



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR MOLECULAR

**Caracterização filogenética das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) de mamona (*Ricinus communis* L.) e análise da expressão dos genes *Rcom* RIPs durante o desenvolvimento da semente**

**Guilherme Loss de Moraes**

**Porto Alegre, março de 2010**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Centro de Biotecnologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Caracterização filogenética das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) de mamona (*Ricinus communis* L.) e análise da expressão dos genes *Rcom* RIPs durante o desenvolvimento da semente**

Guilherme Loss de Moraes

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

**Orientador: Rogério Margis**

**Porto Alegre**  
**Março de 2010**

## **INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

As agências de financiamento do Projeto de pesquisa em que se enquadra o presente trabalho de Mestrado foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e científica, aos colegas do LBMV, NGFP e do LGPP, em especial à Andréia Turchetto, Cláudia, Cordenonsi, Felipe, Fran, Fernanda e Júlio. Gostaria de agradecer à professora Dra. Márcia Margis, por sempre estar disposta a ajudar, colaborar com críticas pertinentes e não permitir que o trabalho perdesse o foco e ao professor Dr. Rogério Margis, por ter me acolhido no laboratório, aceitando ser meu orientador, sempre disposto a me orientar, me tornando um pouco menos “lost” em pesquisa.

Gostaria de agradecer, em especial, a minha irmã Fernanda e ao meu sobrinho tei-tei, meu irmão Victor, minha noiva Joseane, a quem me prova ser especial a cada dia e à minha mãe, meu exemplo de superação.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1.0 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 <i>Ricinus communis</i> L.....	11
1.1.1 Etimologia e história de <i>Ricinus communis</i> .....	11
1.1.2 Características da planta.....	11
1.1.3 Importância e usos da mamona.....	12
1.1.4 As Albuminas 2S.....	14
1.1.5 A ricinina.....	14
1.2 Proteínas Inativadoras de Ribossomos.....	15
1.2.1 A ricina.....	18
1.2.2 A aglutinina.....	21
1.3 Evolução dos genes que codificam RIPS em mamona.....	22
1.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	23
1.5 Genes de referência para RT-qPCR .....	24
2.0 OBJETIVOS.....	25
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Banco de dados.....	26
3.2 Buscas e resgate de sequências potenciais de RIPS e lectinas de mamona.....	26
3.3 Análises das RIPS, alinhamentos e filogenias.....	27
3.4 Material biológico extração de DNA e RNA total, síntese de DNA complementar (cDNA) e projeção de oligonucleotídeos iniciadores .....	29
3.4.1 Material biológico e separação dos estádios da semente .....	29
3.4.2 Extração de DNA.....	29
3.4.3 Extração de RNA total.....	30
3.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	30
3.5 Escolha de genes de referência para PCR quantitativa (RT-qPCR)	31
3.6 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores.....	31

3.7 PCR qualitativa (RT-PCR), PCR quantitativa (RT-qPCR) e sequenciamento nucleotídico.....	32
3.7.1 RT-PCR.....	32
3.7.2 RT-qPCR.....	32
3.7.3 Sequenciamento de DNA.....	33
3.8 Análises estatísticas dos dados de expressão por RT-qPCR.....	34
4.0 RESULTADOS.....	35
4.1 Resgate de potenciais sequências de RIPs e lectinas de mamona..	35
4.2 Análises das sequências das potenciais RIPs e lectinas de <i>R. communis</i> e conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para atividade RIP e lipolítica.....	38
4.3 Análises filogenéticas das <i>Rcom</i> RIPs e <i>Rcom</i> Lecs .....	43
4.4 Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA.....	47
4.5 Expressão das <i>Rcom</i> RIPs em cinco estádio da semente.....	49
4.5.1 Padronização de genes de referência para RT-qPCR.....	50
4.5.2 Expressão gênica das <i>Rcom</i> RIPs em cinco estádios do desenvolvimento de semente, por RT-qPCR.....	55
5.0 DISCUSSÃO.....	60
5.1 Resgate e anotação das <i>Rcom</i> RIPs.....	60
5.2 Análises das sequências das <i>Rcom</i> RIPs e <i>Rcom</i> Lecs e conservação dos aminoácidos críticos para atividade RIP e lipolíticas.....	61
5.3 Análises filogenéticas das <i>Rcom</i> RIPs e <i>Rcom</i> Lecs.....	65
5.4 Confirmação da existência das <i>Rcom</i> RIPs.....	68
5.5 Escolha de genes de normalização.....	68
5.6 Expressão das <i>Rcom</i> RIPs nos cinco estádios da semente.....	69
6.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	71
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICES.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL – microlitro

28 S – índice de Sedimentação (S) 28 do RNA ribossomal

A<sup>4232</sup> – adenina localizada na posição 4232 do RNA ribossomal

AA - aminoácidos

Ala – alanina

Arg – arginina

Asp - aspartato

b-32 – Proteína Inativadora de Ribossomo do milho

BL2Seq – algoritmo do “BLAST” de comparação de duas sequências

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool” – ferramenta de procura de sequências

cDNA – DNA complementar

CDS – “Coding Sequence” (Sequência Codificante)

CI50 – concentração de Inibição para que ocorra metade do efeito da substancia em estudo sobre uma população testada.

DL50 – Dose Letal para que ocorra morte de metade dos indivíduos em estudo

DNA – “Desoxiribonucleic Acid” (Ácido Desoxirribonucléico)

EFs – “Elongation Factors” (Fatores de Elongação)

ER – “Endoplasmatic Reticulum” (Retículo Endoplasmático)

EST – “Expressed Sequence Tag” (fragmento de sequência expressa)

G – “gamma distribution” (distribuição gamma)

Gln – glutamina

Glu – glutamato

GTR – modelo evolutivo “Generalized Time Reversible” (Tempo Reversível Generalizado)

HKY – modelo evolutivo Hasegawa, Kishino and Yano

I – “Invariable sites” (sítios invariáveis)

Ile - isoleucina

JIP32 – “Jasmonate Induced Protein” 32 (Proteína 32 induzida por jasmonato)

KDa – quiloDalton  
Kg - quilograma  
Lecs – lectinas  
Leu – leucina  
M – molar  
mg - miligramas  
Mpb – mega pares de base  
ML – “Maximum-Likelihood” (Máxima verrosemelhança)  
M-MLV – “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”  
mRNA – RNA mensageiro  
NaClO – hipoclorito de sódio  
NCBI – “National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)  
NJ – “Neighbor-Joining”  
°C – graus Celsius  
PCR – “Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia de Polimerase)  
PM – peso molecular  
*Rcom Lec* – *Ricinus communis* Lectin (Lectina de *R. communis*)  
*Rcom RIP* – *Ricinus communis* RIP (RIP de *R. communis*)  
RIPs – “Ribosome Inactivating Proteins” (Proteínas Inativadoras de Ribossomos)  
RNA – “Ribonucleic Acid” (Ácido Ribonucléico)  
rRNA – RNA Ribossomal  
TIGR – “The Institute for Genomics Research” (Instituto para Pesquisa Genômica)  
Trp – triptofano  
TVM – “Transversional model” (modelo evolutivo transversional)  
tBLASn – algoritmo da ferramenta BLAST que inspeciona um banco de dados de sequências codificantes, utilizando sequências peptíicas como isca.  
WGS – “Whole Genome Shotgun”



## RESUMO

As Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) compreendem uma família de enzimas que inibem a síntese protéica através da depurinação de uma adenina específica do RNA ribossomal. Os membros desta família são classificados como RIPs do tipo I, quando possuem somente o RNA-*N*-Glicosidase e RIPs do tipo II quando além do domínio glicosidase, também apresentam um domínio de lectina. As RIPs foram mais estudadas em plantas, onde a ricina e a aglutinina, ambas RIP do tipo II de mamona (*Ricinus communis*), estão entre as primeiras descritas. O presente trabalho teve o objetivo de identificar parálogos da ricina e aglutinina, bem como RIPs do tipo I de mamona e analisar as suas relações filogenéticas. Além disso, validar o uso de 14 potenciais genes de referência para qRT-PCR em cinco estádios do desenvolvimento da semente de mamona. O padrão de expressão gênica por RT-qPCR de todas RIPs de mamona identificadas, também foram analisados nestes mesmos estádios. Um total de 18 genes de RIPs foi identificado em mamona (*Rcom* RIPs), dos quais 10 foram classificados como do tipo II e 8 do tipo I. As topologias das árvores filogenéticas sugerem que as *Rcom* RIPs foram originadas a partir de múltiplos eventos de duplicação gênica. Dois modelos evolutivos foram propostos para a radiação das *Rcom* RIPs, baseados em processos de fusão gênica associado ou não a eventos de duplicação parcial. Os genes Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, TIP e UBC foram os que apresentaram perfil de expressão mais estável e foram selecionados para subsequente normalização dos dados de expressão das *Rcom* RIPs. Os genes que codificam as *Rcom* RIPI 3, 4, 5, 7 e 8 e as *Rcom* RIPII 1, 2, 4, 5, 6 e 8 são transcritos em sementes, sendo que a *Rcom* RIPII 1 (ricina) e a *Rcom* RIPII 2 (aglutinina) foram as mais expressas. O presente trabalho apresenta um modelo evolutivo das *Rcom* RIPs, o qual pode ser extrapolado para outras espécies de plantas. Este trabalho também demonstra o primeiro esforço para a padronização de genes de referência para RT-qPCR em mamona e o primeiro que apresenta a expressão outras *Rcom* RIPs, além da ricina e aglutinina.

**Palavras-chave:** RIP, Proteínas Inativadoras de Ribossomos, *Ricinus communis*, toxina vegetal, aglutinina, ricina

## ABSTRACT

Ribosome inactivating proteins (RIPs) comprise a family of enzymes that inhibit protein synthesis, after depurination of an adenine-specific ribosomal RNA. The members of this family are classified as type I RIPs, which have a RNA-N-glycosidase domain and type II RIPs encompassing a RNA-N-glycosidase and a lectin domain. The RIPs were more studied in plants, where ricin and agglutinin, both type II RIP of castor bean (*Ricinus communis*), were the first to be described. This work aimed to: 1) identify paralogous of ricin and agglutinin, as well as the type I RIPs of castor bean; 2) analyze their phylogenetic relationships; 3) validate the use of 14 potential housekeeping genes for qRT-PCR for five developmental stages of *R. communis* seeds; 4) analyze the pattern of gene expression by RT-qPCR of all RIPs castor identified in these same stages. A total of 18 genes that encode RIPs were identified in castor bean (*Rcom* RIPs), 10 of which were classified as type II and 8 as type I. The phylogenetic trees topologies suggest that *Rcom* RIPs were originated from multiple events of gene duplications. Two evolutionary models have been proposed for the radiation of *Rcom* RIPs based on gene fusion processes associated or not to events of partial duplication. The genes Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, TIP and UBC presented the more stable expression profile and were selected for further RT-qPCR normalization experiments. The *Rcom* RIPI 3, 4, 5, 7 and 8 and *Rcom* RIPI 1, 2, 4, 5, 6 and 8 genes are actively transcribed in seeds, whereas the *Rcom* RIPI 1 (ricin) and *Rcom* RIPI 2 (agglutinin) were the most expressed. This paper presents an evolutionary model of *Rcom* RIPs, which can be extrapolated to other plant species. Also, corresponds to the first effort to standardize housekeeping genes for RT-qPCR in castor bean and the first that shows the expression *Rcom* RIPs, other than ricin and agglutinin.

**Keywords:** RIP, are Ribosome Inactivating Proteins, *Ricinus communis*, plant toxin, agglutinin, ricin

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Ricinus communis* L.

#### 1.1.1 Etimologia e história de *Ricinus communis*

*Ricinus communis* L. é uma planta pertencente à família Euforbiaceae, sendo que a etimologia do seu nome científico é oriunda da semelhança morfológica que suas sementes apresentam com carrapatos (*Ricinus* do latim: carrapato). A planta é popularmente conhecida no Brasil como mamona ou mamoneira, devido à analogia de suas folhas com as do mamoeiro (*Carica papaya*). A planta também é conhecida como palma-de-cristo ou palma-santa, devido às propriedades curativas de seu óleo (SILVA *et al.*, 2008). Em países de língua inglesa, essa planta é comumente conhecida como “castor bean”, pelo fato da utilização de seu óleo como substituto da substância *castoreum* retirada de glândulas epidérmicas de castores (*Castor* sp.), substância a qual é utilizada como fixador de perfumes pela indústria farmacêutica.

A mamona é originária da África, mas atualmente é encontrada em todas as regiões temperadas, subtropicais e tropicais do planeta (OLSNES, 2004). No Brasil, a mamona foi introduzida pelos portugueses com a finalidade de utilizar seu óleo em lamparinas para iluminação de ruas e para lubrificação dos eixos de carroças. O clima tropical predominante no Brasil facilitou a sua disseminação, tornando essa planta presente em todo o território nacional (BIODIESELBR, 2010).

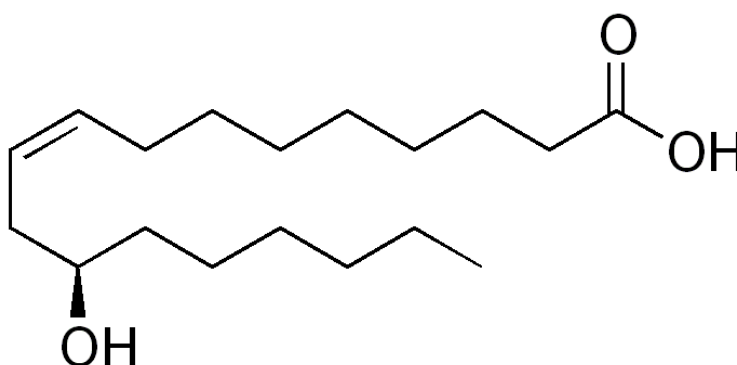
#### 1.1.2 Características morfológicas da planta

Plantas de *R. communis* apresentam o sistema radicular tipo pivotante e profundo, com grande emissão de radicelas. O caule da planta adulta é lenhoso, com grande variação de coloração. A epiderme é cerosa, com rugosidades, nós bem definidos e cicatrizes foliares proeminentes. As folhas são simples, grandes, com largura do limbo variando de 10 a 40 cm, do tipo digitolobadas, denticuladas, de pecíolos longos, com 20 a 50 cm de comprimento. A mamona possui

inflorescências monóicas e monoclinas, do tipo cacho racemóide, contendo as flores masculinas distais em relação às femininas (BARNES *et al.*, 2009). A polinização é anemófila e entomófila (EMBRAPA, 2007). A reprodução geralmente é autógama, porém, alogamia também pode ocorrer (OLIVEIRA & ZANOTTO, 2008). O fruto é tricarpelar e trilobular, contendo uma semente por lóculo, podendo ser deiscente ou indeiscente, com coloração verde ou avermelhada. A semente madura apresenta coloração, forma e peso muito variados, contendo além do embrião, o endosperma, a testa e com presença ou não de oleófilo (carúncula) (BARNES *et al.*, 2009, EMBRAPA, 2007).

