre nos calos. Nota-se que existem diferenças sutis entre os calos de hipocótilo e epicótilo e uma baixa quantidade de proteínas nos calos provenientes de cotilédones.

Já nessa análise inicial podemos notar a ausência de proteínas nos calos vegetais na região onde, normalmente, a enterolobina é encontrada. Porém, para um maior aprofundamento da análise dos extratos foi realizada 2-DE, a qual tem o poder de resolver de forma mais eficiente cada proteína.

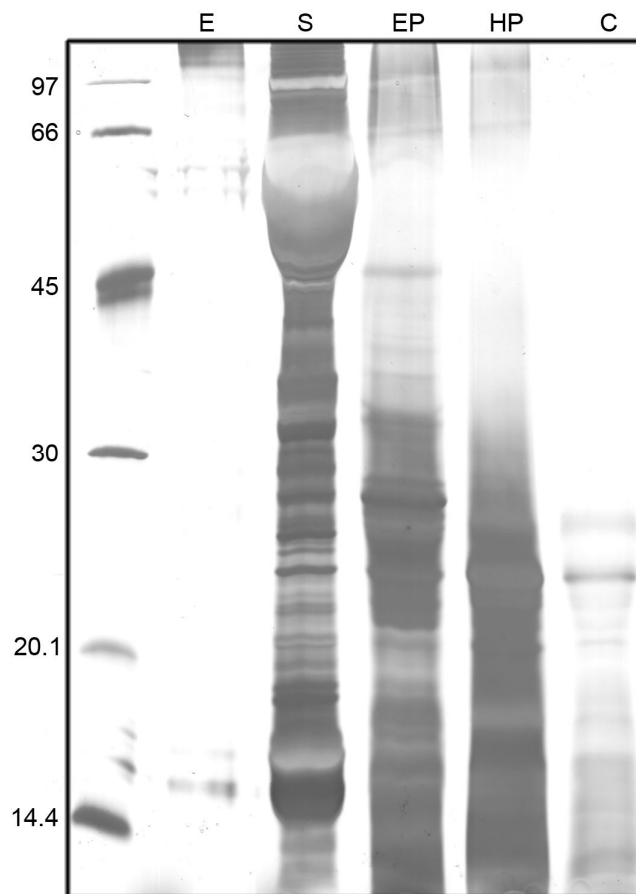


Figura 8. Perfil Unidimensional dos extratos de semente e calos vegetais de *E. contortisiliquum*. Volumes de 10 µl de amostras de semente e calo respectivamente, dissolvidas em tampão úreia/tiuréia foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (10%). E: enterolobina pura; S: extrato de semente; EP: epicotilo; HP: hipocotilo; C: cotiledone.

4.3. Padronização das condições da 2D-PAGE

As condições para a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) das amostras provenientes de calos e de sementes foram padronizadas inicialmente utilizando-se géis de gradientes imobilizados de pH (IPG) na faixa de pH de 3-10 não lineares. Posteriormente, optou-se pelo uso de géis de gradientes imobilizadores de pH (IPG) na faixa de pH 3-10 linear, o qual nos deu um melhor perfil bidimensional para a amostra analisada.

Para a focalização isoeétrica foram utilizados dois equipamentos, o Multiphor II e o IPGPhor (Amersham Biosciences), os quais forneceram resultados similares (dados não mostrados). Então, o IPGPhor foi o mais utilizado devido a sua maior praticidade. Foram testadas algumas concentrações dos géis de poliacrilamida sendo

que a concentração de 10% foi a que permitiu uma resolução satisfatória para as proteínas de alta massa molecular encontradas no extrato de semente. Utilizou-se a coloração com nitrato de prata de acordo com Blum *et al.* (1987).

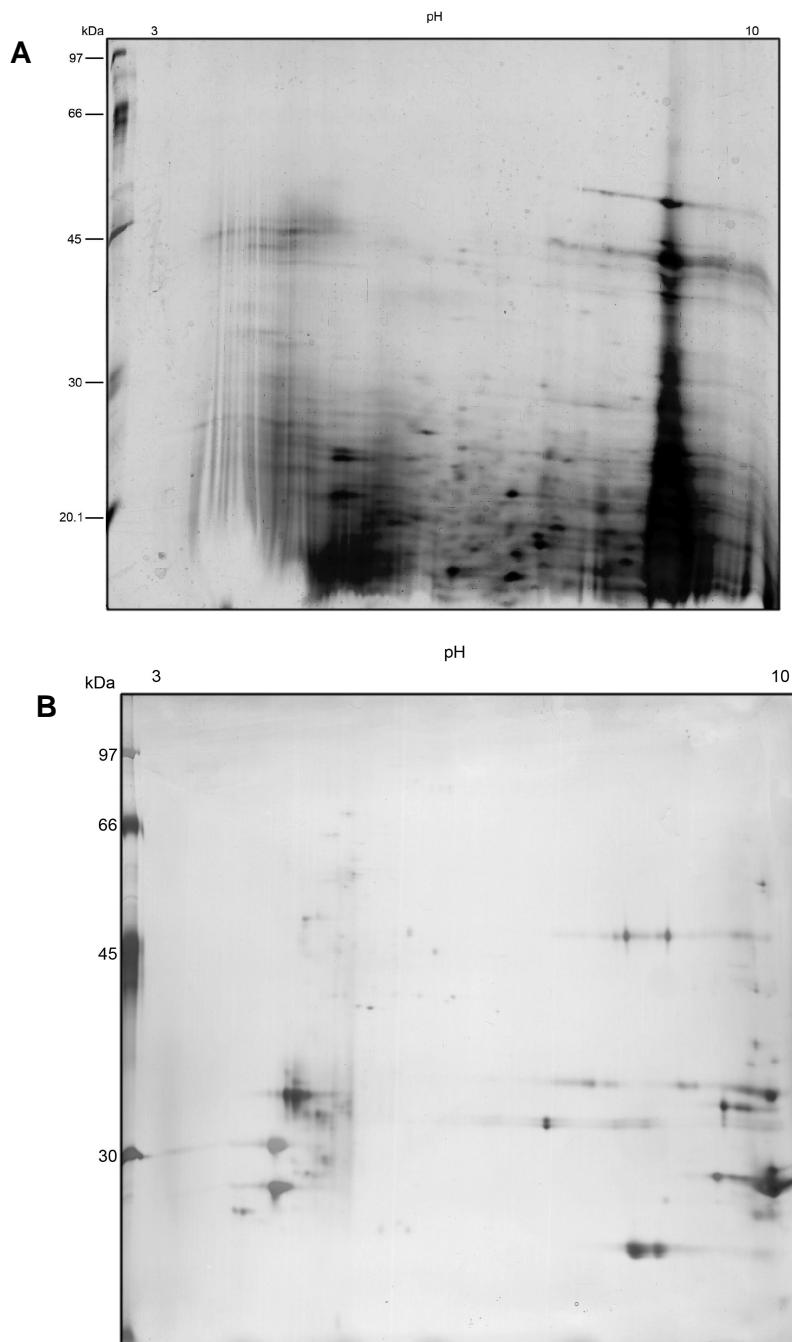


Figura 9. Efeito da preparação da amostra no perfil bidimensional dos extratos de calo. A) Perfil protéico de calos vegetais de *E.contortisiliquum* extraído com PBS; B) Perfil proteico de calos vegetais precipitados com TCA/acetona e extraídos no tampão de reidratação composto por uréia 7M/ tiouréia 2M.

4.4. Perfil Bidimensional do Extrato de calos e semente de *E.contortisiliquum*

Os mapas bidimensionais produzidos com amostras do extrato de sementes e de calos de *E. contortisiliquum* são mostrados na Fig.10 e 11, respectivamente. Essas amostras foram submetidas à focalização isoeletrica com *strips* de 18 cm e pl de 3-10 lineares e géis de concentração 10%T na segunda dimensão.

