

**EFEITOS DE PROTEÍNAS DO TIPO VICILINA, LIGANTES DE  
INSULINA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*Canavalia ensiformis* (Fabaceae)**

**ELANE DA SILVA RIBEIRO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**MARÇO DE 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITOS DE PROTEÍNAS DO TIPO VICILINA, LIGANTES DE  
INSULINA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*Canavalia ensiformis* (Fabaceae)**

**ELANE DA SILVA RIBEIRO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, como parte das exigências para a obtenção do Grau em Mestre em Biociências e Biotecnologia, modalidade Biologia Celular.”

**ORIENTADOR: PROF<sup>a</sup>. ÂNTONIA ELENIR AMÂNCIO OLIVEIRA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO DE 2007**

**EFEITOS DE PROTEÍNAS DO TIPO VICILINA, LIGANTES DE  
INSULINA, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE  
*Canavalia ensiformis* (Fabaceae)**

**ELANE DA SILVA RIBEIRO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, como parte das exigências para a obtenção do Grau em Mestre em Biociências e Biotecnologia, modalidade Biologia Celular.”

APROVADA EM: 29 / 03 / 2007.

COMISSÃO EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Belarmindo da Silva (Universidade Estácio de Sá)

---

Prof. Dr. Victor Martin Quintana Flores (LBT/UENF)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maura da Cunha (LBCT/UENF)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Antônia Elenir Amâncio Oliveira (LQFPP/UENF)

Orientadora

**Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Jociléa e Reinaldo, aos meus irmãos Thaís e Patrick e ao meu namorado Ilson, que sempre estiveram comigo em todos os momentos da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres. Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se; aos últimos, segue-se. Minha gratidão à professora Antônia Elenir Amâncio Oliveira pelos valiosos ensinamentos durante estes anos de orientação, por esse resultado de um esforço comum e por repartir comigo os seus conhecimentos, transformando nossos ideais em realizações. Deus te abençoe. Muito obrigada.

Agradeço aos professores Luciana Berlamindo da Silva, Maura da Cunha e Victor Martin Quintana Flores, por aceitarem fazer parte dessa banca examinadora e por todas as contribuições que vierem a oferecer.

Agradeço a professora Kátia V. S. Fernandes, por aceitar revisar essa tese e pelas colaborações oferecidas ao nosso trabalho.

A você que abriu mão dos momentos de convívio, que sofreu a minha ausência, quando o dever e o laboratório me chamavam; a você que muitas vezes, me recebeu de mau humor, quase raivosa, quer pela minha ausência, por saudade ou impaciência. Ilson (meu namorado), muito obrigada por fazer parte desta conquista e por está comigo em todos os momentos desta caminhada.

Quantas horas estivemos lado a lado! Quantas alegrias e sofrimentos compartilhados! Sonhos desfeitos e ideais construídos. Agradeço de maneira muito especial a minha grande e eterna amiga Patrícia Oliveira.

Agradeço com carinho muito especial aos meus “fardinhos” amigos Iara, Simone e Alice, que me deram o privilégio de aprender, ensinando.

Obrigada as minhas amigas, não menos importantes, Amanda, Jamile e Sheila Márcia por tornar tão agradável a convivência durante tantos dias de trabalho.

Agradeço de maneira muito especial aos colegas de laboratório Fábio, Nathália, Flávia, Griciele, Lucilene, Patrícia Conceição, Cassiana, Márcio e a todos que estiveram comigo durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários Cristóvão, Isabela, Sheila e Jucélia que de maneira direta ou indiretamente contribuíram com nosso trabalho.

Aos funcionários Giovana e Bia, do setor de microscopia do LBCT, por auxiliarme nos experimentos de microscopia.

Aos demais alunos e colegas do LQFPP.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELA</b>	<b>XVI</b>
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	<b>XVII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIX</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 – SEMENTES DE PLANTAS</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 – ESTRUTURA DE SEMENTES</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.1 – O TEGUMENTO</b>	<b>1</b>
<b>1.2 – GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 – EMBEBIÇÃO E RETOMADA DO METABOLISMO</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 – SÍNTESE DE PROTEÍNAS DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3 – EMERGÊNCIA DA RADÍCULA E TÉRMINO DA GERMINAÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>1.3 – RESERVAS ENERGÉTICAS USADAS DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 – PROTEÍNAS DE RESERVA</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2 – POLISSACARÍDEOS DE RESERVA</b>	<b>9</b>
<b>1.4 – INSULINA</b>	<b>10</b>
<b>1.4.1 – PRESENÇA DE INSULINA EM PLANTAS</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2 – PROTEÍNAS DE PLANTAS QUE SE LIGAM À INSULINA</b>	<b>13</b>
<b>1.4.3 – EFEITOS DE INSULINA SOBRE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO</b>	<b>14</b>
<b>1.5 – <i>Canavalia ensiformis</i> (Fabaceae)</b>	<b>15</b>
<b>2 – OBJETIVO GERAL</b>	<b>18</b>
<b>2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>



<b>3 – MATERIAIS</b>	<b>19</b>
<b>3.1 – MATERIAL BOTÂNICO</b>	<b>19</b>
<b>3.2 – REAGENTES PARA DOSAGENS DE GLICOSE</b>	<b>19</b>
<b>3.3 – REAGENTES PARA DOSAGENS DE AMIDO</b>	<b>19</b>
<b>3.4 – REAGENTE PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA <math>\alpha</math>-AMILASE</b>	<b>19</b>
<b>3.5 – MATERIAIS PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE</b>	<b>20</b>
<b>3.6 – REAGENTES PARA ELETROFORESE</b>	<b>20</b>
<b>3.7 – REAGENTES E MATERIAIS PARA OS ENSAIOS DE ELISA</b>	<b>20</b>
<b>3.8 – MATERIAIS PARA IMUNODETECÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>4 – MÉTODOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1 – EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA DAS PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE <i>C. ensiformis</i></b>	<b>21</b>
<b>4.2 – DOSAGENS DE PROTEÍNAS</b>	<b>21</b>
<b>4.3 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA</b>	<b>21</b>
<b>4.4 – “WESTERN BLOTTING”</b>	<b>22</b>
<b>4.5 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE</b>	<b>25</b>
<b>4.6 – ENSAIO DE ELISA</b>	<b>25</b>
<b>4.7 – ENSAIO DE LIGAÇÃO DE VICILINA À INSULINA IMOBILIZADA EM PLACA DE ELISA</b>	<b>26</b>
<b>4.8 – MONTAGEM DA COLUNA DE AFINIDADE DE INSULINA ACOPLADA A SEPHAROSE 4B</b>	<b>27</b>
<b>4.9 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM INSULINA-SEPHAROSE 4B</b>	<b>27</b>
<b>4.10 – EXPERIMENTOS DE GERMINAÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>4.11 – EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO PROCESSO GERMINATIVO</b>	<b>29</b>
<b>4.12 – ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2D)</b>	<b>29</b>
<b>4.13 – DOSAGEM DE GLICOSE</b>	<b>31</b>
<b>4.14 – DOSAGEM DE AMIDO</b>	<b>32</b>
<b>4.14.1 – MÉTODO DE EXTRAÇÃO</b>	<b>32</b>

4.14.2 – ENSAIO PARA DOSAGEM DE AMIDO	32
4.15 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE	33
4.16 – EXPERIMENTOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA	34
4.16.1 – FIXAÇÃO E CORTE DOS TECIDOS	34
4.16.2 – IMUNOHISTOQUÍMICA	34
5 – RESULTADOS	36
5.1 – ELETROFORESE E “WESTERN BLOTTING” DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA	36
5.2 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE E DOSAGEM DE VICILINA PELO MÉTODO DE ELISA	36
5.3 – ENSAIO DE LIGAÇÃO DE VICILINA À INSULINA EM PLACA DE ELISA	37
5.4 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM INSULINA-SEPHAROSE 4B	41
5.5 – QUANTIFICAÇÃO DE VICILINA NA FRAÇÃO ELUÍDA DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B POR ENSAIO DE ELISA	41
5.6 – VISUALIZAÇÃO DA FRAÇÃO RETIDA NA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B	41
5.7 – EFEITOS DAS FRAÇÕES PROTÉICAS SOBRE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE <i>C. ensiformis</i>	46
5.8 – DOSAGEM DE VICILINA PELO MÉTODO DE ELISA	50
5.9 – ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL	50
5.10 – DOSAGEM DE CARBOIDRATOS	53
5.10.1 – DOSAGEM DE GLICOSE	53
5.10.2 – DOSAGEM DE AMIDO	53
5.11 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE	53
5.12 – DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORRELACIONADAS À <i>LIVU</i> NOS DIFERENTES TECIDOS DAS SEMENTES DE <i>C. ensiformis</i>	57
5.13 – DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORRELACIONADAS À <i>LIVU</i> NA RADÍCULA DE PLÂNTULAS DE <i>C. ensiformis</i> , POR MICROSCOPIA ÓPTICA	57

<b>6 – DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7 – CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>
<b>COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E ENCONTROS CIENTÍFICOS</b>	<b>82</b>
<b>PUBLICAÇÃO EM REVISTA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** SEMENTES MADURAS DE *Canavalia ensiformis*: (A): SEMENTES ÍNTEGRAS. (B): SEMENTES ÍNTEGRAS E SEPARADAS EM TEGUMENTO E EMBRIÃO. **17**
- FIGURA 2:** ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Canavalia ensiformis*. **24**
- FIGURA 3:** SEMENTE GERMINADA DE *Phaseolus vulgaris*, MOSTRANDO AS DIFERENTES REGIÕES DO EMBRIÃO DESENVOLVIDO. **29**
- FIGURA 4:** (A): SDS-PAGE E (B): “WESTERN BLOTTING” DAS PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Canavalia ensiformis*. RAIAS 1 E 3: VICILINA DE COTILÉDONES DE *Vigna unguiculata* CULTIVAR EPACE 10 (20 µg DE PROTEÍNAS); RAIAS 2 E 4: PROTEÍNAS DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM SULFATO DE AMÔNIO (20 µg). **38**
- FIGURA 5:** (A): CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM SULFATO DE AMÔNIA EM COLUNA DE CM-SEPHAROSE. AS PROTEÍNAS ADSORVIDAS FORAM ELUÍDAS POR SOLUÇÃO CONTENDO 0,25; 0,5 E 1 M DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl) E A ABSORBÂNCIA LIDA EM COMPRIMENTO DE ONDA DE 280 nm. (B): QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO TIPO VICILINA POR PROTEÍNA. (C): QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO TIPO VICILINA POR PROTEÍNA. AMBAS DOSAGENS, REALIZADAS NAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA CM-SEPHAROSE POR ENSAIO DE ELISA, UTILIZANDO O ANTICORPO ANTI-VICILINA DE *Vigna unguiculata* (cv.EPACE 10). OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA E OS DADOS MOSTRADOS SÃO AS MÉDIAS DOS RESULTADOS. **39**
- FIGURA 6:** (A): EXPERIMENTOS DE LIGAÇÃO À INSULINA UTILIZANDO INSULINA BOVINA IMOBILIZADA EM PLACA DE ELISA (ENSAIO DE ELISA **40**

MODIFICADO). AS AMOSTRAS TESTADAS: VICILINA DE EPACE 10 E FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA EM CM-SEPHAROSE. NR (FRAÇÃO NÃO-RETIDA), FR1 (FRAÇÃO RETIDA, ELUÍDA COM NaCl 0,25 M); FR2 (FRAÇÃO RETIDA, ELUÍDA COM NaCl 0,5 M); FR3 (FRAÇÃO RETIDA ELUÍDA COM NaCl 1 M). QUANTIDADE DE VICILINA LIGADA À INSULINA BOVINA (ng/μg). (B): PERCENTAGEM DE VICILINA LIGADA À INSULINA BOVINA. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DESTES RESULTADOS.

**FIGURA 7:** CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE INSULINA-SEPHAROSE 4B DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM SULFATO DE AMÔNIA (0-90 % DE SATURAÇÃO) DOS TEGUMENTOS DE *Canavalia ensiformis*. A COLUNA FOI EQUILIBRADA COM TAMPÃO BICARBONATO DE SÓDIO 100 mM, NaCl 500 mM pH 9,0 E AS FRAÇÕES RETIDAS FORAM ELUÍDAS COM NaCl 1M E ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0. **42**

**FIGURA 8:** QUANTIFICAÇÃO DE VICILINA TOTAL DA FRAÇÃO ELUÍDA DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE, POR ENSAIO DE ELISA UTILIZANDO O ANTICORPO ANTI-VICILINA DE *Vigna unguiculata* (cv.EPACE 10). OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. **43**

**FIGURA 9:** ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (15 %) NA PRESENÇA DE SDS, DA FRAÇÃO OBTIDA ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B. 1- VICILINA DE EPACE 10 (20 μg); 2- FRAÇÃO RETIDA NA COLUNA DE AFINIDADE (5 μg). **45**

**FIGURA 10:** DESENVOLVIMENTO DE RADÍCULAS DE *Canavalia ensiformis* EMBEBIDAS EM ÁGUA OU EM PRESENÇA DE SOLUÇÃO DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE NA CONCENTRAÇÃO DE 3,6 μg/mL. (A): MASSA DA RADÍCULA (mg) E (B): TAMANHO DA RADÍCULA (cm). OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA (TOTAL DE 20 SEMENTES POR TRATAMENTO) E OS DADOS MOSTRADOS SÃO AS **47**

MÉDIAS DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 11:** DESENVOLVIMENTO DE EPICÓTILOS DE *Canavalia ensiformis* EMBEBIDAS EM ÁGUA OU EM PRESENÇA DE SOLUÇÃO DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE NA CONCENTRAÇÃO DE 3,6  $\mu\text{g/mL}$ . (A): MASSA DO EPICÓTILO (mg) E (B): TAMANHO DO EPICÓTILO (cm) DAS PLÂNTULAS DE *C. ensiformis*. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA (TOTAL DE 20 SEMENTES POR TRATAMENTO) E OS DADOS MOSTRADOS SÃO AS MÉDIAS DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T ( $p < 0,05$ ).

**48**

**FIGURA 12:** PERCENTUAL DE PROTEÍNAS NOS COTILÉDONES E EPICÓTILOS DE PLÂNTULAS DE *Canavalia ensiformis* (120 h) TRATADAS COM ÁGUA (CONTROLE) OU COM A SOLUÇÃO DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B NAS CONCENTRAÇÕES DE 7,2 E 3,6  $\mu\text{g/mL}$ , RESPECTIVAMENTE. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T ( $p < 0,05$ ).

**49**

**FIGURA 13:** CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TIPO VICILINA NOS COTILÉDONES DE PLÂNTULAS DE *Canavalia ensiformis* (120 h) TRATADAS COM ÁGUA (CONTROLE) OU COM A SOLUÇÃO DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B NA CONCENTRAÇÃO DE 7,2  $\mu\text{g/mL}$ . OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T ( $p < 0,05$ ).

**51**

**FIGURA 14:** VISUALIZAÇÃO POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL DOS TECIDOS DE COTILÉDONES DE *C. ensiformis*. **(A):** TECIDOS CONTROLE **(B):** TRATADOS COM A FRAÇÃO DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B, APÓS ANÁLISE USANDO O SOFTWARE PHORETIX 2D. **(C):** VOLUME DO “SPOT” MAJORITÁRIO QUE SOFREU AUMENTO COM O TRATAMENTO. **(D):** PI E MR DO PRINCIPAL “SPOTS” ALTERADO (“SPOT” 1) E DOS DIFERENTEMENTE EXPRESSOS (“SPOT” 2-5). NA PRIMEIRA DIMENSÃO: TAMANHO-MASSA IMOBILIZADO NUM GRADIENTE DE pH (PH DE 4 A 7); SEGUNDA DIMENSÃO: SDS-PAGE 12 %. AS PROTEÍNAS FORAM DETECTADAS POR REVELAÇÃO COM NITRATO DE PRATA. **52**

**FIGURA 15:** CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NAS RADÍCULAS E EPICÓTILOS DE PLÂNTULAS DE *C. ensiformis* (GERMINADAS POR 120 h) TRATADAS COM ÁGUA (CONTROLE) OU NA CONCENTRAÇÃO DE 3,6 µg/mL DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA (20 SEMENTES POR TRATAMENTO) E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T (p<0,05). **54**

**FIGURA 16:** CONCENTRAÇÃO DE AMIDO NAS RADÍCULAS E COTILÉDONES DE PLÂNTULAS DE *C. ensiformis* (GERMINADAS POR 120 h) TRATADAS COM ÁGUA (CONTROLE) OU NA CONCENTRAÇÃO DE 3,6 µg/mL DA FRAÇÃO ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA (20 SEMENTES POR TRATAMENTO) E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T (p<0,05). **55**

**FIGURA 17:** ATIVIDADE DA ENZIMA α-AMILASE NOS COTILÉDONES DE PLÂNTULAS DE *C. ensiformis* (GERMINADAS POR 120 h) TRATADAS COM ÁGUA (CONTROLE) OU NA CONCENTRAÇÃO DE 3,6 µg/mL DA FRAÇÃO **56**

ELUÍDA COM ÁCIDO ACÉTICO 100 mM pH 3,0 DA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B. OS EXPERIMENTOS FORAM FEITOS EM TRIPLICATA (20 SEMENTES POR TRATAMENTO) E OS DADOS MOSTRADOS SÃO A MÉDIA DOS RESULTADOS. \* INDICA OS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DO CONTROLE DE ACORDO COM O TESTE T ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 18:** DETECÇÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE INSULINA IMURRELACIONADAS A *LIVU* (LIGANTE DE INSULINA DE *Vigna unguiculata*) NOS COTILÉDONES, EPICÓTILOS, RADÍCULAS E TEGUMENTOS DE *Canavalia ensiformis* GERMINADAS NA PRESENÇA DE LIGANTES DE INSULINA ISOLADOS DOS TEGUMENTOS DE *C. ensiformis*. \* DADOS ESTATISTICAMENTE DIFERENTES DOS RESPECTIVOS CONTROLES ( $p < 0.05$ ). **58**

**FIGURA 19:** DETECÇÃO DE PROTEÍNAS LIGANTES DE INSULINA IMURRELACIONADAS A *LIVU* (LIGANTE DE INSULINA DE *Vigna unguiculata*) NAS RADÍCULAS DE *C. ensiformis* GERMINADAS POR 120 HORAS, ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓPTICA. RADÍCULAS CONTROLE (**A**). RADÍCULAS TRATADAS COM O ANTICORPO ANTI *LIVU* (1:50) (**B**). A REVELAÇÃO FOI REALIZADA POR PRATA. **59**



## LISTA DE TABELA

**TABELA 1:** CONCENTRAÇÃO PERCENTUAL DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS: FARINHA DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Canavalia ensiformis*, PRECIPITADO 0-90 % DE SULFATO DE AMÔNIA E FRAÇÃO RETIDA NA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B. **44**

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

<b>ABS</b>	ABSORBÂNCIA
<b>APS</b>	PERSULFATO DE AMÔNIA
<b>BCIP</b>	BROMO CLORO INDOL FOSFATO
<b>Bg</b>	GLOBULINA 7S BÁSICA
<b>CNBr</b>	BROMETO DE CIANOGENÍO
<b>DMSO</b>	DIMETILSULFÓXIDO
<b>DNS</b>	ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO
<b>DTT</b>	DITIOREITOL
<b>ELISA</b>	“ENZYME LINKED IMUNO ASSAY”
<b>EPACE 10</b>	GENÓTIPO DE <i>Vigna unguiculata</i> SUSCETÍVEL AO CARUNCHO <i>Callosobruchus maculatus</i>
<b>FR</b>	FRAÇÃO RETIDA
<b>GmSPB</b>	PROTEÍNA LIGANTE DE SACAROSE DE <i>Glycine max</i>
<b>IgG</b>	IMUNOGLOBULINA
<b>LEAs</b>	“LATE-EMBRYOGENESES ABUNDANT”
<b>LIVu</b>	LIGANTE DE INSULINA DE <i>Vigna unguiculata</i>
<b>NBT</b>	“NITRO BLUE TETRAZOLIUM”
<b>NR</b>	FRAÇÃO NÃO RETIDA
<b>OPD</b>	ORTO-FENIL-DIAMINA
<b>PBS</b>	TAMPÃO FOSFATO SALINO
<b>RcSUTC</b>	CARREADOR DE SACAROSE DE SEMENTES DE <i>Ricinus comunis</i>
<b>SDS</b>	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
<b>TEMED</b>	N'TETRAMETILETILENODIAMINO
<b>TRIS</b>	TRIS-HIDROXIMETILAMINOMETANO
<b>µg/P</b>	MICROGRAMA / PROTEÍNA

## RESUMO

Vicilinas são proteínas de reserva de sementes classificadas como globulinas 7s que são utilizadas durante o desenvolvimento pós-germinativo para a diferenciação dos tecidos e órgãos da nova planta. Entretanto proteínas do tipo vicilinas com habilidade diferencial de ligação à sacarose têm sido relatadas como envolvidas na mediação da absorção de sacarose pelas sementes em desenvolvimento. Globulinas 7s que se ligam à insulina têm também sido registradas em plantas e podem estar relacionadas a um mecanismo regulatório em plantas semelhante ao desencadeado por insulina, em animais. Neste trabalho nós mostramos a presença de vicilinas que se ligam à insulina no tegumento de sementes de *canavalia ensiformis*, as quais foram imunologicamente similares a vicilina de epace 10. Vicilinas que se ligam a insulina foram capazes de acelerar o desenvolvimento de plântulas de *c. Ensiformis* causando um aumento de tamanho e massa das radículas e epicótilos após 120h de embebição. Nos cotilédones e epicótilos tratados com vicilinas que se ligam a insulina foi observado um aumento na concentração de proteínas solúveis. O tratamento também aumentou os níveis de vicilinas nos cotilédones e de glicose nas radículas e epicótilos. Os níveis de amido diminuíram com o tratamento nos cotilédones e aumentaram nas radículas. A atividade  $\alpha$ -amilásica aumentou nos cotilédones submetidos ao tratamento. Antígenos do tipo *livu* foram detectados em todos os tecidos de plântulas de *c. Ensiformis*, com as mais altas concentrações em tegumentos. Além disso, esses antígenos foram detectados por imunohistoquímica em tecidos de radículas germinadas por 120 h, sendo observados em estruturas citoplasmáticas circulares. Estes resultados reforçam a idéia de múltiplas funções para algumas proteínas do tipo vicilinas, muito além de um simples papel de proteína de reserva.