### 1.1.3 Importância e usos da mamona

As sementes de *Ricinus communis* apresentam mais de 60% de seu peso em óleo, sendo que 90% deste correspondem ao ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-octadecacis-9-enoico: 18:1-OH) (HOUSTON *et al.*, 2009, LU *et al.*, 2007, OGUNNIYI, 2006) (Figura 1). Este óleo apresenta características laxantes e desde tempos remotos, são encontradas relatos das propriedades medicinais desta planta (OLSNES, 2004), sendo também utilizado popularmente para induzir trabalho de parto (BURDOCK *et al.*, 2006).



**Figura 1:** Estrutura molecular do ácido ricinoléico (12-hidroxi-octadecacis-9-enoico: 18:1-OH).

Recentemente, o ricinolato foi empregado na construção de uma matriz biodegradável, a qual quando associada a um anestésico resultou em aumento na duração do efeito deste (SOKOLSKY-PAPKOV *et al.*, 2009). Além disso, o uso de polímeros que contenham ácido ricinoléico em tecido muscular e cerebral de ratos com a finalidade de carrear moléculas terapêuticas foi considerada segura (VAISMAN *et al.*, 2010).

O ácido ricinoleico é utilizado amplamente em indústrias como matéria-prima para produção de poliuretano, adesivos, espumas, isolantes térmicos, vinil, lubrificantes anticongelantes e reagentes para produção de perfumes e inseticidas, devido a características únicas desse ácido graxo, tais como um único ponto de insaturação (monoinsaturado) e a presença de um grupo hidroxila (OGUNNIYI, 2006). Além do mais, os resíduos da extração do óleo da semente (tortade mamona) podem ser utilizados como adubo orgânico (JÚNIOR *et al.*, 2005), para a produção de álcool (MELO *et al.*, 2008) ou ainda para a produção de celulose (AZZINII *et al.*, 1981).

Dentre as oleaginosas cultivadas no Brasil, a mamona destaca-se pela rusticidade e adaptabilidade a condições adversas de clima e solo, pelo rápido crescimento, elevada produção e considerável teor de óleo em suas sementes (LIMA *et al.*, 2006). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de mamona, sendo somente superado por Índia e China (OGUNNIYI, 2006). Desde o verão de 2004, o governo brasileiro tem incentivado o cultivo de mamona, principalmente nos estados do Nordeste, como uma medida de combate à pobreza, inserção social, proteção ambiental e provisão de energia, através da produção de biodiesel (SCHOLZ & DA SILVA, 2008).

Devido a rusticidade das plantas de *R. communis*, seu emprego como meio de detoxificação de solos contaminados com arsênio (MAHMUD *et al.*, 2008, MELO *et al.*, 2009) e chumbo (ROMEIRO *et al.*, 2007) também foi estudado. Potencializando a utilização da mamona para fitoremediação ou fitoextração de solos contaminados.

Apesar do grande teor de óleo que pode ser extraído das sementes de *R. communis*, o ácido ricinoléico apresenta características que dificultam o seu uso

como biodiesel, tais como alta viscosidade e grande miscibilidade em água quando comparado a outros óleos (SCHOLZ & DA SILVA, 2008).

A cultura de mamona apresenta produção desigual de sementes, tamanho de planta irregular, e conseqüentemente, a colheita tem de ser manual. Do último fato, surge o maior empecilho dessa cultura, sua alergenicidade, causada por proteínas de reserva, denominadas albuminas 2S, e sua toxicidade causada pelo alcalóide ricinina e Proteínas Inativadoras de Ribossomo (RIPs), em pessoas que entram em contato direto com a planta ou sementes (CHEN *et al.*, 2004).

#### **1.1.4 As Albuminas 2S**

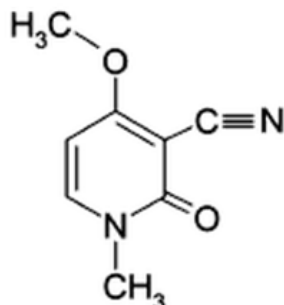
As albuminas 2S são potentes alergênicos que ocasionam respostas imunológicas mediadas por imunoglobulinas do tipo IgE, podendo resultar em sérias complicações médicas em trabalhadores expostos a essas substâncias (CHEN *et al.*, 2004). Foi visto que 96% dos pacientes que desenvolveram alergias em contato com a mamona, desenvolveram anticorpos específicos para Albuminas 2S (AHN & CHEN, 2007).

A albumina 2S é codificada por um gene, que expressa um precursor de 258 resíduos de aminoácidos (IRWIN & LORD, 1990), o qual carrega um sinal de direcionamento vacuolar (BROWN *et al.*, 2003). Uma vez no vacúolo, esse precursor é clivado, produzindo a proteína ativa, composta por dois heterodímeros, nomeados RIC1 e RIC3 (CHEN *et al.*, 2004).

#### **1.1.5 A ricinina**

A ricinina ( $C_8H_8O_2N_2$ ) (Figura 2) é um alcalóide, primeiramente isolado de sementes de mamona em 1864 (YULDASHEV, 2001). Contudo, esse alcalóide também está presente em folhas e flores (CAZAL *et al.*, 2009). A ingestão das sementes, ou de qualquer outra parte da planta, permite que o alcalóide provoque náuseas, vômitos, sangramentos gastrointestinais, coma, hipotensão, parada respiratória e morte (COOPMAN *et al.*, 2009). No entanto, a sintomatologia de

intoxicação por ricinina é muito similar com a das Proteínas Inativadoras de Ribossomos, e os sintomas podem estar sendo sobrepostos.



**Figure 2.** Estrutura Molecular do alcalóide ricinina

## 1.2 Proteínas Inativadoras de Ribossomos

Proteínas Inativadoras de Ribossomos ou “Ribosome Inactivating Proteins” (RIPs) tiveram a sua ação relacionada, ainda no início do século XX, à defesa das plantas, devido à inibição de crescimento viral por extratos de *Phytolacca americana* (NIELSEN & BOSTON, 2001).

Sua denominação é devido ao fato dessas enzimas promoverem a depurinação de uma adenina específica (A<sup>4324</sup>), situada em uma alça exposta do RNA ribossomomomal (rRNA) 28 S de fígado de rato (BARBIERI *et al.*, 1993), através do rompimento da ligação glicosídica entre a base e a ribose. Com isso, sua atividade foi caracterizada como de RNA-*N*-glicosidases (ENDO & TSURUGI, 1987).

Esta alça de rRNA é relacionada a interações com fatores de alongação (EFs) 1 e 2 (BRIGOTTI *et al.*, 1989). A clivagem dessa adenina específica, impede essa interação, resultando em um decréscimo da síntese de proteínas (ENDO *et al.*, 1991). O decaimento da síntese protéica nas células afetadas pelas RIPs, comumente resulta em morte celular (NIELSEN & BOSTON, 2001, STIRPE, 2004).

As RIPs podem também depurar adeninas de DNA de esperma de arenque, RNA mensageiro e caudas poli(A) de maneira inespecífica, e devido a esse fato, o nome de polinucleotídeo:adenosina glicosidase foi proposto

(BARBIERI *et al.*, 1997, BOLOGNESI *et al.*, 1997). Recentemente, foi verificada atividade de depuração de DNA plasmidial de *Escherichia coli*, induzida por saporina (RIP de *Saponaria officinalis*) (RUGGIERO *et al.*, 2009).

As Proteínas Inativadoras de Ribossomos são classificadas em dois tipos majoritários: (i) RIPs do tipo I, as quais são amplamente distribuídas no reino vegetal (GIRBES *et al.*, 2004), consistindo em uma cadeia  $\alpha$ , pesando entre 26 a 32 KDa, com a atividade de glicosidase; e (ii) RIPs do tipo II, que consistem em um heterodímero, com aproximadamente 60 KDa, onde uma cadeia  $\alpha$ , muito similar às do tipo I, é ligada por pontes de enxofre (LAPPI *et al.*, 1978) a uma cadeia  $\beta$ , a qual possui propriedades de lectina (BARBIERI *et al.*, 1993, OLSNES & PIHL, 1973, STIRPE, 2004). A cadeia  $\beta$  também permite reconhecimento de resíduos terminais de galactose na superfície celular, acarretando a ligação das RIPs do tipo II na membrana celular (LORD *et al.*, 1994).

Existe também um terceiro tipo de RIP (tipo III), menos comum, que foi descrita somente em milho, denominada de b-32 (WALSH *et al.*, 1991) e em cevada (*Hordeum vulgare*) nomeada de JIP60 (REINBOTHE *et al.*, 1994), sendo que essa apresentou atividade de glicosidase em RNA 28S de fumo (*Nicotiana tabacum*) (DUNAEVA *et al.*, 1999). Proteínas desse tipo possuem uma cadeia  $\alpha$ , com grande similaridade as RIPs do tipo I e II, porém, no lugar da cadeia  $\beta$ , existe um pequeno peptídeo de função desconhecida (PEUMANS *et al.*, 2001), o qual é proteoliticamente clivado durante a maturação da semente e não foi relacionado com o direcionamento vacuolar (WALSH *et al.*, 1991).

A atividade de depuração das RIPs em RNA ribossomal, e subsequente morte celular, qualificam as RIPs como importantes toxinas. A toxicidade de algumas RIPs já foi caracterizada, sendo que o CI50 em culturas de células "HeLa" pode variar de  $3 \times 10^{-13}$  a  $1,6 \times 10^{-9}$  M e a DL50 podem variar de <1,2 a 8  $\mu\text{g/Kg}$  (STIRPE & BATTELLI, 2006).

Essa grande toxidez despertou o interesse de uma possível utilização dessas proteínas conjugadas com anticorpos, como imunotoxinas, no tratamento de câncer (ALAM *et al.*, 2008, LIN *et al.*, 1971, SCADDEN *et al.*, 1998, WANG *et al.*, 1998), sendo que, já foi feito um teste fase I para uso de Vicumina (RIP do tipo II de *Viscum album*) acoplada em um anticorpo para tratamento de câncer



colo-retal, sarcomas e melanomas (BERGMANN *et al.*, 2008). Estudos para combater o vírus HIV, utilizando imunotoxinas complexadas com RIPs também foram realizados (WANG *et al.*, 2000, TILL *et al.*, 1988, DONAYRE TORRES *et al.*, 2009).

Por outro lado, há um grande temor que a toxicidade das RIPs, principalmente da ricina (RIP do tipo II de *R. communis*) seja aproveitada para bioterrorismo (OLSNES, 2004). A rusticidade, o baixo custo para manter a planta, a fácil extração da proteína e a boa estabilidade da ricina, faz da mamona uma excelente fonte de RIPs. Infelizmente, esta poderia, em uma situação de bioterrorismo, ser utilizada por injeção direta da RIP no indivíduo, contaminação de alimentos e fontes de água ou pulverização aérea (SPIVAK & HENDRICKSON, 2005).

A intoxicação por injeção da toxina apresenta efeitos num período de 1 a 12 horas após o contato, resultando em necrose na região da injeção e óbito dentro de 36 a 48 horas. A intoxicação por ingestão resulta em diarreia, náuseas, vômitos, sangramento gastrointestinal nas primeiras 3 horas, levando a morte em até 48 horas após a contaminação. A inalação de RIPs ocasiona dores no peito, fraqueza, febre, antralgia, dispnéia, edema pulmonar e colapso no sistema cardiorrespiratório, dentro das primeiras 3 horas, e morte em até 48 horas após a exposição com a toxina (ASSOCIATION, 2003).

Devido a essa grande preocupação sobre um possível ataque bioterrorista com as RIPs e em especial com a ricina, existe um grande número de publicações sobre detecção, por métodos espectrométricos em água e leite (BECHER *et al.*, 2007, BRINKWORTH *et al.*, 2009), alimentos (KALB & BARR, 2009) bem como por meios imunológicos em água (YUE *et al.*, 2009), urina (SHYU *et al.*, 2002), talco, leite e açúcar (GUGLIELMO-VIRET & THULLIER, 2007) e alimentos (GARBER *et al.*, 2005, GARBER & O'BRIEN, 2008). Estratégias baseadas em PCR também foram empregadas para detecção de transcritos do gene que codifica a ricina em alimentos (HE *et al.*, 2007, MELCHIOR & TOLLESON, 2009). Além do possível uso em bioterrorismo, essa toxina também foi empregada em assassinatos, como o do jornalista Georgori Markov em 1978 (LORD *et al.*, 1994).

Apesar dessa grande preocupação com um possível ataque terrorista utilizando a ricina ou outra RIP equivalente, há somente um trabalho sobre descontaminação de objetos contendo ricina, o qual abordou a utilização de hipoclorito de sódio (NaClO) (MACKINNON & ALDERTON, 2000). Neste mesmo estudo, o NaClO foi considerado seguro e eficaz para desnaturar a ricina, consequentemente inativando a toxidez desta RIP.

Recentemente, um estudo descreveu o desenvolvimento de uma vacina, denominada RiVax contra a ricina, que demonstrou ser segura e eficaz em cobaias e voluntários mesmo em altas concentrações (SMALLSHAW & VITETTA, 2010).

Apesar das RIPs apresentarem alta toxidez em mamíferos (OLSNES, 2004), atuar contra herbivoria e parasitismo (GIRBES *et al.*, 2004) e a sua atividade em DNA estar aumentada em folhas senescentes e submetidas a estresse osmótico, (STIRPE *et al.*, 1996), sua real função para as plantas ainda continua a ser um grande desafio para a comunidade científica (STIRPE & BATTELLI, 2006).