O mapa bidimensional obtido com amostra do extrato de semente de *E.contortisiliquum* é mostrado na Fig.10. A análise visual do gel mostra uma resolução satisfatória de *spots*, exceto na faixa de alta massa molecular, onde encontramos um bloco de proteínas não resolvidas. Pode-se notar que o perfil protéico da semente de *E. contortisiliquum* mostra uma grande quantidade de proteínas de alta massa molecular, com distribuição ampla e um grande número de *spots*. No entanto, os perfis proteômicos de calos de *E. contortisiliquum* diferem bastante do perfil de semente. Nos calos, há uma predominância de proteínas de média e baixa massa molecular, uma distribuição de proteínas mais concentrada na faixa básica de pH, além de um número menor de *spots* (Fig.11)

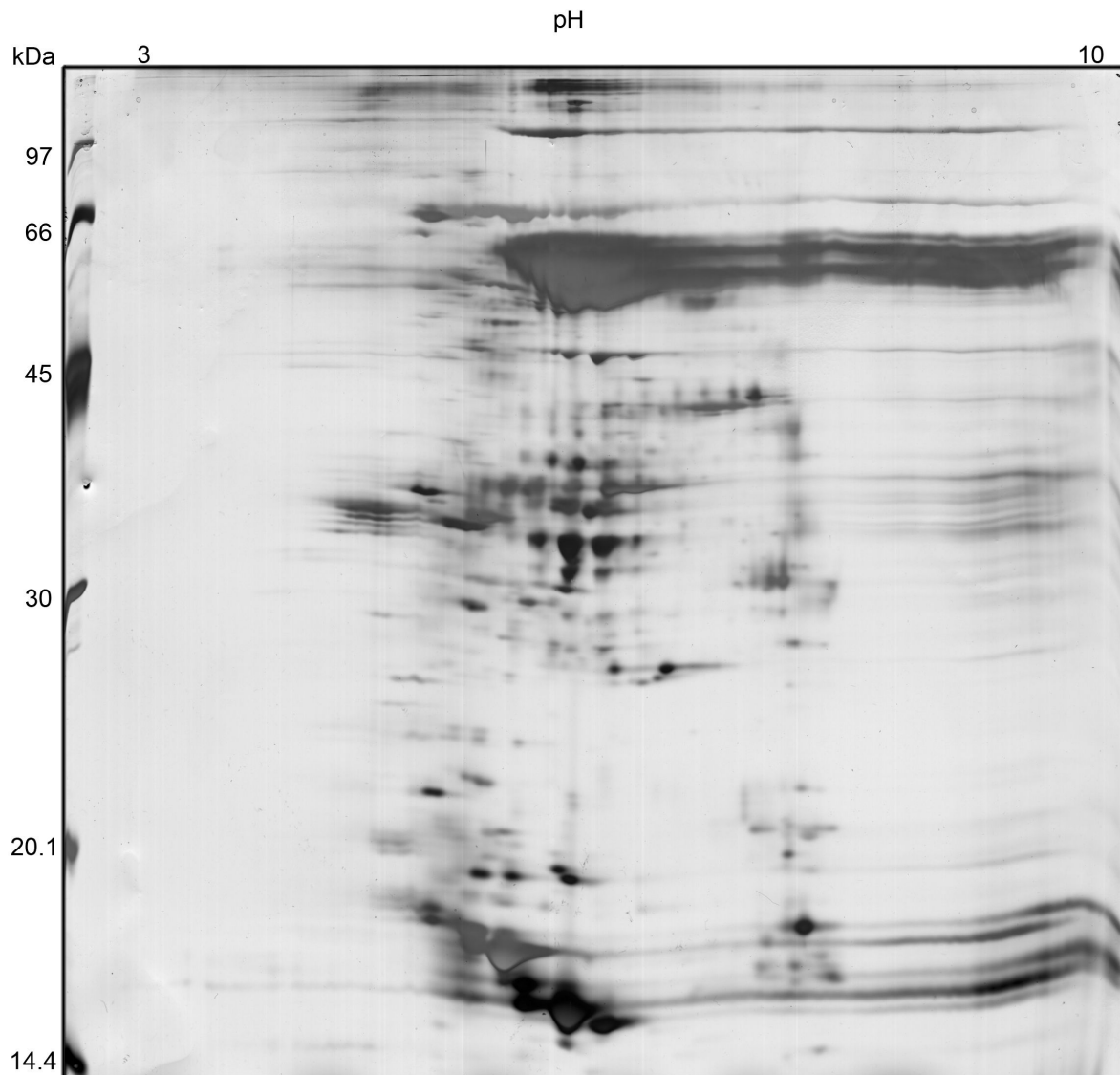


Fig 10 . Mapa proteômico bidimensionais da semente de *E.contortisiliquum*. A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 3 a 10 e para a segunda dimensão os géis foram feitos a 10% T, utilizou-se 150 µg de amostra. Coloração com nitrato de prata.

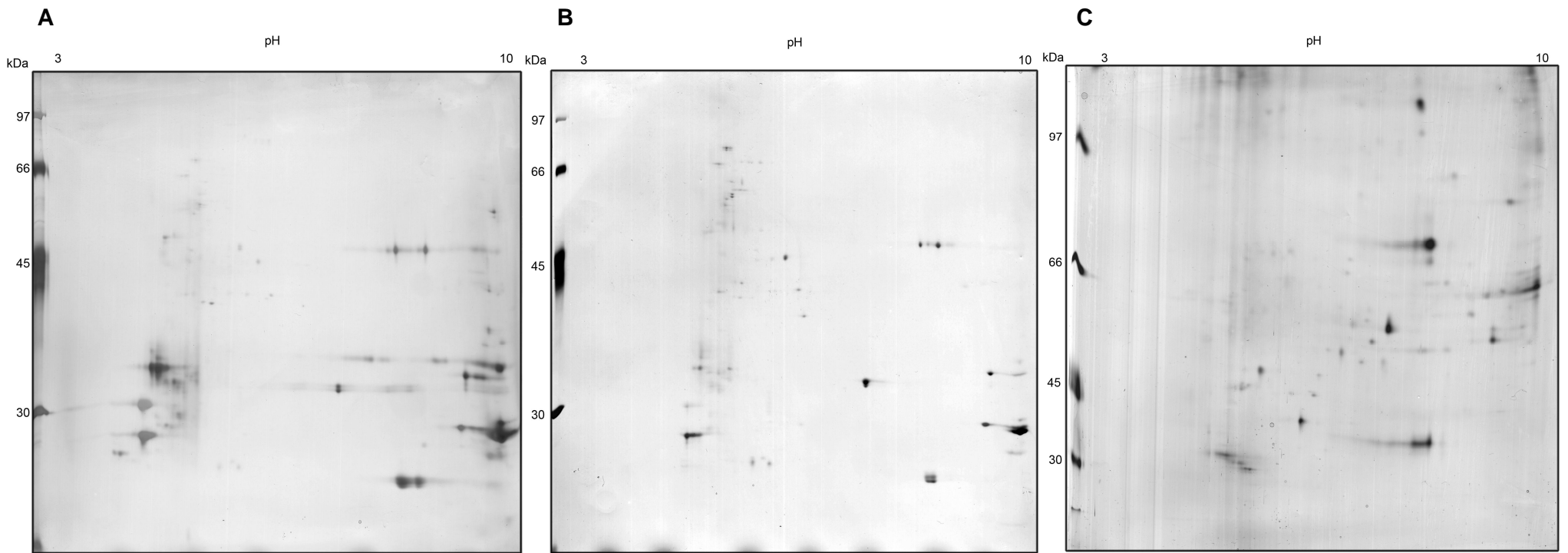


Figura 11. Mapas proteômicos bidimensionais de calos de *E. contortisiliquum*. A focalização isoeétrica foi realizada com IPGs de pH 3-10 e a segunda dimensão os géis foram feitos a 10%T, e 150 µg de amostra. Coloração com nitrato de prata. A: epicótilo; B: hipocótilo; C: cotilédone.

Os mapas proteômicos de calos e sementes de *E. contorsiliquum* foram obtidos sob as mesmas condições (primeira dimensão, focalização IPG pH 3-10 L, 18 cm; segunda dimensão SDS-PAGE 10%, corrente constante).

O objetivo inicial desse trabalho era a análise comparativa de extratos de calos e sementes, porém ao longo dos experimentos percebemos que essa comparação não seria possível devido à grande diferença existente entre os extratos de calos e das sementes, o que não nos permitiria comparar perfis protéicos tão distintos, pois em tal situação, seria infrutífera essa prática.

Os perfis proteômicos de calos vegetais de *E. contortisiliquum* provenientes do hipocótilo, epicótilo e cotilédone mostraram-se bem diferentes daquele da semente, o órgão doador. Essa diferença gritante tornou impossível a comparação entre os perfis da semente e dos calos, já que mesmo que uma proteína tenha a mesma massa e o mesmo pI, não poderíamos afirmar que se tratava da mesma proteína. O que se pode notar é a diferença na expressão de proteínas e a distribuição destas no gel.

A comparação dos perfis bidimensionais de calos vegetais de *E. contorsiiquum* mostra mapas protéicos bastante semelhantes (Fig.11). Nos três casos, na região de massa de 30-35 KDa apresenta-se como a mais importante. No mapa proteômico de calos vegetais provenientes de epicótilo e hipocótilo (Fig.11A e 11B, respectivamente), as proteínas dessa faixa de massa encontram-se distribuídas na faixa de pI de mais ácido (3-7), enquanto que o perfil proteômico de calos provenientes de cotilédone indica proteínas deslocadas para a região mais básica do gel (pI 6-10). Nos três perfis, a região de alta massa molecular é muito semelhante, onde poucas proteínas são encontradas. Para os três perfis encontramos um grupo semelhante de proteínas na faixa de baixa massa molecular (abaixo de 30KDa).