## ABSTRACT

Vicilins are seed storage proteins classified as 7s globulins which are utilized during post germination development for the differentiation of tissues and organs of the new plant. However vicilin-like proteins with the differential ability of binding to sucrose have been shown to function in the mediation of sucrose uptake by developing seeds. Plant insulin-binding 7s globulins have been studied and could be involved in an insulin-like regulatory mechanism in plants. In this work we show the presence of insulin-binding vicilins in *canavalia ensiformis* (L.) Seed coat which were immunologically similar to epace 10 vicilins. Insulin-binding vicilins were able to accelerate *c. Ensiformis* seedling development causing an increase in both radicle and epicotyl lengths and weights, after 120 h of imbibition. In cotyledons and epicotyls treated with insulin-binding vicilins it was observed an increase in the concentration of soluble proteins. The treatment also increased the levels of vicilins in cotyledons and of glucose in radicles and epicotyls. The levels of starch decreased with the treatment in cotyledons and increased in radicles. Amylase activity increased in cotyledons submitted to the treatment. *Livu*-like antigens were detected in all tissues of *c. Ensiformis* seedlings, and higher concentrations were found in seed coats. These antigens were also detected by optical microscopy in 120 h imbibed radicle cells, being observed in circular cytoplasmic structures. These results reinforce the idea of multiple functions for some vicilin-like proteins, far beyond a simple role of seed storage proteins.

# **1 - INTRODUÇÃO**

## **1.1 - SEMENTES DE PLANTAS**

A semente é o órgão reprodutor das plantas responsável pela perpetuação da espécie e carrega, por isso, toda a informação genética necessária para a formação de um novo indivíduo (Xavier-Filho, 1993). O principal fator para o sucesso das sementes, no ambiente, é a presença de reservas nutritivas, as quais são responsáveis por sustentarem uma jovem planta nos seus primeiros estágios de desenvolvimento, até que esta seja capaz de tornar-se auto-sustentável, capaz de utilizar a luz solar para a realização do processo de fotossíntese (Bewley & Black, 1994).

### **1.1.1 - ESTRUTURA DE SEMENTES**

As sementes são formadas basicamente por três tecidos: o eixo embrionário, o tecido de reserva e o tegumento. O tecido meristemático ou eixo embrionário promove o desenvolvimento dos eixos no sentido da raiz e do caule. O tecido de reserva é formado pelo endosperma, pelo(s) cotilédono(s) e em alguns casos pelo perisperma. Este tipo de tecido é caracterizado por ser especialmente rico em três grupos de substâncias: proteínas, carboidratos e lipídeos. Finalmente há o tecido de revestimento, também conhecido como tegumento (Copeland, 1980, *apud* Oliveira, 2001).

#### **1.1.1.1 - O TEGUMENTO**

Todas as sementes estão recobertas por uma capa, o envoltório seminal ou envoltório da semente, que se desenvolve a partir do(s) integumento(s) do óvulo e fornece proteção ao embrião. Essa estrutura nas sementes secas é denominada tegumento, sendo comumente mais fina que o(s) integumento(s) do qual se formou (Raven *et al.*, 1999; Esaú, 1998).

A casca é a estrutura externa que delimita a semente. Pode ser constituída apenas pelo tegumento, porém em certos casos, também pelo pericarpo que é originário da parede do ovário. Em algumas espécies este pericarpo se desenvolve intimamente ligado ao tegumento, sendo difícil identificar os limites de cada tecido (Carvalho & Nakagawa, 1983). Dos dois integumentos do óvulo, o interno desaparece durante a ontogênese, enquanto

o externo se diferencia em diversas camadas. A epiderme, que é a camada externa, permanece unisseriada e origina a camada palissádica característica das sementes das leguminosas (Carvalho & Nakagawa, 1983).

O tegumento é considerado de grande importância para a semente, devido à sua função de proteção ao embrião em relação ao seu ambiente externo. A proteção exercida pelo tegumento pode ser explicada pela presença de uma cutícula externa ou interna, freqüentemente impregnada com ceras e óleos. Camadas de células contendo cristais (oxalato de cálcio) ocorrem no tegumento de muitas espécies, bem como compostos do metabolismo secundário (Bewley & Black, 1994) e proteínas tóxicas (Oliveira *et al.*, 1999a; Moraes *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004), reforçando o seu papel de proteção.

## **1.2 - GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO**

A germinação é o processo que abrange eventos que são iniciados com a tomada de água pela semente seca e termina com a alongação do eixo embrionário. O sinal visível de que a germinação está completa é, usualmente, a penetração da radícula nas estruturas ao redor do embrião. Eventos subseqüentes, incluindo a mobilização de reservas de armazenamento, estão associados com o crescimento e desenvolvimento da plântula (Bewley, 1997).

### **1.2.1 - EMBEBIÇÃO E RETOMADA DO METABOLISMO**

A tomada de água pela semente madura é dividida em três fases: A inicial é caracterizada por uma rápida tomada de água (fase I), seguida por uma fase de estabilização (fase II). Posteriormente, somente após a germinação estar completa, ocorre uma nova tomada de água (fase III). Sementes dormentes não completam a germinação, conseqüentemente, estas não entram na fase III (Bewley, 1997). O influxo de água das células da semente seca durante a fase I resulta em alterações estruturais temporais, particularmente nas membranas, culminando num imediato e rápido vazamento de solutos e de metabólitos de baixo peso molecular. Dentro de pouco tempo após a re-hidratação, as membranas retornam a sua configuração estável (Bewley, 1997).

Após o início da embebição, a semente seca rapidamente reassume as suas atividades metabólicas. As estruturas e enzimas necessárias para essa retomada inicial de atividade já estão presentes na semente seca (Bewley,

1997). Uma das primeiras mudanças após a embebição é a retomada da atividade respiratória, que pode ser detectada em poucos minutos. Posteriormente, inicia-se a segunda fase, que é caracterizada por um declínio nessa atividade até que a radícula penetre as estruturas ao redor, quando ocorre um novo aumento da atividade respiratória (Botha *et al.*, 1992; Bewley & Black, 1994). A ativação da via glicolítica, da via das pentoses fosfato, bem como a ativação das enzimas do ciclo de Krebs ocorre na fase I de absorção de água (Nicolás & Aldasoro, 1979; Salon *et al.*, 1988).

É sabido que tecidos de sementes quiescentes contêm mitocôndrias, e embora estas organelas sejam pobremente diferenciadas como consequência da maturação, elas contêm enzimas suficientes do ciclo de Krebs e oxidases que providenciam uma quantidade adequada de ATP para suportar o metabolismo por várias horas após o início da embebição (Ehrenshaft & Brambi, 1990; Attucci *et al.*, 1991).

Durante a germinação há o aparecimento de dois padrões distintos de desenvolvimento de mitocôndrias. Estes padrões, que são observados em cotilédones, dependem das reservas estocadas na semente. Em sementes que armazenam amido, o reparo e ativação de pró-plastídeos pré-existentes são predominantes, no entanto, em sementes que armazenam óleos, há uma produção de novas mitocôndrias (Morohashi & Bewley, 1980; Morohashi, 1986). Estas observações implicam em uma coordenada regulação da expressão dos genomas nucleares e mitocondriais em plantas, iniciada durante os primeiros estágios da germinação (Bewley, 1997).

### **1.2.2 - SÍNTESE DE PROTEÍNAS DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO**

Duas discretas fases na síntese e reparo de DNA ocorrem nas células da radícula após o início da embebição. A primeira fase é iniciada tão logo se inicia a embebição e provavelmente envolve o reparo de danos causados ao DNA durante a maturação, secagem e re-hidratação, bem como a síntese de DNA mitocondrial. A segunda fase está associada com a síntese de DNA associado com divisões celulares pós-germinativas (Zlatnova *et al.*, 1987; Osborne & Boubriak, 1994; Bewley, 1997).

Foi demonstrado que moléculas de RNA mensageiro estão presentes dentro do embrião quiescente, dentre elas, alguns mRNAs residuais, cuja função está associada com processos de desenvolvimento da semente, e outros mRNAs, cujos produtos têm funções associadas com os estágios iniciais da germinação (Comai & Harada, 1990; Lane, 1991). Acredita-se que as proteínas codificadas por esses mRNAs residuais são importantes durante o processo de maturação e desidratação da semente, dentre estas, podemos citar as proteínas LEAs (“late-embryogeneses abundant”), que protegem as membranas durante a desidratação e podem ser rapidamente degradadas após a embebição (Jiang & Kermode, 1994; Han *et al.*, 1996, Hong-Bo *et al.*, 2005). Proteínas LEAs estão presentes nas sementes de plantas superiores. Estas também são encontradas em plântulas, raízes e outros órgãos da planta (Chen *et al.*, 2002), estando principalmente localizadas no citoplasma e regiões nucleares (Zhang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). Em plântulas de algodão submetidas a estresses (hídrico e altas temperaturas) levaram ao acúmulo de mRNAs para proteínas LEAs (Li *et al.*, 1998; Wisniewski & Zagdanska, 2001; Yang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Jiang & Huang, 2002). Zhang *et al.* (2002) demonstraram que a expressão de genes para proteínas LEAs é induzida por diferentes tipos de estresses, provavelmente com o intuito de manter o metabolismo normal de plantas superiores sob condições severas. Novos mRNAs são transcritos durante os processos germinativos, a maioria destes, provavelmente, codifica para proteínas essenciais para o suporte do metabolismo celular normal (Bewley & Marcus, 1990).

### **1.2.3 - EMERGÊNCIA DA RADÍCULA E TÉRMINO DA GERMINAÇÃO**

Com poucas exceções, a emergência da radícula através das estruturas ao redor do embrião é o evento que termina a germinação e marca o início do desenvolvimento da plântula. Esta emergência, resultante do alongamento de tecidos radiculares, pode ou não ser acompanhada por divisões celulares. Três possíveis mecanismos para o início do crescimento da radícula. A primeira possibilidade é que, durante a germinação, o potencial osmótico das células da radícula torna-se mais negativo devido à acumulação de solutos, talvez como resultado da hidrólise de reservas poliméricas presentes dentro das células da radícula. A diminuição do potencial osmótico leva ao aumento da tomada de



água, e resulta no aumento do turgor, levando a extensão celular. No entanto, não há evidências consistentes para esta mudança no potencial osmótico durante a germinação (Welbaum & Bradford, 1990; Bradford, 1995).

A segunda possibilidade é que a extensibilidade da parede celular da radícula permita o seu crescimento. No entanto, o mecanismo pelo qual as células da radícula iniciam a sua extensibilidade diferencial ainda não é conhecido. O afrouxamento da parede celular pode resultar da clivagem e rearranjo de moléculas de xiloglucanos, que amarram as microfibrilas de celulose adjacentes. (Wu *et al.*, 1994). Uma candidata alternativa para causa do afrouxamento da parede celular seria a ação de proteínas chamadas de expansinas, que têm habilidades para romper pontes de hidrogênio entre polímeros da parede celular. Expansinas têm sido fortemente implicadas na expansão de hipocótilos de pepinos (McQueen-Mason & Cosgrove, 1995).

A terceira possibilidade é o enfraquecimento dos tecidos da extremidade ao redor da radícula. O declínio da resistência é provavelmente devido à ação de enzimas do tipo hidrolases, tais como hemicelulases, produzidas e secretadas pelo endosperma adjacente (Bewley, 1997).

### **1.3 - RESERVAS ENERGÉTICAS USADAS DURANTE A GERMINAÇÃO E O DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO**

#### **1.3.1 – PROTEÍNAS DE RESERVA**

As sementes acumulam reservas durante o seu desenvolvimento e para muitos tipos de sementes a maior parte dessas reservas é constituída de proteínas (Shewry & Casey, 1999 *apud* Müntz *et al.*, 2001), tais como as globulinas, que predominam nas sementes de dicotiledôneas, ou as prolaminas que são as principais proteínas de armazenamento em cereais. O acúmulo de proteínas de reserva inicia-se durante os períodos medianos e tardios dos estágios de maturação, quando o preenchimento da semente é responsável pelo declínio dos níveis de nitrogênio da planta mãe (Müntz *et al.*, 2001). Essas reservas são depositadas em compartimentos membranosos denominados corpos protéicos, que são originados diretamente do retículo endoplasmático, como ocorre em milho e na maioria das espécies (Müntz, 1998). Durante esse período de deposição, a degradação e a renovação protéicas são

insignificantes, indicando que as proteínas estão protegidas contra o ataque proteolítico (Madison *et al.*, 1981).

A mobilização de proteínas armazenadas é observada em sementes de plantas cultivadas tais como grãos, legumes e cereais. É observado que nos cotilédones das dicotiledôneas e no endosperma de cereais, a mobilização de proteínas armazenadas somente torna-se mensurável após a emergência da radícula, sendo desta forma um evento predominantemente pós-germinativo. Precursores inativos de proteinases são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso e transportados através de um sistema de endomembranas para corpos protéicos onde ocorrerá a ativação enzimática dos zimogênios e a quebra das proteínas de reserva é iniciada (Wilson, 1986 *apud* Müntz *et al.*, 2001; Shutov & Vaintraub, 1987; Bewley & Black, 1994; Müntz, 1996).

Proteínas são armazenadas para posterior mobilização não só em tecidos de reserva específicos como cotilédones e endosperma, mas também no eixo embrionário, tais como radícula, epicótilo e hipocótilo (Tiedemann *et al.*, 2000). A mobilização protéica nesses tecidos não é iniciada em todas as regiões simultaneamente; pequenas quantidades dessas proteínas armazenadas são mobilizadas em regiões limitadas durante a germinação (Smith, 1981, citado em Müntz *et al.*, 2001). Não é bem conhecido se a mobilização de proteínas armazenadas no eixo embrionário é mediada pela síntese *de novo* de proteinases ou por proteinases já armazenadas. No entanto, é bem conhecido que a biossíntese de proteínas durante a germinação no eixo e nos tecidos de reserva depende de aminoácidos livres liberados pela mobilização protéica (Bewley, 1997). Diversos trabalhos relatam a presença de proteases em corpos protéicos de sementes quiescentes e durante a germinação de muitas plantas (Ashton, 1979; Matile, 1982 *apud* Müntz *et al.*, 2001; Wilson, 1986 *apud* Müntz *et al.*, 2001; Shutov & Vaintraub, 1987; Fincher, 1989; Bewley & Black, 1994; Müntz, 1996). Chrispeels & Boulter (1975) demonstraram a atividade de uma endopeptidase nos cotilédones em germinação de sementes de *Vigna mungo*. Em sementes de *Vicia sativa* L., proteinases cisteínicas do tipo papaína (CPRs) são responsáveis pela mobilização de proteínas do tipo globulinas (Schlereth *et al.*, 2000, 2001). Proteinases C

reserva do tipo globulinas 7S presentes no eixo embrionário e nos cotilédones dessas sementes (Tiedemann *et al.*, 2000). Em sementes de *Vigna unguiculata*, tais proteinases também foram relacionadas com os eventos de desenvolvimento e germinação de sementes (Fernandes *et al.*, 1991; Flores *et al.*, 2001).

As proteínas de reserva do tipo globulinas podem ser classificadas de acordo com seus coeficientes de sedimentação como 7S (grupo das vicilinas) e 11S (grupo das leguminas). As vicilinas estão presentes nas sementes como complexos triméricos com massas moleculares que variam de 140 a 190 kDa compostas de três

isolado de uma biblioteca de cotilédones de *Vicia faba* mostrou 58 % de homologia com a proteína GmSBP (Heim *et al.*, 2001). Como as sementes são típicos órgãos de reserva (dreno) dependentes dos tecidos-fonte de assimilatos e ainda o mais importante fotoassimilato transportado nas plantas superiores é a sacarose, os autores sugerem que essas vicilinas que se ligam a sacarose podem ser importantes como transportadores de sacarose cruciais para o desenvolvimento das sementes.

Outras proteínas do tipo globulina 7S também têm sido isoladas e caracterizadas como proteínas que se ligam a insulina (Kagawa & Hirano, 1989). Esse tópico será abordado mais a frente desta introdução.

### **1.3.2 - POLISSACARÍDEOS DE RESERVA**

A mobilização do amido, como principal polissacarídeo de reserva, vem sendo estudada em muitas sementes. Os carboidratos, de modo geral, são requeridos para o desenvolvimento do embrião e para deposição de compostos necessários para germinação. Após a germinação, estes compostos são hidrolisados e seus produtos são liberados para o apoplasto (Williams *et al.*, 2000). Na germinação de sementes de *Ricinus communis*, um carreador de sacarose (*RcSUTI*) é expresso em níveis elevados nas células da epiderme e cotilédones que estão situadas adjacientemente ao endosperma e ao floema (Bick *et al.*, 1998).

As enzimas hidrolíticas possuem papéis importantes na degradação de reservas, principalmente amido. As enzimas  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -1,4-glucano-4-glucanohidrolase) são enzimas endoglicolíticas responsáveis pela mobilização de carboidratos armazenados através da quebra de ligações  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e de outros carboidratos (Fincher, 1989; Payan, 2004). É comumente aceito que, embora outras enzimas participem neste processo da quebra do amido, a contribuição das  $\alpha$ -amilases é pré-requisito para o início do processo (Jones & Jacobsen, 1991; Perata *et al.*, 1992). A síntese de  $\alpha$ -amilase é acompanhada pelo aumento nos níveis de RNAm correspondentes, e este acúmulo é regulado em nível transcricional em resposta a fitohormônios, sinais metabólicos e estresse hídrico (Guglielminetti *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 2002). Na germinação de sementes de cereais, o ácido giberélico (GA) é sintetizado

no embrião de sementes embebidas, difunde-se pela camada de aleurona e induz várias enzimas hidrolíticas, incluindo as  $\alpha$ -amilases. O mecanismo de indução de  $\alpha$ -amilase por GA tem sido extensivamente estudado, e informações consideráveis da via de sinalização em monocotiledôneas durante a germinação têm sido acumuladas (Gubler *et al.*, 1995; Penson *et al.*, 1996; Ritchie & Gilroy, 1998; Ashikari *et al.*, 1999; Kaneko *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2006). Em monocotiledôneas, a indução de  $\alpha$ -amilase por GA é inibida pela ação de ácido abscísico (ABA), ilustrando a reação cruzada entre esses dois fitohormônios (Gomez-Cadenas *et al.*, 1999). Em sementes de espécies de Araucária, a reserva de amido chega a perfazer 60 % da semente (Cardemil & Reiner, 1982). Em plantas de mandioca (uma raiz tuberosa), tratamentos com GA exógena induziram a expressão do gene para  $\alpha$ -amilase, o qual é responsável pelo início da mobilização de carbono, através da degradação do amido armazenado nas raízes. Desta forma, o carbono obtido por degradação de amido pode ser utilizado no crescimento da raiz. Em contraste ao hormônio GA, o fitohormônio ABA não induziu a expressão de genes para esta enzima (Tangphatsornruang *et al.*, 2005). A inibição do efeito de GA na indução de  $\alpha$ -amilase por ABA tem sido demonstrada em trigo, cevada e arroz (Bush, 1996; Gilroy & Jones, 1994; Gomez-Cadenas *et al.*, 1999; Lovegrove & Hooley, 2000).

Estudos das funções e da expressão de genes para  $\alpha$ -amilases em dicotiledôneas são limitados e pouco esclarecedores. Os níveis de RNAm para  $\alpha$ -amilase e a atividade desta enzima são aumentados durante os primeiros estágios da germinação de sementes de *Vigna mungo*, dando consistência à idéia de que esta é responsável pelo ataque aos grânulos de amido (Yamauchi *et al.*, 1994).

#### **1.4 - INSULINA**

A insulina foi descoberta em 1921 por Frederick Banting e colaboradores, como uma proteína secretada pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas, que restaurava a glicemia para níveis normais quando administrada a cães pancreatectomizados. Ela é um peptídeo de massa molecular de 5.700 Da formado por duas cadeias (cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com 21 e 30 resíduos de aminoácidos, respectivamente) unidas entre si por duas pontes dissulfeto. A

insulina exerce múltiplas ações sobre o metabolismo e crescimento celular, que se iniciam sempre pela ligação da insulina com receptores situados na membrana plasmática (Guyton & Hall, 1997). De maneira geral, a insulina estimula processos endergônicos de síntese e armazenamento de reservas energéticas isto é, promove a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, possuindo sua ação principalmente nos músculos, no tecido adiposo e no fígado (Sperelakis, 1994). No fígado, a insulina aumenta a captação de glicose, estimulando seu armazenamento na forma de glicogênio e sua utilização como substrato para lipogênese. Esse hormônio estimula a via glicolítica e a via das pentoses fosfato, além de inibir a glicogenólise e a gliconeogênese, reduzindo a produção hepática de glicose e inibindo a formação de corpos cetônicos (Ganong, 1997). No tecido muscular, a insulina estimula o transporte de glicose para o interior da célula, aumentando a capacidade do sistema transportador da membrana. A maior parte da glicose é armazenada como glicogênio, devido à ativação da glicogênio sintase muscular (Ganong, 1997).