### **1.2.1 A ricina**

Em 1887, o pesquisador Thomas Dixson descobriu que a toxina de *R. communis* era uma proteína e um ano depois o nome de ricina foi proposto (OLSNES, 2004). No mesmo ano, um extrato protéico foi incubado com sangue e uma atividade de aglutinação foi observada, a qual foi relacionada com a toxicidade da ricina (VASCONCELOS & OLIVEIRA, 2004). Posteriormente, a atividade tóxica da ricina foi separada da atividade de aglutinação (OLSNES, 2004). A ricina, também foi uma das toxinas escolhida por Paul Ehrlich para induzir imunização em animais e junto com a utilização da abrina (*Abrus precatorius* - Fabaceae), outra RIP do tipo II de origem vegetal. Desse experimento foi observado que o efeito de imunização era específico para cada uma das RIP (OLSNES, 2004).

Somente em 1971 o efeito tóxico da ricina foi elucidado, quando foi visto que a introdução desta RIP em culturas de células induzia inibição da síntese

protéica (LIN *et al.*, 1971). O efeito tóxico da ricina nas células infectadas é muito potente, tendo sido estimado que uma molécula de ricina seria suficiente para inativar uma célula (SMALLSHAW & VITETTA, 2010).

As sequências genômica (gDNA) e codificante (CDS) da ricina foram identificadas em 1985 (HALLING *et al.*, 1985, LAMB *et al.*, 1985). O gene que codifica a ricina sintetiza um único RNA mensageiro o qual expressa uma pré-proteína, nomeada pré-pro-ricina (576 resíduos de aminoácidos) contendo um peptídeo sinal de 35 resíduos de aminoácidos, ambas as cadeias  $\alpha$  (tóxica, com 267 AA) e  $\beta$  (lectina, com 262 AA) e um peptídeo de ligação de 12 resíduos de aminoácidos (FRIGERIO & ROBERTS, 1998, LAMB *et al.*, 1985). Este peptídeo de ligação possui um sinal para o direcionamento vacuolar da ricina e está relacionado à ativação da RIP (FRIGERIO *et al.*, 1998), sendo o resíduo de Isoleucina (Ile271) essencial para a manutenção do direcionamento vacuolar (FRIGERIO *et al.*, 2001). Uma vez no vacúolo, o peptídeo de ligação é proteoliticamente clivado por uma proteína de processamento vacuolar (VPE), liberando as duas cadeias, e gerando a forma heterodimérica ativa da ricina (FRIGERIO & ROBERTS, 1998). Uma VPE, purificada do endosperma da semente de *R. communis*, caracterizada como uma aspártico endopeptidase, foi capaz de processar o peptídeo de ligação da ricina (HIRAIWA *et al.*, 1997).

Trabalhos com mutações sítio dirigidas (KIM *et al.*, 1992) e cristalografia de raio-x (MONZINGO & ROBERTUS, 1992), revelaram que a adenina do RNA ribossomal interage com resíduos de tirosina conservados nas RIPS (posições Tir80 e Tir123 na ricina). O sítio ativo da atividade N-glicosidásica da ricina é composto por um resíduo de glutamato (Glu177), posicionado perto da ribose e por um resíduo de arginina (Arg180), o qual forma uma ligação de hidrogênio com a posição N3 da adenina. Contudo, ainda não se sabe qual dos resíduos promove o ataque à molécula de água e se a posição N3 da adenina é completa ou parcialmente protonada (DAY *et al.*, 1996).

Outros trabalhos caracterizaram um resíduo de triptofano (Trp) específico, como importante para manter a conformação do sítio ativo da tricosantina (RIP do tipo I de *Trichosantes kirilowii*), sendo esse resíduo conservado entre todos os membros até então conhecidos das RIPS (KATZIN *et al.*, 1991). Na mesma

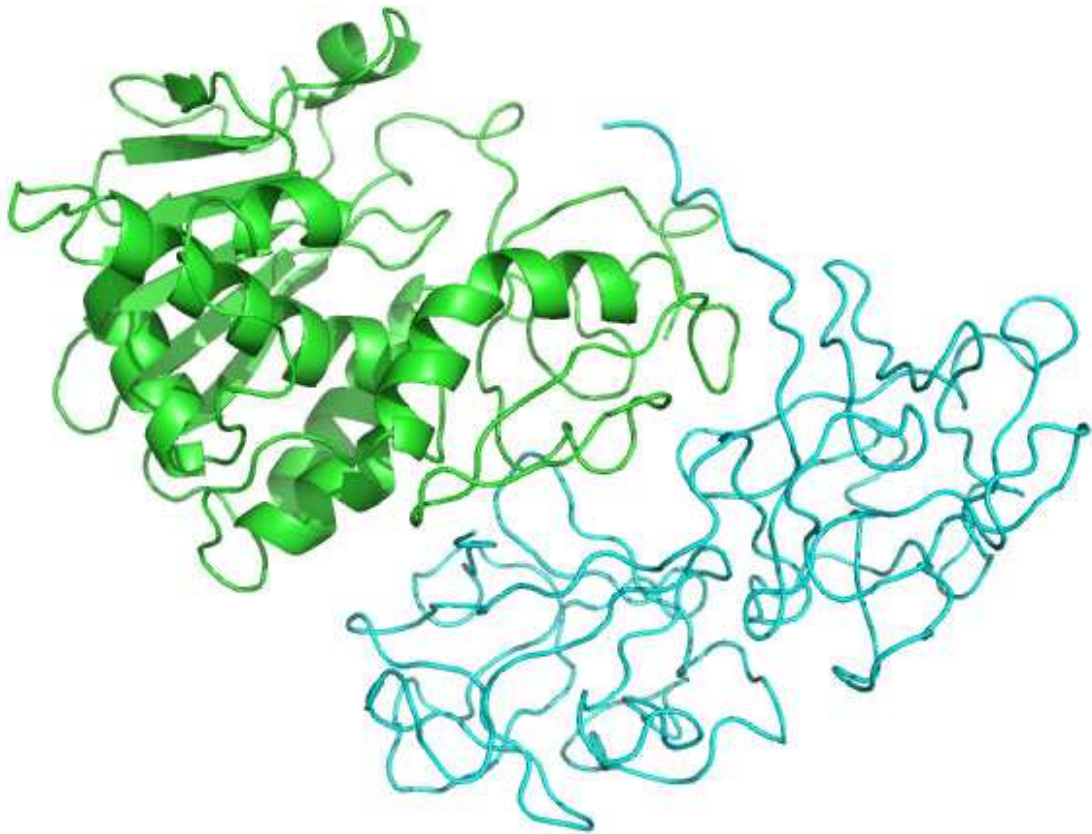
época, Bradeley e MacGuire (1990), mostraram que uma substituição do resíduo de triptofano por um resíduo de fenilalanina, diminui a atividade tóxica da ricina (BRADLEY & MCGUIRE, 1990).

A cadeia  $\beta$  da ricina (lectina) é um produto de duplicação gênica, onde cada parte duplicada corresponde a um dos domínios dessa cadeia (VILLAFRANCA & ROBERTUS, 1981), sendo que, cada domínio duplicado consiste em três lobos, arranjados como trifolhas-  $\beta$  (ROBERTUS & READY, 1984, RUTENBER *et al.*, 1987).

Moulin e colaboradores (1994) demonstraram que uma lipase purificada de *Euphorbia characias* apresentava alta similaridade de sequência com a cadeia  $\beta$  da ricina (MOULIN *et al.*, 1994). Posteriormente, foi descoberto que a cadeia  $\alpha$  tem atividade lipolítica (HELMY *et al.*, 1999). Contudo, somente com o trabalho de Morlon-Guyot e colaboradores (2003), que utilizou técnicas de mutação sítio dirigida, análise estrutural protéica e cinética enzimática, foi caracterizada a atividade lipolítica da ricina, a qual é direcionada a glicerofosfolipídeos e triglicerídeos (MORLON-GUYOT *et al.*, 2003). No mesmo trabalho, a tríade catalítica do sítio ativo foi identificada como um resíduo de histidina (His40), um resíduo de serina (Ser208), situados na cadeia  $\alpha$  e um resíduo de aspartato (Asp361) localizado na cadeia  $\beta$  (MORLON-GUYOT *et al.*, 2003).

A ricina (Figura 1) também é um modelo de estudo para a retro-translocação de proteínas em células eucariotas (FRIGERIO & ROBERTS, 1998). O mecanismo de entrada da ricina ocorre pelo reconhecimento de receptores de galactose na membrana celular, com posterior endocitose da ricina (SPIVAK & HENDRICKSON, 2005). Uma vez dentro da célula, a ricina utiliza de uma maneira ainda pouco compreendida, a rota trans-golgi para alcançar os ribossomos (WESCHE *et al.*, 1999).

A extração de ricina sempre foi feita a partir de sementes maduras (OLSNES, 2004). Mas, curiosamente, nenhum experimento de análise de expressão da ricina durante o desenvolvimento da semente foi realizado até o presente.

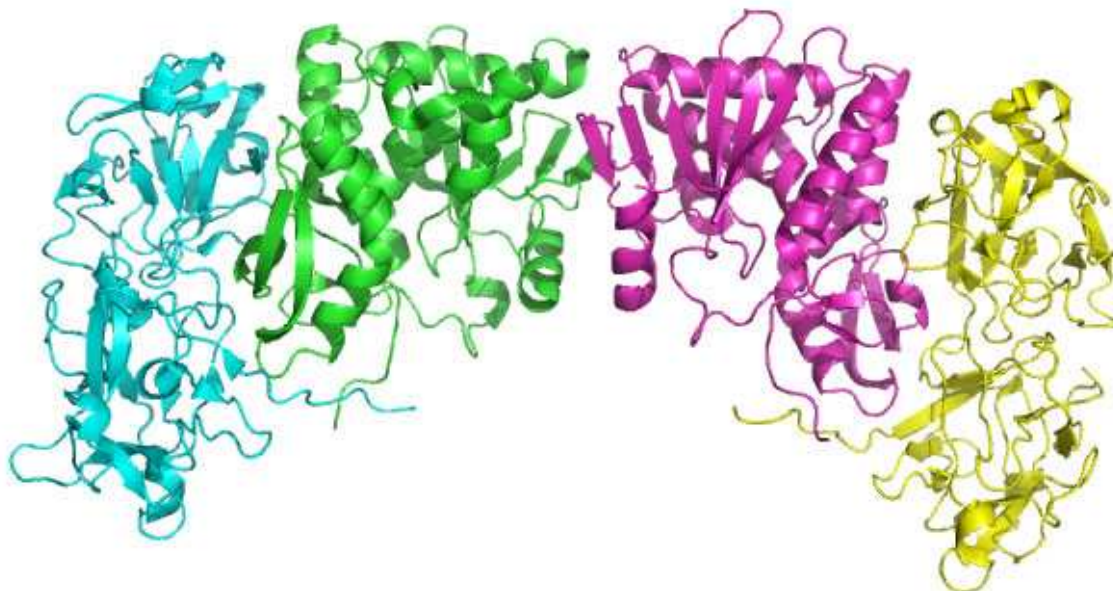


**Figura 3.** Modelo cristalográfico da ricina (2AAI) com resolução de 2,6Å obtida do Protein Data Bank (PDB). Em verde a cadeia  $\alpha$  e em azul a cadeia  $\beta$  da ricina

### 1.2.2 A aglutinina

A aglutinina (Figura 2) é uma proteína que apresenta alta identidade de sequência com a ricina (ROBERTS *et al.*, 1985), o que sugere que esta seja produto de um gene que se originou por duplicação do gene da ricina (READY *et al.*, 1984), e não uma isoforma protéica da ricina como sugerido por Butterworth e Lord (1983) (BUTTERWORTH & LORD, 1983). Interessante é o fato da aglutinina apresentar baixa toxidez, quando comparada com a ricina, efeito aglutinante em hemácias e uma configuração tetramérica ( $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ ) (HEGDE & PODDER, 1998). Como a ricina, a aglutinina é traduzida como um pré-pró-proteína, com algumas diferenças que podem resultar na formação do tetrâmero (ROBERTS *et al.*, 1985).

Assim como a ricina, a aglutinina também é purificada a partir de sementes (ZHAN & ZHOU, 2003) e seu padrão de expressão durante o desenvolvimento da semente também não foi ainda analisado.



**Figura 4.** Modelo cristalográfico da aglutinina (1RZO), com resolução de 2,37Å obtida do Protein Data Bank (PDB). Em verde e rosa as cadeias  $\alpha$  e em azul e amarelo as cadeias  $\beta$  da aglutinina.

### 1.3 Evolução dos genes que codificam RIPS em mamona

A possibilidade de existência de genes parálogos à ricina e aglutinina foi inicialmente investigada por Halling e colaboradores (1985), que utilizando “Southern Blot” identificaram seis possíveis parálogos do gene da ricina (HALLING *et al.*, 1985). Posteriormente, esse número subiu para oito parálogos da ricina (TREGGAR & ROBERTS, 1992). Recentemente, Leshin e colaboradores (2009) usando a sequência da ricina como isca, inspecionou o “draft” do genoma de *R. communis*, encontrando seis proteínas tipo ricina (RLPs) (LESHIN *et al.*, 2009).

A existência de parálogos de genes de Proteínas Inativadoras de Ribossomos do tipo I em mamona nunca foi identificada, bem como o perfil evolutivo da ricina e aglutinina com seus genes parálogos e possíveis membros do tipo I.

#### 1.4 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica de simples execução e baixo custo, sendo a RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), a sua evolução, especialmente útil para a quantificação de transcritos (BUSTIN *et al.*, 2009). Essa técnica atualmente é considerada o padrão ouro para análise de expressão gênica, combinando simplicidade técnica, velocidade e sensibilidade (BUSTIN, 2009).

A técnica de RT-qPCR, se baseia na captação de sinais de fluorescência, os quais são correlacionados, a cada ciclo, com o acúmulo de produtos de PCR (CIKOS & KOPPEL, 2009). Existem diversas metodologias que possibilitam quantificar o transcrito em questão (WONG & MEDRANO, 2005). Contudo, as mais difundidas são: (i) sondas de hidrólise (TaqMan<sup>®</sup>), onde existe uma sonda, específica a um transcrito em estudo, que se anela entre os oligos senso e anti-senso do produto de PCR. Essa sonda tem um fluoróforo ligado à extremidade 5' e uma molécula ("quencher") que absorve essa fluorescência na extremidade 3' (GIBSON *et al.*, 1996). Conforme a PCR decorre, a DNA polimerase, a qual apresenta atividade 5' nucleosidase, libera o fluoróforo, o qual tem sua emissão de luz captada a cada ciclo da reação (WONG & MEDRANO, 2005); (ii) fluoróforos intercalantes de DNA dupla fita (SYBR Green), onde é utilizado uma molécula que se intercala no DNA, que emite fluorescência, a qual é captada a cada ciclo e não inibe a atividade da DNA polimerase. (WITTEWER *et al.*, 1997). A especificidade dos oligos com o transcrito em estudo pode ser testada pela realização de uma curva de dissociação após a reação de PCR (WONG & MEDRANO, 2005). Nesta técnica, os produtos de PCR são aquecidos até total dissociação, a qual gera uma queda abrupta da emissão de luz pelo fluoróforo. Com isso, os produtos de PCR com tamanhos e conteúdos GC diferentes apresentarão curvas de dissociação diferentes, as quais podem ser comparadas para verificar a especificidade dos oligos (RIRIE *et al.*, 1997).