A análise visual dos géis unidimensionais apresentou pequenas diferenças qualitativas entre os calos, principalmente entre hipocótilo e epicótilo. Essa análise revelou que a maioria das proteínas detectadas apresentou expressão conservativa sugerindo que as características que diferenciam cada explante são provavelmente conseqüências da expressão diferencial de um número limitado de proteínas, talvez não detectável utilizando-se géis bidimensionais, ou devido a característica de dediferenciação que existe entre as amostras. Utilizamos um programa computacional específico para a análise dos géis, *Image Master 2D v.5* (GE Healthcare), que nos deu o número total de *spots* para os calos como 125 para hipocótilo, 103 para epicótilo e 77 para cotilédone.

Os calos vegetais são massas de tecidos que crescem em um substrato sólido (Bottino, 1981). A formação dos calos pode ser induzida por níveis elevados de hormônios. Os meios de cultura utilizados para produção de calos contêm adições de citocininas e de auxinas. A formação dos calos é central em muitos procedimentos investigativos e aplicados da cultura de tecido. Os calos podem ser multiplicados e mais tarde usados para clonar plantas inteiras. Adicionalmente, vários protocolos de engenharia genética empregam procedimentos da iniciação de calos depois que o DNA foi introduzido em células; as plantas transgênicas são regeneradas então dos calos transformados. Em outros protocolos calos são gerados para o uso em procedimentos biotecnológicos como a formação das culturas da suspensão de que os produtos secundários das planta podem ser conseguidos.

Explantos, quando cultivados em meio apropriado podem gerar uma massa de células desorganizadas. Pensa-se que todo tecido de planta pode ser usado como explantes, se as condições corretas forem encontradas. Na cultura, esta proliferação pode ser mantida indefinidamente, contanto que a cultura de calos seja colocada em um meio fresco periodicamente. Durante a formação dos calos ocorre dediferenciação (isto é as mudanças que ocorrem durante o desenvolvimento e a especialização, a alguma extensão, são invertidas), tanto na morfologia (o calo é geralmente composto de células não especializadas) quanto no metabolismo. Uma consequência desta dediferenciação é que a maioria das culturas vegetais perde a capacidade de realizar fotossíntese. Isso tem consequências importantes para a cultura de calos, como a de que o perfil metabólico provavelmente não será igual ao da planta doadora.

A degradação de proteínas em células e tecidos vegetais pode reduzir, significativamente, o nível de acumulação dos produtos (Stevens *et al.*, 2000; Sharp and Doran, 2001a; Outchkourov *et al.*, 2003). Proteases têm sido apontadas como as responsáveis pelas degradações intracelulares e intrateciduals (Magnunson *et al.*, 1996; Sharp and Doran, 2001; Tsoi and Doran, 2002). Entretanto, as razões para perda de proteínas em culturas vegetais ainda não foram elucidadas (Doran, 2005)

A pequena quantidade de proteína da cultura celular vegetal comparada com órgãos de estoque de plantas é bastante discutida. Isto reflete parcialmente ao estado indiferenciado das culturas e a quebra de promotores que são pouco ativos sobre condições semelhantes. A produção de proteínas também é afetada pela estabilidade das mesmas, já que é significativa a sua degradação no meio de cultura devido a

proteólise, agregação e outros fatores não conhecidos (Know, 2003; LaCount, 1997; Lee, 2002).

4.5. Imunodeteção de enterolobina

Inicialmente o método de extração para obtenção de enterolobina foi aquele utilizado por Lima (1999), empregando extração protéica com PBS. Utilizando esse método já havíamos observado a presença da proteína enterolobina, porém como o procedimento de extração foi modificado, utilizando TCA/Acetona como precipitante, foi necessário verificar a presença desta no novo método proposto utilizando a técnica de *Immunoblotting*. As proteínas do gel unidimensional dos extratos de semente de *E. contortisiliquum* foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetido à imunodeteção usando um anticorpo policlonal contra enterolobina.

A Fig.12 mostra o resultado da imunodeteção no extrato de semente. A forma monomérica da enterolobina foi imunodetectada, assim como foi possível a deteção do dímero e de complexos maiores no extrato de semente. Esse resultado já havia sido encontrado por experimentos de eletroforese unidimensional, cromatografia de gel filtração, espectrometria de massa e microscopia de força atômica (AFM) demonstrando que a enterolobina pode assumir forma dimérica em solução, mesmo em baixas concentrações (10µg/ml) tal como a proaerolisina (Bittencourt *et al.*, 2003).

Diversas características obtidas para a enterolobina levam à sugestão de que o modelo de estudo comparativo mais próximo a ela é a aerolisina, citolisina extraída e purificada a partir do sobrenadante de cultura de bactérias do gênero *Aeromonas*. Embora sejam provenientes de organismos muito distintos, as duas citolisinas possuem um grande número de características em comum. A sequência de aminoácidos da enterolobina mostra 45% de identidade e 59% de similaridade com a sequência da aerolina, toxina citolítica encontrada em *Aeromonas hydrophila* e em outras espécies de *Aeromonas* (Sousa *et al.*, 94; Fontes *et al.*, 97)

A pré-proaerolisina sofre processamentos pós-traducionais que permitem sua exportação e oligomerização. O canal formado durante a oligomerização insere-se em membranas causando lise celular. A pró-proteína pode ser encontrada organizada na forma de dímero ou monômero em concentrações muito baixas (Fivas *et al.*, 1999). A ativação da pró-proteína depende da retirada de um fragmento C-terminal, que dispara

um conjunto de modificações estruturais que levam ao reconhecimento do receptor na membrana da célula alvo, com conseqüente formação de poro na membrana (Buckley, 1991; van der Goor *et al.*, 1993; Cabiliaux *et al.* 1997; Fivas *et al.*, 1999).

No entanto, para a enterolobina ainda não foi descrita a presença de qualquer processamento necessário para a sua ativação. Os trabalhos desenvolvidos permitiram a observação por eletroforese de que sua forma preferencial era a monomérica. Porém, em pHs baixos, a proteína tendia a oligomerização e em pH em torno de 10, a forma monomérica era preferida (Fontes, 1996; Fontes *et al.*, 1997). Então, sugere-se que dependendo da forma de purificação, a enterolobina pode ser encontrada ativa na forma monomérica ou dimérica.

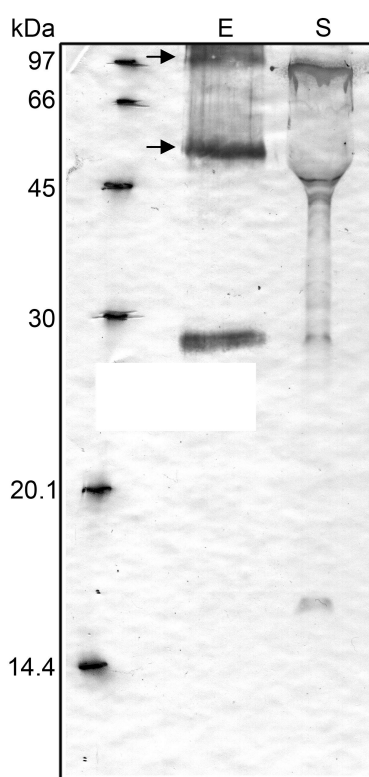


Figura 12. Imunodeteção da enterolobina no extrato de semente de *E. contortisiliquum*. Amostras de 15 µg de semente dissolvida em tampão úreia/tiuréia, foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (10%), eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção. Foi utilizado como 1º anticorpo anti-enterolobina produzido em coelho (dilição 1/1000) e como 2º anticorpo anti-IgG de coelho produzido em asno, conjugado à peroxidase (diluuição 1/5000). A revelação foi realizada com DAB utilizando H₂O₂ como substrato. E: monômero e dímero de enterolobina pura indicados pelas setas; S: extrato de semente de *E. contortisiliquum*.

Nos calos vegetais, como mostrado na Fig.13 a enterolobina não foi imunodetectada. Este resultado pode ser inferido como uma consequência da dediferenciação que ocorre nos calos vegetais. Outra hipótese seria a inexistência de um fator responsável pela expressão da proteína.

A possibilidade da enterolobina atuar como proteína de defesa vem sendo sugerida desde que ela foi associada à capacidade de causar lise de alguns tipos celulares, de agir como agente pró-inflamatório e de causar a morte de coleópteros (Sousa, 1991; Castro-Faria-Neto *et al*, 1991; Sousa *et al.*, 1993). Essas atividades relatadas não são as únicas a sugerir a sua função de defesa.

Em calos esperava-se encontrar a enterolobina nos cotilédones, pois de acordo com Lima (1999) e Bittencourt (2003) a proteína foi encontrada em eixo embrionário e cotilédones de sementes, sendo persistente e ativa nos cotilédones e desaparecendo após a germinação no eixo embrionário.