A insulina partilha com os chamados fatores de crescimento (IGF-1, IGF-2, EGF, etc.) a capacidade de estimular o crescimento celular e a síntese protéica, aumentando a síntese de mRNA (Guyton & Hall, 1997).

O receptor de insulina humana é uma proteína do tipo quinase, uma glicoproteína com quatro subunidades. Duas subunidades  $\alpha$  idênticas (135 kDa) são voltadas para o exterior da membrana, onde se localizam os sítios de reconhecimento e ligação da insulina. Duas subunidades  $\beta$  (95 kDa) são u

e feijão verde; raízes de cebola e cevada e caules de feijão verde). Nestes trabalhos, observou-se que todos os extratos promoviam a redução dos níveis de glicose do sangue de coelhos normais e cães pancreatectomizados. Os níveis de glicose no sangue de cães pancreatectomizados também retornavam aos níveis normais após o tratamento com extratos de beterraba (Best, 1924).

No trabalho realizado por Khanna *et al.* (1976) com sementes de *Momordica charantia*, foi isolada uma proteína com massa molecular de aproximadamente 6 kDa que reagia com anticorpos contra insulina humana. Trabalho realizado por Collier *et al.* (1987) relataram o isolamento de proteínas de folhas de espinafre e plantas de *Lemna gibba* G3, com massas moleculares semelhantes à insulina, que reagiam com anticorpos anti-insulina suína e ligavam-se ao receptor de insulina humana. Mas nenhum desses trabalhos determinou a estrutura primária dessas proteínas. Somente em 1999, foi isolada do tegumento de sementes de *C. ensiformis*, uma proteína de massa molecular de 6 kDa que apresentou homologia com a insulina bovina (Oliveira *et al.*, 1999). Trabalhos realizados posteriormente pelo nosso grupo mostraram a presença de proteínas homólogas à insulina em vagens verdes de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (Venâncio *et al.*, 2003), e em folhas de *Bauhinia variegata* (Azevedo *et al.*, 2006). Outros resultados mostraram que antígenos do tipo insulina estão presentes na torta de filtro, subproduto residual da clarificação de açúcar extraído da cana-de-açúcar (Lopes, 2001), em folhas de *Phaseolus vulgaris*, nas gimnospermas *Cupressus sempervirens*, *Pinus ponderosa*, *Cycas revoluta*, *Eycadaceae zamia* e *Selaginella sp*, na parte aérea das pteridófitas *Psilotaceae sp* e *Equisetoceae sp*, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na alga *Rodofita sp*, no caldo de cana (*Saccharum officinarum*) (Silva *et al.*, 2002; Xavier-Filho *et al.*, 2003).

Sheng *et al.* (2004) extraíram de sementes de *Momordica charantia* um polipeptídeo hipoglicêmico, que através de análises de sua seqüência de aminoácidos e do seu perfil em eletroforese SDS-PAGE, assemelhou-se à proteínas do tipo insulina.

Trabalhos realizados por Oliveira *et al.* (2004) mostraram que proteínas imunorrelacionadas à insulina, um receptor do tipo proteína quinases e proteínas do tipo fosfoserina estão localizadas na camada interna do tegumento de sementes de *C. ensiformis*. Esses resultados sugerem que estes

possam ser componentes de vias de sinalizações semelhantes às aquelas em animais, referentes ao metabolismo energético.

#### **1.4.2 - PROTEÍNAS DE PLANTAS QUE SE LIGAM À INSULINA**

Estudos identificaram uma proteína do tipo globulina 7S básica, glicosilada, em sementes de soja, a qual consiste de duas cadeias polipeptídicas de 16 e 26 kDa, unidas entre si por pontes dissulfeto. Esta foi denominada Bg ("Basic sp



### 1.4.3 - EFEITOS DE INSULINA SOBRE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO

Trabalhos realizados por Ellis & Eyster (1923) mostraram que insulina promovia um aumento do crescimento de plântulas de milho, assim como um aumento do desenvolvimento de raízes primárias e secundárias. No entanto, a insulina em concentrações elevadas promovia o retardamento do crescimento dessas plântulas de milho. Csaba & Pál (1982) observaram que insulina promovia o aumento do tamanho e peso de raízes e coleótilos de sementes de cevada, que haviam germinado em solução a  $10^{-8}$  M desse hormônio. Também foram estudados os efeitos de concentrações crescentes de insulina e dos fatores de crescimento IGF I e II sobre a germinação das sementes de melancia (*Citrullus vulgaris*), girassol (*Helianthus annuus*) e pepino (*Cucumis sativus*) (Goodman & Davis, 1993). Esse trabalho mostrou que insulina humana, IGF I e IGF II promoveram o crescimento das radículas dessas sementes.

Trabalhos recentes mostram os efeitos da insulina na síntese de proteínas ribossomais do eixo embrionário de sementes de milho (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Dinkova *et al.*, 2000), os quais remetem aos trabalhos realizados por Eyster & Ellis (1924) sobre os efeitos da insulina na germinação de sementes de milho. Os trabalhos mostraram que a insulina promovia o aumento da germinação e da síntese de proteínas ribossomais do eixo embrionário de milho. Posteriormente, Flores *et al.* (2001) trabalhando com sementes de milho registra a purificação de uma proteína de peso molecular de 20 kDa, que exerce uma função “insulina-like”, promovendo uma significativa diminuição no tempo de germinação de sementes de milho.

Resultados semelhantes foram vistos em sementes de *Phaseolus vulgaris* germinadas em presença de concentrações crescentes de insulina (por 72 horas), onde se observaram aumentos de massa e tamanho das radículas e epicótilos dessas sementes (Santos, 2003). Posteriormente, outro trabalho realizado por nosso grupo demonstrou que insulina, vanadil sulfato (composto que apresenta efeitos similares aos da insulina) e pinitol (composto análogo ao inositol, um segundo mensageiro na cascata desencadeada por insulina) aceleraram o desenvolvimento de epicótilos e radículas de *C. ensiformis*

(Oliveira *et al.*, 2004). Todos esses resultados indicam que a insulina deva desempenhar uma função nos processos germinativos das sementes, podendo estar possivelmente envolvida no transporte de açúcar do tegumento para os cotilédones das sementes, assim como na mobilização dessas reservas durante a germinação.

### **1.5 - *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae)**

*Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae) é uma leguminosa anual, de origem na Índia e América Central, sendo atualmente cultivada na maioria das regiões tropicais e subtropicais, apesar de poucos serem os países que a cultivem em grande escala (Braga, 1960). Sua utilização como cultivo de cobertura, tem uma grande importância numa variedade de sistemas agrícolas, onde se aproveita sua cobertura verde durante as temporadas de secas (Alemàn & Flores, 1993).

Normalmente as sementes maduras são obtidas de 180 a 300 dias após o plantio, dependendo do genótipo e das condições climáticas do local. Suas sementes são geralmente brancas ou mais raramente podem apresentar uma cor amarelada. Possuem dimensões aproximadas de 2,5 x 1,25 cm e pesam cerca de 1,5 g (Braga, 1960). Algumas linhagens dentro da mesma espécie apresentam características trepadoras, mas a maior parte possui características arbustivas (Alemàn & Flores, 1993), (Figura 1). Esta leguminosa apresenta-se bastante tolerante a sombra e a condições adversas de temperaturas, sendo bastante resistente a seca e se adaptando bem a condições úmidas (Alemàn & Flores, 1993).

As sementes e plântulas de *C. ensiformis* vêm sendo objetos de estudo no nosso grupo durante anos. Proteínas envolvidas com os mecanismos de defesa dessas sementes contra o ataque de *Callosobruchus maculatus* (Oliveira *et al.*, 1999a) e fungos fitopatogênicos (Oliveira *et al.*, 1999b) foram identificadas nos cotilédones e tegumentos de sementes quiescentes. Dentre essas, foram destacadas proteínas homólogas a proteínas de reserva do tipo vicilinas (Oliveira *et al.*, 1999a).

Oliveira *et al.* (1999) demonstraram a presença de proteína homóloga à insulina nos tegumentos de sementes quiescentes de *C. ensiformis*.

Posteriormente, foi demonstrada por imunolocalização, através de microscopia óptica de fluorescência, a presença de antígenos do tipo insulina, receptor de insulina e proteínas do tipo fosfoserina no tegumento de sementes quiescentes de *C. ensiformis*. A marcação para os três tipos de proteínas foi observada na camada de célula mais interna do tegumento (Oliveira *et al.*, 2004).

***Canavalia ensiformis***

**A**



**B**



**Figura 1:** Sementes maduras de *Canavalia ensiformis*: **(A)**: Sementes íntegras. **(B)**: Sementes íntegras e separadas em tegumento e embrião.

## **2 - OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho é identificar proteínas ligantes de insulina no tegumento de *Canavalia ensiformis* e investigar os possíveis efeitos dessas moléculas no desenvolvimento pós-germinativo de plântulas.

### **2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar proteínas ligantes de insulina do tegumento de sementes de *C. ensiformis*.
- Investigar os efeitos dessas proteínas sobre o desenvolvimento pós-germinativo de *C. ensiformis*.
- Investigar a presença de proteínas imunorrelacionadas a *LIVu* (ligante de insulina de *Vigna unguiculata*) em *C. ensiformis*.

### **3 - MATERIAIS**

#### **3.1 - MATERIAL BOTÂNICO**

Sementes de *Canavalia ensiformis* foram obtidas do Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, e foram plantadas e mantidas no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Classificação botânica - Reino: Plantae, Divisão: Magnoliophyta,  
Classe: Magnoliopsida, Ordem: Fabales, Família: Fabaceae, Subfamília:  
Papilionoideae, Gênero: Canavalia, Espécie: *ensiformis*  
([http://pt.wikipedia.org/wiki/canavalia\\_ensiformis](http://pt.wikipedia.org/wiki/canavalia_ensiformis)).

#### **3.2 - REAGENTES PARA DOSAGEM DE GLICOSE**

- “Kit” enzimático Glicose Enz-color – Biodiagnóstica.

#### **3.3 - REAGENTES PARA DOSAGEM DE AMIDO**

- “Kit” Starch: UV Method – Sigma.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Merck.
- Ácido clorídrico (HCl) – Vetec.
- Hidróxido de sódio (NaOH) – Vetec.

#### **3.4 - REAGENTES PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE**

- Ácido dinitrossalicílico – Sigma.
- Amido – Sigma.
- Fenol cristalino – Sigma.
- Maltose – Sigma.
- Tartarato duplo de sódio e potássio – Sigma.

#### **3.5 - MATERIAIS PARA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE**

- Resina Sepharose 4B ativada com CNBr - Amersham Pharmacia.
- Insulina suína – BIOBRÁS.
- Insulina bovina – Sigma.

### **3.6 - REAGENTES PARA ELETROFORESE**

- Acrilamida e Bis-acrilamida – Sigma.
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Sigma.
- N'tetrametiletilenodiamino (TEMED) – Sigma.
- Persulfato de amônia – Merck.
- Tris-base (pH 6,8 e 8,8) - Sigma.

### **3.7 - REAGENTES E MATERIAIS PARA OS ENSAIOS DE ELISA**

- OPD (orto-fenil-diamina) – Sigma.
- Peróxido de hidrogênio – Sigma.
- Placa de 96 poços Maxisorp – NUNC.

### **3.8 - MATERIAIS PARA IMUNODETECÇÃO**

- Anticorpo anti-vicilina de EPACE 10 produzido em coelho - Produzido contra vicilina de *Vigna unguiculata*, cedido pela Dr<sup>a</sup> Adriana Ferreira Uchoa.
- Anticorpo anti-IgG de coelho complexado com peroxidase Sigma.
- Anticorpo anti-proteína *LIVu* produzido em camundongo, cedido pelo Doutorando Thiago Motta Venâncio.
- Anticorpo anti-IgG de camundongo complexado a peroxidase – Sigma.
- Anticorpo anti-IgG de camundongo complexado a ouro coloidal – Sigma.

Todos os demais reagentes utilizados são de grau analítico e foram obtidos comercialmente.

## **4 - MÉTODOS**

### **4.1 - EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA DAS PROTEÍNAS DO TEGUMENTO DE SEMENTES DE *C. ENSIFORMIS***

Os tegumentos de sementes quiescentes foram separados dos cotilédones, triturados em moinho e peneirados em uma peneira de malha fina. A farinha foi extraída na proporção de 1:10 (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 500 mM, pH 7,6, por 1 hora em temperatura ambiente; em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido após centrifugação foi precipitado com sulfato de amônia a 0-90 % de saturação, agitado por 30 minutos e deixado em repouso por 16 horas, a 4 °C e, então centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado resultante foi dialisado contra água, por 48 horas, a 4 °C e liofilizado (Figura 2).

### **4.2 - DOSAGENS DE PROTEÍNAS**

Para realizarmos as dosagens protéicas das amostras, foi utilizado o método de Bradford (1976). Primeiramente, foi feita uma curva padrão com a proteína ovalbumina (1:1), a qual foi diluída em concentrações crescentes de 10 a 100 µgP/ 100 µL para o cálculo do fator. Após extração, de cada amostra a ser dosada, foi retirada uma alíquota de 20 µL e acrescentados 1 mL do reagente de Bradford. Após o tempo de 10 min, as amostras foram lidas em comprimento de onda de 595 nm e as concentrações protéicas determinadas de acordo com a seguinte fórmula:  $C = f * Abs * (1/diluição)$  (µgP/100 µL).

### **4.3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

Para a visualização do perfil protéico, as amostras de vicilina e da precipitação com sulfato de amônia das proteínas do tegumento (Figura 2) e a fração eluída com ácido acético 100 mM da cromatografia de afinidade Insulina Sepharose-4B (Figura 7) foram submetidas ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %), na presença de SDS (Laemmli, 1970). O gel principal (gel de separação) foi montado em placas de vidro de 10 X 13,5 cm, misturando-se: 3,5 mL de água destilada; 7,5 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 3,8 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 0,15 mL



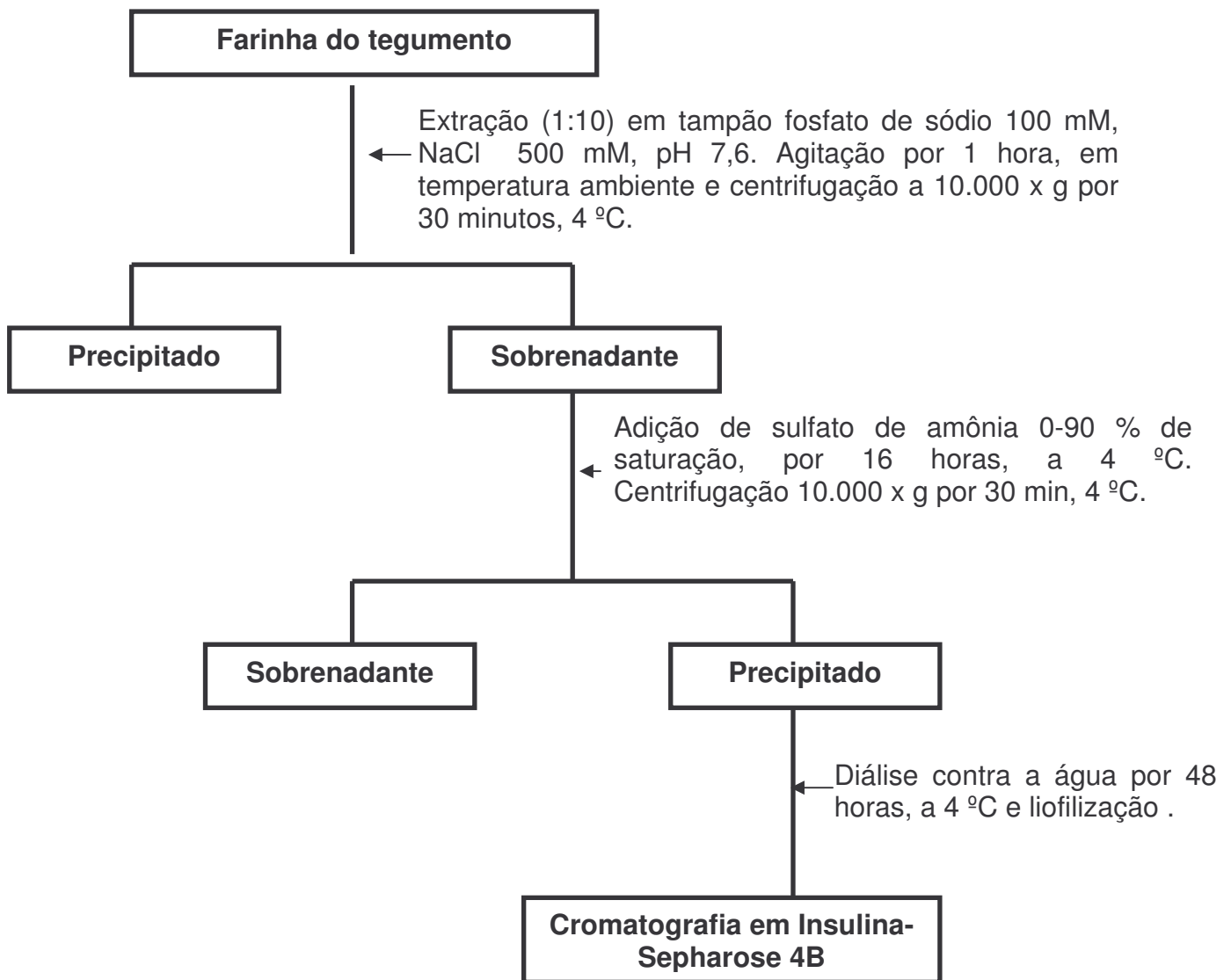
de SDS 10 %; 0,15 mL de persulfato de amônia 10 % e 0,006 mL de TEMED. O gel de empacotamento foi preparado misturando-se: 2,1 mL de água destilada; 0,5 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 0,38 mL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 0,03 mL de SDS 10 % ; 0,03 mL de persulfato 10 % e 0,003 mL de TEMED. O tampão de corrida, com o qual se preencheu a cuba de eletroforese, foi Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3. A eletroforese processou-se por aproximadamente 2 horas com uma corrente constante de 15 mA. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M, glicerol 10 %, SDS 10 %, Azul de bromofenol 1 %, pH 6,8), e aplicados 10 µg de proteína no poço. O gel foi corado com uma solução corante (0,8 g de Azul de Coomassie R, 320 mL de metanol e 80 mL de ácido acético). O gel foi descorado por uma solução descorante para Coomassie (35 % de metanol e 10 % ácido acético).

#### **4.4 - “WESTERN BLOTTING”**

Após a eletroforese, o gel não corado foi submetido a transferência para uma membrana de nitrocelulose para experimento de “Western blotting” (Towbin *et al.*, 1979). A transferência ocorreu em sistema semi-seco usando-se tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,0 contendo 20% de metanol (tampão de transferência). A membrana de nitrocelulose foi equilibrada no mesmo tampão por 20 minutos. Foram colocados seis pedaços de papel de filtro, recortados nas dimensões do gel, umedecidos em tampão juntamente com o gel (durante 5 minutos). O “sanduíche” de transferência foi montado da seguinte maneira: três pedaços de papel de filtro, seguidos da membrana de nitrocelulose, do gel e outros três pedaços de papel de filtro umedecidos em tampão de transferência. O sistema foi fechado e a transferência processou-se usando uma corrente de 1 mA/cm<sup>2</sup> do gel durante aproximadamente 4 horas.

Após a transferência, a membrana foi deixada por 2 horas em tampão bloqueador (PBS-fosfato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 7,6 contendo 2 % de leite em pó desnatado), a temperatura ambiente. Após ser bloqueada, a membrana foi incubada com anticorpo anti-vicilina de EPAGE 10, produzido em coelho, em uma diluição de 1:2000 em tampão bloqueador, por 2 horas, em temperatura ambiente. Após esse tempo, a membrana foi lavada por 1 hora com tampão PBS e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho complexado

com fosfatase alcalina, em uma diluição de 1:2000 em tampão bloqueador por 2 horas. Novamente a membrana foi lavada por 1 hora em PBS e realizada a revelação para fosfatase alcalina, utilizando para isso, uma pastilha composta por BCIP/NBT (Sigma), dissolvida em 10 mL de água destil



**Figura 2:** Esquema de extração das proteínas do tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*.

#### **4.5 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE**

A amostra contendo 140 mg do precipitado (fração 0-90 %) foi dissolvida em 15 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e aplicada em uma coluna de troca iônica em CM-Sepharose, equilibrada e eluída com o mesmo tampão de dissolução. A amostra foi percolada através da matriz a um fluxo de 30 mL/h. O material não retido foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio e as frações retidas foram eluídas com concentrações de 0,25; 0,50 e 1 M de NaCl. Foram coletadas frações de 5 mL por tubo e a densidade óptica medida a 280 nm.

#### **4.6 - ENSAIO DE ELISA**

O ensaio de ELISA, segundo metodologia descrita por Engvall & Perlman, 1971, foi utilizado neste trabalho para detecção e quantificação de proteínas imunorrelacionadas a vicilina e também para a detecção de proteínas imunorrelacionadas a *LIVu*.