Os dados utilizados para a quantificação de transcritos por RT-qPCR são os pontos ( $C_T$ ) na fase exponencial de amplificação, os quais representam o ciclo de amplificação pela fluorescência obtida (CIKOS & KOPPEL, 2009).

## 1.5 Genes de referência para RT-qPCR

Genes de referência para RT-qPCR (“Housekeeping” genes) são considerados aqueles que estão envolvidos em processos celulares básicos e supostamente apresentam um perfil de expressão uniforme em diferentes tratamentos, tecidos e órgãos (REMANS *et al.*, 2008).

A comparação do perfil de expressão do gene de referência com o do gene em estudo é chamada normalização, a qual muitas vezes é feita somente com um gene de referência, com padrão de expressão não validado para o experimento, o qual geralmente resulta em uma normalização errônea (BUSTIN *et al.*, 2009, VANDESOMPELE *et al.*, 2002). A utilização de RNAs ribossomais para a normalização também é comum, mas este tipo de RNA apresenta maior integridade e abundância quando comparado ao RNA mensageiro, fatos que influenciam negativamente na normalização da expressão gênica (WONG & MEDRANO, 2005).

Atualmente, estudos com a validação de possíveis genes de referência, antes da análise de expressão dos genes-alvo foram realizados com *Arabidopsis thaliana* (CZECHOWSKI *et al.*, 2005, REMANS *et al.*, 2008), arroz (JAIN *et al.*, 2006), álamo (BRUNNER *et al.*, 2004), batata (NICOT *et al.*, 2005), café (BARSALOBRES-CAVALLARI *et al.*, 2009), pêssago (TONG *et al.*, 2009), soja (HU *et al.*, 2009, JIAN *et al.*, 2008), tomate (EXPOSITO-RODRIGUEZ *et al.*, 2008), trigo (PAOLACCI *et al.*, 2009), entre outras plantas. Contudo, até o presente momento, não existe nenhum trabalho descrevendo a validação de genes de referência para a mamona.

Antes de analisar o padrão de expressão gênica das RIPs de *R. communis* é importante validar os genes de referências nos cinco estádios da semente, pois este estudo possibilitará análises de expressões gênicas relativas mais acuradas e confiáveis.



## 2.0 OBJETIVOS

Identificar os genes parálogos da ricina e aglutinina, bem como os possíveis representantes de RIPs do tipo I presentes no genoma de *Ricinus communis*, analisar a conservação dos motivos críticos à atividade de RNA-glicosidase e lipolítica entre as RIPs de mamona, analisar as relações filogenéticas destas proteínas. Além disso, validar os genes de referência para RT-qPCR em cinco estádios do desenvolvimento da semente de mamona, e determinar o perfil de expressão dos genes das RIPs identificados neste trabalho ao longo dos cinco estádios.

### Objetivos Específicos

- Identificar os genes parálogos da ricina e aglutinina;
- Identificar a existência de RIPs do tipo I em mamona;
- Analisar a conservação dos motivos relacionados à atividade RNA-glicosidase das RIPs de mamona;
- Caracterizar a conservação dos motivos relacionados à atividade lipolítica das RIPs de mamona;
- Validar a existência destes genes por PCR e sequenciamento;
- Analisar o padrão filogenético das RIPs de *R. communis*;
- Validar 14 genes candidatos como referência para RT-qPCR em cinco estádios do desenvolvimento da semente;
- Analisar o padrão de expressão das RIPs nos cinco estádios do desenvolvimento da semente.

## 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Banco de dados

A primeira versão completa do genoma de *Ricinus communis*, efetuada pelo método de sequenciamento “Whole Genome Shotgun” (WGS), apresenta uma cobertura de 4X dos aproximados 400 Mpb do genoma desta planta e está gratuitamente disponível para acesso desde 2006 (<http://castorbean.jcvi.org/>), bem como, uma biblioteca de aproximadamente 50.000 “ESTs” de vários tecidos (JCVI, 2006). Este banco de dados disponibiliza para acesso, na sua última atualização (22/05/2008), cinco arquivos no formato FASTA: (i) um arquivo, contendo 25.852 sequências não processadas do WGS; (ii) um arquivo contendo 31.221 sequências de genes contendo éxons e íntrons; (GASPAR-OLIVEIRA *et al.*) um arquivo disponibilizando 31.321 sequências codificantes (CDS); (iv) um arquivo com 31.221 sequências de proteínas (tradução das CDS); (v) um arquivo disponibilizando os 53.501 “ESTs” de *R. communis*.

### 3.2 Buscas de sequências potenciais de RIPs e lectinas de mamona

Utilizando os bancos de sequências de sequências codificantes (CDS) e genômicas (gDNA), as buscas das sequências prováveis de RIPs de mamona foram efetuadas metodologias de bioinformática, utilizando o algoritmo tBLASTn da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), versão 2.2.21 no seu formato “stand-alone”, sob os seguintes comandos:

- Formatação dos bancos de sequências:  
formatdb -d nome do banco de sequências a ser inspecionado -p f -o t
- Procura de prováveis RIPs nos banco de sequências  
blastall -p tblastn -d nome do banco de sequências a ser inspecionado  
-i nome do arquivo com as sequências iscas -o nome do arquivo de saída
- Resgate das sequências resultantes do BLAST  
fastacmd -d nome do banco de sequências inspecionado -i nome do arquivo com os códigos das sequências de potenciais RIPs

Para todas as buscas com a ferramenta BLAST, as sequências da ricina (X52908.1) e aglutinina (M12089.1), disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) foram utilizadas tanto na primeira versão dos bancos de sequências (acessada em março de 2008) quanto na segunda (acessada em agosto de 2009). Para a busca de lectinas, no genoma da mamona, a ferramenta BLAST, no formato “stand-alone”, foi utilizada a cadeia  $\beta$  da ricina como isca.

As sequências de todas as RIPs de Magnoliopsida foram resgatadas por procura nominal, baseados no trabalho Girbés e colaboradores (2004) (GIRBES *et al.*, 2004) no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) e por BLAST “stand-alone” no “TIGR Transcript Assemblies” (<ftp://ftp.tigr.org/pub/data/plantta/>) usando a sequência da ricina (X52908.1) como isca.

### **3.3 Análises das RIPs, alinhamentos e filogenias**

As sequências codificantes das potenciais RIPs de mamona foram traduzidas *in silico* e posteriormente verificadas quanto às assinaturas de RIPs no banco de dados InterPro (HUNTER *et al.*, 2009), o qual integra 14 bancos de dados de assinaturas de proteínas. Para calcular o peso molecular de cada uma das RIPs putativas, foi utilizado o servidor ExPASy de proteômica (<http://www.expasy.ch/>).

As sequências foram alinhadas com o programa MEGA 4.1 (TAMURA *et al.*, 2007) com parâmetros padrões e posterior correções manuais. Uma vez alinhadas as sequências, a conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para a atividade RIP e lipolítica foram analisados manualmente. O algoritmo BL2seq da ferramenta BLAST foi utilizado para comparar sequências codificantes com genômicas, para revelar a posição e tamanho dos íntrons, caso esses estivessem presentes.

Para a construção de árvores filogenéticas, as sequências foram analisadas pelo método Bayesiano (2 milhões de gerações), com auxílio do programa MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) e pelo de Máxima Verossimilhança (1000 replicatas), com o programa PAUP 4.1

(WILGENBUSCH & SWOFFORD, 2003). O programa Modeltest 3.7 (POSADA, 2003) foi utilizado para calcular o melhor modelo evolutivo para análise de Máxima Verossimilhança e o programa MrModeltest 2.2 foi utilizado para verificar o melhor modelo evolutivo para análise bayesiana.

Para a construção de árvores filogenéticas das RIPs de mamona, somente as sequências equivalentes às cadeias  $\alpha$  da ricina e aglutinina foram utilizadas. Para a análise Bayesiana se utilizou do modelo evolutivo GTR+I+G, enquanto que o melhor modelo evolutivo para a análise de Máxima Verossimilhança foi HKY+I+G.

Para a construção das árvores filogenéticas das lectinas com as cadeias  $\beta$  das RIPs de mamona as análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança utilizaram os modelos evolutivos GTR+G e TVM+G, respectivamente. As sequências contendo as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da abrina (RIP de *Abrus precatorius*) foram utilizadas como grupo externo nas análises filogenéticas das RIP e lectinas de mamona, respectivamente.

As sequências das cadeias  $\alpha$  de todas as RIPs de Magnoliopsida foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética, com o programa MEGA 4.1 pelo método "Neighbor-Joining" (SAITOU & NEI, 1987).

O programa Gendoc foi utilizado para editar e ilustrar a conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para atividade RNA glicosidase e lipolítica das RIPs de mamona. Os modelos cristalográficos da ricina (código pdb 2AAI) e aglutinina (código pdb 1RZO) foram utilizados com o programa Swiss-Pdb-Viewer 4.1 (GUEX & PEITSCH, 1997), para ilustração dos resíduos de aminoácidos importantes para as atividades RIP e lipase.

### **3.4 Material Biológico e extração de DNA e RNA total, síntese de DNA complementar (cDNA) e projeção de oligonucleotídeos iniciadores**

#### **3.4.1 Material Biológico e separação dos estádios da semente**

Cachos de *R. communis*, cultivar Al Guarany, contendo frutos em diferentes estádios de desenvolvimento foram seccionados da planta e estocados em ambiente refrigerado para posterior dissecção dos frutos.

Em laboratório, os frutos foram dissecados manualmente e cinco estádios da semente, baseados em critérios morfológicos, foram separados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer até extração de RNA total.

O estádio S1 apresenta semente com aprox. 0,5 cm de largura, coloração verde-amarelada, sem testa e carúncula, o estádio S2 a semente tem aprox. 1 cm de largura, coloração amarela clara, sem testa e com início da formação da carúncula, S3 com semente com aprox. 1 cm de largura, coloração amarela com manchas escuras, início da formação da testa e maturação da carúncula, S4 apresenta semente com aprox. 1 cm de largura, coloração marron escura, com testa e carúncula formadas e S5 onde a semente está madura.

#### **3.4.2 Extração de DNA**

As folhas de *R. communis* cultivar Al. Guarany foram pulverizadas com pistilo e cadinho em nitrogênio líquido, e aproximadamente 100 mg de folha pulverizada foi utilizada para a extração de DNA com auxílio do kit PureLink™ (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A amostra de DNA foi diluída na proporção de 1:100 e estocada em freezer (-20 °C) para posterior utilização.

### **3.4.3 Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total foram utilizadas sementes dos cinco estádios da semente de *R. communis* cultivar Al. Guarany anteriormente citados, folhas da mesma cultivar, também foram utilizadas para extração de RNA.

Em torno de 100 mg de sementes e folhas, foram pulverizadas separadamente com pistilo e cadinho em nitrogênio líquido e utilizadas para a extração de RNA total com auxílio do kit NucleoSpin<sup>®</sup> (MN), seguindo as instruções do fabricante. Ao final da extração, o RNA foi eluído em 60µL de água deionizada e livre de nucleases, disponibilizada pelo fabricante.

Devido ao alto grau de DNA genômico contaminante nas amostras de RNA total de folhas e sementes, bem como a alta degradação e contaminação por lipídeos no RNA total de semente, foi necessária a utilização do kit de purificação de RNA mensageiro PolyTtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems (Promega), o qual foi utilizado conforme as especificações do fabricante. O RNA mensageiro purificado foi eluído em 50 µL e estocado a -80°C, para posterior utilização. A integridade e qualidade do RNA total foram avaliadas pela presença de bandas, correspondentes ao RNA ribossomal em gel de agarose 1,5% corado com o fluoróforo SYBR-Gold (Invitrogen).

Para a extração de RNA de sementes, cada estádio foi representado por um conjunto de três a quatro sementes, e realizado em quadruplicata biológica.

### **3.4.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)**

Aproximadamente 2µg de RNA mensageiro purificado e o oligo poli25TV (1µg) foram misturados e tiveram seu volume final ajustado em 10µL com água deionizada livre de RNase para posterior desnaturação à 70°C por 5 minutos. Após essa etapa, o tubo contendo o RNA mensageiro purificado e desnaturado foi rapidamente transferido para banho de gelo. Posteriormente, foram adicionados 2 µL de dNTPs (5mM), 6 µL de tampão de reação 5X, 1 µL transcriptase reversa M-MLV (200U/µL) e água deionizada livre de RNase, totalizando 30 µL. A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 40°C por 1 h. O cDNA produzido foi

diluído na proporção de 1:10 em água deionizada livre de RNase e estocado a -80°C. A partir desta diluição, uma segunda diluição foi feita, na proporção de 1:100, a qual foi utilizada para os experimentos. Cada reação de síntese de cDNA ocorreu em duplicata.

### **3.5 Escolha de genes de referência para PCR quantitativa (RT-qPCR)**

Baseando-se em trabalhos de escolha de genes de referência em *Arabidopsis thaliana* (REMANS *et al.*, 2008) e soja (HU *et al.*, 2009), 14 genes foram escolhidos para análise de expressão gênica em sementes de mamona. Dentre esses, os que apresentaram maior estabilidade de expressão gênica foram utilizados na normalização dos dados de RT-qPCR.

As sequências dos genes de *Arabidopsis* que codificam Actina 2/7 (Act 2/7), Actina 11 (Act 11), Clatrina (Cla), Ciclofilina (Cic), Fator de Elongação  $\alpha$  e  $\beta$  (EF  $\alpha$  e  $\beta$ ), Glicerol-6-Fostato-Desidrogenase (GP6DH), uma Proteína Hipotética (Hip), Transportador de Fostato (TIP), Tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  (Tub  $\alpha$  e  $\beta$ ), Ubiquitina (BUSTIN *et al.*), Proteína de Conjugação de Ubiquitina (UBC e UBC9), foram utilizadas como isca para a procura de genes ortólogos em mamona, através da ferramenta BLAST. A partir destes genes, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos.