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos que as protege contra eventos fisiológicos próprios das sementes, como a dessecação durante o processo de maturação da semente (Guimarães e col, 2002), e da ação externa, como infecções causadas por microorganismos. Podemos citar as barreiras físicas (parede celular, poros de tamanho limitado, etc) e químicas (entre estas as proteínas) (Wojtaszek, 1997). Proteínas de defesa podem ser classificadas em constitutivas e induzidas. As induzidas dependem do contato e reconhecimento do agressor, desencadeando posteriormente processos que resultam na ativação de vias metabólicas de resposta, que usualmente são reguladas durante a transcrição. Uma grande quantidade de proteínas e peptídeos tem sido descritas como de defesa (Ryan, 1990).

Os estresses bióticos ou abióticos podem induzir à produção de uma grande variedade de proteínas em plantas. Essas proteínas foram denominadas por Ohashi e Oshima (1992) como proteínas relacionadas a patogenicidade (PR). Elas são induzidas como resultado da reação de hipersensibilidade do hospedeiro contra agentes infecciosos. Além do estresse provocado por infecção, outros estresses podem induzir as proteínas PR, tais como cortes, injúrias e alta pressão. Além destes, ácido salicílico e etileno também foram relacionados com a indução positiva das proteínas PR.

Nas sementes, a enterolobina comporta-se como sendo uma proteína capaz de ser induzida ou reprimida nas duas partes da semente submetidas a diversos estresses. Estresse hídrico leva ao aumento da atividade em amostras de cotilédones,

assim como observa-se alterações em condições de estresse salino e hídrico (Bittencourt, 2003).

A permanência da enterolobina em cotilédones e seu desaparecimento em eixo embrionário após a germinação sugerem uma possível atividade regulatória na germinação de sementes de *E.contortisiliquum*. Vale ainda lembrar que a enterolobina está presente no núcleo de células de cotilédones (Lima *et al.*, 1999). Se também estiver presente em núcleo de células de eixo embrionário, poderia estar ainda exercendo uma regulação da germinação a nível gênico.

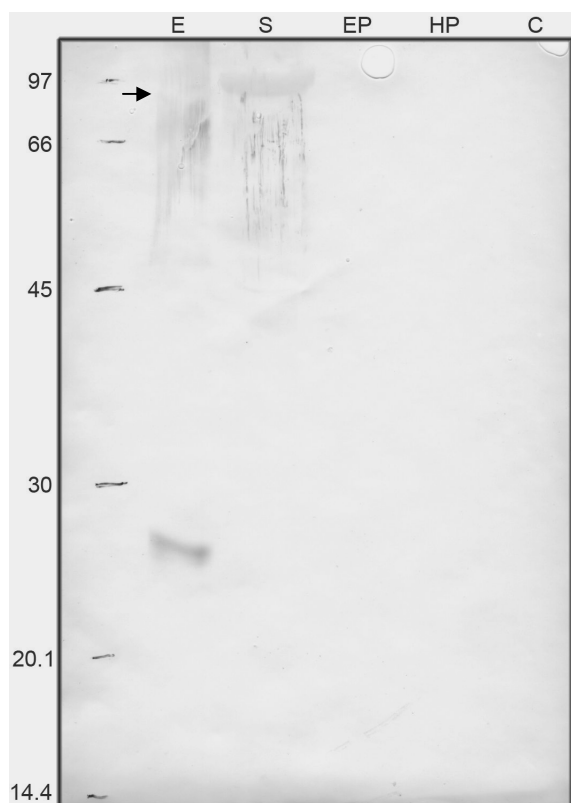


Figura 13. Imunodeteção da enterolobina no extrato de semente e calos vegetais de *E.contortisiliquum*. Amostras de 15 µg de semente e calo de *E.contortisiliquum* respectivamente, dissolvidas em tampão úreia/tiurêia, foram separadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (10%), eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e submetidas à imunodeteção. Foi utilizado como 1º anti-corpo anti-enterolobina produzido em coelho (diluição 1/1000) e como 2º anticorpo anti-IgG de coelho produzido em asno, conjugado à peroxidase (diluição 1/5000). A revelação foi realizada com DAB utilizando H₂O₂ como substrato. E: representa a enterolobina purificada (10µg), S extrato de semente (10 µg) , EP- Epicótilo (10 µg), HP- Hipocótilo (15 µg) , C-cotiledone (15 µg).

A Fig. 14 mostra o resultado da imunodeteccção no gel bidimensional do extrato de semente de *E.contortisiliquum*. Esse resultado reforça a hipótese da existência de isoformas de enterolobina detectadas por Cunha (2003) através de análise por espectrometria de massa em ESI-MS, o qual propôs três isoformas distintas.

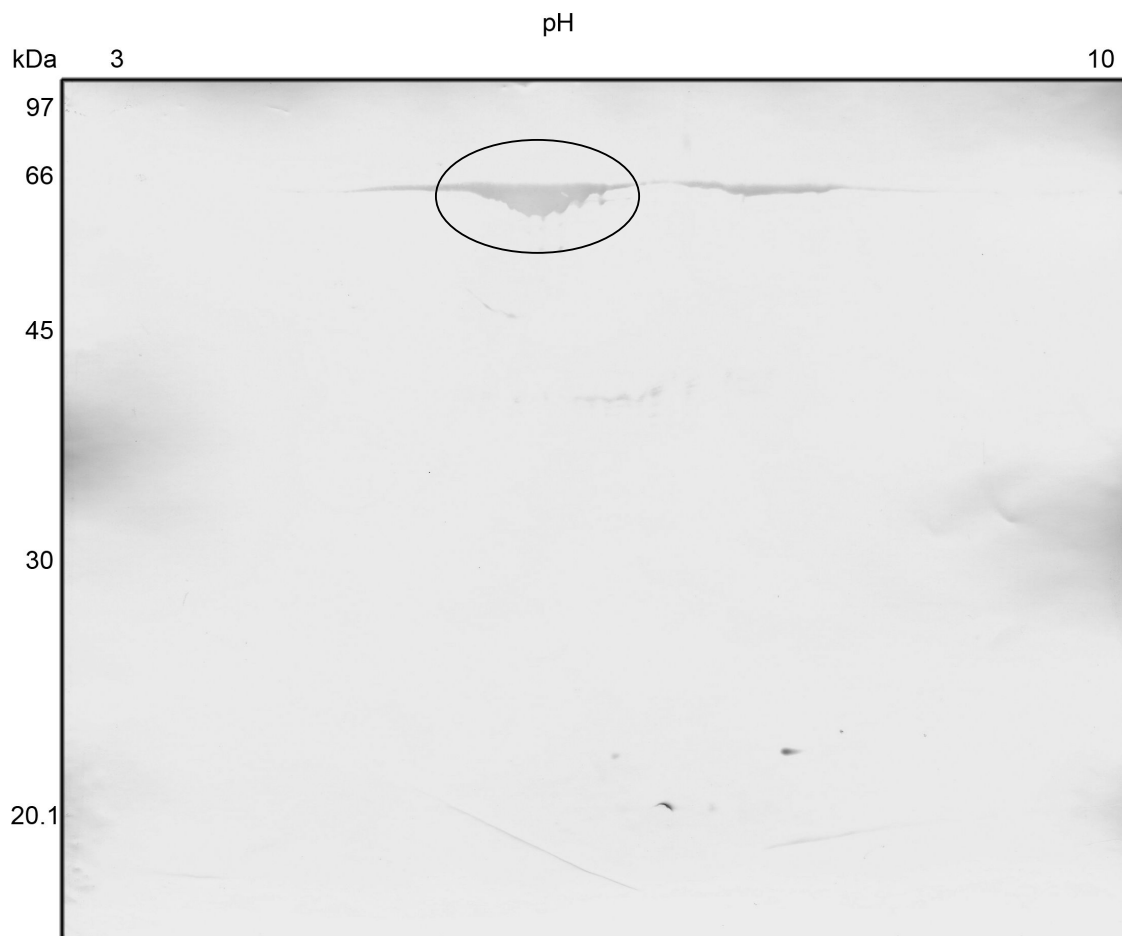


Figura 14. Imunodeteccção da enterolobina no extrato de semente de *E.contortisiliquum*. Amostra de 150 µg enterolobina purificada foram dissolvida em tampão úreia/tiuréia, separada por eletroforese 2-DE em gel de poliacrilamida (10%), eletrotransferida para membrana de nitrocelulose e submetida à imunodeteccção. Foi utilizado como 1º anti-corpo anti-enterolobina produzido em coelho (diluição 1/1000) e como 2º anticorpo anti-IgG de coelho produzido em asno, conjugado à peroxidase (diluição 1/5000). A revelação foi realizada com DAB utilizando H₂O₂ como substrato.