As dosagens destas proteínas foram realizadas de acordo com os seguintes procedimentos. Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com a amostra, em concentração de 20 µg de proteína/100 µL de tampão carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,6 a 4° C por 16 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada 3 vezes com tampão PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-Tween) e, posteriormente, a cada poço foi adicionado um volume de 300 µL de tampão bloqueador (PBS-Tween contendo 1 % de gelatina) durante 2 horas, a temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio a placa foi novamente lavada 10 vezes com PBS-Tween.

Para dosagens de proteínas imunorrelacionadas a vicilina foram adicionados 50 µL do anticorpo anti-vicilina de EPAGE 10, produzido em coelho, diluído 1:2000 em tampão bloqueador por 2 horas em temperatura ambiente.

Na detecção de proteínas imunorrelacionadas a *LIVu* foram adicionados 50 µL do anticorpo anti-proteína *LIVu*, produzido em camundongo, diluído 1:2000 em tampão bloqueador, por 2 horas em temperatura ambiente.

Após a exposição ao anticorpo, a placa foi lavada com PBS-Tween 10 vezes. Em seguida foram adicionados 50 µL do segundo anticorpo (anti-IgG de

coelho para proteínas imunorrelacionadas a vicilina e anti-IgG de camundongo para proteínas imunorrelacionadas a *LIVu*, ambos complexados a peroxidase), diluído 1:2000 em tampão bloqueador, por 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi lavada 10 vezes com PBS-Tween.

A revelação da atividade da peroxidase foi realizada com uso de OPD (Orto fenil diamina), na proporção de 10 mg de OPD/ 25 mL de tampão ácido (3,25 mL de ácido cítrico 0,1M; 3,5 mL de fosfato de sódio 0,2 M; 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %; 5,75 mL de H<sub>2</sub>O, pH 5,0). Foram aplicados a cada poço da placa 50 µL de solução de OPD. Após o aparecimento da cor (aproximadamente 15 min), a reação foi parada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N, e a leitura foi realizada a 492 nm. Os resultados foram repetidos 3 vezes.

#### **4.7 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DE VICILINA A INSULINA IMOBILIZADA EM PLACA DE ELISA**

A placa de ELISA foi incubada com insulina bovina (20 µg proteína/ 100 µL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6) por 16 h, a 4° C. Posteriormente a solução foi descartada e a placa lavada durante 1 hora com PBS-Tween. Após a lavagem, foram adicionados à placa 300 µL de tampão bloqueador durante 2 horas, a temperatura ambiente. Depois do bloqueio a placa foi lavada durante 30 minutos e incubada durante 2 horas com as amostras: vicilina de EPACE 10 ou com as frações NR, FR1, FR2 e FR3 provenientes da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose (20 µg de proteína/100 µL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6). Posteriormente, a placa foi lavada com PBS-Tween e todos os procedimentos seguintes foram idênticos ao descrito no item anterior, onde o anticorpo utilizado foi anti-vicilina de EPACE 10, produzido em coelho, diluído 1:2000 em tampão bloqueador. Os seguintes controles foram realizados: controle positivo de vicilina incubada com os anticorpos (anticorpo anti vicilina de EPACE 10 e 2° anticorpo anti-IgG de coelho complexado com fosfatase alcalina), e os controles negativos: insulina incubada com os anticorpos citados acima, insulina incubada com vicilina e não incubada com os anticorpos, tampão carbonato/bicarbonato incubado com os anticorpos citados acima e insulina e

vicilina incubados com o 2º anticorpo anti-IgG de coelho complexado com fosfatase alcalina.

#### **4.8 - MONTAGEM DA COLUNA DE AFINIDADE DE INSULINA ACOPLADA A SEPHAROSE 4B**

Coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B foi montada de acordo com metodologia descrita por Cuatrecasas (1970). Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (2 g) foi embebida em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 durante 16 horas, a 4 °C. Posteriormente, uma solução de 25 mg de insulina suína dissolvida no tampão acima foi adicionada à matriz e deixada sob agitação lenta por 4 horas, a temperatura ambiente. A suspensão foi mantida a 4 °C, por 16 horas, para aumento da eficiência de ligação. Posteriormente, a resina foi agitada levemente com bicarbonato de sódio 100 mM, glicina 100 mM, pH 9,0, por 3 horas, a temperatura ambiente e em seguida filtrada e lavada com ácido acético 100 mM, pH 3,0 e novamente filtrada. Após cada lavagem, os eluídos foram medidos e a concentração de proteína nesses eluídos foi determinada por Bradford (1976). A quantidade de proteína eluída nas lavagens foi diminuída da quantidade inicial de proteínas na solução de insulina. Pela diferença, pode-se determinar a quantidade de proteína retida na coluna, a qual foi de 1,9 mgP. A resina foi lavada 5 horas com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 e conservada a 4 °C.

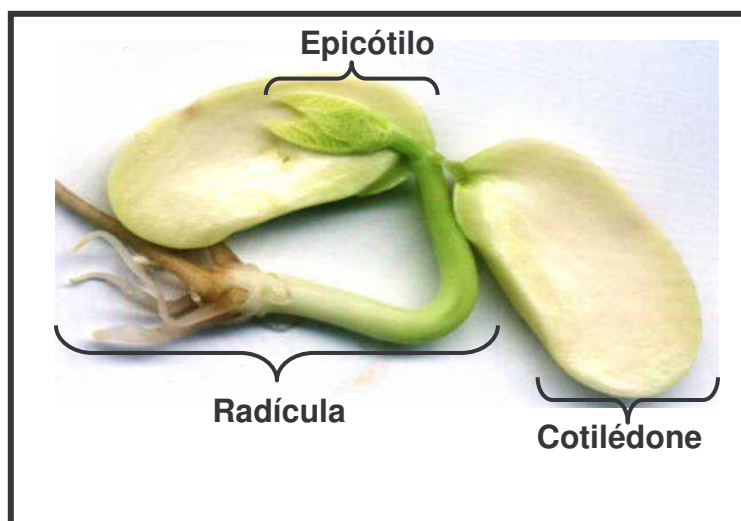
#### **4.9 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM INSULINA-SEPHAROSE 4B**

A fração precipitada com sulfato de amônia (0-90 %) do tegumento (100 mg) foi dissolvida em 50 mL de tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM pH 9,0 e aplicada na coluna de afinidade. O material não retido na coluna foi lavado com o mesmo tampão de equilíbrio e o material retido foi eluído primeiramente com NaCl 1M e depois com ácido acético 100 mM, pH 3,0. Foram coletados 5 mL/tubo, num fluxo de 30 mL/h. A densidade óptica das frações foi lida a 280 nm. Posteriormente, todas as frações foram submetidas à diálise para os experimentos seguintes.

#### 4.10 - EXPERIMENTOS DE GERMINAÇÃO

As sementes de *Canavalia ensiformis* foram esterilizadas com 100 mL de solução de álcool etílico 70 % por 1 minuto. Foram colocadas 20 sementes para germinar em placas de Petri, contendo algodão estéril umedecido com 30 mL de água destilada estéril (controle) ou com mesmo volume das soluções em diferentes concentrações preparadas a partir da amostra proveniente da cromatografia de afinidade na coluna de insulina-Sepharose 4B (0,36 µg/mL; 1,44 µg/mL; 2,88 µg/mL; 3,6 µg/mL e 7,2 µg/mL). Os experimentos tiveram duração de 120 horas (intercalando-se 12 h de luz e 12 h de escuro) a 28 °C, em estufa incubadora. Inicialmente o algodão foi umedecido com 30 mL de solução e após 60 h o algodão foi novamente umedecido com o mesmo volume. Após esse período, as plântulas foram separadas em cotilédones, tegumentos, radículas e epicótilos (Figura 3) e as radículas e epicótilos foram medidos e pesados (Oliveira *et al.*, 2004). Os resultados foram repetidos cinco vezes, 20 sementes por experimento (total de 100 sementes) e os resultados foram submetidos a análises estatísticas através do teste t de Student.

Os tecidos obtidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e liofilizados. A farinha resultante de cada tecido será usada para os experimentos posteriores.



**Figura 3:** Semente germinada de *Phaseolus vulgaris*, mostrando as diferentes regiões do embrião desenvolvido.

#### **4.11 - EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO PROCESSO GERMINATIVO**

A farinha dos tegumentos foi extraída na proporção de 1:10 em tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 0,5 M; pH 7,6 (tampão PBS), por 30 min e o extrato foi centrifugado (10.000 x g por 30 min, 4 °C) e liofilizado. Após liofilização, o pó resultante foi ressuspenso em 1 mL de tampão PBS. A farinha dos cotilédones, epicótilos e radículas foi extraída na proporção de 2 mg em 1 mL de tampão PBS. Todas as amostras foram utilizadas para posteriores dosagens protéicas. As quantidades de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

#### **4.12 - ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2D)**

Para descrevermos o perfil eletroforético das proteínas encontradas nos cotilédones de plântulas de *C. ensiformis*, tecidos de plântulas controle e teste (germinadas na concentração de 7,2 µg/mL da fração eluída com ácido acético 100 mM, pH 3,0 da cromatografia de afinidade) foram submetidos a eletroforese em gel bidimensional (O'Farrel, 1975). A concentração escolhida foi de acordo com o maior aumento de proteínas. As amostras de cotilédones controle e teste foram extraídas na proporção de 2 mg de pó diluído em 150 µL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A extração se processou durante 30 min e posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 3 min para retirada do sobrenadante. Em seguida, estas foram submetidas a dosagem protéica pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram repetidos 2 vezes.

Alíquotas de cada amostra, contendo 20 µgP/30 µL de tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foram aplicadas em tiras de gel ("strips") de poliacrilamida com um gradiente de pH imobilizado de 4,0 – 7,0 e colocadas em tampão de re-hidratação (contendo uréia 8 M, Chaps 2 %, DTT 60 mM, tampão IPG 0,5 % e azul de bromofenol 0,002 %). A focalização Isoelétrica (IEF) e a SDS–PAGE foram feitas com auxílio dos equipamentos IPGphor e do MULTIpHpor – (Amersham Pharmacia) de acordo com as instruções do fabricante. A focalização processou-se isoeletricamente a 50 mA e 20 °C, em um gradiente de pH variando de 4,0 a 7,0 em condições crescentes de voltagem atingindo aproximadamente 24.000 volts/hora ao final da focalização,



de aproximadamente 12 horas. Ao final desse processo, os “strips” foram equilibrados em tampão de equilíbrio (contendo tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol 30 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002 % e DTT 10 %) durante 15 min.

A segunda dimensão foi feita de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), onde os “strips” foram montados sobre um gel de poli-acrilamida 12 %, contendo SDS. As condições de separação ocorreram em uma corrida a 50 V, durante aproximadamente duas horas.

A revelação do gel foi feita com nitrato de prata de acordo com a metodologia de Dunn & Crisp (1994). Neste método, o gel foi posto numa solução fixadora (metanol 50 %, ácido acético 12 % e formol 37 %) durante 1 hora. Em seguida, o gel foi lavado com uma solução de etanol 50 % (2 vezes de 20 min) e com uma solução de etanol 30 % (1 vez de 20 min). Após as lavagens, o gel foi posto numa solução de tiosulfato de sódio durante 1 min sob agitação e novamente foi lavado com água mili-Q (3 vezes de 20 segundos). O gel foi então corado com uma solução de nitrato de prata (200 mg/100 mL de água mili-Q) acrescida de 75 µL de formol e deixado em repouso por 20 min. Terminado o tempo de reação, este foi lavado com água mili-Q (2 vezes de 20 min) e revelado com uma solução composta de carbonato de sódio (6 g/100 mL), formol (50 µL) e 400 µL da solução de tiosulfato de sódio (1 mg/mL). A revelação processou-se durante 20 min até o aparecimento completo das bandas, sendo em seguida parada com a solução fixadora (descrita acima).

Em seguida, o gel foi digitalizado e submetido a análise do perfil protéico. Foram analisados o ponto isoelétrico e a massa molecular dessas proteínas em tecidos controle e teste, com auxílio do software, Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics Ltd). Posteriormente os “spots” dos géis controle e teste foram comparados e as diferenças analisadas para identificação de proteínas alteradas pelo tratamento.

#### **4.13 - DOSAGEM DE GLICOSE**

Para as dosagens de glicose foi utilizado o “Kit” enzimático Glicose Enz-color (Biodiagnóstica). As amostras das sementes germinadas foram extraídas, por 30 Td (d)Tj 6.66273 0 Td (o)Tj 6.66273 0 T0433 0 Td (r)Tj 4.02165 0 Td (e)Tj 6.6Tj 6.662

nas seguintes proporções: epicótilos, cotilédones e radículas (50 mg/mL) e tegumentos (100 mg/mL). Posteriormente, foram centrifugadas para a retirada do sobrenadante. Para as dosagens de glicose, foram retiradas alíquotas de 10 µL de cada amostra e acrescentado 1 mL do reagente para glicose (0,2 mmol/L de 4-aminofenazona; 5 mmol/L de hidroxibenzoato; 10000 U/L de glicose oxidase e 500 U/L de peroxidase). Para os cálculos da concentração de glicose foi feita uma solução padrão constituída de 10 µL da solução de glicose (100 mg/dL de glicose em ácido benzóico 0,16 %) acrescentados de 1 mL do reagente para glicose. Os brancos foram compostos de 10 µL de salina acrescentados de 1 mL do reagente para glicose. As soluções foram deixadas em estufa a 37 °C por 10 min e posteriormente lidas em comprimento de onda de 500 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata para cada experimento de germinação (total de 3 germinações).

#### **4.14 - DOSAGEM DE AMIDO**

##### **4.14.1 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO**

As amostras foram dissolvidas nas seguintes proporções: 100 mg de pó diluído em 1 mL de DMSO (dimetilsufóxido) e 250 µL de HCl 8 M. As amostras utilizadas foram os epicótilos, radículas, cotilédones e tegumentos resultantes de plântulas de 120 horas de germinação. Posteriormente, os tubos foram incubados a 60 °C, por 30 min. Após este tempo foram adicionados em cada tubo 2,5 mL de água mili-Q, centrifugados para a retirada do sobrenadante. O sobrenadante resultante foi completado para 4 mL com a adição de água mili-Q. Posteriormente, para cada solução o pH foi ajustado para entre 4-5, com utilização de NaOH. Após o ajuste do pH, as soluções resultantes foram completadas para o volume final de 5 mL, com água mili-Q.

##### **4.14.2 - ENSAIO PARA DOSAGEM DE AMIDO**

Para as dosagens de amido foi utilizado o “Kit” Starch: UV Method (Sigma). As dosagens de amido das amostras foram feitas pela retirada de 25 µL do extrato final, acrescentados de 25

acrescentado de 25  $\mu\text{L}$  de água mili-Q. Além destes, foi feito o branco da água com 50  $\mu\text{L}$  de água mili-Q.

Depois do preparo do meio reacional, cada tubo foi colocado a 60  $^{\circ}\text{C}$ , por 15 min. Posteriormente, as amostras devem chegar a temperatura ambiente para a realização da segunda parte do ensaio. Esta parte do ensaio foi feita numa placa de cultura de células. Nos poços foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras e 50  $\mu\text{L}$  do reagente

que as absorvâncias pudessem serem lidas num leitor de microplacas a 540 nm.

Os tecidos de sementes de *C. ensiformis* controle e germinada por 120 horas nas soluções de 0,36; 1,44; 2,88 e 3,6 e 7,2 µg/mL da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade, utilizados na dosagem de α-amilase, foram submetidos à extração por 30 min a 4 °C em tampão fos

Esta solução foi colocada em quantidade suficiente para cobrir o material. Posteriormente, o material foi desidratado, em temperatura ambiente, numa série de soluções de metanol: 50 % por 30 min; 70 % e 90 % por 1 h. O material foi então incluído em Resina LR Gold, na seguinte ordem: 50 % de metanol + 50 % de resina LR-Gold, durante 18 h; 100 % de resina LR-Gold, durante 3 - 4 dias; 100 % de resina LR-Gold + catalisador, durante 10 h.

Os catalisadores utilizados foram benzil e peróxido de benzoil. A polimerização da resina ocorreu sob baixa temperatura e incidência de luz visível. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em cortes ultrafinos em ultramicrótomo Reichert Ultracuts, em temperatura ambiente, e os cortes foram montados em lâminas de vidro para a análise por imunohistoquímica.

#### **4.16.2 - IMUNOHISTOQUÍMICA**

As lâminas foram bloqueadas com cloreto de amônio 50 mM por 2 h. Em seguida, estas foram lavadas com tampão PBS (fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,3) por 1 h. Novamente, as lâminas foram bloqueadas com tampão PBS acrescido de BSA (1 %), por 2 h, e incubadas com o 1º anticorpo (anti-proteína ligante de insulina de 160 kDa isolada de tegumento de EPACE 10 - LIVu) produzido em camundongo, na diluição de 1:50 e 1:100 em tampão PBS-BSA. O controle foi feito com o tampão PBS acrescido de BSA (1 %). Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão PBS (6X de 5 min) e incubadas com o 2º anticorpo (anti-IgG de camundongo) complexado com ouro coloidal (10 nm), na diluição de 1:200 em tampão PBS-BSA, por 1 h. Após, estas foram lavadas com tampão PBS (6X de 5 min) e água mili-Q. Ao fim, os cortes foram revelados por precipitação com prata (inibidor + estimulador) na proporção de 1:1, por 10 min. Em seguida, foram observadas por microscopia óptica de campo claro.

Algumas lâminas, que não foram utilizadas no ensaio imunohistoquímico, foram lavadas com água mili-Q e coradas com azul de toluidina 1 % por 5 min, para serem utilizadas como controle.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - ELETROFORESE E “WESTERN BLOTTING” DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIA

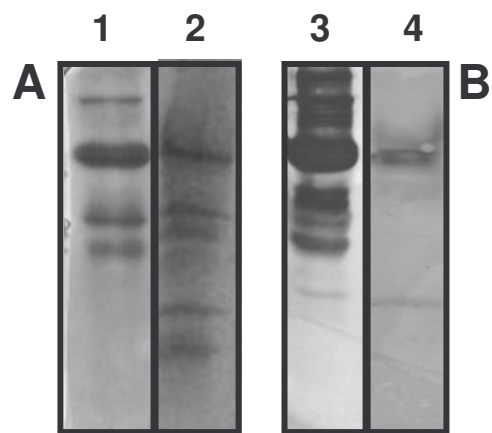
O perfil protéico da fração do tegumento das sementes de *Canavalia ensiformis* obtida por precipitação com sulfato de amônia foi avaliado por eletroforese e a presença de proteínas do tipo vicilina foi avaliada por “Western blotting”, usando-se vicilina de cotilédones de feijão-de-corda cv. EPACE 10 como padrão positivo, e anticorpos anti-vicilina deste mesmo cultivar. De acordo com os resultados mostrados na figura 4, podemos verificar bandas protéicas com massas moleculares variadas e algumas coincidentes com as massas moleculares das subunidades da vicilina de EPACE 10, em especial aquela em torno de 45 kDa (Figura 4A). No “Western blotting” observa-se que a banda protéica de 45 kDa reagiu com o anticorpo anti vicilina de EPACE 10 (Figura 4B).

### 5.2 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM CM-SEPHAROSE E DOSAGEM DE VICILINA PELO MÉTODO DE ELISA

A separação das proteínas da fração precipitada com sulfato de amônia por cromatografia em CM-Sepharose mostrou a presença de quatro frações diferentes. Uma fração constituída de proteínas ácidas e neutras que não ficou retida na matriz (NR) e foi eluída com tampão acetato pH 5,0, e as frações constituídas por proteínas básicas que foram retidas na matriz e, posteriormente, eluídas com solução de NaCl 0,25 M (FR1), NaCl 0,5 M (FR2) e NaCl 1 M (FR3) em tampão acetato, pH 5,0 (figura 5A). Os níveis de vicilinas foram quantificados em cada fração por ensaio de ELISA e resultados mostram que proteínas do tipo vicilina estão presentes em todas as frações, principalmente na fração não-retida (NR), onde a concentração de vicilina é de 27 µg/mg. As frações FR1, FR2 e FR3 mostraram concentrações de 2; 0,92 e 0,69 µg/mg, respectivamente (Figura 5B). Na relação de vicilina por proteína, temos na fração não-retida (NR) a concentração de 0,21 µg/µgP e nas frações de FR1, FR2 e FR3 as concentrações de 0,02; 0,04 e 0,042 µg/µgP, respectivamente (Figura 5C).