A análise da estabilidade dos 14 genes candidatos, como referência para RT-qPCR nos cinco estádios da semente de mamona foi efetuada com o programa geNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

### **3.6 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores**

A ferramenta Primer3 (ROZEN & SKALETSKY, 2000) foi utilizada para projeção dos oligos senso e anti-senso, utilizados tanto para as Reações de Cadeia de Polimerase qualitativas e quantitativas, quanto para as reações de sequenciamento. Os oligos foram desenhados, para formarem após amplificação por PCR, produtos com 100 a 250 pares de base. Os oligos, também foram projetados para, sempre que possível, se hibridizarem na região 3' dos genes de

referência e das RIPs e para que a região delimitada pelos oligos contenha íntrons, possibilitando identificar contaminação de DNA genômico nas amostras de cDNA. Isso permite a eliminação de falsos positivos, nas reações de RT-qPCR (BUSTIN, 2009, BUSTIN *et al.*, 2009). Todos os oligos apresentados no presente trabalho, foram projetados com a temperatura de “melting” (CZECHOWSKI *et al.*) de 60 °C, com intuito de facilitar a padronização das PCRs.

### **3.7 PCR qualitativa (RT-PCR), PCR quantitativa (RT-qPCR) e sequenciamento nucleotídico**

#### **3.7.1 RT-PCR**

As RT-PCRs foram realizadas sob as condições descritas abaixo:

Em 10 µL de DNA genômico (100ng/µL) ou cDNAs diluídos 1:100 ( $\geq 0,1$ ng/µL), foram adicionados 0,4 µL de oligos senso e anti-senso (0,5 µM); 0,4 µL de dNTP (5 mM); 2 µL tampão de reação 10X (Tris-HCl 100mM, pH 8,0); 1,2 µL MgSO<sub>4</sub> (50 mM); 0,05 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (5U/µL) e 6,35µL de água deionizada autoclavada, resultando em 20 µL de reação.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho Viriti (Applied Biosystems), sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 10 s e 72 °C por 15 s. Uma alíquota de 10 µL dos produtos de PCR para cada gene de referência e RIP de mamona foi resolvida em gel de agarose 2%, corado com o fluoróforo “SYBR-Gold”.

#### **3.7.2 RT-qPCR**

As RT-qPCRs foram realizadas sob as seguintes condições:

Em 10 µL de cDNA diluídos 1:100 ( $\geq 0,1$ ng/µL), foram adicionados 0,4 µL de oligos senso e anti-senso (0,5 µM); 0,4 µL de dNTP (5 mM); 2 µL tampão de reação 10X (Tris-HCl 100mM, pH 8,0); 1,2 µL MgSO<sub>4</sub> (50 mM); 2 µL de SYBR Green (1X), 0,05 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (0,25U) e 4,35 µL de água deionizada autoclavada, resultando em 20µL de reação.



As RT-qPCRs foram realizadas no equipamento 7500 Real Time System (Applied Biosystems), tendo uma etapa inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 10 s e 72 °C por 15 s. Posteriormente as amostras foram mantidas a 50°C por 2 min e aquecidas até 99°C (0,4°C/s), para obtenção da curva de dissociação ou desnaturação. Todas as reações de RT-qPCR ocorreram em quadruplicatas e os cálculos de expressão relativa foram feitos pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão de todas *Rcom* RIPs sendo efetuada com os valores obtidos no estádio S1.

### **3.7.3 Sequenciamento de DNA**

A especificidade de todos oligonucleotídeos iniciadores e a identidade dos produtos de PCR originados de DNA, cDNA de folhas e sementes foram analisadas, por sequenciamento no sequenciador automático Genetic Analyzer ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems), pertencente ao Centro de Biotecnologia/UFRGS.

Em aproximadamente 50ng de cada produto de PCR foram adicionados 5 pmol de um oligonucleotídeo iniciador, 2 µL de tampão de reação, 1 µL de marcador ("Big Dye") e água deionizada até o volume de 10µL. A reação de termociclagem ocorreu por uma etapa inicial de desnaturação de 96°C, por 3 minutos, seguida por 25 ciclos de 96°C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60°C por 4 minutos. Ao final desta reação, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, e posteriormente lavadas com etanol 60%. Depois de secas, foi adicionado formamida às amostras, as quais foram desnaturadas (95°C por 5 minutos) e injetadas no sequenciador.

### 3.8 Análises estatísticas dos dados de expressão por RT-qPCR

Os dados de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) foram submetidos aos testes de normalidade e de homogeneidade da variância, que indicaram a necessidade de transformação logarítmica dos dados ( $\log x$ ).

A análise de variância dos dados de expressão relativa foi realizada com o programa Sisvar (versão 5.0), ao nível de significância estatística de 5% de probabilidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (11x5), no qual foram estudados os efeitos de dois fatores, genes expressos (11) e estádios do desenvolvimento da semente (5). Foi adotada a estratégia de análise dos desdobramentos dos graus de liberdade de um fator dentro de cada nível do outro fator, quando a interação for significativa ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 1% de probabilidade.

Aos dados de expressão do estágio S1, utilizados na normalização dos resultados de expressão, foi atribuído o valor de "1", que ao ser corrigido pelo  $\log x$ , foram transformado para o valor zero.

## **4.0 RESULTADOS:**

### **4.1 Buscas de sequências potenciais de RIPS e lectinas de mamona**

As buscas por sequências de genes parálogos à ricina e aglutinina, bem como de potenciais RIPS do tipo I de mamona com a ferramenta BLAST, revelaram 20 sequências putativas de RIPS na primeira versão e 18 na segunda versão do banco de dados, onde todas as sequências, independentemente da versão apresentaram E-value inferior a  $10^{-150}$  (dados não mostrados) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Códigos de acesso das sequências codificantes e a anotação das sequências das potencias RIPs de mamona, segundo o "Castor Bean Genome Database", para as versões I (2006) e II (2008).

Versão I		Versão II		Acrônimos
Acessos	Anotações	Acessos	Anotações	
29638.m000512	gelonin precursor	29638.m000512	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 1
29638.m000513	gelonin precursor	29638.m000513	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 2
29995.m000173	gelonin precursor	60638.m00022	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 3
28842.m000952	gelonin precursor	28842.m000952	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 4
29852.m001982	gelonin precursor	29852.m001982	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 5
29942.m000748	gelonin precursor	29942.m000748	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 6
30113.m001449	gelonin precursor	30113.m001449	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 7
29995.m000170	conserved hypothetical protein	60638.m00025	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPI 8
59679.m000011 44148.m000007	ricin precursor	60629.m00002	ricin precursor	<i>Rcom</i> RIPII 1
28274.m000033	agglutinin precursor	60637.m00004	agglutinin precursor	<i>Rcom</i> RIPII 2
29995.m000175	ricin precursor	60638.m00019	ricin homolog partial	<i>Rcom</i> RIPII 3
29995.m000180	agglutinin precursor	60638.m00018	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 4
29988.m000128	conserved hypothetical protein	29988.m000128	ricin homolog partial	<i>Rcom</i> RIPII 5
29988.m000125	ricin precursor	29988.m000125	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 6
29995.m000171	ricin precursor	60638.m00023	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 7
28274.m000034	ricin precursor	60637.m00006	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 8
28274.m000037	ricin precursor		sequência removida	<i>Rcom</i> RIPII 9
29791.m000533	ricin precursor	29791.m000533	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 10
29942.m000749	nigrin b precursor	29942.m000749	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> RIPII 11
29995.m000177	conserved hypothetical protein		sequência removida	<i>Rcom</i> RIPII 12

Alinhamentos das sequências de ambas liberações com a da ricina (*Rcom* RIPII 1) e aglutinina (*Rcom* RIPII 2), revelaram que a primeira parte da CDS da ricina era representada pelos acessos: 59679.m000011, e a segunda parte pelo acesso 44148.m000007 (dados não mostrados), porém esses acessos foram substituídos pelo 60629.m000002 (Tabela 1). A aglutinina foi representada pelo acesso 28274.m000033 na primeira liberação e pelo acesso 60637.m000004 na segunda liberação (Tabela 1).

Além das alterações de outros códigos de acesso entre as duas liberações, existem duas sequências (*Rcom* RIPII 9 e *Rcom* RIPII 12) que foram removidas na segunda liberação (Tabela 1). Contudo, essas sequências foram mantidas para análises posteriores, resultando em 20 potenciais sequências codificadoras de RIPs.

As anotações das sequências apresentaram alterações entre as duas liberações, sendo que a maioria das sequências recebeu a designação de pertencente à família da ricina e aglutinina (“ricin-agglutinin-family”) (Tabela 1).

A busca de lectinas, por “BLAST” no banco de sequências codificantes de mamona, utilizando a sequência da cadeia  $\beta$  da ricina, resultou em sete sequências na primeira liberação e cinco na segunda liberação, devido à remoção de duas sequências (Tabela 2).

As designações das potenciais lectinas de mamona foram alteradas de proteínas hipotéticas conservadas (liberação I) para membros da família da ricina e aglutinina (Tabela 2).

Para as análises posteriores, foram consideradas as sete lectinas putativas, denominadas de *Rcom* Lec 1-7 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Códigos de acesso das sequências codificantes e a anotação das sequências das potencias lectinas de mamona, segundo o "Castor Bean Genome Database", para as liberações I (2006) e II (2008).

Liberação I		Liberação II		Acrônimos
Acessos	Anotações	Acessos	Anotações	
29988.m000129	conserved hypothetical protein	29988.m000129	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> Lec 1
28750.m000015	conserved hypothetical protein	28750.m000015	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> Lec 2
54157.m000007	conserved hypothetical protein	54157.m000007	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> Lec 3
59846.m000010	conserved hypothetical protein	59846.m000010	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> Lec 4
29995.m000176	conserved hypothetical protein		sequência removida	<i>Rcom</i> Lec 5
29995.m000174	conserved hypothetical protein		sequência removida	<i>Rcom</i> Lec 6
59846.m000009	conserved hypothetical protein	59846.m000009	ricin-agglutinin family	<i>Rcom</i> Lec 7

#### 4.2 Análises das sequências potenciais de RIPs e lectinas de *R. communis* e conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para as atividades RIP e lipolítica.

Todas as 20 sequências codificantes de RIPs e 7 de lectinas foram traduzidas *in silico* e analisadas contra o banco de assinaturas protéicas InterPro.

As sequências peptídicas das potenciais RIPs (incluindo a ricina e a aglutinina) apresentaram assinaturas de Proteínas Inativadoras de Ribossomos em no mínimo quatro bancos de assinaturas. As lectinas putativas também apresentaram assinaturas de cadeias  $\beta$ .

As sequências de RIPs e lectinas que foram retiradas da segunda liberação, também apresentaram as assinaturas correspondentes à RIPs e cadeias  $\beta$ .

O alinhamento das 20 sequências peptídicas revelou que oito não apresentavam a região relativa à cadeia  $\beta$  das RIPs do tipo II, sugerindo que estas proteínas pertencem às RIPs do tipo I. As oito sequências receberam o acrônimo de *Rcom* RIPI (1-8) e as demais foram nomeadas de *Rcom* RIPII (1-12), sendo que a ricina denominada de *Rcom* RIPII1 e a aglutinina de *Rcom* RIPII2 (Tabela 1). Cada sequência peptídica teve o seu peso molecular calculado pelo servidor de análises proteômicas ExpASy (Tabela 3).

**Tabela 3.** Peso molecular teórico (kDa) das 20 RIPs putativas de mamona

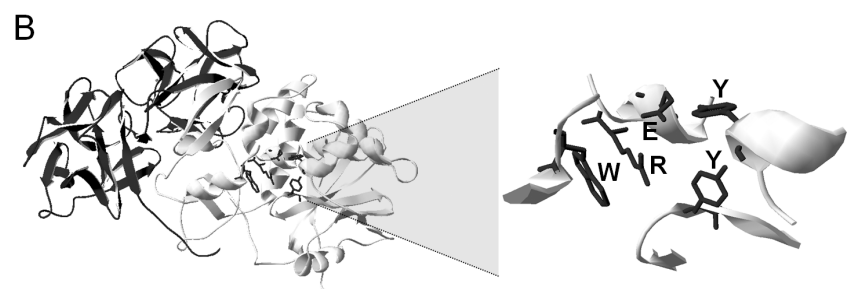
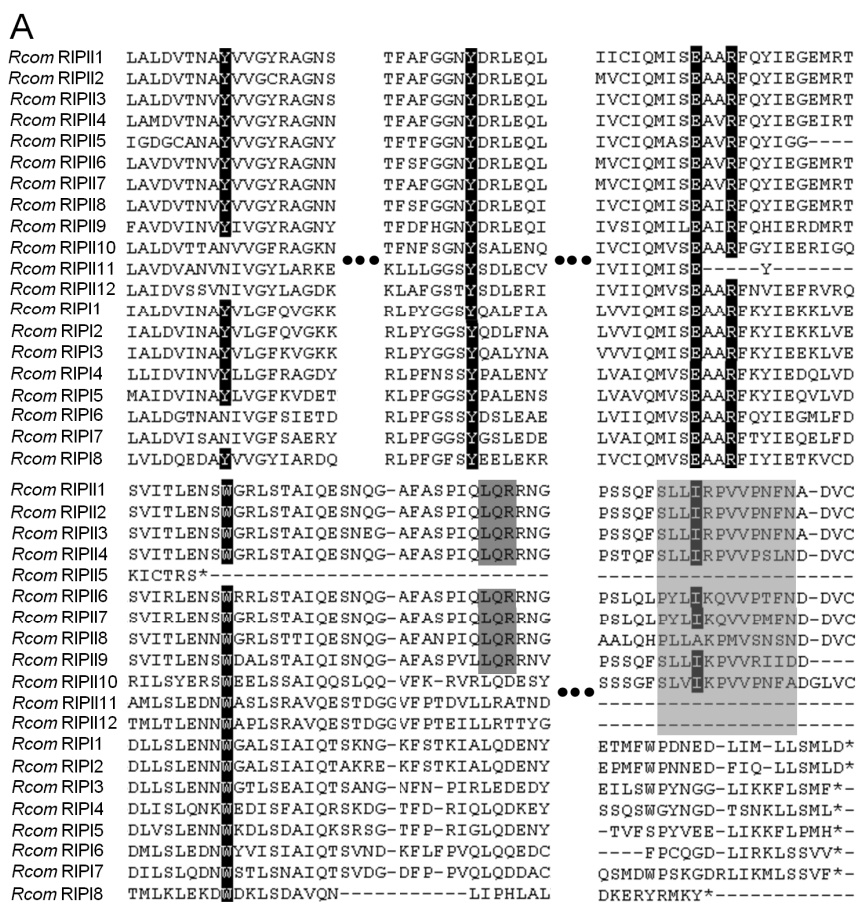
<b>Acrônimos</b>	<b>PM (kDa)</b>
<i>Rcom</i> RIPI 1	30
<i>Rcom</i> RIPI 2	30.2
<i>Rcom</i> RIPI 3	33.7
<i>Rcom</i> RIPI 4	31.2
<i>Rcom</i> RIPI 5	33.3
<i>Rcom</i> RIPI 6	34
<i>Rcom</i> RIPI 7	34.6
<i>Rcom</i> RIPI8	40.5
<i>Rcom</i> RIPII 1	67.5
<i>Rcom</i> RIPII 2	67.2
<i>Rcom</i> RIPII 3	47.7
<i>Rcom</i> RIPII 4	64.3
<i>Rcom</i> RIPII 5	22.6
<i>Rcom</i> RIPII 6	64.6
<i>Rcom</i> RIPII 7	58.1
<i>Rcom</i> RIPII 8	65.1
<i>Rcom</i> RIPII 9	38.2
<i>Rcom</i> RIPII 10	63.9
<i>Rcom</i> RIPII 11	47.7
<i>Rcom</i> RIPII 12	51.7

A partir dos alinhamentos com as sequências peptídicas, foi feita a análise da conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para a atividade RIP (Figura 5A, B).