Para verificar se não estava ocorrendo reações cruzadas devido à natureza policlonal do anticorpo, o que nos traria um resultado falso positivo, foi feito o perfil bidimensional utilizando amostra de enterolobina purificada, mostrado na fig.15. Pode-se observar, assim como no *immunblotting* do extrato de semente, a presença de cinco prováveis isoformas. Também podemos observar a detecção de proteínas de alta massa molecular, o que pode ser explicado pela conhecida capacidade de oligomerização da enterolobina, já que a presença de dímeros e outros oligômeros em soluções dessa proteína já foram encontrados (Fontes *et al.*, 1997 e Lima *et al.*, 1999).

A enterolobina apresentou-se como sendo incapaz de formar uma única espécie oligomérica. Testes realizados indicaram que essa proteína se oligomeriza na presença de DTT, como observado no gel bidimensional. De acordo com Bittencourt, 2003, o DTT parece auxiliar na agregação da proteína, formando estados organizacionais mais visíveis, sugerindo que a oligomerização da proteína não é dependente de pontes dissulfeto.

Plantas são expostas a diferentes tipos de estresses como seca, alta salinidade, temperaturas extremas, alagamentos, deficiência de minerais, toxicidade do solo, poluentes e radiação ultravioleta B (UV-B) (Smirnoff, 1998). Esses fatores podem ter agido como pressão evolutiva que resultou na diversificação de múltiplas isoformas de algumas proteínas vegetais, as quais podem estar envolvidas na regulação e coordenação de atividades de outras proteínas funcionais (Finnie *et al.*, 2006).

A origem dessas isoformas pode ser o resultado de processos proteolíticos pós-transducionais no N- como na C- terminal das proteínas. Wilson e Chen (1983) mostraram que o inibidor de tripsina de *Vigna radiata* é proteoliticamente processado tanto nas regiões de N- ou C- terminal durante a germinação da semente. Entretanto, para explicar a grande variedade de isoformas em plantas, outra hipótese como a presença de múltiplos genes não deve ser descartada.

Processos incluindo *splicing* alternativo, edição de RNA e modificações pós-transducionais podem levar a diferentes espécies de proteínas de um único gene (Godovac-Zimmermann *et al.*, 2005). O *splicing* alternativo é um importante mecanismo celular que aumenta a diversidade dos produtos dos genes (Sunyaev *et al.*, 2000). Diferentes alternativas de *splicing* têm sido associadas com diferentes fisiologias e fenótipos (Hanke *et al.*, 1999).

Análises de 2-DE das frações de proteínas encontradas nas sementes demonstram o potencial proteômico para o estudo de mudanças nos perfis protéicos em sistemas complexos e a correlação com propriedades específicas (Gorg,1992). Desde o desenvolvimento da técnica de espectrometria de massa para identificação de proteínas, a análise proteômica de sementes inclui *Arabidopsis thaliana* (Gallardo *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2002), o cereal trigo (*Triticum aestivum*) (Skylas *et al.*,2000; Skylas *et al.*, 2001; Vensel *et al.*, 2005), arroz (*Oryza sativa*) (Koller *et al.*, 2002), milho (*Zea mays*,) (Mechin *et al.*,2004), entre outros.

Santino *et al.* (2005) mostrou que diferentes isoformas de Lipoxigenases (LOXs) são expressas e ativadas em diferentes estágios fisiológicos das sementes. Loxs são comumente associadas por possuírem um importante papel em processos fundamentais como defesa, desenvolvimento e senescência em plantas. Peroxiredoxinas são conhecidas por sofrerem modificações pós-transduconais em resposta ao estresse oxidativo (Rabilloud *et al.*, 2002) e como uma parte de outros mecanismos catalíticos em reação com peroxidase (Wood *et al.*, 2003). Finnie *et al.*(2006), constatou o aparecimento de isoformas nos diferentes meios de cultura em grãos de cevada, chegando a conclusão de que a mudança nos padrões de proteína também reflete a variação nas características da cultura. No estudo, isto se tornou evidente já que diferentes formas de cultivo podem variar não somente a presença ou ausência de alguns *spots*, mas também o tempo de aparecimento destes.

A razão para existência de isoformas relatadas para uma proteína pode ser devido a uma adaptação evolutiva da planta para obter um maior sucesso da sua função, como a de defesa. Posteriormente, para verificar se as cinco proteínas presentes no mapa protéico correspondem a isoformas da enterolobina, será necessário determinar as seqüências destas. As seqüências serão analisadas quanto as suas similaridades a fim de verificar quais os tipos de modificações existentes e as diferenças entre elas. Logo, a purificação e caracterização de todas as isoformas de enterolobina é um passo necessário para entender a sua bioquímica e fisiologia. Outra hipótese a ser testada é se estes possíveis tipos de enterolobina encontrados não são devido as amostras terem sido purificadas de lotes diferentes, coletadas de árvores distintas ou em diferentes datas.

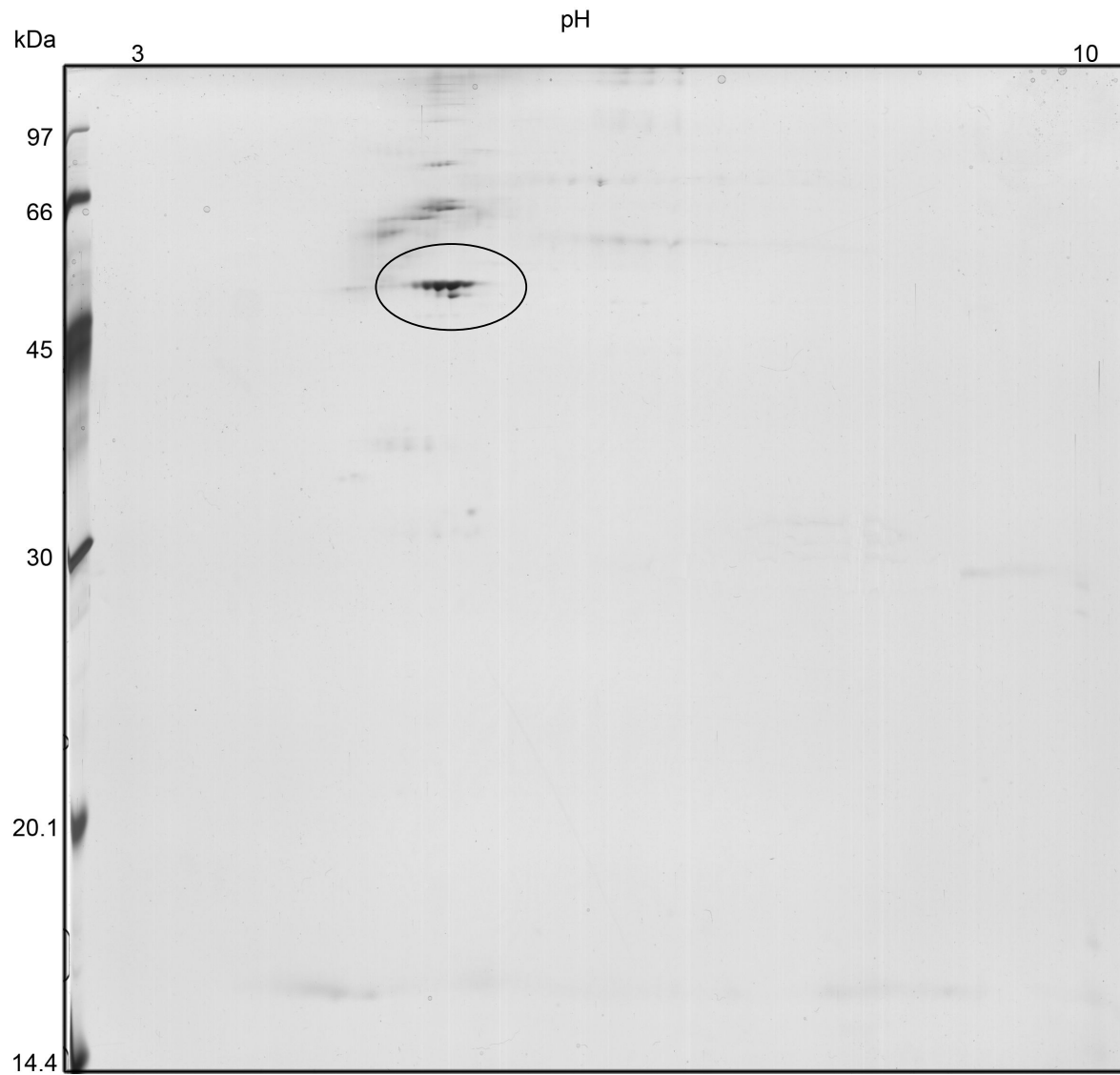


Figura 15. Mapas bidimensionais da enterolobina purificada de *E. contortisiliquum*. A focalização isoeletrica foi realizada com IPGs de pH 3 a 10 e para a segunda dimensão os géis foram feitos a 10% T, utilizou-se 150 µg de amostra. Coloração com nitrato de prata. Seta: possíveis isoformas

4. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho é uma continuação da linha de pesquisa desenvolvida no laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP), o qual estuda a proteína hemolítica enterolobina, que foi pela primeira vez purificada e caracterizada por Sousa, 1988. Os trabalhos desenvolvidos no LBQP incluem a determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular, modelagem da estrutura terciária (Fontes, 1996), identificação e determinação da natureza química do receptor de enterolobina (Ferreira, 1995; Costa, 2000), entre outros que estão em desenvolvimento.