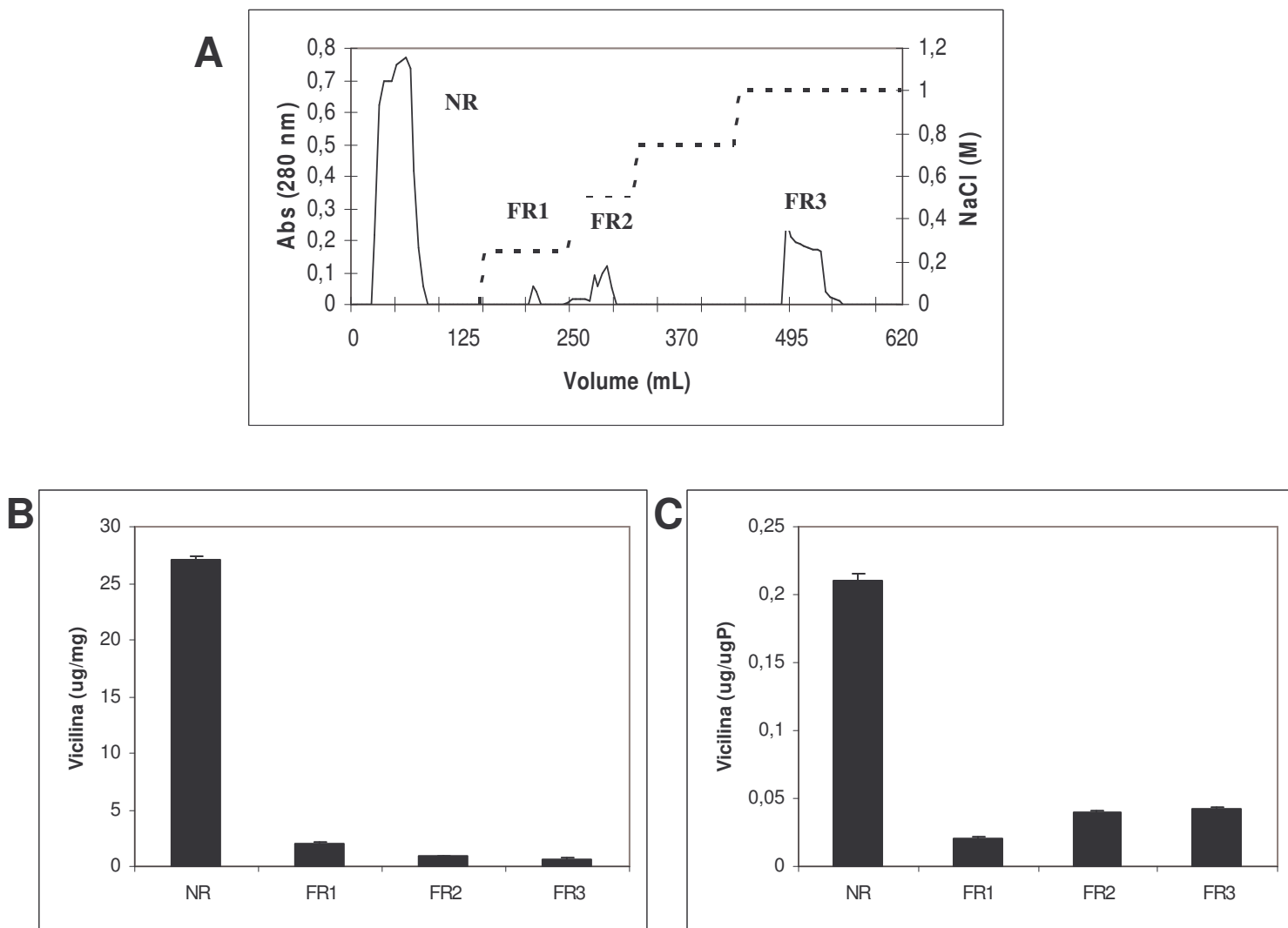
### 5.3 - ENSAIO DE LIGAÇÃO DE VICILINA À INSULINA EM PLACA DE ELISA

A afinidade de insulina com as proteínas do tipo vicilina do tegumento foi medida por ensaio de ELISA modificado. Foram imobilizados 20  $\mu\text{g}$  de insulina em cada poço de uma placa de ELISA e, posteriormente, incubados com 20  $\mu\text{g}$  de vicilina de EPACE 10 ou 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada fração da cromatografia CM-Sepharose contendo diferentes concentrações de vicilina: Fração NR (4,32  $\mu\text{g}$  de vicilina), fração FR1 (0,38  $\mu\text{g}$  de vicilina), fração FR2 (0,81  $\mu\text{g}$  de vicilina) e fração FR3 (0,85  $\mu\text{g}$  de vicilina). Nossos resultados mostram que apenas parte das vicilinas presentes em cada uma das frações NR, FR1, FR2 e FR3 foi capaz de se ligar à insulina (figura 6A e 5B). Na fração NR foi observado que a quantidade de vicilina ligada à insulina foi de 103  $\text{ng}/\mu\text{g}$ , o que representa 47,7 % do total de vicilina presente nesta fração. Para as frações FR1, FR2 e FR3 foi observado que as quantidades de vicilina ligadas à insulina foi de 9,25; 32,3 e 29,7 ( $\text{ng}/\mu\text{g}$ ) respectivamente (figura 6A). Esta quantidade representa respectivamente 48,6; 79,7 e 69,8 % da vicilina presente em cada fração (figura 6B). A afinidade de insulina para vicilina de EPACE foi a menor observada, onde apenas 0,4 % da vicilina testada foi capaz de se ligar insulina (figura 6B). Estes resultados sugerem que apenas algumas isoformas de vicilina e/ou subunidades presentes no tegumento de sementes tem afinidade por insulina e que essa afinidade independe do caráter ácido ou básico da molécula.



**Figura 4:** (A): SDS-PAGE e (B): “Western blotting” das proteínas do tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*. Raias 1 e 3: vicilina de cotilédones de *Vigna unguiculata* cultivar EPACE 10 (20 µg de proteínas); Raias 2 e 4: proteínas da fração precipitada com sulfato de amônio (20 µg).





**Figura 5:** (A): Cromatografia da fração precipitada com sulfato de amônio em coluna de CM-Sepharose. As proteínas adsorvidas foram eluídas por solução contendo 0,25; 0,5 e 1 M de cloreto de sódio (NaCl) e a absorbância lida em comprimento de onda de 280 nm. (B): Quantificação de proteínas totais do tipo vicilina por pó. (C): Quantificação de proteínas totais do tipo vicilina por proteína. Ambas dosagens, realizadas nas frações da cromatografia CM-Sepharose por ensaio de ELISA, utilizando o anticorpo anti-vicilina de *Vigna unguiculata* (cv.EPACE 10). Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados são as médias dos resultados.



#### **5.4 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM INSULINA-SEPHAROSE 4B**

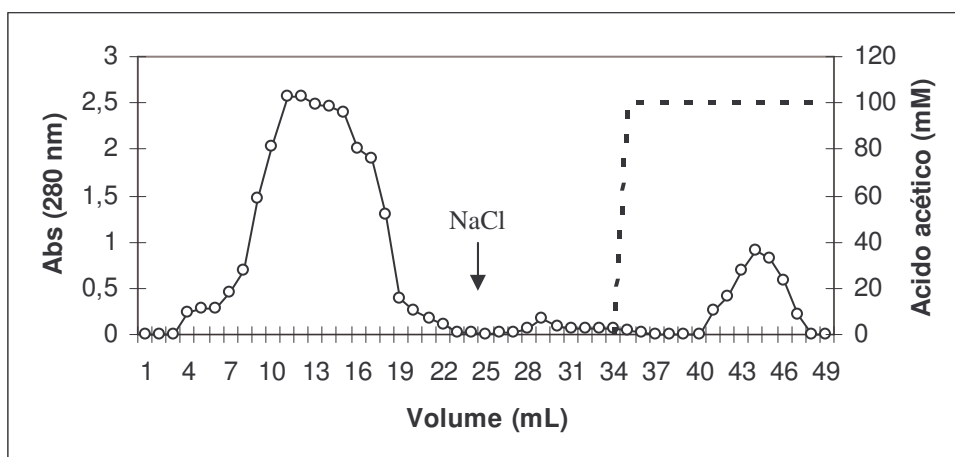
Na tentativa de isolar especificamente as isoformas e/ou subunidades de vicilinas que apresentam afinidade por insulina, aplicamos a fração precipitada com sulfato de amônia em uma coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B. Observamos, através do perfil cromatográfico, que obtivemos uma pequena fração retida na matriz que foi eluída com uma solução de cloreto de sódio 1 M e uma outra fração eluída com ácido acético 0,1 M pH 3,0 (Figura 7).

#### **5.5 - QUANTIFICAÇÃO DE VICILINA NA FRAÇÃO ELUÍDA DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE INSULINA-SEPHAROSE 4B POR ENSAIO DE ELISA**

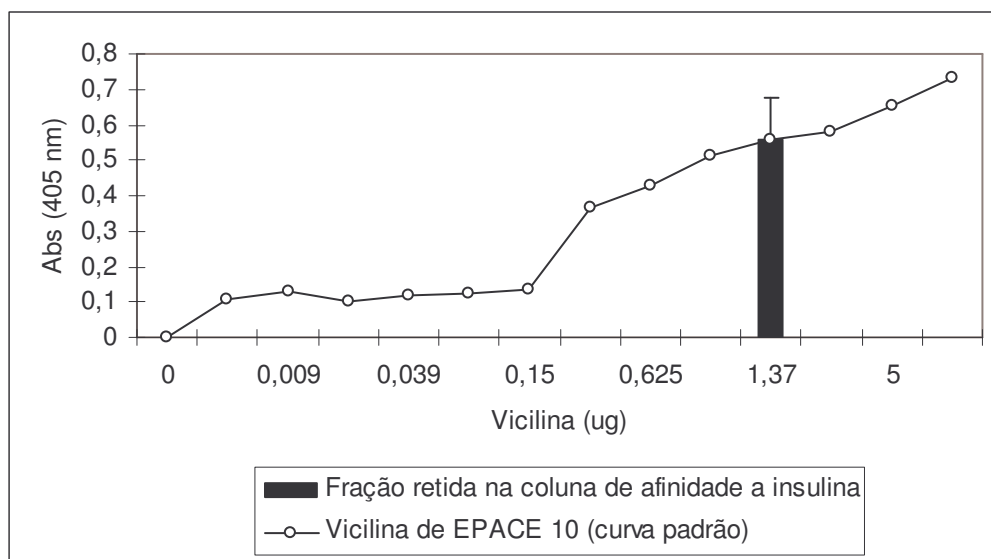
A fração que foi eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 mostrou reação com o anticorpo anti-vicilina de EPACE 10, sendo imunologicamente similar à vicilina de EPACE 10 (figura 8). A dosagem de proteína desta fração mostrou uma alta concentração protéica, aproximadamente 81,5 % (Tabela 1).

#### **5.6 - VISUALIZAÇÃO DA FRAÇÃO RETIDA NA COLUNA DE AFINIDADE INSULINA- SEPHAROSE 4B**

A fração obtida na cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B, eluída com ácido acético, foi visualizada por gel de poliacrilamida 15 %, na presença de SDS. Na primeira raia encontra-se a vicilina de EPACE 10 e na raia 2 a fração com banda de massa molecular semelhante a vicilina padrão (Figura 9). Podemos observar nessa fração, a presença de uma banda principal com massa molecular de 45 kDa, semelhante a vicilina padrão .



**Figura 7:** Cromatografia de afinidade em coluna de insulina-Sepharose 4B da fração precipitada com sulfato de amônia (0-90 % de saturação) dos tegumentos de *Canavalia ensiformis*. A coluna foi equilibrada com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM pH 9,0 e as frações retidas foram eluídas com NaCl 1M e ácido acético 100 mM pH 3,0.



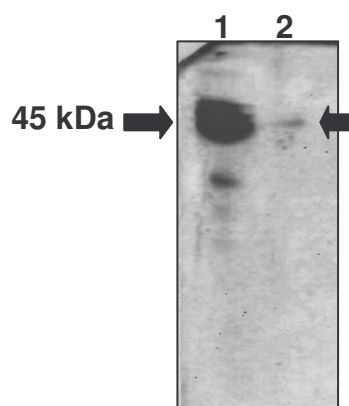
**Figura 8:** Quantificação de vicilina total da fração eluída da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose, por ensaio de ELISA utilizando o anticorpo anti-vicilina de *Vigna unguiculata* (cv.EPACE 10). Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados são a média dos resultados.

---

Fração	Percentagem de proteína
Farinha do tegumento	13,0 %
Precipitado 0-90 % de sulfato de amônia	26,37 %
Fração retida na coluna de afinidade Insulina-Sepharose 4B	81,5 %

---

**Tabela 1:** Concentração percentual de proteínas nas amostras: farinha do tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*, precipitado 0-90 % de sulfato de amônia e fração retida na coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B.



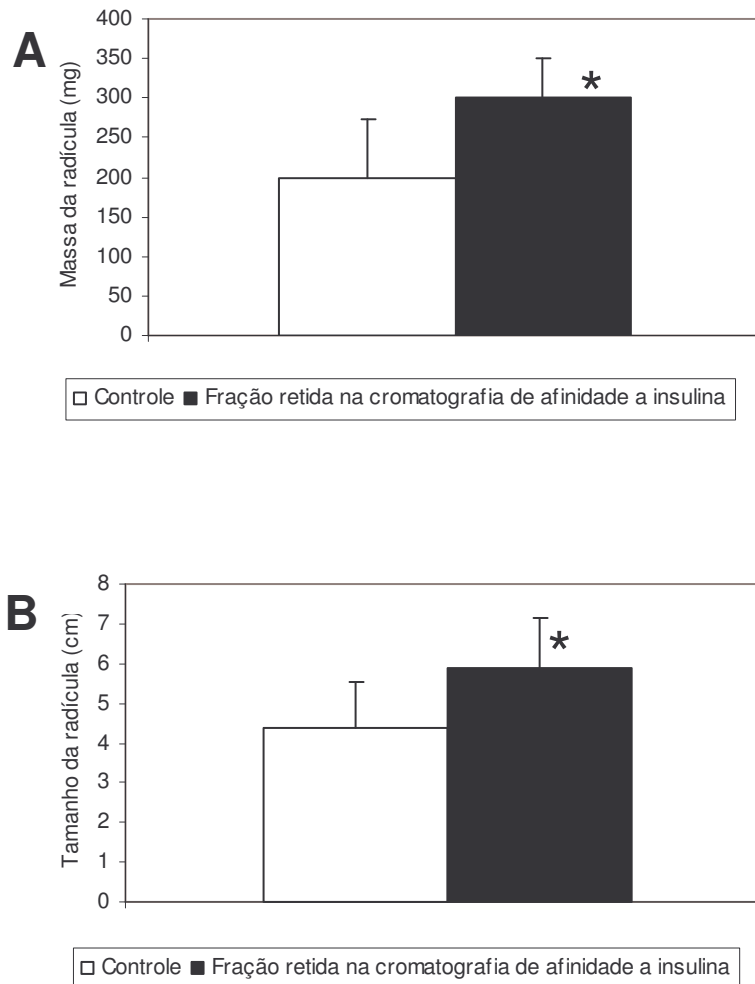
**Figura 9:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) na presença de SDS, da fração obtida através da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B. 1- Vicilina de EPACE 10 (20  $\mu\text{g}$ ); 2- Fração retida na coluna de afinidade eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 (5  $\mu\text{g}$ ).

## 5.7 - EFEITOS DAS FRAÇÕES PROTEÍCAS SOBRE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE *C. ensiformis*

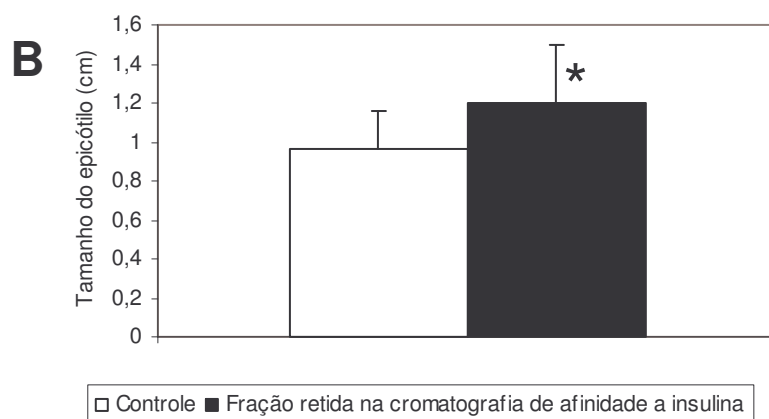
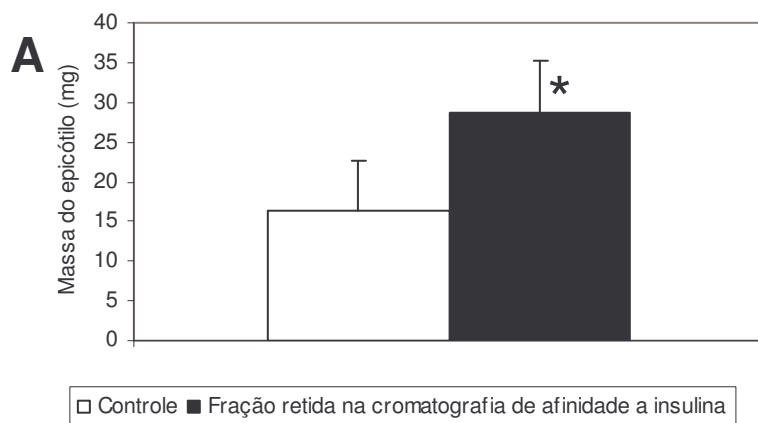
Nestes experimentos foram utilizadas todas as amostras germinadas em presença de diferentes concentrações da amostra proveniente da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade (0,36 µg/mL; 1,44 µg/mL; 2,88 µg/mL; 3,6 µg/mL e 7,2 µg/mL), mas somente estão apresentados os dados que foram estatisticamente diferentes do controle. Nas figuras 10 e 11 são observados os resultados de desenvolvimento das radículas e epicótilos de plântulas de *C. ensiformis*, respectivamente, tratadas por 120 horas com a fração eluída da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B, em concentração de 3,6 µg/mL. Podemos observar que a adição desta solução acelerou o desenvolvimento das plântulas de *C. ensiformis*, sendo responsável pelo aumento na massa de 28,15 % e no tamanho de 13,51 % de radículas (Figura 10A e B). Os epicótilos tiveram aumento de 20,35 % e de 5,39 % na massa e tamanho, respectivamente. (Figura 11A e B).

Após a germinação, foi realizada dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). Nos cotilédones tratados com a solução de concentração de 7,2 µg/mL da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B foi observado o aumento de 35 % nos níveis de proteínas solúveis (Figura 12). Resultados similares foram observados para os tecidos de epicótilos germinados em solução de concentração de 3,6 µg/mL, onde observamos o aumento de 80 % nos níveis de proteínas solúveis (Figura 12). Alterações nos níveis de proteínas solúveis não foram detectadas nos tecidos de radícula e tegumento tratados em relação aos tecidos controles.

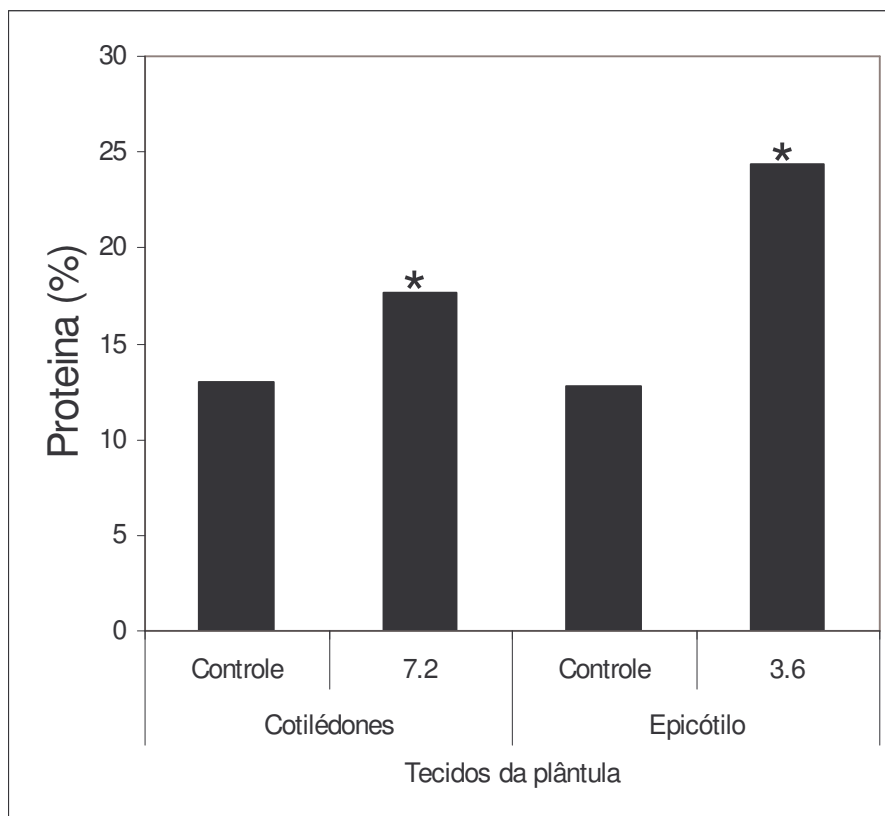




**Figura 10:** Desenvolvimento de radículas de *Canavalia ensiformis* embebidas em água ou em presença de solução da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade na concentração de 3,6 µg/mL. **(A):** Massa da radícula (mg) e **(B):** Tamanho da radícula (cm). Os experimentos foram feitos em triplicata (total de 20 sementes por tratamento) e os dados mostrados são as médias dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11:** Desenvolvimento de epicótilos de *Canavalia ensiformis* embebidas em água ou em presença de solução da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade na concentração de 3,6 µg/mL. **(A):** Massa do epicótilo (mg) e **(B):** Tamanho do epicótilo (cm) das plântulas de *C. ensiformis*. Os experimentos foram feitos em triplicata (total de 20 sementes por tratamento) e os dados mostrados são as médias dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).