Os dois resíduos de tirosina são muito conservados, sendo que o segundo resíduo de Tyr está presente em todas *Rcom* RIPs. O sítio ativo, que promove a depurinação da amina ribossomal, composto por um resíduo de glutamato e um resíduo de arginina, também apresenta grande conservação, com exceção da *Rcom* RIPII 11, onde o resíduo de Arg está ausente. O resíduo de triptofano, relacionado à estabilidade do sítio ativo, porém, está ausente somente na *Rcom* RIPII 5, pois essa apresenta um códon de terminação, antes da posição relativa do resíduo de Trp (Figura 5A).

O motivo Leu-Gln-Arg, responsável pelo direcionamento vacuolar em algumas lectinas, está totalmente conservado em 8 das 12 *Rcom* RIPs do tipo II e o peptídeo de ligação, também apresenta elevada conservação, estando ausente nas *Rcom* RIPII 11 e 12 (Figura 5A). O resíduo de isoleucina, caracterizado como

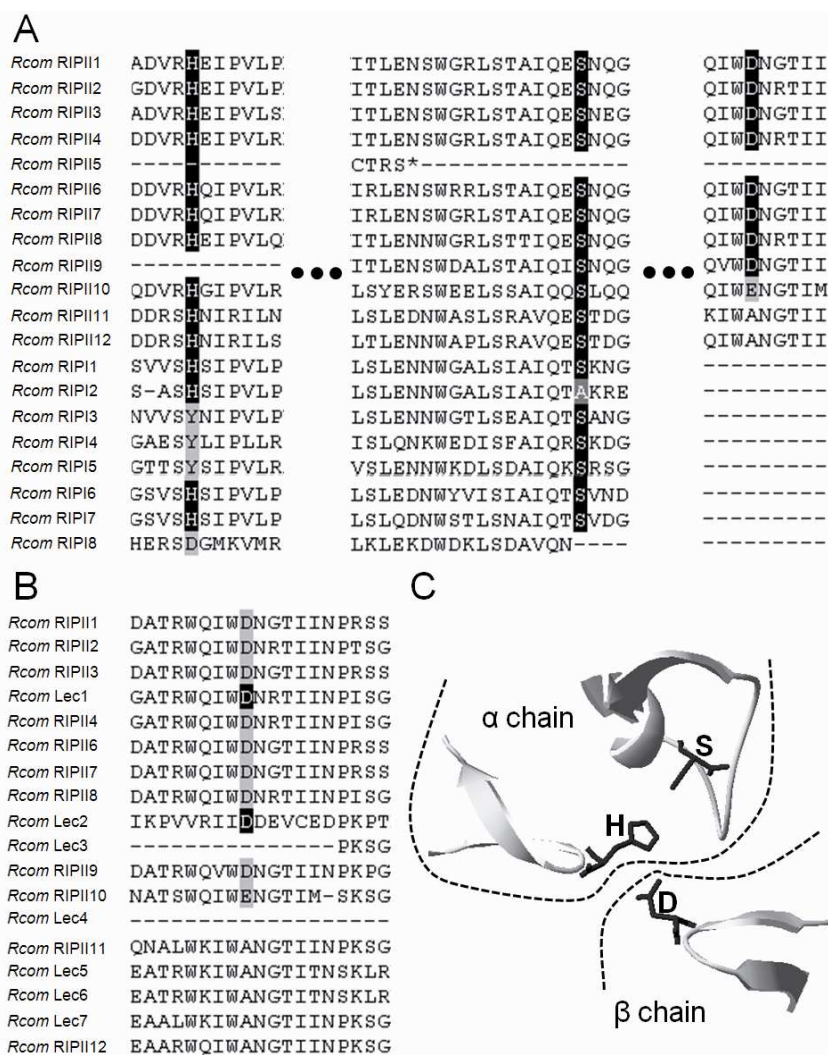
essencial para direcionamento vacuolar tem alta conservação, com exceção da *Rcom* RIPII 8, na qual há a substituição da isoleucina por alanina.



**Figura 5.** Conservação e posição relativa dos resíduos de aminoácidos críticos para a atividade RNA glicosidase. A) Alinhamento peptídico das 20 *Rcom* RIPs: em fundo preto, os resíduos críticos a atividade RIP e de direcionamento vacuolar, em fundo cinza escuro o motivo de direcionamento vacuolar L-Q-R, em cinza claro está a posição relativa do peptídeo de ligação. B) Estrutura cristalográfica da ricina (2AA1), contendo as cadeias  $\alpha$  (cinza claro)  $\beta$  (preto). No detalhe, a região do sítio ativo.



Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo que promovem a atividade lipolítica (Figura 6C), também apresentam alto grau de conservação. O primeiro resíduo da tríade catalítica, uma histidina está ausente nas *Rcom* RIPII 5 e 9, sendo substituída por um resíduo de tirosina, nas *Rcom* RIPI 3, 4 e 5 por um aspartato na *Rcom* RIPI 8 (Figura 6A).

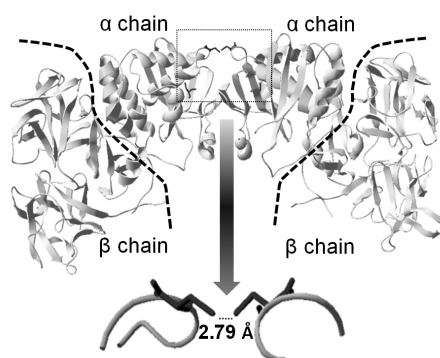


**Figura 6.** Conservação e posição relativa dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo da atividade lipolítica. A) Alinhamento peptídico das 20 *Rcom* RIPs. Em fundo preto, os resíduos do sítio ativo, em fundo cinza, as substituições destes resíduos. B) Alinhamento peptídico das 12 cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPs do tipo II, com as 7 *Rcom* Lecs. Em fundo preto, o resíduo de Ácido Aspártico das *Rcom* Lec 1 e 2. C) Estrutura cristalográfica da ricina (2AA1), enfatizando a região do sítio ativo.

O resíduo de serina, que promove o ataque nucleofílico ao substrato, está ausente na *Rcom* RIPII5 e substituído por um resíduo de alanina na *Rcom* RIPI2 (Figura 6A). O terceiro resíduo do sítio ativo, um aspartato, presente na cadeia  $\beta$ , está ausente em todas as *Rcom* RIPs do tipo I, devido ao fato destas não possuírem esta cadeia. A *Rcom* RIPII 10 apresenta um resíduo de glutamato no lugar de Asp, enquanto as *Rcom* RIPII 11 e 12 têm o resíduo de aspartato substituído pelo resíduo de alanina (Figura 6A).

A conservação do resíduo de aspartato também foi analisada nas lectinas de mamona, as quais receberam o acrônimo de *Rcom* Lecs (1-7) (Figura 6B). Somente as *Rcom* Lec 1 e 2, apresentam o resíduo de Asp, na posição relativa às demais cadeias  $\beta$ , enquanto que nas *Rcom* Lec 3 e 4, o aspartato está ausente. As *Rcom* Lec 5, 6 e 7 apresentam substituição de Asp por Ala, da mesma forma que as cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPII 11 e 12 (Figura 6B).

As diferenças de sequência peptídica entre a ricina, que forma o dímero ( $\alpha\beta$ ), com a aglutinina, que forma um tetrâmero ( $\beta\alpha\alpha\beta$ ) (ROBERTS *et al.*, 1985), quando analisadas junto com o modelo cristalográfico da aglutinina, foi possível notar que um dos pares de resíduos de cisteína se localiza em uma região muito favorável para formação de uma ponte dissulfeto (Figura 7), a qual poderia auxiliar na formação do tetrâmero. Curiosamente as demais *Rcom* RIPs não apresentam os resíduos de Cys nesta posição (dados não mostrados).

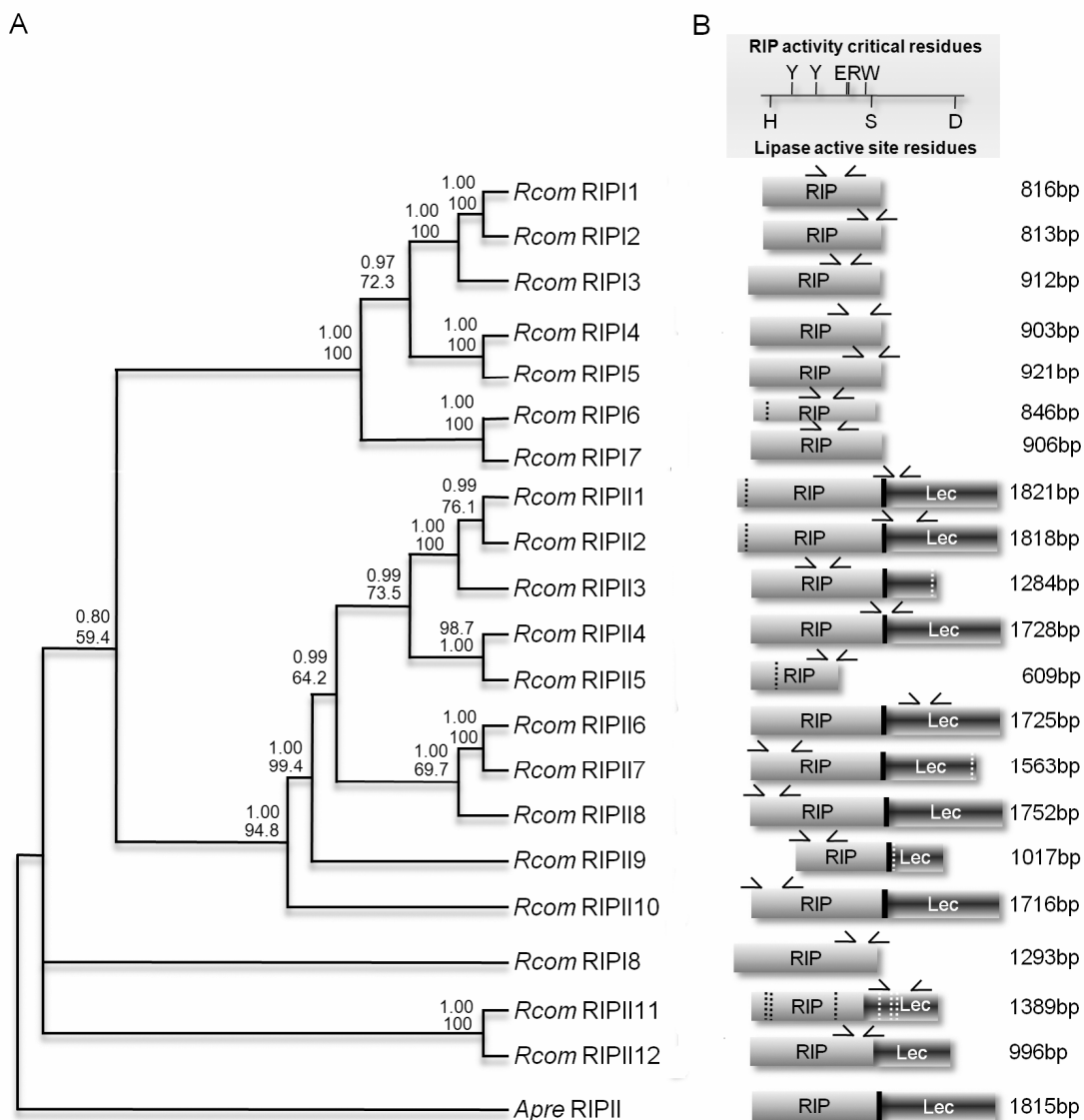


**Figura 7.** Modelo cristalográfico da aglutinina (1RZO), com resolução de 2.37Å. No detalhe a posição das cisteínas, que podem auxiliar na formação de tetrâmero.

### 4.3 Análises filogenéticas das *Rcom* RIPs e *Rcom* Lecs

As construções de árvores filogenéticas pelo método Bayesiano e de Máxima Verossimilhança das cadeias  $\alpha$  das *Rcom* RIPs, revelaram a formação de dois grupos principais, o primeiro referente às *Rcom* RIPs do tipo I e o segundo, compreendendo as *Rcom* RIPs do tipo II (Figura 8A). A exceção destes dois grupos, são as *Rcom* RIPI 8 e *Rcom* RIPII 11 e 12, as quais não agruparam com seu respectivo grupo.

Os acrônimos das Proteínas Inativadoras de Ribossomos de mamona (*Rcom* RIPs) foram listados de acordo com a posição na árvore filogenética, iniciando pelo membro mais recente, desta forma, a ricina recebeu o acrônimo de *Rcom* RIPII 1 e a aglutinina de *Rcom* RIPII 2 (Figura 8 A).