Plantas são fontes ricas de vários compostos químicos, largamente desconhecidos e inexplorados. Embora pequenos, os recentes avanços e o perfil metabólico oferecem oportunidades para utilizar a capacidade bioquímica de plantas para produzirem compostos (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004).

A proteína enterolobina apresenta potencial biotecnológico. Por exemplo, poderá ser utilizada no controle biológico de coleópteros devido a sua atividade inseticida. Para o desenvolvimento de aplicações, é necessário dispor de grande quantidade de proteína. Desta forma, métodos de obtenção de proteína devem buscar alto rendimento, alto grau de pureza, reprodutibilidade e no menor tempo possível.

Se bem compreendido o mecanismo de ação da enterolobina, será possível a proposição de novos usos para enterolobina. A compreensão mais detalhada do comportamento da aerolisina, por exemplo, permitiu o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, culminando em uma empresa de biotecnologia canadense chamada Protox. Entre as aplicações biotecnológicas já patenteadas pela empresa estão: a patente 6.532.095, que versa sobre a utilização da proteína para a identificação de doença relacionada ao seu receptor (GPI) a hemoglobinúria noturna paroxismal (PNH) (Diep *et al.*, 1998; Brodsky *et al.*, 1999; Buckley and Brodsky, 2003) e a patente 6.495.315, esta patente reclama os direitos do uso da proteína no possível desenvolvimento de vacinas contra os vírus e retrovírus que contenham envelopes, como por exemplo o vírus da AIDS.

A fim de se ter um suprimento contínuo de enterolobina, lançamos mão de cultura de tecido vegetal de semente de *E. contortisiliquum* como forma de se garantir uma possível fonte de material para produção ininterrupta de enterolobina. Com este trabalho averiguamos se a enterolobina é expressa em calos e, se existe diferenças proteômicas significativas entre calos e semente.

Observamos que o perfil protéico entre calos e sementes era bastante diferenciado, o que nos inviabiliza a fazer comparações. Através da imunodeteção identificou-se possíveis isoformas de enterolobina, as quais necessitam ser mais profundamente estudadas a fim de verificar quais as modificações que as diferenciam. Nos calos vegetais não observamos a presença de enterolobina, porém a não expressão dessa proteína pode estar relacionada ao meio em que os calos foram cultivados. Pode-se tentar diferentes meios, com diferentes vitaminas, quantidade de hormônios a fim de tentar induzir a sua expressão em calos vegetais.

A análise de géis bidimensionais dos extratos de calos de *E.contortisiliquum* revelou que a maioria das proteínas detectadas apresentou expressão conservativa sugerindo que as características que diferenciam cada explante são provavelmente conseqüências da expressão diferencial de um número limitado de proteínas, talvez não detectável utilizando-se géis bidimensionais. Os resultados obtidos neste trabalho e suas próximas etapas abrem perspectivas para continuidade e criação de novas linhas de pesquisa em calos vegetais de *E.contortisiliquum* e em outras espécies de angiospermas florestais. Estas linhas de pesquisa se basearão principalmente no emprego de ferramentas proteômicas e análise da expressão gênica, visando a identificação de marcadores bioquímicos para acompanhar a diferença de expressão nos calos vegetais de acordo com o explante de origem. Dificuldades podem ser apontadas para cada um dos métodos usados. Na abordagem eletroforética, as principais dificuldades se relacionaram ao ajuste à amostra de um protocolo de extração que fornecesse um perfil protéico o mais completo possível. Outro ponto foi relacionado à reprodutibilidade em termos de intensidade e localização dos *spots* em cada mapa proteômico. Na abordagem da espectrometria de massa, a dificuldade da identificação das proteínas por peptide *mass fingerprinting* (PMF) vem do fato do organismo em estudo não possuir genoma seqüenciado.

Inicialmente, os géis 2-DE variaram muito em sua reprodutibilidade devido ao protocolo de extração do tampão fosfato que não removeu grande parte dos interferentes provenientes do metabolismo secundário vegetal, o uso da coloração de prata como método de detecção que também era afetado pelos interferentes citados anteriormente, e a necessária intervenção humana ao longo de todo o processo.

Devido a sua ampla difusão, a eletroforese bidimensional tem suas vantagens e deficiências bem documentadas. De forma geral, é aceito que algumas classes de proteína são excluídas ou pouco representadas em géis bidimensionais. Essas incluem

proteínas muito ácidas ou básicas; proteínas com massas moleculares maiores que 200 kDa e menores de 5 kDa, assim como proteínas de membrana e/ou muito hidrofóbicas. Também, proteínas totalmente diferentes podem ter valores de ponto isoelétrico e massa molecular o suficientemente próximos para não serem resolvidas nos mapas bidimensionais ainda que usando IPGs de faixas estreitas de pH (Paba *et al.*, 2004).

O uso da técnica de 2-DE em nosso trabalho permitiu uma visão mais geral dos proteomas dos calos e semente de *E.contortisiliquum*. De um modo geral o mapa proteômico dos extratos de semente mostrou uma maior complexidade de *spots* que do extrato de calos, destaca-se a necessidade de continuidade desses estudos com a identificação qualitativa de proteínas específicas nos diferentes extratos de calos e a comparação das mesmas. Pode-se também proceder à identificação por MS dos *spots* diferencialmente expressos. Outra abordagem seria a avaliação de mudanças do proteoma sob a influência de mais parâmetros que influenciem no crescimento dos calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics *Nature* 422, 198-207.

Agrawal, G.K.; Yonekura, M.; Iwahashi, Y.; Iwahashi, H.; Rakwal, R. (2004). System trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part I: Technologies in proteome establishment. *Journal of Chromatography*, 815 (1-2), 109-123.

Alcalay, N. e Amaral, D.M.I. (1982). Quebra de dormência em sementes de timbaúva-*Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong. *Silvicultura em São Paulo* 16A, 1149-1152.

Archambault, J. (1991) Large-scale (20-L) culture of surface-immobilized *Catharanthus roseus* cells. *Enzyme Microb. Technol* 13, 882-892.

Assa, Y.; Shani, S.; Gesterner, B.; Tencer, Y.; Birk, Y and Bondi, A. (1973). Interaction of alfafa saponins with components of the erythrocyte membrane in hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 307,83-91.

Banerjee, K.K., and Sem, A (1981). Purification and properties of a lectin from seeds of *Croton tiglium* with hemolytic activity towards rabbit red cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 212,740-753.

Batista IF, Oliva ML, Araujo MS, Sampaio MU, Richardson M, Fritz H, Sampaio CA (1996). Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry* 41(4), 1017-22.

Batista IF, Nonato MC, Bonfadini MR, Beltramini LM, Oliva ML, Sampaio MU, Sampaio CA, Garratt RC (2001). Preliminary crystallographic studies of EcTI, a serine proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57(4), 602-4.

Bernheimer, A.W. (1970). Cytolytic toxins of bacteria. In K. S. Ajl & T.C. Montie (Eds.), *Bacterial protein Toxins*. Academic Press. New York. P. 183-212.

Bernheimer, A.W. and Rudy, B. (1986). Interactions between membranes and cytolytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*. 864,123-141.

Bewley, J.D. and Black, M. (1978). *Physiology and biochemistry of seed*. Volume 1, Springer-Verlag, Berlin. 306 p.

Bittencourt, S.E.T.; Silva, L.P.; Azevedo, R.B.; Cunha, R.B.; Lima, C.M.R.; Ricart, C.A. and Sousa, M.V. (2003) The plant cytolytic protein enterolobin assumes a dimeric structure in solution. *FEBS Letters*. 549,47-51.

Bittencourt, S.E.T. (2003). *Germinação de *Enterolobium contortisiliquum* e aspectos funcionais e estruturais da Enterolobina*. Tese de doutorado apresentada na Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

Blum, H.; Bier, H.; Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-95.

Bottino, P. J. (1981). *Methods in plant tissue culture*. Kemtec Educational Corp., Kensington, Maryland, 72 pag.

Buckley, J.T. (1991). Secretion and mechanism of action of the hole-forming toxin aerolysin. *Experientia* 47, 418-419.

Cabiaux, V., Buckley, J.T., Wattiez, R., Ruyschaert, J., Parker, M.W. and Goot, F.G. (1997). Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry* 36, 15224-15232.

Cánovas, F.M.; Dumas-Gaudot, E.; Recobert, G.; Jorin, J.; Mock, H.P; Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, v. 4, 285-298.

Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R and Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, 5, 2497-2507.