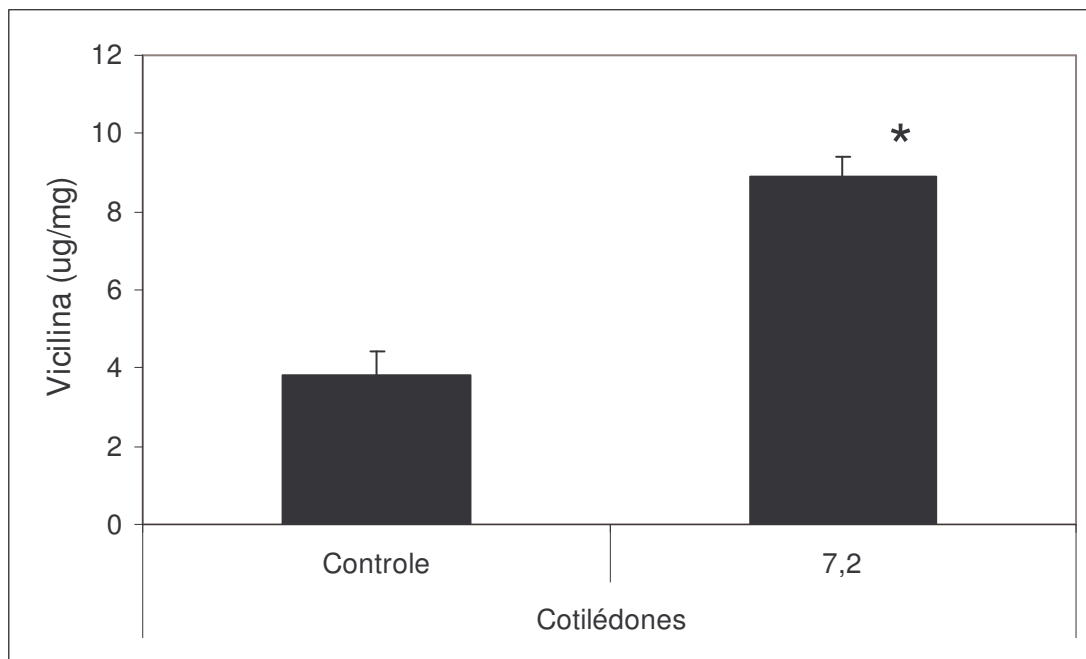
**Figura 12:** Percentual de proteínas nos cotilédones e epicótilos de plântulas de *Canavalia ensiformis* (120 h) tratadas com água (controle) ou com a solução da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B nas concentrações de 7,2 e 3,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados são a média dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).

## 5.8 - DOSAGEM DE VICILINA PELO MÉTODO DE ELISA

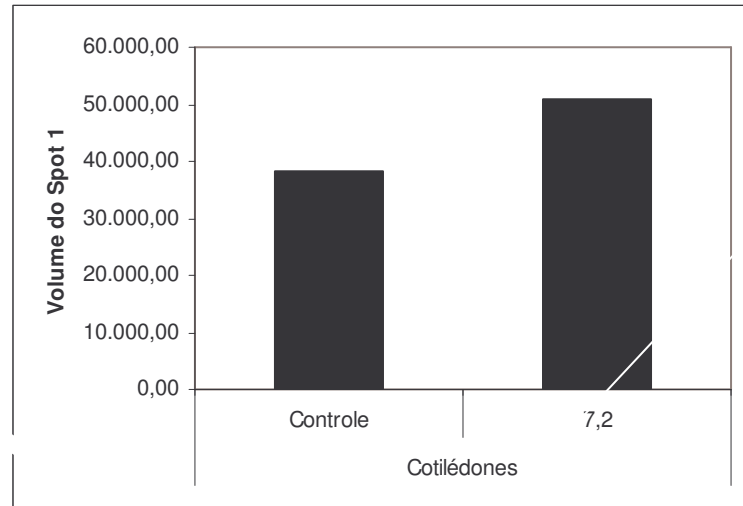
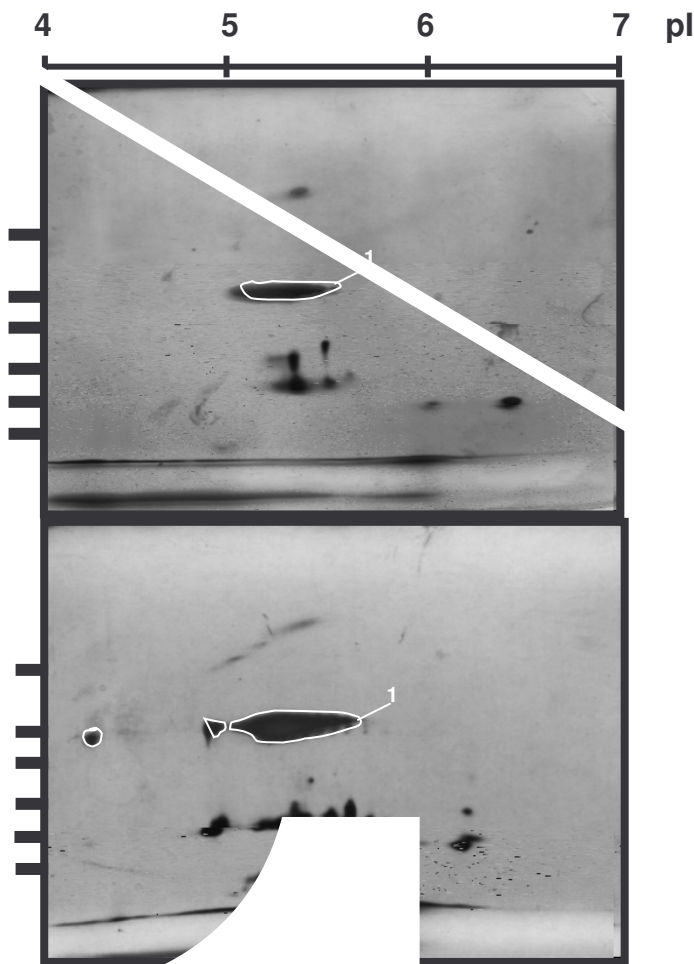
Neste experimento foram utilizadas todas as amostras germinadas por 120 horas em presença de diferentes concentrações da amostra proveniente da cromatografia de afinidade eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 (0,36 µg/mL; 1,44 µg/mL; 2,88 µg/mL; 3,6 µg/mL e 7,2 µg/mL), mas somente estão apresentados os dados que foram estatisticamente diferentes do controle. Os níveis de proteínas do tipo vicilina nos tecidos de tegumentos, cotilédones, radículas e epicótilos foram medidos por experimento de ELISA. Podemos observar que nos cotilédones tratados com a solução de concentração de 7,2 µg/mL da fração proveniente da coluna insulina-Sepharose 4B houve um aumento de proteínas do tipo vicilina em torno de 100 % em comparação com os tecidos de cotilédones controles (Figura 13).

## 5.9 - ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL

O perfil de proteínas dos cotilédones de plântulas de *C. ensiformis* controles e tratados com a fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B, na concentração de 7,2 µg/mL, foi visualizado por eletroforese em gel bidimensional. Os géis foram revelados por nitrato de prata, mostrando que os cotilédones de ambos os tratamentos mostraram um “spot” intenso de massa molecular em torno de 46,1 kDa e pI de 5,4. Este “spot” apresentou um aumento de volume de aproximadamente 30 % nos cotilédones tratados (Figura 14C). Devido aos valores de massa molecular, pI e abundância dessa proteínas nas amostras, possivelmente, este “spot” corresponda a proteínas de reserva do tipo vicilina. Nos cotilédones tratados também foram observados “spots” diferentemente expressos onde destacamos, principalmente, 4 “spots” com massas moleculares de 45,4 e pI 4,85 (“spot” 2), 44,7 e pI 4,2 (“spot” 3), 22,16 e pI 4,9 (“spot” 4) e 14,7 e pI 5,2 (“spot” 5) (Figura 14A, B, e D).



**Figura 13:** Concentração de proteínas do tipo vicilina nos cotilédones de plântulas de *Canavalia ensiformis* (120 h) tratadas com água (controle) ou com a solução da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B na concentração de 7,2  $\mu\text{g/mL}$ . Os experimentos foram feitos em triplicata e os dados mostrados são a média dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).



Spots	pI	Mr (kDa)
1	5,1	46,1
2	4,85	54
3	4,2	44,7
4	4,9	22,16
5	5,2	14,7

cotilédon  
da fraçã  
afinidade  
(C): Volu  
e Mr do  
("spot" 2-  
de pH (p  
detectad

ção por eletroforese bidimensional dos tecidos de  
*formis*. (A): Tecidos controle (B): Tratados com a fração  
ácido acético 100 mM pH 3,0 da cromatografia de  
arose 4B, após análise usando o software Phoretix 2D.  
maioritário que sofreu aumento com o tratamento. (D): pl  
ts" alterado ("spot" 1) e dos diferentemente expressos  
a dimensão: tamanho-massa imobilizado num gradiente  
segunda dimensão: SDS-PAGE 12 %. As proteínas foram  
ção com nitrato de prata.

## **5.10 - DOSAGEM DE CARBOIDRATOS**

Na dosagem dos carboidratos glicose e amido e da enzima  $\alpha$ -amilase foram utilizadas todas as amostras germinadas na presença de diferentes concentrações da amostra proveniente da cromatografia de afinidade na coluna insulina-Sepharose 4B eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 (0,36  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,44  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,88  $\mu\text{g/mL}$ ; 3,6  $\mu\text{g/mL}$  e 7,2  $\mu\text{g/mL}$ ), mas somente estão apresentados os resultados que foram estatisticamente diferentes do controle.

### **5.10.1 - DOSAGEM DE GLICOSE**

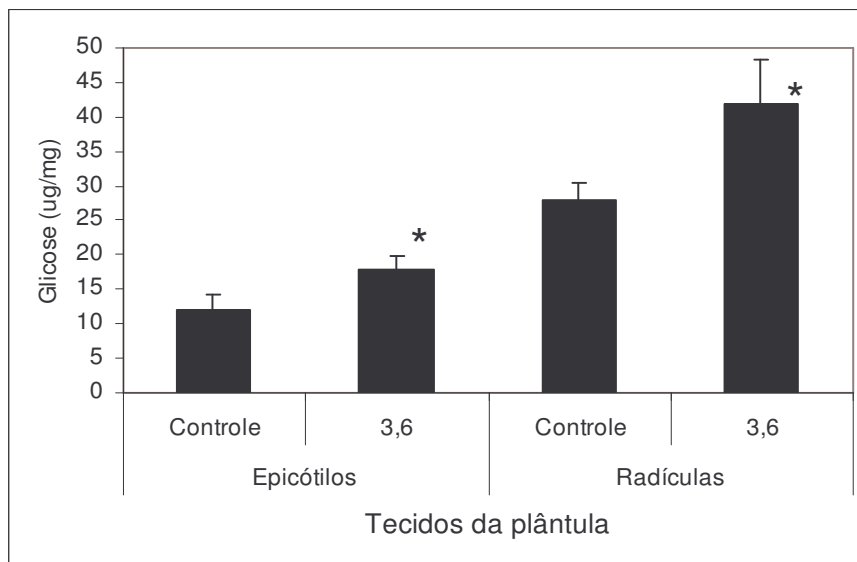
Os níveis de glicose foram determinados nas plântulas de *C. ensiformis* controles e germinadas na concentração de 3,6  $\mu\text{g/mL}$  da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0. Foi observado que a concentração de glicose nos tecidos de radículas e epicótilos tratados com esta solução sofreu aumento de 37 % e 50 %, respectivamente, quando comparados com os tecidos controles (Figura 15).

### **5.10.2 - DOSAGEM DE AMIDO**

Alterações na concentração de amido também foram observadas nos tecidos de cotilédones e radículas germinados na concentração de 3,6  $\mu\text{g/mL}$  da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0. De acordo com o resultado (Figura 16) observamos que o nível de amido diminuiu em 38 % nos tecidos de cotilédones, enquanto que nos tecidos de radícula a concentração de amido aumentou em 75 %, ambos em relação aos tecidos germinados na solução controle.

## **5.11 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA $\alpha$ -AMILASE**

Alterações na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase foram determinadas. De acordo com o resultado apresentado (Figura 17), verificamos o aumento de 70,3 % na atividade desta enzima nos tecidos de cotilédones de plântulas de *C. ensiformis* germinados na solução de 3,6  $\mu\text{g/mL}$ . Relacionando, na figura anterior (Figura 16) observamos a diminuição do amido, estando ambos os resultados relacionados. No gráfico, a atividade de  $\alpha$ -amilase está representada através de mg de maltose produzido por 1 mg de tecido por min.

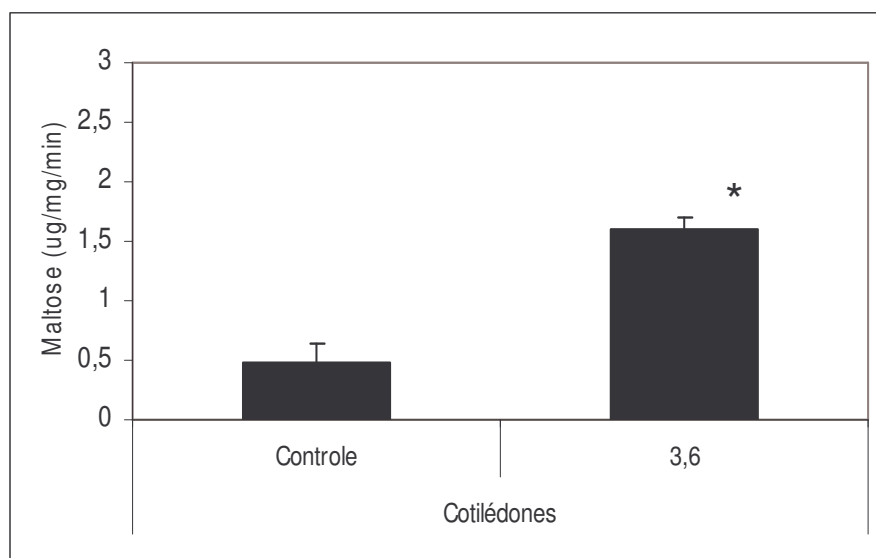


**Figura 15:** Concentração de glicose nas radículas e epicótilos de plântulas de *C. ensiformis* (germinadas por 120 h) tratadas com água (controle) ou na concentração de 3,6  $\mu\text{g/mL}$  da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B. Os experimentos foram feitos em triplicata (20 sementes por tratamento) e os dados mostrados são a média dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).





**Figura 16:** Concentração de amido nas radículas e cotilédones de plântulas de *C. ensiformis* (germinadas por 120 h) tratadas com água (controle) ou na concentração de 3,6  $\mu\text{g/mL}$  da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B. Os experimentos foram feitos em triplicata (20 sementes por tratamento) e os dados mostrados são a média dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).



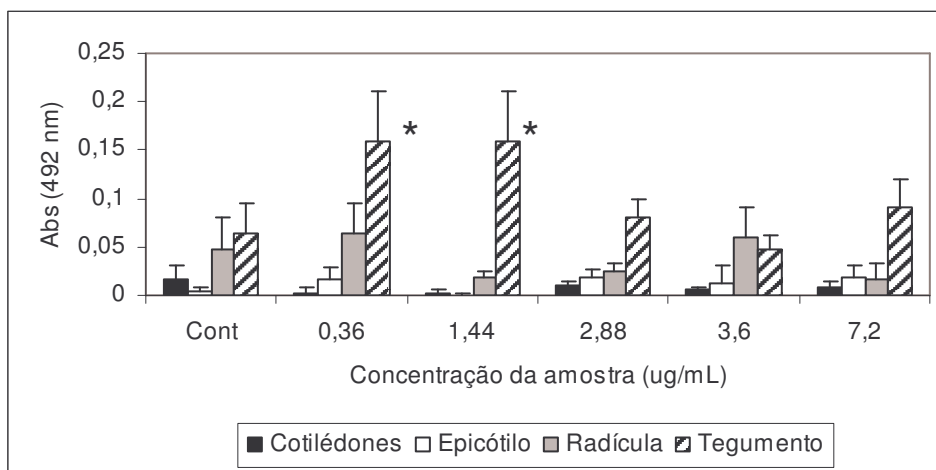
**Figura 17:** Atividade da enzima  $\alpha$ -amilase nos cotilédones de plântulas de *C. ensiformis* (germinadas por 120 h) tratadas com água (controle) ou na concentração de 3,6  $\mu\text{g/mL}$  da fração eluída com ácido acético 100 mM pH 3,0 da coluna de afinidade insulina-Sepharose 4B. Os experimentos foram feitos em triplicata (20 sementes por tratamento) e os dados mostrados são a média dos resultados. \* indica os resultados estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste T ( $p < 0,05$ ).

### **5.12 - DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORRELACIONADAS À *LIVu* NOS DIFERENTES TECIDOS DAS SEMENTES DE *C. ENSIFORMIS***

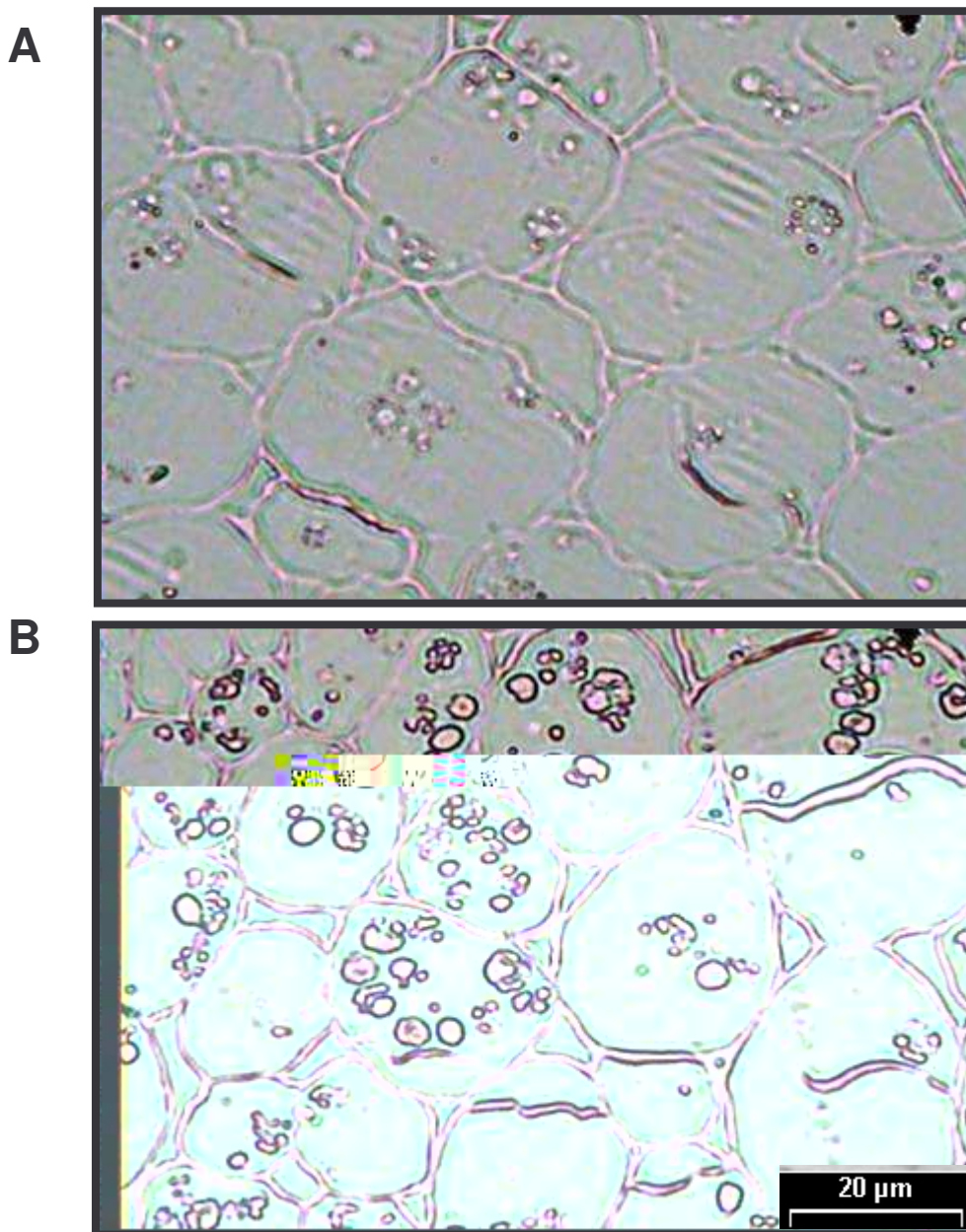
Os resultados de ELISA apresentados na figura 18 mostram a presença de proteínas imunorrelacionadas à proteína *LIVu* nos tecidos de cotilédones, epicótilos, radículas e tegumentos germinados em condições controle (água) e experimental. Essas proteínas estão presentes em altas concentrações nos tegumentos, tendo sua concentração aumentada principalmente nos tratamentos com as concentrações de 0,36 e 1,44 µg/mL. Nos demais tecidos não observamos alterações significativas na concentração destas proteínas entre as condições controle e teste.

### **5.13 - DETECÇÃO DE PROTEÍNAS IMUNORRELACIONADAS À *LIVU* NA RADÍCULA DE PLÂNTULAS DE *C. ENSIFORMIS*, POR MICROSCOPIA ÓPTICA**

Com o objetivo de detectarmos a localização tecidual das proteínas imunorrelacionadas à *LIVu* foram feitos ensaios de imunohistoquímica por microscopia óptica. Nas figuras 19 A e B estão mostrados as micrografias das radículas desenvolvidas em água e submetidas ao ensaio controle (não incubadas com o primeiro anticorpo) e os cortes incubados com o anticorpo anti-proteína *LIVu*, na proporção de 1:50. Nesses resultados observamos marcação nessas radículas, sendo essas marcações presentes principalmente em vacúolos de reserva desses tecidos.