**Figura 8.** Árvore filogenética e análise estrutural dos genes que codificam as *Rcom* RIPs. A) Árvore filogenética, demonstrando o padrão evolutivo das *Rcom* RIPs, valores de probabilidade *posteriore* das análises de Máxima Verossimilhança (superiores) e de “Bootstrap” da análise Bayesiana (inferiores) estão indicados. A sequência da cadeia  $\alpha$  da Abrina (*Abrus precatorius*) foi utilizada como raiz da árvore. B) análise estrutural gênica das *Rcom* RIPs, demonstrando a posição relativa dos resíduos de aminoácidos críticos à atividade RIP e do sítio ativo promotor da atividade lipolítica. Os tamanhos da sequências codificantes, número e posição do íntrons (linha pontilhadas), posição do oligos utilizados para PCR e qRT-PCR (setas), posição relativa da cadeia  $\alpha$  (cinza claro), peptídeo de ligação (preto) e cadeia  $\beta$  (cinza escuro) estão indicados.

A construção filogenética demonstra que, em *R. communis*, os eventos de duplicação gênica de cada grupo, ocorreram de maneira independente, e que a *Rcom* RIPII 1 (ricina) e a *Rcom* RIPII 2 (aglutinina) resultaram de uma duplicação gênica recente (Figura 8A). As *Rcom* RIPII 4 e 5, também são resultados de duplicação gênica de um ancestral comum, porém neste caso, provavelmente ocorreu um evento de duplicação parcial, ou de duplicação de todo gene com subsequente perda da cadeia  $\beta$  da *Rcom* RIPII 5 (Figura 8A, B).

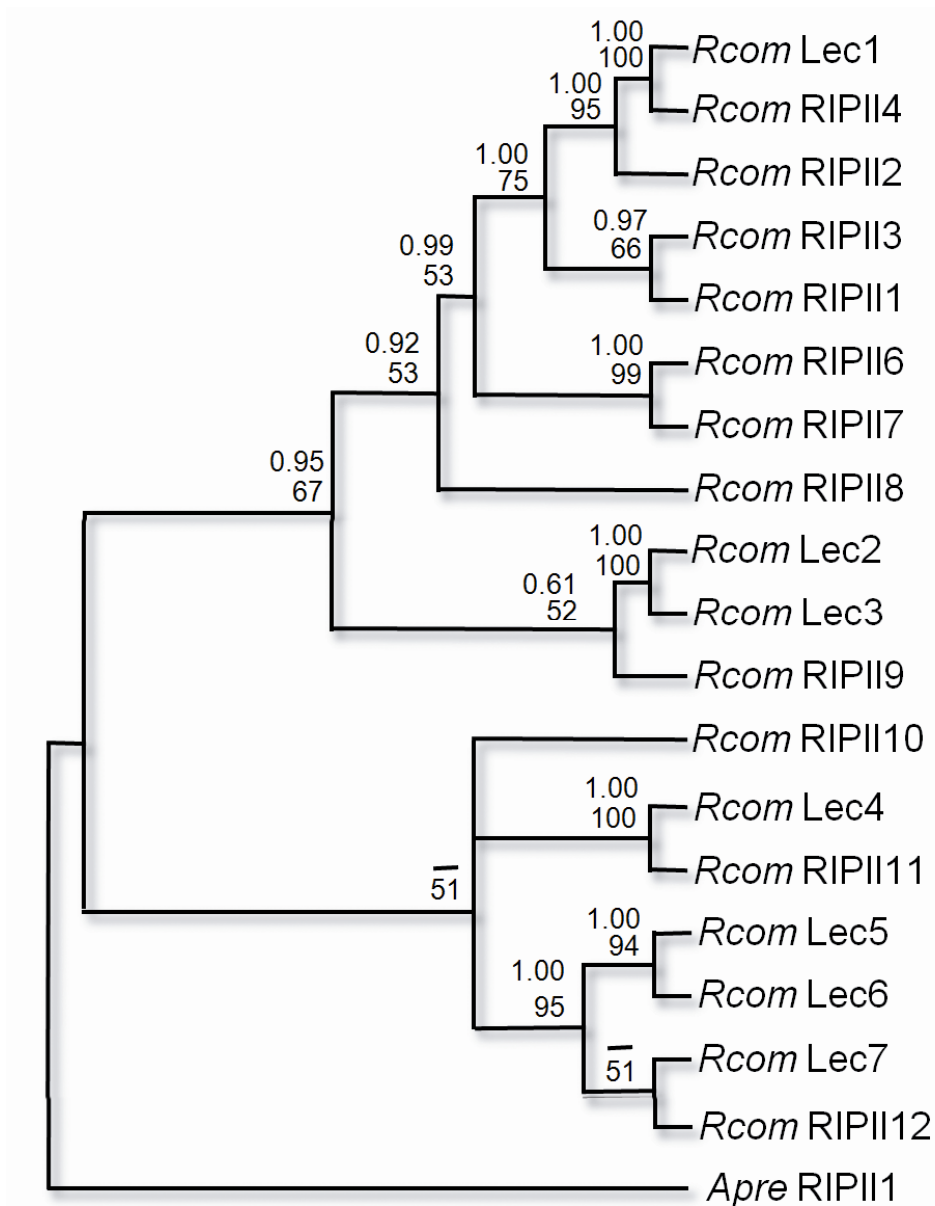
As comparações de sequências genômicas e codificantes, pelo algoritmo BL2seq, permitiram identificar e posicionar íntrons das *Rcom* RIPs, bem como os alinhamentos destas permitiram encontrar as regiões relativas às cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  e o peptídeo de ligação (Figura 8B).

Entre as 20 *Rcom* RIPs, oito apresentam íntrons, mas somente a *Rcom* RIPII 11 apresenta mais de um íntron. Dentre as *Rcom* RIPs do tipo I somente a *Rcom* RIPI 6 possui um íntron (Figura 6B). A delimitação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  e do peptídeo de ligação pode revelar particularidades estruturais das *Rcom* RIPs (Figura 8B). O tamanho da cadeia  $\alpha$  é regular em todas as 20 *Rcom* RIPs, com exceção das *Rcom* RIPII 5 e 9, as quais são menores. O tamanho das cadeias  $\beta$  é mais variável, onde somente as *Rcom* RIPII 4, 6, 8 e 10 apresentam tamanhos similares às da ricina e da aglutinina. Apesar das variações das cadeias  $\beta$ , a posição relativa do peptídeo de ligação nas *Rcom* RIPs é estável, tendo como exceção as *Rcom* RIPII 11 e 12, as quais não apresentam este peptídeo (Figura 8B).

Uma árvore filogenética foi construída a partir das cadeias  $\beta$  e as *Rcom* Lecs, com a finalidade de encontrar a lectina ancestral que, por fusão gênica, originou as cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPs (Figura 9).

A árvore filogenética revelou que as *Rcom* Lec 1, 4 e 7 correspondem às potenciais lectinas ancestrais das cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPII 4, 11 e 12 e as *Rcom* Lec 2 e 3 são produtos de duplicação gênica, sendo que o ancestral dessas é comum à cadeia  $\beta$  das *Rcom* RIPII 9 (Figura 9). Contudo, a hipótese de que as *Rcom* Lecs sejam resultado de duplicação das cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPs do tipo II, não pode ser descartada.

Curiosamente a cadeia  $\beta$  da *Rcom* RIPII 1 (ricina) é mais relacionada à cadeia  $\beta$  da *Rcom* RIPII 3, do que a da *Rcom* RIPII2 (aglutinina), gerando uma topologia diferente na árvore da árvore das *Rcom* RIPs (Figura 8A).



**Figura 9.** Árvore filogenética das *Rcom* Lecs e cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIPs do tipo II. Valores de probabilidade *posteriore* das análises de Máxima Verossimilhança (superiores) e de “Bootstrap” da análise Bayesiana (inferiores) estão indicados. A sequência da cadeia  $\beta$  da Abrina (*Abrus precatorius*) foi utilizada como raiz da árvore filogenética.

#### 4.4 Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA

Reações em cadeia de Polimerase (PCR) foram realizadas com DNA e cDNA de folhas e sementes, com a finalidade de comprovar experimentalmente a existências das *Rcom* RIPs no genoma da mamona, e apresentar um indicativo de sua transcrição em mRNAs.

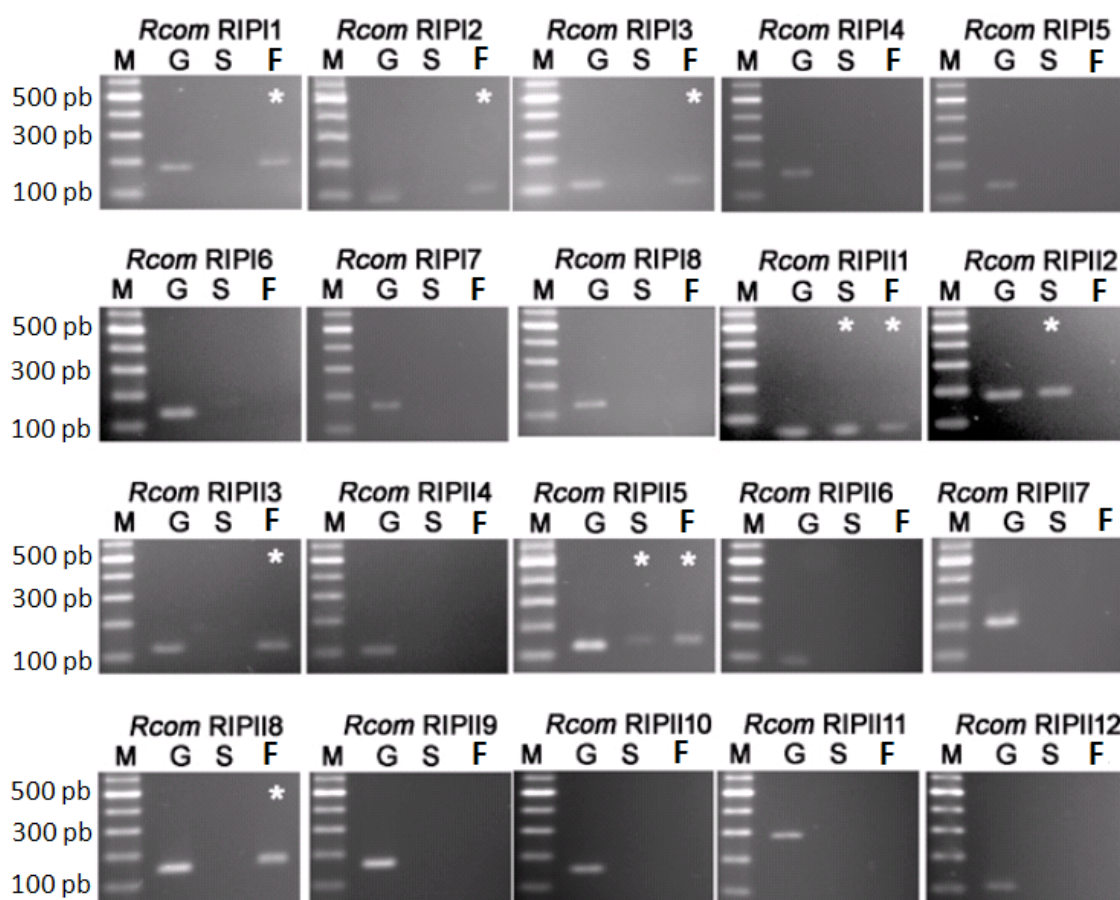
Todas as 20 *Rcom* RIPs apresentaram os produtos de PCR com o tamanho esperado, confirmando a existência das sequências depositadas no “Castor Bean Genome Database” (Tabela 4, Figura 10).

Devido aos tamanhos dos genes e baixo número de íntrons, só foi possível desenhar oligonucleotídeos iniciadores que flanqueassem íntrons para *Rcom* RIPII 11 (Tabela 4, Figura 8B, 9). Por causa da grande identidade de sequência entre as *Rcom* RIPs, não foi possível projetar iniciadores na extremidade 3’ do gene nas *Rcom* RIPI 2, 4, 5 e 8 e *Rcom* RIPII 5 (Figura 8B).

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos senso e anti-senso, utilizados na PCR e tamanho dos produtos de PCR para as 20 *Rcom* RIPs em estudo

Acrônimos	Sequências dos Oligos		Produtos de PCR (pb)
	Oligo senso	Oligo anti-senso	
<i>Rcom</i> RIPI1	TTAAgTATgCTTCCTCTCCTTCAACT	TgTCTgAATggCAATggAAA	197
<i>Rcom</i> RIPI2	AACCTATgATgggACTCTTgCTT	TTgACAgCAgCTggATgAAg	93
<i>Rcom</i> RIPI3	AATATATCgAggAAAAATTggTTgAg	TTgCAGATgTCTgAATTgCTTC	117
<i>Rcom</i> RIPI4	CCAAAACgAggggATTTgA	TgTggCCAAGTACAgCAAgA	183
<i>Rcom</i> RIPI5	AATAggATTgCAAgATgAAAACCTACC	gCATTggCAAgAACTTTTTgAT	146
<i>Rcom</i> RIPI6	AgAgAATACCACATTgggAACCTA	gCAgCCTCTgAAACCATTTg	129
<i>Rcom</i> RIPI7	gAgAgTACAACACTgggAAGTgg	CAATTCTTgCTCgATATATgTgAATC	156
<i>Rcom</i> RIPI8	gATACCATgCTTAAgCTCgAgAAg	TCCACTTTTTCTCCgCTCAC	138
<i>Rcom</i> RIPII1	gCgTATCgTAggTCgAAATgg	gCgTTTCCgTTgTgAATC	62
<i>Rcom</i> RIPII2	gAgCCCATAgTgCgTATCgTA	CTgTCCTggACTggACTTgg	198
<i>Rcom</i> RIPII3	TCACggATgTTCCAAATCC	TAAAgCgCTgAgATAgCATCC	130
<i>Rcom</i> RIPII4	gTgCACgTCCACCATCAA	CATTTcAgACCCgCgATAC	114
<i>Rcom</i> RIPII5	TTgTTTgCATCCAAATggC	gCAgATCTTCgATTgTgTCg	92
<i>Rcom</i> RIPII6	TTCAACCACTTACgggTACAA	TCTgggATTTATgATggTTCC	118
<i>Rcom</i> RIPII7	gCTCAACAATACCCAACgg	AAAgCTCTgCCTgATTTgTgA	200
<i>Rcom</i> RIPII8	ggTCATTCACATTgCAggATAgT	ACgTCATCTCCAgCTAATAATTgA	145
<i>Rcom</i> RIPII9	CTATTTCTTTCgCACTgACAATgA	CTCgATATCTTCTCTCgCACCT	160
<i>Rcom</i> RIPII10	TCAACCAgCTTggCgg	CTgTCACgCAgCACTggTAT	173
<i>Rcom</i> RIPII11	ggATATgCTTTggCAgCATC	TgCAggACTgCAAgATgAAA	183*
<i>Rcom</i> RIPII12	TTTggAAAACAACCTgggCAC	CgAggTATCgCgAACCATAA	110

\* DNA = 312 pb



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação dos genes das 20 *Rcom* RIPs utilizando DNA genômico (G), e cDNAs de sementes maduras (S) e folhas (F). O marcador de peso molecular é indicado pela letra “M”. Os asteriscos indicam amplificação ou possibilidade de expressão em dado tecido.