Castro-Faria-Neto, H.C.; Martins, M.A. ; Bozza, P.T.; Perez, S.^aC., Correa, A.C.V.; Lima, M.R.C.; Cruz, II.N.; Cordeiro, R.S.B.; Sousa, M.V.; and Morhy, L. (1991). Pro-inflammatory activity of enterolobin: a hemolytic protein purified from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 86,129-131.

Carvalho, P.E.R. (1994). Espécies florestais brasileiras- recomendações silviculturais e uso da madeira. EMBRAPA-SPI. P 235-241.

Chawla, H.S. (2000). Introduction to Plant Biotechnology. *Science Publishers Inc.* Enfield, NH, USA.

Costa RH, Stella RC, Alves KB (1991). Purification and partial characterization of *Enterolobium contortisiliquum* seed arylamidase. *Braz J Med Biol Res.* (4), 337-44.

Costa, M.C. (2000). Identificação de Glicoforina como possível receptor de Enterolobina utilizando espectrometria de massa. Tese de mestrado apresentada na Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

Damerval, C., Devienne D., Zivy, M., Thiellement, H. (1986), *Electrophoresis*, 7, 52-54.

Dodds, J. H. and Roberts, L. W. (1995). Experiments in plant tissue culture. *Cambridge University Press*, Cambridge.

Doran, P.M. (2005) Loss of secreted antibody from transgenic plant tissue cultures due to surface adsorption. *Journal of Biotechnology* 122(1),39-54.

Fischer, R., Liao, Y.C., Hoffmann, K., Schillberg, S. & Emans, N (1999). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol. Chem.* 380, 825-839.

Fontes, W. (1996). Estudos Estruturais da Enterolobina. Tese de doutorado apresentada na Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

Fontes, W.; Sousa, M.V.; Aragão, J.B. and Morhy, L. (1997). Determination of the amino acid sequence of the plant cytotoxin Enterolobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 347(2),201-207.

Ferreira, V.R. (1995). Determinação da natureza química do receptor da enterolobina em eritrócitos. Tese de mestrado apresentada para a Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

Finnie, C., Bak-Jensen, K.S., Laugesen, S., Roepstorff, P., Svensson, B. (2006). Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant Science* 170, 808–821.

Fivas, M.; Velluz, M.C. and Van der Got, F.G. (1999). Dimer dissociation of the pore-forming toxin aerolysin precedes receptor binding. *J. Biol. Chem.* 274, 37705-37708.

Fountoulakis, M., Langen, H., Gray, C., Takacs, B. (1998). Enrichment and purification of proteins of *Haemophilus influenzae* by chromatofocusing. *J Chromatogr A.* 806 (2),279-91.

Fountoulakis, M., Takacs, B. (2001), Effect of strong detergents and chaotropes on the detection of proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis.* 22(9),1593-602.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2001). Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126, 835–848.

Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2002). Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* 129, 823–837.

Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A. & Vasil, I.K.(1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* 12, 473-478.

Gamborg, O.L. (2002) Plant tissue culture. Biotechnology milestones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38, 84-92.

Godovac-Zimmermann, J., Kleiner, O., and Drukier, A. K. (2005) Perspectives in spicing up proteomics with splicing, *Proteomics* 5, 699–709.

Gorg, A., Postel W., Gunther, S. (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546.

Gorg,A., Postel,W., Baumer, M., Weiss,W.(1992). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: discrimination of cultivars with different malting grades. *Electrophoresis* 13, 192–203.

Granier, F. (1988). Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 9 (11), 712-718.

Guimarães, R.M.; Vieira, M.G.C.; Fraga, A.C.; Von Pinho, É.V.R. e Ferraz, V.P. (2002) Tolerância a dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arábica* L.). *Ciênc. Agrotec.* 26(1),128-139.

Gygi, S.P., Aebersold, R (2000). Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 4, 489-494.

Hanke, J., Brett ,D., Zastrow, I., Aydin,A., Delbruck,S., Lehmann,G., Luft,F.,Reich,J.,Bork,P.(1999) Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends Genet.* 15, 389–90.

Harper, J.L.; Lovel, P.H. and Morre, K.G. (1970). The shape and size of seeds. *Annul Review in Ecological Systems.* 1, 327-56.

Hellwing, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R.(2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*. 22 ,1415-1422.

Heringer, E.P. (1978). Comportamento de algumas espécies eufólias, quando cultivadas no cerrado de Brasília de sementes pertencentes a outras regiões fitogeográficas brasileiras. Brasília. EMPRABA/CPAC.

Hilton, M.G. & Rhodes., M.J.C (1990). Growth and hyoscyamine production of hairy root cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 132-138.

Imim, N.; Kerim, T.; Weinman, J.J.; Rolfe, B.G. (2001). Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics* .1, 1149-1161.

Jacobs, D. I., Van Rijssen, M.S., Van Der Heijden, R., Verpoorte, R., 2001 *Proteomics*, 1, 1345-1350.

Kahademi, M.; Koranski, D.S.; Hannapel, D.J.; Knapp, A.D. and Gladon, R.J. (1991). Water stress and storage-protein degradation during germination of impatiens seed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 (2), 302-306.

Kersten B., Burkle L., Kuhn E.J., Giavalisco P., Konthur Z., Lueking A., Walter G., Eickhoff H., Schneider U. (2002). Large-scale plant proteomics. *Plant Mol Biol.* 48, 133-41.

Kieran, P.M., MacLoughlin, P.F. & Malone, D.M. (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotechnol.* 598, 39-52.

Klose, J. (1975), Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik*, 26, 231-243.

Know, T.H. *et al.* (2003) Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* 81,870-875.

Koller,A., Washburn,M.P., Lange,B.M., Andon,N.L., Deciu,C., Haynes,P.A., Hays,L., Schieltz,D., Ulaszek, R., Wei,J., Wolters,D., Yates, J.R. (2002) Illrd, Proteomic survey of metabolic pathways in rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 ,11969–11974.

LaCount, W., An, G. & Lee, J.M. (1997) The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures. *Biotechnol. Lett.* 19, 93-96.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lêdo, A.A.M. (1977). Estudos da causa da dormência e semetes de Guapuruvu (*Schizolobium parahybum* (Vell) Blake) e Orelha de Negro(*Enterolobium contortisiliquum*(Vell) Morong) e métodos para sua quebra. Tese de mestrado. Universidade de viçosa, Minas Gerais.

Lee, J.H., Kim, N.S., Know, T.H., Jang, Y.S. & Yang, M.S. (2002) Increased production of human granu locyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polkymer in plant suspension cultures. *J. Biotechnol.* 96, 205-211.

Lewis, G.P. (1987). Legumes of Bahia. Royal Botanic Gardens. *Kew.* P. 167-168;

Lima, C.M.R.L. (1999). Enterolobina: aspectos bioquímicos e fisiológicos. Tese de doutorado apresentada na Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil;

Lima, C.M.R.L.; Borghetti, F. and Sousa, M.V. (1997). Temperature and germination of the leguminosae *Enterolobium contortisiliquum*. *R. Bras. Fisiol. Veg* 9(2), 97-102.

Loomis W D & Battaile J. (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry* 5, 423-438.

Lorenzi, H. (1992). Árvores Brasileiras. Nova Odessa, Ed. Plantarum, p.177.

Magnuson, N.S., Linzmaier, P.M., Gao, J.-W., Reeves, R., An, G., Lee, J.M., (1996). Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Protein Expr. Purif.* 7, 220–228.

Mancheno JM, Tateno H, Goldstein IJ, Martinez-Ripoll M, Hermoso J.A. (2005) Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *J Biol Chem* 280, 17251-17259.

Mathesius U., Imin N., Natera SH., Rolfe BG. (2004). Proteomics as a functional genomics tool. *Methods Mol Biol.* 236, 395-414.

Mechin, V., Balliau, T., Chateau-Joubert, S., Davanture, M., Langella, O., Negroni, L., Prioul, J.L., Thevenot, C., Zivy, M., Damerval, C. (2004) A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry* 65, 1609–1618.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay for tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.

Navas, A., Laredo, M.A., Cuesta, A., Anzola, H. y Leon, J.C. (1992). Evaluation of *Enterolobium cyclocarpum* as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Livestock Research for Rural Development* 4(1), 1-7.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biology Chemistry.* 250, 4007-4021.

Ohashi, Y. and Ohshima, M. (1992). Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. *Plant Cell Physiol.* 33(7), 819-826.

Oksman-Caldentey, K and Dirk, I (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites *TRENDS in Plant Science* Vol.9 No.9 September 2004.

Oliva ML, Sampaio MU, Sampaio CA (1987). Serine- and SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contortisiliquum* beans. Purification and preliminary characterization. *Braz J Med Biol Res.* 20(6), 767-70.

Oliva ML, Sampaio MU, Sampaio CA (1988).. Purification and partial characterization of a thiol proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* beans *Biol Chem Hoppe Seyler.* 369 , 229-32.