**Figura 18:** Detecção de proteínas ligantes de insulina imrelacionadas a *LIVu* (ligante de insulina de *Vigna unguiculata*) nos cotilédones, epicótilos, radículas e tegumentos de *Canavalia ensiformis* germinadas na presença de ligantes de insulina isolados dos tegumentos de *C. ensiformis*. \* Dados estatisticamente diferentes dos respectivos controles ( $p < 0.05$ ).



**Figura 19:** Detecção de proteínas ligantes de insulina imrelacionadas a *LIVu* (ligante de insulina de *Vigna unguiculata*) nas radículas de *C. ensiformis* germinadas por 120 horas, através de microscopia óptica. Radículas controle (A). Radículas tratadas com o anticorpo anti *LIVu* (1:50) (B). A revelação foi realizada por prata.

## 6 - DISCUSSÃO

Proteínas de reserva do tipo globulina podem representar até 50 % das proteínas totais de sementes; como exemplo, podem-se destacar as globulinas 7S, também conhecidas como vicilinas que representam de 20 a 30 % das proteínas de reserva de sementes maduras de leguminosas (Bewley & Black, 1994). Essas proteínas são depositadas durante a maturação das sementes e são mobilizadas durante o desenvolvimento pós-germinativo das plântulas (Shewry & Lucas, 1997). O sucesso da germinação e o desenvolvimento da plântula dependem dos mecanismos de regulação de todos estes eventos. Dessa maneira, o entendimento destes mecanismos é de crucial importância.

Apesar de bem caracterizadas as funções das globulinas 7S como proteínas de reserva, alguns trabalhos têm sugerido múltiplas funções para essas proteínas. Proteínas do tipo vicilinas que se ligam à sacarose têm sido isoladas de cotilédones de soja (Ripp *et al.*, 1988; Braun *et al.*, 1996; Grimes & Overvoorde 1996), de milho (Overvoorde *et al.*, 1997) e de *Vicia faba* (Heim *et al.*, 2001). Trabalho realizado por Kagawa & Hirano (1989) reportaram o isolamento a partir de sementes maduras de soja (*Glycine max*), de uma globulina básica (Bg) que através de experimentos de “blotting” ligante usando insulina e fatores de crescimento IGF I e II foi capaz de se ligar não somente a insulina, mas também aos fatores de crescimento do tipo insulina e apresentaram atividade de proteína quinase (Watanabe *et al.*, 1994). Proteínas do tipo Bg de células de cenoura também apresentaram atividade ligante de insulina. Essas proteínas do tipo Bg podem estar envolvidas nos mecanismos regulatórios mediados por insulina em muitas espécies de plantas (Komatsu & Hirano, 1991).

Resultados anteriores, obtidos pelo nosso grupo, mostraram a presença de insulina (Oliveira *et al.*, 1999), e também de proteínas imunorrelacionadas a vicilinas no tegumento de *C. ensiformis* (Oliveira *et al.*, 1999a). Experimentos de imunolocalização mostraram que proteínas imunorrelacionadas à insulina e ao receptor de insulina (Oliveira *et al.*, 2004) estão localizadas na última camada de células do tegumento, denominadas células de transferências, nas quais foram identificadas proteínas como sacarose sintase e invertases (Cheng *et al.*, 1996; Cheng & Chourey, 1999), proteínas envolvidas no transporte de açúcares do tegumento para os cotilédones.

Neste trabalho nós mostramos a presença de vicilinas que se ligam à insulina no teg

sementes (Kagawa & Hirano, 1989; Komatsu & Hirano 1991; Satoh, 1998). Apesar dessas observações, não há evidências de que as proteínas “Bg-like” funcionem como receptores para a insulina e para os IGFs ou apresentem características semelhantes a esses tipos de receptores. Essas proteínas são sugeridas como moléculas que participam de sistemas de sinalização e regulação desencadeados por insulina ou moléculas “insulina-like” em plantas, e acredita-se ainda que possam estar envolvidas com a embriogênese (Satoh, 1998).

Com o objetivo de investigarmos possíveis efeitos das vicilinas que se ligam à insulina no desenvolvimento pós-germinativo, foram realizados experimentos de germinação com sementes maduras de *C. ensiformis*, embebidas em água e em solução de 3,6; 1,44; 2,88; 3,6 e 7,2 µg/mL da fração adsorvida da cromatografia de afinidade insulina-Sepharose 4B. Os efeitos observados foram analisados por medições de tamanho e massa de radículas e epicótilos de cada plântula, comparando-se sempre com plântulas germinadas em água (controle). Nesses resultados observamos que a adição desta solução já em concentração de 3,6 µg/mL acelerou o desenvolvimento de plântulas de *C. ensiformis*, sendo responsável pelo aumento na massa e no tamanho de radículas e de epicótilos.

Do pouco conhecimento sobre moléculas do tipo insulina ou seus ligantes em plantas, a presença de mecanismos de regulação desencadeados por insulina durante a germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas tem sido examinada desde o início da década de 20. Em experimentos com linhagens de milho, insulina e glucocinina (molécula do tipo insulina de plantas) aceleraram o desenvolvimento dessas plântulas (Ellis & Eyster, 1923) e aumentaram o desenvolvimento de pigmentos cloroplásticos (Eyster & Ellis, 1924). Insulina também mostrou acelerar o desenvolvimento de sementes de cevada (Csaba & Pál, 1982). Insulina, adicionada ao meio, tem mostrado agir na mobilização de ácidos graxos em alguns tipos de sementes, como girassol (*Helianthus annuus*), melancia (*Citrullus vulgaris*) e pepino (*Cucumis sativus*), por acelerar a atividade de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos armazenados em carboidratos (Goodman & Davis, 1993). Flores *et al.* (2001) isolaram uma proteína (ZmIGF) do eixo embrionário após 48 h de germinação, que promoveu um significativo aumento na germinação e crescimento da



plântula de milho. Trabalhos realizados por nosso grupo mostraram que insulina exógena e pinitol (3-O-metil-quiroinositol) isolado de *Bougainvillea spectabilis* (composto análogo ao inositol, um segundo mensageiro na cascata de sinalização desencadeada por insulina e que mimetiza a ação desse hormônio) estimulam o desenvolvimento pós-germinativo de *C. ensiformis*, aumentando o tamanho e massa das radículas e epicótilos de sementes (Oliveira *et al.*, 2004).

É sabido na literatura que insulina, em animais, é um importante hormônio controlador do metabolismo energético, estimulando ou inibindo rotas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Guyton & Hall, 1997). Com base nesses resultados, os passos seguintes deste trabalho foram investigar os efeitos do tratamento com vicilina ligante de insulina sobre as concentrações dessas macromoléculas em plântulas de 120 horas. Os tecidos resultantes do tratamento foram liofilizados e triturados e a farinha resultante usada nos experimentos.

Para isso, foram feitas dosagens de proteínas em todos os tecidos da plântula. Nos cotilédones tratados com a solução de concentração de 7,2 µg/mL foi observado o aumento de 35 % nos níveis de proteínas solúveis já nos epicótilos tratados com solução de concentração de 3,6 µg/mL, observamos um aumento de 80 % nos níveis das proteínas solúveis. Com base nos resultados de dosagens de proteínas, fomos investigar se o aumento de proteína promovido pelo tratamento estaria relacionado ao aumento de proteínas de reserva do tipo vicilina. A dosagem de vicilina pelo método de ELISA possibilitou a verificação da concentração dessas proteínas nos tecidos de cotilédones, epicótilos, radículas e tegumentos das plântulas tratadas. De acordo com os resultados mostrados, podemos detectar a presença de proteínas imunorrelacionadas a vicilina em todos os tecidos e nos cotilédones tratados com a solução de concentração de 7,2 µg/mL da fração proveniente da coluna Sepharose Insulina-4B, onde houve o aumento nos níveis de vicilina em torno de 100 % em comparação com os cotilédones controles.

Trabalhos anteriores já mostraram os efeitos da insulina na síntese de proteínas ribossomais no eixo embrionário de sementes de milho (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Dinkova *et al.*, 2000), os quais remetem aos trabalhos realizados por Eyster & Ellis (1924) sobre os efeitos da insulina na germinação

de sementes de milho. Esses trabalhos mostraram que a insulina promovia o aumento da germinação e da síntese de proteínas ribossomais do eixo embrionário de milho. Fornaciari (2006) demonstrou que tratamentos com insulina exógena e pinitol estimularam a síntese protéica em todos os tecidos de *C. ensiformis*, exceto no epicótilo, onde somente a insulina exógena teve efeito. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que o aumento na quantidade de proteínas totais, induzindo pela insulina exógena e pelo pinitol, foi acompanhado pelo aumento de vicilina.

Com o objetivo de analisarmos o perfil protéico dos cotilédones testes e controles, foram feitos géis bidimensionais. Os tecidos utilizados foram aqueles que apresentaram a maior quantidade de proteínas, assim sendo, foram utilizados os cotilédones controles e tratados com 7,2 µg/mL da fração obtida na coluna de afinidade de insulina e as principais alterações foram analisadas. Nesses resultados foram observados que ambos os cotilédones controles e testes mostraram um “spot” forte e espalhado de massa molecular de 46,1 kDa e pl de 5,4; este “spot” apresentou um aumento de volume de aproximadamente 30 % nos cotilédones tratados, devido a massa molecular e o pl, nós acreditamos que este “spot” pode ser vicilina. Nos cotilédones tratados também foram observados “spots” diferentemente expressos com massa molecular de 45,4 e pl 4,85 (“spot” 2), massa molecular de 44,7 e pl 4,2 (“spot” 3), massa molecular 22,16 e pl 4,9 (“spot 4”) e massa molecular de 14,7 e pl 5,2 (“spot” 5).

Os carboidratos, de modo geral, são requeridos para o desenvolvimento do embrião, para a germinação e para o desenvolvimento das plântulas. Após a germinação, estes compostos são hidrolisados e seus produtos são liberados para o apoplasto (Williams *et al.*, 2000). Dessa forma, o próximo passo do nosso projeto foi verificar se as plântulas controle e tratadas apresentavam alterações nas concentrações de glicose e amido. Com relação à glicose observamos que as concentrações desse carboidrato nas radículas e epicótilos tratados com as proteínas ligantes de insulina em concentração de 3,6 µg/mL, tiveram um aumento de 37 % e 50 %, respectivamente. Com relação ao amido foram observadas alterações na concentração de amido nos tecidos de cotilédones e radículas. De acordo com nossos resultados observamos que o nível de amido diminuiu 38% nos cotilédones, enquanto que nos tecidos de

radícula a concentração de amido aumentou 75 %, ambos em relação aos respectivos tecidos desenvolvidos em condições controle.

Sabendo que a quantidade de amido sofreu alterações em alguns tecidos tratados, outra etapa do nosso trabalho foi a dosagem da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase. A enzima  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1,4-glucano-4-glucanohidrolase) é uma enzima monomérica que constitui uma família de endoamilases e catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essa enzima tem um importante papel no metabolismo em plantas, animais e microorganismos. A clivagem do amido pela  $\alpha$ -amilase constitui o primeiro passo na degradação desse polissacarídeo, o que é essencial na assimilação dos monossacarídeos (Payan, 2004). De acordo com os nossos resultados verificamos um aumento na atividade desta enzima nos cotilédones de plântulas desenvolvidas na presença de 3,6  $\mu$ g/mL da fração obtida na cromatografia de afinidade em insulina-Sepharose 4B.

Além das funções essenciais no metabolismo energético das plantas já bem descritas para os carboidratos, açúcares como sacarose e os seus produtos de clivagem (glicose e frutose), ainda têm sido citados como importantes sinais metabólicos que afetam a expressão de diferentes classes de genes (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2002) e estão envolvidos em cascatas de regulação vegetal nos mais diversos estágios do desenvolvimento das plantas desde o período germinativo e o crescimento vegetativo até o desenvolvimento reprodutivo e formação da semente (Wobus & Weber, 1999; Smeekeens, 2000). Interações regulatórias com hormônios clássicos de plantas parecem ser essenciais para essa sinalização mediada por açúcares (Rolland *et al.*, 2006). Uma alta atividade de invertases de parede celular está sendo descrita em vários sistemas vegetais, como necessária para geração de altos níveis de hexoses, a partir de sacarose, promovendo o crescimento do embrião por divisão celular. Trabalhos realizados por Borisjuk *et al.* (1998) correlacionaram à concentração de glicose com a atividade mitótica no desenvolvimento de cotilédones. Durante a fase de transição (quando a diferenciação e crescimento por expansão celular são priorizados em detrimento do crescimento mitótico do embrião), os níveis de hexoses diminuem dramaticamente e o fluxo metabólico é redirecionado para o acúmulo de reservas (principalmente amido e nitrogênio no caso de sementes de ervilhas). A sacarose está associada com este

processo de regulação entre armazenamento e diferenciação, em parte por regular a expressão de genes que codificam para enzimas regulatórias além de regular diretamente a atividade destas enzimas (Weber *et al.*, 2005). Essa fase de transição também é marcada pela troca da atividade da enzima invertase de parede (de origem materna) pela atividade da enzima sacarose sintase (Weber *et al.*, 2005).

Glicose exógena aumenta a expressão da síntese de ABA levando ao aumento dos níveis endógenos desse hormônio (Cheng *et al.*, 2002), sugerindo que a acumulação de ABA é requerida para a sinalização mediada por glicose durante os estágios iniciais do desenvolvimento de plantas. A interação entre glicose e ABA sugere o envolvimento de vias de sinalização específicas no processo germinativo e a resposta diferenciada a determinados açúcares dependendo do estágio de desenvolvimento (Rolland *et al.*, 2006). Além disso, a modulação, por açúcares, da expressão de genes, parece estar envolvida na resposta a muitos estresses bióticos e abióticos, freqüentemente inter-relacionado com hormônios (Gazzamini & McCourt, 2003; Gibson, 2004). Trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram que glicose exógena estimulou o desenvolvimento pós-germinativo de *Canavalia ensiformis*, promovendo um aumento de tamanho e massa de radículas e epicótilos (Oliveira *et al.*, 2004).

Trabalho realizado anteriormente pelo nosso grupo mostrou o isolamento, através de cromatografia de afinidade com coluna de insulina-Sepharose, de uma proteína de tegumento de sementes de *V. unguiculata* em desenvolvimento, que se liga fortemente a insulina, essa proteína foi denominada *LIVu* (ligante de insulina de *Vigna unguiculata*). A análise por seqüenciamento mostrou que essa proteína tem alta proporção de aminoácidos aromáticos e possui similaridades com alguns receptores do tipo quinase de *A. thaliana* e com o precursor do receptor de insulina de ratos Venâncio (2004). Esse mesmo autor, além de purificar esta proteína, também produziu, em camundongo, um anticorpo policlonal contra a mesma. Com o intuito de investigarmos a presença de proteínas imunorrelacionadas a *LIVu* em plântulas de *C. ensiformis*, foram realizados ensaios de ELISA, utilizando o anticorpo anti-*LIVu*. Os resultados de ELISA mostraram a presença de proteínas imunorrelacionadas à *LIVu* nos cotilédones, epicótilos, radículas e tegumentos

germinados em condições controle (água) e de tratamento. Essa proteína está presente em maiores concentrações nos tegumentos, tendo sua concentração aumentada em alguns tegumentos tratados. Além disso, por ensaio de microscopia óptica podemos afirmar, de acordo os resultados que proteínas imunorrelacionadas à *LIVu* estão presentes nas radículas de plântulas de *C. ensiformis*, estando localizadas principalmente em estruturas circulares, localizadas no citoplasma. Resultados semelhantes foram descritos por Fornaciari (2006), onde antígenos do tipo *LIVu* foram detectados em tegumentos e radículas de plântulas de *C. ensiformis* e seus níveis foram aumentados na radícula pelos tratamentos com insulina e pinitol.

Todos esses resultados sugerem o envolvimento de moléculas que se ligam à insulina nos processos de germinação das sementes e desenvolvimento pós-germinativo. Neste trabalho, mostramos que proteínas imunorrelacionadas à vicilina que se ligam à insulina, quando adicionadas no meio de germinação, são capazes de interferir com os níveis de carboidratos e proteínas dessas plântulas.

## 7 - CONCLUSÕES

- Proteínas presentes no tegumento de *C. ensiformis* imunorrelacionadas à vicilina foram capazes de se ligarem a insulina bovina.
- O tratamento com a fração obtida na coluna de afinidade insulina-Sepharose na concentração de 3,6 µg/mL acelerou o desenvolvimento de plântulas de *C. ensiformis*.
- O tratamento com a fração obtida na coluna de afinidade insulina-Sepharose na concentração de 7,2 µg/mL acelerou os níveis de proteínas totais e de vicilina nos cotilédones tratados. A concentração de 3,6 µg/mL acelerou os níveis de proteínas totais nos epicótilos tratados.
- Cotilédones tratados com a fração obtida na coluna de afinidade a insulina em concentração de 7,2 µg/mL apresentaram mudanças no perfil protéico.
- O tratamento com a fração obtida na coluna de afinidade insulina-Sepharose em concentração de 3,6 µg/mL promoveu o aumento dos níveis de glicose e amido nas radículas e somente glicose nos epicótilos. Enquanto que nos cotilédones, houve a diminuição nos níveis de amido e aumento na atividade da enzima  $\alpha$ -amilase.
- Antígenos do tipo *LIVu* foram detectados em todos os tecidos das plântulas de *C. ensiformis* sendo encontrado em maiores concentrações nos tegumentos e estando presentes em vacúolos de reservas.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemán, R. & Flores, M. (1993). Algunos datos sobre *Canavalia ensiformis*. Natl. Acad. Sci. p. 54 – 59.
- Anson, K.J.I.; Miles, M.J.; Bacon, J.R.; Carr, H.J.; Lambert, N.; Morris, V.J. & Wright, D.J. (1988). Structure of the 7S globulin (Vicilin) from pea (*Pisum sativum*). Int. J. Biol. Macromol. 10: 311-317.
- Ashikari, M.; Wu, J.; Yano, M.; Sasaki, T. & Yoshimura, A. (1999). Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the  $\alpha$ -subunit of GTP-binding protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10284–10289.
- Ashton, F.M. (1979). Mobilization of storage proteins in seeds. Annu. Rev. Plant Physiol. 27: 95-117.
- Attucci, S.; Carde, J.P.; Raymond, P.; Saint Góes, V.; Spiteri, A. & Pradet, A. (1991). Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. Plant Physiol. 95: 390 – 396.
- Azevedo, C.R.; Maciel, F.M.; Silva, L.B.; Ferreira, A.T.; da Cunha, M.; Machado, O.L.T.; Fernandes, K.V.S.; Oliveira, A.E.A. & Xavier-Filho, J. (2006). Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. Braz. J. Med. Biol. Res. 39(1): 1435-1444.
- Banting, F.C.; Best, C.H.; Collip, J.B.; Campbell, W.R. & Fletcher, A.A. (1921). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary Report. Can. Med. Assoc. J. 12: 141-146.
- Barre, A.; Borges, J.P. & Rougé, P. (2005). Molecular modeling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. Biochimie 87: 499-506.
- Best, C.H. (1924). Recent work on insulin. Endocrinology. 1: 617-629.
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. Plant Cell. 9: 1055-1066.
- Bewley, J.D. & Black, M. Seeds: Physiology of Development and Germination. 2<sup>o</sup> ed. New York: Plenum Press, 1994. p. 40-50.
- Bewley, J.D. & Marcus, A. (1990). Gene expression in seed development and germination. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 38: 165 - 193.

- Bick, J.A.; Neelam, A.; Smith, E.; Nelson, S.J.; Hall, J.L. & Willians, L.E. (1998). Expression analysis of sucrose carrier in the germinating seedling of *Ricinus communis*. *Plant Mol. Biol.* 38: 425-435.
- Blagrove, R.J & Gillespie, J.M. (1975). Isolation, purification and characterization of the seed globulins of *Lupinus angustifolius*. *Austr. J. Plant Physiol.* 2: 13-17.
- Borisjuk, L.; Walenta, S.; Weber, H.; Mueller-Klieser, W. & Wobus, U. (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant J.* 15: 583-591.
- Botha, F.C.; Potgieter, G.P. & Botha, A.M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *J. Plant Growth Regu.* 11: 211 – 224.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradford, K.J. (1995). Water relations in seed germination. In: *Seed development and germination*. J. Kigel and G. Galli, eds (New York Marcel Dekker). pp: 351-396.
- Braga, R. In: *Plantas do Nordeste do Brasil, Especialmente do Ceará*. 2<sup>a</sup> ed. Fortaleza, Ceará. Imprensa Oficial, 1960. p. 3-543.
- Braun, H.; Czihal, A.; Shutov, A.D. & Baumlein, H. (1996). A vicilin-like seed protein of cycads: similarit to sucrose-binding proteins. *Plant. Mol. Biol.* 31: 35-44.
- Bridge, P.D. & Sawilowsky, S.S. (1999). Increasing physicians' awareness of the impact of statistic on research outcomes: Comparative power of the T-test and Wilcoxon rank-sum test in small samples applied research. *J. Clin. Epidemiol.* 52: 229-235.
- Bush, D.S. (1996). Effects of gibberellic acid and environmental factors on cytosolic calcium in wheat aleurone cells. *Planta.* 199: 89–99.
- Cardemil, L. & Reinerio, A. (1982). Changes in *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Can. J. Bot.* 60: 1629-1638.



- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. 2<sup>o</sup> ed. Campinas. Fundação Cargill, 1983. p. 1-118.
- Chen, Z.Q.; Liu, Q.; Zhu, Y.S. & Li, Y.X. (2002). Assessment on predicting methods for membrane-protein transmembrane regions, *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 34 (3): 285–290.
- Cheng, S.H.; Willmann, M.R.; Chen, H.C. & Sheen, J. (2002). Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 129: 469–485.
- Cheng, W.H. & Chourey, P.S. (1999). Genetic evidence that invertase-mediate release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theor. Appl. Genet.* 98: 485-495.
- Cheng, W.H.; Talierico, E.W. & Chourey, P.S. (1996). The miniature 1 seed locus encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell.* 8: 971-983
- Chrispeels, M.J. & Boulter, D. (1975). Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of endopeptidases. *Plant Physiol.* 55:1031-1037.
- Collier, E.; Watkinson, A.; Cleland, C.F. & Roth, J. (1987). Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* 262: 6238-6247.
- Collip, J.B. (1923). Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 56: 513-543.
- Comai, L. & Harada, J.J. (1990). Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2671 - 2674.
- Csaba, G. & Pál, K. (1982). Effects of insulin, triiodothyronine, and serotonin on plant seed development. *Protoplasma.* 110: 20-22.
- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 245: 3059-3065.
- Delatte, T.; Umhang, M.; Trevisan, M.; Eicke, S.; Thorneycroft, D.; Steven, M.S. & Zeeman, S.C. (2006). Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J. Biol. Chem.* 281(17): 12050 – 12059.

- Dinkova, T.D.; Aguilar, R. & Sánchez de Jiménez, E. (2000). Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translation level. *Biochem. J.* 351: 825-831.
- Dunn, M.J. & Crisp, S.J. In: *Methods in Molecular Biology Basic Protein and Peptides*. Ed: J.M. Walker, Totowa, NJ. 1994. (32): 113-117.
- Ehrenshaft, M. & Brambi, R. (1990). Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol.* 93: 295 - 304.
- Ellis, M.M. & Eyster, W.H. (1923). Some effects of insulin and glucokinin on maize seedlings. *Science.* 58: 541-542.
- Engvall, E. & Perlman, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8: 871-874.
- Esaú, K. In: *Anatomia das Plantas com Sementes*. 15 ed. São Paulo. Editora Edgard Blücher LTDA, 1998. p. 6-14.
- Eyster, W.H. & Ellis, M.M. (1924). Growth of maize seedlings as affected by glucokinin and insulin. *J. Gen. Physiol.* 6: 653-670.
- Fernades, K.V.S.; Campos, F.A.P.; Val, R.R.D. & Xavier-Filho, J. (1991). The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds. *Plant Science.* 74: 179-184.
- Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (1998). The biological roles of legume seed vicilins (7S storage proteins). *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 4: 241-245.
- Fincher, G. (1989). Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 350–356.
- Flores, C.G.; Aguilar, R.; De La Cruz, H.R.; Albores, M. & de Jiménez, E.S. (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* 358: 95-100.
- Flores, V.M.; Louro, R.P.; Xavier-Filho, J.; Barrat, D.H.; Shewry, P.R. & Fernandes, K.V.S (2001). Temporal and tissue localization of a cowpea (*Vigna unguiculata*) cystatin. *Physiol. Plant.* 112(2): 195-199.
- Fornaciari, K.V. Efeito da insulina e do pinitol sobre o desenvolvimento embrionário de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae). Campos dos Goytacazes , 2006. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas).

- Setor de Bioquímica de plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Ganong, W.F. In: Fisiologia Médica. 2 ed. São Paulo. Editora Atheneu. 1997. p. 251-269.
- Gazzamini, S. & McCourt, P. (2003). Cross-talk in plant hormone signaling: what *Arabidopsis* mutants are telling us. *Ann. Bot.* 91: 605–612.
- Gibson, S.I. (2004). Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *J Exp Bot.* 55: 253–264.
- Gilroy, S. & Jones, R.L. (1994). Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.), aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 1185–1192.
- Gomez-Cadenas, A.; Verhey, S.D.; Holappa, L.D.; Shen, Q.; Ho, T.H. & Walker-Simmons, M.K. (1999). An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96. 1767–1772.
- Goodman, D.B.P. & Davis, W.L. (1993). Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 440-446.
- Grimes, H.D. & Overvoorde, P.J. (1996). Functional characterization of sucrose binding protein-mediated in yeast. *J. Exp. Bot.* 47: 1217-1222.
- Gubler, F.; Kalla, R.; Roberts, K. & Jacobsen, J.V. (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI  $\alpha$ -amylase gene promoter. *Plant Cell.* 7: 1879–1891.
- Guglielminetti, L.; Perata, P. & Alpi, A. (1995). Effect of anoxia on carbohydrate metabolism in rice seedlings. *Plant Physiol.* 108: 735 –741.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. In: Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. 6 ed. Guanabara Koogan. 1997. p. 532-557.
- Han, B.; Hughes, D.W.; Galau, G.A.; Bewley, J.D. & Kermode, A.R. (1996). Changes in late embryogenesis abundant (*Lea*) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. *Planta.* 201: 27-35.
- Heim, U.; Wang, Q.; Kurz, T.; Borisjuk, L.; Golombek, S.; Neubohn, B.; Dier, K.; Gahrtz, M.; Sauer, N.; Weber, H. & Wobus, U. (2001). Expression patterns

- and subcellular localization of a 52 kDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest different functions during development. *Plant Mol. Biol.* 47: 461-474.
- Hong-Bo, S.; Zong-Suo, L. & Ming-An, S. (2005). LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloid. Surface B.* 45: 131-135.
- [http://pt.wikipedia.org/wiki/canavalia\\_ensiformis](http://pt.wikipedia.org/wiki/canavalia_ensiformis).
- Ilgoutz, S.C.; Knittel, N.; Lin, J.M.; Sterle, S. & Gayler, K.R. (1997). Transcription of genes for conglutinin  $\gamma$  and a leginsulin-like protein in narrow-leaved lupin. *Plant. Mol. Biol.* 34: 613-627.
- Jiang, L. & Kermode, A.R. (1994). Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Sci. Res.* 4: 149 -173.
- Jiang, Y.W. & Huang, B.R. (2002). Protein alteration in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid, *Crop Sci.* 42 (1): 207–217.
- Jones, R.L. & Jacobsen, J.V. (1991). Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *Int. Rev. Cytol.* 126: 49–88.
- Kagawa, H. & Hirano, H. (1989). Sequence of cDNA encoding soybean basic 7S globulin. *Nucl. Acids Res.* 17: 8868-8872.
- Kaneko, M.; Inukai, Y.; Ueguchi-Tanaka, M.; Itoh, H.; Izawa, T.; Kobayashi, Y.; Hattori, T.; Miyao, A.; Hirochika, H.; Ashikari, M. & Matsuoka, M. (2004). Loss-of-function mutations of the rice GAMYB gene impair  $\alpha$ -amylase expression in aleurone and flower development. *Plant Cell.* 16: 33–44.
- Kaneko, M.; Itoh, H.; Ueguchi-Tanaka, M.; Ashikari, M. & Matsuoka, M. (2002). The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol.* 128: 1264–1270.
- Khanna, P.; Nag, T.N.; Chandrajai, S. & Mohan, S. (1976). Process for isolation of insulin from plant source. *United States Patent.* 3: 945-988.
- Ko, T.P.; Day, J. & MacPherson, A. (2000). The refined structure of canavalin from jack bean in two crystal forms at 2.1 and 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D* 56: 411-420.
- Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509–540

- Komatsu, S. & Hirano, H.; (1991). Plant basic 7S globulin-like proteins have insulin and insulin-like growth factor binding activity. *Science*. 294: 210-212.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lane, B.G. (1991). Cellular desiccation and hydration: Developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB J*. 5: 2893-2901.
- Lawrence, M.C.; Izard, T.; Beuchat, M.; Blagrove, R.J. & Colman, P.M. (1994). Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. Implications for a common vicilin/legumin structure and the genetic engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.* 238: 748-776.
- Li, N.Y.; Gao, J.F. & Wang, P.H. (1998). Protein characters induced by water stresses in wheat seedlings. *Acta Phytophysiol. Sin.* 24 (1): 65–71.
- Lopes, M.A.C. Avaliação preliminar do conteúdo protéico da torta de filtro, um subproduto da indústria açucareira. Campos dos Goytacazes, 2001. Tese (Mestrado em Bioquímica). Setor de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Lovegrove, A. & Hooley, R. (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5:102–110.
- Lquari, H.; Pedroche, J.; Girón-Calle, J.; Vioque, J. & Millán, F. (2003). Interaction of *Lupinus angustifolius* L.  $\alpha$  and  $\gamma$  conglutins with 13-hydroperoxide –11,9-octadecadienoic acid. *Food Chem.* 80: 517-523.
- Madison, J.T.; Thompson, J.F. & Muenster, A.E. (1981). Turnover of storage protein in seeds of soybean and pea. *Ann. Bot.* 47: 65-73.
- Marcone, M.F. (1999). Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chem.* 65: 533-542.
- Maruyama, N.; Adachi, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Kohmo, M.; Yakenaka, Y.; Okuda, E.; Nakagawa, S.; Mikami, B. & Utsumi, S. (2001). Crystal structure of recombinant and native soybean beta-conglycin homotrimers. *Eur. J. Biochem.* 268: 3595-3604.
- McQueen-Mason, S. & Cosgrove, D.J. (1995). Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding. *Plant Physiol.* 107: 87-100.

- Moraes, R.A.; Sales, M.P.; Pinto, M.S.; Silva, L.B.; Oliveira, A.E.A.; Machado, O.L.T.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2000). Lima bean (*Phaseolus lunatus*) seed coat phaseolin is detrimental to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(2): 191-198.
- Morohashi, Y. (1986). Patterns of mitochondrial development in reserve tissue of germinated seeds: A survey. *Physiol. Plant.* 66: 653-658.
- Morohashi, Y. & Bewley, J.D. (1980). Development of mitochondrial activities in pea cotyledons during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 66: 70-73.
- Müntz, K. (1996). Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp. Bot.* 47: 606-622.
- Müntz, K. (1998). Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* 38: 77-99.
- Müntz, k.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedeman, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52 (362): 1741-1752.
- Nicolás, G. & Aldasoro, J.J. (1979). Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum* L. *J. Exp. Bot.* 30: 1163-1170.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10): 4007-4021.
- Oliveira, A.E.A. Comprovação da presença de insulina em plantas. Campos dos Goytacazes, 2001. Tese (Doutorado em Bioquímica). Setor de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Oliveira, A.E.A.; Gomes, V.M.; Sales, M.P.; Fernández, K.V.S.; Carlini, C.R. & Xavier-Filho, J. (1999-b). The toxicity of Jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Rev. Braz. Biol.* 59: 59-62.
- Oliveira, A.E.A.; Machado, O.L.T.; Gomes, V.M.; Xavier-Neto, J.; Pereira, A.C.; Vieira, J.G.H.; Fernández, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (1999). Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Prot. Pept. Lett.* 6: 15-21.

- Oliveira, A.E.A.; Ribeiro, E.S.; Da Cunha, M.; Gomes, V.M.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2004). Insulin accelerates *Canavalia ensiformis* seeds germination and development. *Plant Growth Regul.* 43: 57-62.
- Oliveira, A.E.A.; Sales, M.P.; Machado, O.L.T.; Fernández, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (1999-a). The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Ent. Exp. Appl.* 92: 249-255.
- Osborne, D.J & Boubriak, I.L. (1994). DNA and desiccation tolerance. *Seed Sci. Res.* 4: 175-185.
- Overvoorde, P.J.; Chao, W.S. & Grimes, H.D. (1997). A plasma membrane sucrose-binding protein that mediates sucrose uptake shares structural and sequence similarity with seed storage proteins but remains functionally distinct. *J. Biol. Chem.* 272: 15898-15904.
- Payan, F. (2004). Structural basis for the inhibition of mammalian and insect alpha-amylase by plant protein inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta.* 12(2): 171-180.
- Penson, S.P.; Schuurink, R.C.; Fath, A.; Gubler, F.; Jacobsen, J.V. & Jones, R.L. (1996). cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone, *Plant Cell.* 8: 2325–2333.
- Perata, P.; Pozueta-Romero, J.; Yamaguchi, J. & Akazawa, T. (1992). Artifactual detection of ADP-dependent sucrose synthase in crude plant extracts. *FEBS Lett.* 309: 283–287.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. In: *Biologia Vegetal.* 6 ed. Guanabara Koogan. 1999. p. 444-447.
- Ripp, K.G.; Viitanen, P.V.; Hiltz, W.D. & Franceschi, V.R. (1988). Identification of a membrane protein associated with sucrose transport into cells of developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 88:1435-1445.
- Ritchie, S. & Gilroy, S. (1998). Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone, *Plant Physiol.* 116: 765–776.
- Rolland, F.; Baena-Gonzalez, E. & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.

- Rolland F.; Winderickx J. & Thevelein J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2:183–201.
- Salon, C.; Raymond, P. & Pradet, A. (1988). Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J. Biol. Chem.* 263: 12278-12287.
- Sanchez de Jiménez, E.; Beltrán-Penã, E. & Ortiz-López, A. (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Phys. Plant.* 105: 148-154.
- Santos, V.O. Presença de insulina em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca. Campos dos Goytacazes, 2003. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Setor de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Satoh, S. (1998). Function of the cell wall in the interactions of plant cell: analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol.* 39 (4): 361-368.
- Schlereth, A.; Becker, C.; Horstmann, C.; Tiedemann, J. & Müntz, K. (2000). Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 1423-1433.
- Schlereth, A.; Standhardt, D.; Mock, H.P. & Müntz, K. (2001). Stored cysteine proteinases start globulin breakdown in protein bodies of embryonic axes and cotyledons of germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Planta.* 212: 718-727.
- Sheng, C.R.; Yao, N.; Xu, H.; Ling, X. & He, T. (2004). Isolation of plant insulin from *Momordica charantia* seeds by gel filtration and RP-HPLC. *J. Chinese Med.* 27(6): 414-416.
- Shewry, P.R. & Lucas, J.A. (1997). Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. *Adv. Bot. Res.* 26: 136-170.
- Shutov, A.D. & Vaintraub, I.A. (1987). Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry.* 26: 1557-1566.
- Silva, L.B.; Santos, Azevedo, C.R.; Lopes, M.A.C.; Venâncio, T.M.; Cavalcante, C.P.; Uchoa, A.F.; Astolfi-Filho, S.; Oliveira, A.E.A.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2002). The leaves of green plants as well as cyanobacterium, a red alga, and fungi contain insulin-like antigens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 297-303.



- Silva, L.B.; Sales, M.P.; Oliveira, A.E.A.; Machado, O.L.T.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2004). The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (f) (Coleoptera: Bruchidae)]. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 76(1): 57-65.
- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49–81
- Smith, D.L. (1981). Cotyledons of Leguminosae. Citado em: Müntz, k.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedeman, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52 (362): 1741-1752.
- Sperelakis, N. *Cell Physiology*. 1994. Academic Press, Inc.
- Tangphatsornruang, S.; Naconsie, M.; Thammamongtham, C. & Narangajavana, J. (2005). Isolation and characterization of an  $\alpha$ -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiol. Biochem.* 43: 821-827.
- Tiedemann, J.; Neubohn, B. & Müntz, K. (2000). Different functions of vicilin and legumin are reflected in the histopattern of globulin mobilization during germination of vetch (*Vicia sativa* L.). *Planta.* 211: 1-12.
- Towbin, H.; Staehelin, N.T.; Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354.
- Venâncio, T.M.; Oliveira, A.E.A.; Silva, L.B.; Machado, O.L.T.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2003). A protein with sequence homology to bovine insulin is found in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*
- Venâncio, T.M. Purificação e caracterização de insulina e de um candidato a receptor em frutos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] durante o desenvolvimento. Campos dos Goytacazes, 2004. Tese (Mestrado em Bioquímica). Setor de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Watanabe, Y.; Babashoy, S.F.; Komatsu, S.; Hemmings, A.M.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S. & Hirano, H. (1994). A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein: isolation, primary structure and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem.* 224: 167-172.

- Weber, H.; Borisjuk, L. & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:253–79.
- Welbaum, G.E. & Bradford, K.J. (1990). Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination. *Plant Physiol.* 92: 1046-1062.
- Williams, L.E.; Lemoine, R. & Saver, N. (2000). Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 5(7): 283-290.
- Wilson, K.A. (1986). Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in germinating dicot seeds. Citado em: Müntz, k.; Belozersky, M.A.; Dunaevsky, Y.E.; Schlereth, A. & Tiedeman, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* 52 (362): 1741-1752.
- Wisniewski, K. & Zagdanska, B. (2001). Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52 (360): 1455–1463.
- Wobus, U. & Weber, H. (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380, 937–944
- Wu, Y.; Spollen, W.G.; Sharp, R.E.; Hetherington, P.R. & Fry, S.C. (1994). Root growth maintenance at low water potentials. Increased activity of xyloglucan endotransglycosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiol.* 106: 607-615.
- Xavier-Filho, J. (1993). Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto multifuncional de biotecnologia e alimentos. Organização dos Estados Americanos. OEA. 1-31.
- Xavier-Filho, J.; Oliveira, A.E.A.; Silva, L.B.; Azevedo, C.R.; Venâncio, T.M.; Machado, O.L.T.; Oliva, M.L.; Fernandes, K. V.S. & Xavier-Neto, J. (2003). Plant insulin or glucokinin: a conflicting issue. *Braz. J. Plant. Physiol.* Minireview. 15: 67-78.
- Yamauchi, D.; Takeuchi, H. & Minamikawa, T. (1994). Structure and expression of  $\alpha$ -amylase gene from *Vigna mungo*, *Plant Cell Physiol.* 35: 705–711.
- Yang, Q.H.; Ye, W.H.; Song, S.Q. & Yin, S.H. (2002). Seed desiccation tolerance and its relationship to seed types and developmental stages, *Acta Bot. Sin.* 22 (6): 1518–1525.

Zhang, J.F.; Deng, X.P. & Mu, X.Q. (2002). Plant aquaporin. *Plant Physiol. Commun.* 38 (1): 88–91.

Zlatnova, J.S.; Ivanov, P.V.; Stoilov, L.M.; Chimshirova, K.V. & Stanchev, B.S. (1987). DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Mol. Biol.* 10: 139-144.

## COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E ENCONTROS CIENTÍFICOS

Fornaciari, K.V.; **Ribeiro, E.S.**; Silva, L.B.; Venâncio, T.M.; Fernandes, K.V.S.; Xavier-Filho, J. & Oliveira, A.E.A. (2006)

Pinitol as modulator for gemination and seedling development. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular. Águas de

Lindóia – SP. E-60, p1.0245

Bioquímica e Biologia Molecular. Caxambu – MG. E-127, p.66. 18 a 21 de maio de 2002.

**Ribeiro, E.S.;** Venâncio, T.M.; Giuli, L.S.A.; Machado, O.L.T.; Gomes da Silva, L.; Fernandes, K.V.S.; Xavier-Filho & Oliveira, A.E.A. (2006).

Proteínas do tegumento de *Canavalia ensiformis* estimulam o desenvolvimento pós-germinativo. 6º Mostra da Pós-Graduação da UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. 20 de Julho de 2006.

**Ribeiro, E.S.;** Cunha, M.; Machado, O.L.T.; Fernandes, K.V.S.; Xavier-Filho, J.& Oliveira, A.E.A. (2005).

Proteínas de sementes com afinidade a insulina. 5º Mostra da Pós-Graduação da UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. 14 de Julho de 2005.

**Ribeiro, E.S.;** Fernandes, K.V.S.; Xavier-Filho, J.& Oliveira, A.E.A. (2004).

Proteínas ligantes de insulina no tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis*.

IX Encontro de Iniciação Científica da UENF. Campos do Goytacazes – RJ. 29 a 01 de Julho de 2004.

**Ribeiro, E.S.;** Xavier-Filho, J.& Oliveira, A.E.A. (2003).

Proteínas do tegumento de sementes que se ligam à insulina. VIII Encontro de Iniciação Científica da UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. A75. 01 a 03 de Julho de 2003.

Santos, P.O.; **Ribeiro, E.S.;** Machado, O.L.T.; Gomes, V.M.; Xavier-Filho, J.& Oliveira, A.E.A. (2003).

Proteínas do tegumento de soja (*Glycine max*) como moléculas de defesa. VIII Encontro de Iniciação Científica da UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. A05. 01 a 03 de Julho de 2003.

**Ribeiro, E.S.;** Xavier-Filho, J.& Oliveira, A.E.A. (2002).

Efeito de insulina, glicose, 2-deoxi D-glicose, vanadil, tirfostin e pinitol sobre a germinação e desenvolvimento de sementes de *Canavalia ensiformis*. VII

Encontro de Iniciação Científica da UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. A11.  
03 a 05 de Setembro de 2002.

## PUBLICAÇÃO EM REVISTA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Oliveira, A.E.A.; **Ribeiro, E.S.**; Da Cunha, M.; Gomes, V.M.; Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J. (2004). Insulin accelerates *Canavalia ensiformis* seeds germination and development. *Plant Growth Regulation*. 43: 57-62.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)