Oliveira, J.D., Silva, D.A., de Paula, R.C.M.,Feitosa, J.P.A.and Paula, H.C.B. (2001). Composition and effect of salt on rheological and gelationproperties of *Enterolobium contortisiliquum* gum exudate. *International Journal of Biological Macromolecules.* 29, 35-44.

Outchkourov, N.S., Rogelj, B., Strukelj, B., Jongsma, M.A., (2003). Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol.* 133, 379–390.

Pais, M.S., Mavituna, F., Novais, J.M. (1988). *Plant Cell Biotechnology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany

Parker,M.W. (2003). Cryptic clues as to how water-soluble protein toxin form pores in membrane. *Toxicon* 42(1),1-6.

Pereira, C.A. (1992). *Plantas tóxicas e intoxicações na veterinária.* Centro editorial e gráfico/UFG. Goiânia- GO;

Purisco, E., Lemos, R.A.A., Nakaazapt, L., Dutra, I.S.(1998). Principais enfermidades de bovinos de corte do Mato Grosso do Sul-Reconhecimento e diagnóstico. Departamento de Medicina Veterinária, Núcleo de Ciências Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande- MS;

Rabilloud T., Girardot V., Lawrence JJ. (1996). One- and two-dimensional histone separations in acidic gels: usefulness of methylene blue-driven photopolymerization. *Electrophoresis.* 17(1), 67-73.

Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*. 2, 3-10.

Rosales, M., Laredo, M., Cuesta, A., Anzola, H. y Hernandez, L. (1989). Uso de arboles forrajeros para el control de protozoarios ruminales. *Livestock Research for Rural Development*. 1(1), 1-6.

Rose, J.K.C.; Bashir, S.; Giovannoni, J.J.; Jahn, M.M.; Saranavan, R.S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *The Plant Journal*. 39, 715-733.

Rossignol M. (2001). Analysis of the plant proteome. *Curr Opin Biotechnol*. 12(2),131-4.

Sahnoun, I.; Déhais, P; Montagu, M.V.; Rossignol, M.; Rouzé, P. (2000). PPMdb: a plant plasma membrane database. *J Biotech* 78, 235-246.

Santino ,A.,IannaconeB,R.,Richard Hughesc,R.,Caseyc,R.,Mita, G.(2005).Cloning and characterisation of an almond 9-lipoxygenase expressed early during seed development. *Plant Science* 168, 699–706.

Sarin, R. (2004). Insecticidal activity of callus culture of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia*. 75(1), 62-64.

Sharp, J.M. & Doran, P.M. (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol. Prog.* 17, 979-992.

Sher D, Fishman Y, Zhang M, Lebediker M, Gaathon A, Mancheno JM, Zlotkin E(2005) Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria. *J Biol Chem*, 280,22847-22855.

Shewry, P.R. & Lucas, J.A. (1997) Plant protein that confer resistance to pests and pathogens. *Advances in Botanical research* 26 ,135-92.

Skylas,D.J., Mackintosh,J.A., Cordwell,S.J., Basseal,D.J., Walsh,B.J., Harry,J., Blumenthal,C., Copeland,L., Wrigley,C.W., Rathmell,W. (2000).Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm, *J. Cereal Sci.* 32 ,169–188.

Skylas,D.J., Copeland,L.,Rathmell,W.G.,Wrigley,C.W. (2001). The wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identification, *Proteomics* 1 ,1542–1546.

Smirnoff, N., (1998). Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotech.* 9, 14–219.

Silva GA, Oliva ML, Sampaio MU, Araujo MS, Sampaio CA (1995). Isolation and partial characterization of an endopeptidase from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Braz J Med Biol Res.* 27(6), 1299-310.

Sousa, M.V. (1988). Enterolobina, uma proteína hemolítica de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae- Mimosoideae). Purificação e caracterização. Tese de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil;

Sousa, M.V.; Morhy, L. (1989). Enterolobin, a hemolytic protein from *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae- Mimosoideae)- purification and characterization. *An. Acad. Bras. Ci.* 61, 405-412.

Sousa, M.V.; Ricart, C.A .O.; and Morhy, L. (1990). Cytolytic protein and peptides. *Ciênc. Cult.* 42, 495-500.

Sousa, M.V. (1991). Chemical and biologicay characterization of the cytolytic protein enterolobin from seeds on *Enterolobium contortisiliquum*. Ph.D. Thesis. University of Duham, Durham,England.

Sousa, M.V.; Morhy, L.; Richardson, M.; Hilder, V.A.; and Gatehouse, A.M.R. (1993). Effects of the cytolytic seed protein enterolobin on coleopteran and lepidopteran insect larvae. *Entomologia Experimentalis et applicata.* 69, 231-238.

Sousa, M.V.; Richardson, M and Morhy, L. (1994). Homology between the seed cytolysin enterolobin and bacterial aerolysins,. *Journal of Protein Chemistry*. 13, 659-668.

Stevens, L.H., Stoopen, G.M., Elbers, I.J.W., Molthoff, J.W., Bakker, H.A.C., Lommen, Bosch, D., Jordi, W. (2000). Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. *Plant Physiol*. 124, 173–182.

Sunyaev,S., Hanke,J., Brett,D., Aydin,A., Zastrow,I., Lathe,W., Bork,P.,Reich,J.(2000) Individual variation in protein-coding sequences of human genome, *Adv. Protein Chem*. 54, 409–37.

Thelestan, M.; and Mollby, R. (1979). Classification of microbial plant and animal cytolysins based on their membrane-damaging effects on human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Acta*. 557, 156-169.

Thiellement, H.; Bahrman, N.; Damerval, C.; Plomion, C.; Rossignol, M.; Santoni, V.; De Vienne, D.; Zivy, M. 1999. Proteomics for genetics and physiological studies in plants. *Electrophoresis* 20, 2013-2026.

Tilley, S.J. and Saibil, H.R. (2006). The mechanism of pore formation by bacterial toxins. *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 230–236.

Toker G., Memisoglu M., Toker MC., Yesilada E. (2003). Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus cultures. *Fitoterapia* 74(7-8), 618-23.

Torbert, K. A., Rines, H. W. and Somers, D. A. (1998). Transformation of oat using mature embryo-derived tissue cultures. *Crop Science*, 38, 226–31.

Touzet, P.; Riccardi, F.; Morin, C.; Damerval, C. Huet, J-C.; Pernollet, J-C.; Zivy M.; De Vienne, D. (1996). The maize two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. *Theor. Appl. Genet*. 93, 997-1005.

Tsoi, B.M.-Y., Doran, P.M.(2002). Effect of medium properties and additives on antibody stability and accumulation in suspended plant cell cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 171– 180.

Tyers, M., Mann, M. (2003), From genomics to proteomics. *Nature* 422, 193-197.

Van der Goot, F.G., Lakcy, J., Pattus,F., Kay,C.M., Sorokinc, O., Dorssclacr, A.V. and Buckley, J.T. (1993). Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel forming toxin aerolysin: Identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry* 31, 8566-8570.

Van Wijk, K. 2001. Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol* 126, 501-508.

Vensel,W.H., Tanaka,C.K., Cai,N.,Wong,J.H., Buchanan,B.B., Hurkman, W.J.(2005). Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm, *Proteomics* 5, 1594–1611.

Vernon, L.P.; Evett, G.E.; Zeikvs, R.D. and Gray, W.R. (1989). Atoxic thionin from *Pyricularia pubera*: purifications, properties and amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 238, 18-29.

Vidal, W.N. e Vidal, M.R.R. (2000). *Botânica Organográfica*. 3 edição. Editora UFV.p 57-64.

Von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S.G., Fields, S., Bork, P. (2002) Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions, *Nature* 417 , 399-403.

Wasinger V.C., Yesilada E ., Cordwell SJ ., Cerpa-Poljak A ., Yan JX ., Gooley AA ., Wilkins MR ., Duncan MW ., Harris R ., Williams KL ., Humphery-Smith I . (1995).Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 16 (7), 1090-1094.

Watson BS., Asirvatham VS., Wang L., Sumner LW. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiol.* 131(3), 1104-23.

Wilkins, M.R.; Pasquali, C.; Appel, R.D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J.C.; Yan, J.X.; Gooley, A.A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K.L.; Hochstrasser, D.F. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nature Biotechnology* 14, 61-65.

Wilson, K.A. and Chen, J.C. (1983). *Plant Physiol.* 71, 341-349.

Wood Z.A, Schroder, Harris J.R, Poole L.B.(2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem. Sci.* 28, 32–40.

Xu,Q., Modrek,B., Lee,C.(2002) Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome, *Nucleic Acids Res.* 30, 3754–66.

Zalavsky, B.Y.; Ossipov, N.N.; Krivich, V.S.; Baholdina, L.P. and Rogozhin, S.V. (1979). Action of surface-active substances on biological membrane II. Hemolytic activity of nonionic surfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* 507, 1-17.