As reações de RT-PCR em sementes e folhas possibilitaram inferir sobre a expressão gênica das *Rcom* RIPs, onde as *Rcom* RIPII 1 e 5 demonstraram ser expressas em sementes e folhas, enquanto que a *Rcom* RIPII 2 é expressa somente em sementes. As reações de RT-PCR permitiram também demonstrar que as *Rcom* RIPI 1, 2, 3 e *Rcom* RIPII 3 e 8 apresentam expressão gênica somente em folhas (Figura 8).

Não foi possível detectar expressão das demais *Rcom* RIPs, provavelmente devido a estes genes não serem expressos nestes tecidos, ou à baixa sensibilidade da técnica.



O sequenciamento dos produtos de PCR das *Rcom* RIPs demonstrou que estes conferem com as sequências disponíveis no “Castor Bean Genome Database”, assim como os iniciadores utilizados são específicos para cada RIP de *R. communis* (dados não mostrados).

#### 4.5 Expressão das *Rcom* RIPs em cinco estádios da semente.

Com finalidade de analisar a expressão das *Rcom* RIPs com maior sensibilidade, durante cinco estádios do desenvolvimento da semente de mamona (Figura 11), foi empregada a técnica de RT-qPCR. Contudo, antes de analisar a expressão das *Rcom* RIPs, houve a necessidade de padronizar os genes de referência para normalização dos níveis de expressão obtidos por RT-qPCR.



**Figura 11.** Cinco estádio de desenvolvimento da semente de *R. communis* utilizados para extração de RNA e posterior análises de expressão dos genes de referência e *Rcom* RIPs por RT-qPCR. S1) semente com aprox. 0,5 cm de largura, coloração verde-amarelada, sem testa e carúncula; S2) semente com aprox. 1 cm de largura, coloração amarela clara, sem testa e com início da formação da carúncula; S3) semente com aprox. 1 cm de largura, coloração amarela com manchas escuras, início da formação da testa e maturação da carúncula; S4) semente com aprox. 1 cm de largura, coloração marrom escura, com testa e carúncula formadas; S5) semente madura.

#### 4.5.1 Padronização de genes de referência para RT-qPCR

Baseando-se em trabalhos publicados com genes de referência para RT-qPCR em *Arabidopsis* e soja, foram projetados 14 pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 5).

**Tabela 5.** Seleção de genes candidatos a serem utilizados como genes de referência para RT-qPCR em sementes de mamona.

Acessos	Anotações	Acrônimos	Oligos		Produto de PCR* (cDNA)	Tamanhos dos introns
			Senso	Anti-senso		
26613.m000365	Actina 11	Act 11	CCAaggCATTgCTgATAggAAT	ATTCTgCCTTTgCAATCCAC	166	333
29836.m002545	Actina 2/7	Act 2/7	TTgCAGACCgTATgAgCAAg	AAgCACTTCTATgACAATAgATg	199	101
30170.m014193	Ciclofilina	Cic	gggATTTTgTCgATggCTAA	ACgACTCTCCgAACACAAC	113	-
29827.m002545	Clatrina	Cla	CCATgTTTACAgCATCTggTTTAC	TgCTTTAgTTATATACCgAACCCACT	98	90
29904.m002922	Fator de Elongação 1 $\alpha$	EF $\alpha$	CTggTggTTTTgAAgCTggT	gTCggggTTATATCCACCT	200	455
29785.m000934	Fator de Elongação 1 $\beta$	EF $\beta$	gCAgTTCggAgCATTgAgAT	gTCgTCCACAATggTCATCA	108	108
27721.m000026	Glicose-6- Fosfato-Desidrogenase	G6PDH	AATggggTTgTCATTCCAga	CTCgACTgCCTCgTTggTAT	178	152/72 <sup>ψ</sup>
30170.m013902	Proteína Conservada Hipotética	Hip	ATgCAAAGCCAaggTgAAAAg	AACAACCAgTggTgCATTg	194	85
28049.m000299	Proteína de Conjugação de Ubiquitina 9	UBC9	TCCATTTAAgCCACAAAagg	CgTCAAgAgggAACATATggA	154	969/712 <sup>ψ</sup>
29736.m002026	Proteína de Conjugação de Ubiquitina rad6	UBC	TggAAgCATTgTTTggACA	TCCgAgCAgCTTCTgAgTTT	134	720
28152.m000877	Transportador de Fosfato	TIP	GTggCAACCCTgTCATTCTT	TAggAAgCCTCTgACCgATg	129	2368
30084.m000186	Tubulina $\alpha$	Tub $\alpha$	ATCgATCgAATCAAggAACg	CACCCTCAATgTTgTATgCACg	124	386
30170.m113630	Tubulina $\beta$	Tub $\beta$	ATggCATgCTgCTTgATgTA	CACCTTggCAAATCACCT	177	122
30169.m006323	Ubiquitina	Ubi	CggATgTTgCTgTgCTTCT	ggTCTggAACATCTCCACAT	179	78

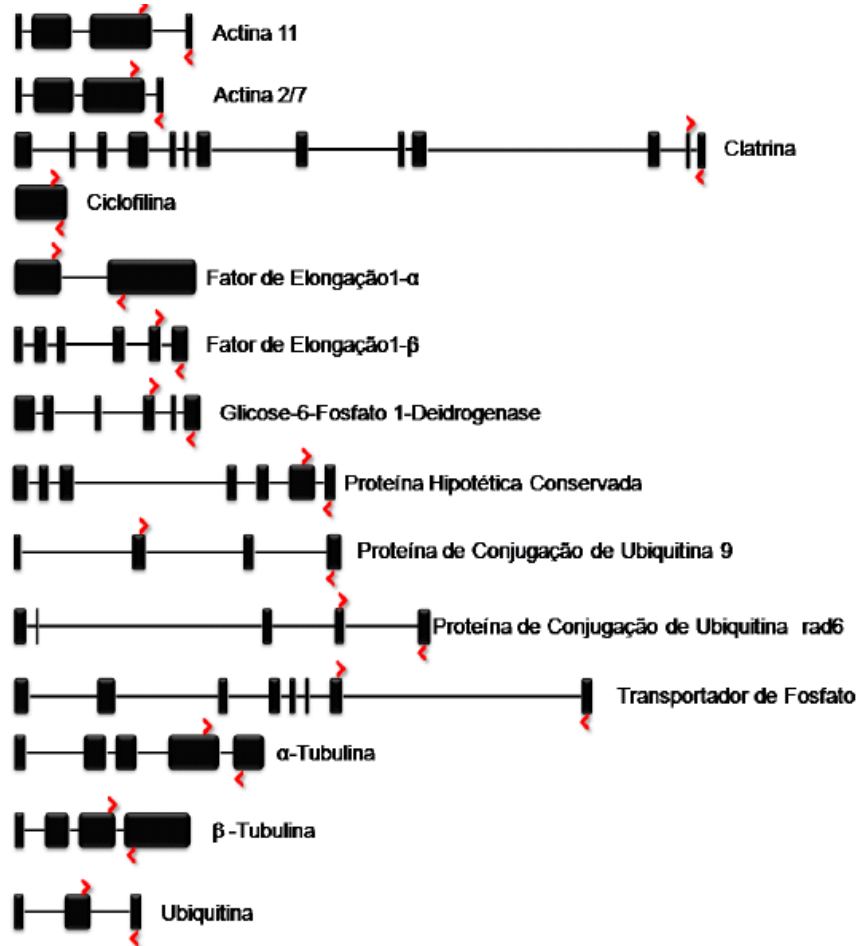
\* Em pares de base

<sup>ψ</sup> Mais de um intron delimitado pelos oligos

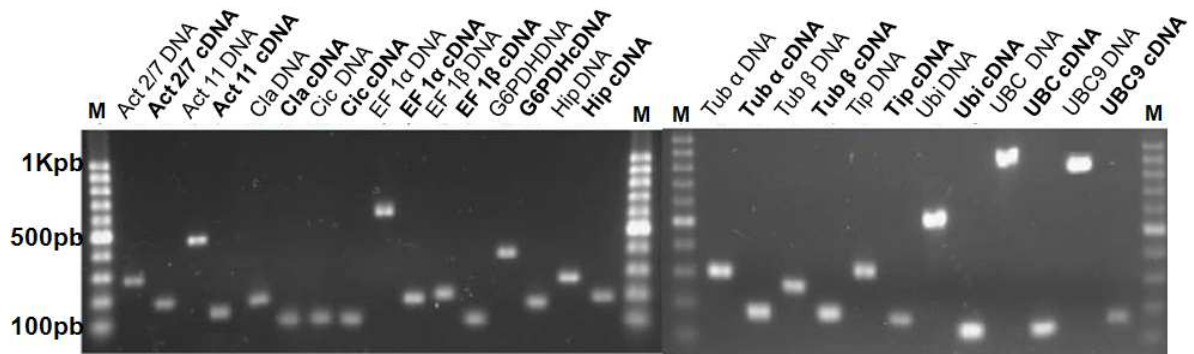
Devido à baixa similaridade entre os 14 potenciais genes de referência e grande disponibilidade de íntrons, com exceção do gene que codifica a ciclofilina, a qual não apresentava íntrons, foi possível desenhar oligos que flanqueassem íntrons e posicionados na extremidade 3' dos genes (Figura 12).

A avaliação da especificidade dos oligos para cada um dos 14 potenciais genes de referência para RT-qPCR e validação dos tamanhos dos íntrons preditos foi efetuada por PCR com DNA genômico e cDNA de sementes maduras (Figura 12) como moldes. Todos os produtos de PCR, a partir do cDNA de semente madura, conferiram com o tamanho predito (Figura 12, Tabela 5). Os produtos de PCR que se originaram de DNA genômico também conferiram com o tamanho predito, com exceção dos genes que codificam a Proteína de conjugação de Ubiquitina 9, cujo produto de PCR esperado teria 1835 pb e, no entanto, se obteve um produto de aproximadamente 900 pb, e o gene que

codifica a proteína transportadora de fosfato (TIP), para o qual o produto de PCR esperado teria 2438 pb e se obteve um produto de aproximadamente 300 pb (Figura 13 Tabela 5).



**Figura 12.** Estrutura dos 14 candidatos a gene de referência de RT-qPCR em sementes de mamona. Os éxons (caixas), íntrons (linhas) e posição relativa dos oligonucleotídeos iniciadores (cabeças-de-seta vermelhas) estão representados.

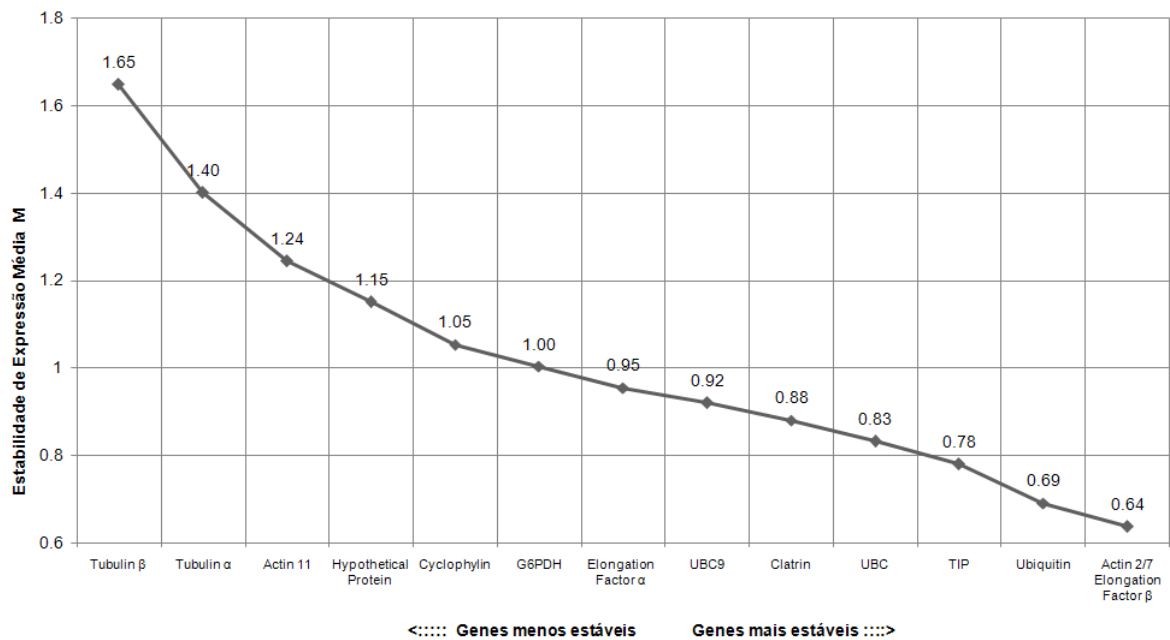


**Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose 2% dos 14 genes candidatos a gene de referência para RT- qPCR. “M” indica o marcador de peso molecular. Produtos de PCR a partir de DNA genômico (indicados na primeira pista de cada dupla) e dos cDNAs (indicados em negrito na segunda pista de cada dupla).

Uma vez validados por PCR, os perfis de expressão gênica dos 14 genes foram obtidos e analisados quanto à estabilidade de expressão, entre os cinco estádios do desenvolvimento da semente, com auxílio do programa geNorm.

Este programa calcula a média geométrica da expressão em cada amostra (estádios da semente), resultando em um valor de estabilidade de expressão média “M”, para cada gene analisado, onde os menores valores de “M” correspondem aos genes mais estáveis nas amostras (Figura 14).

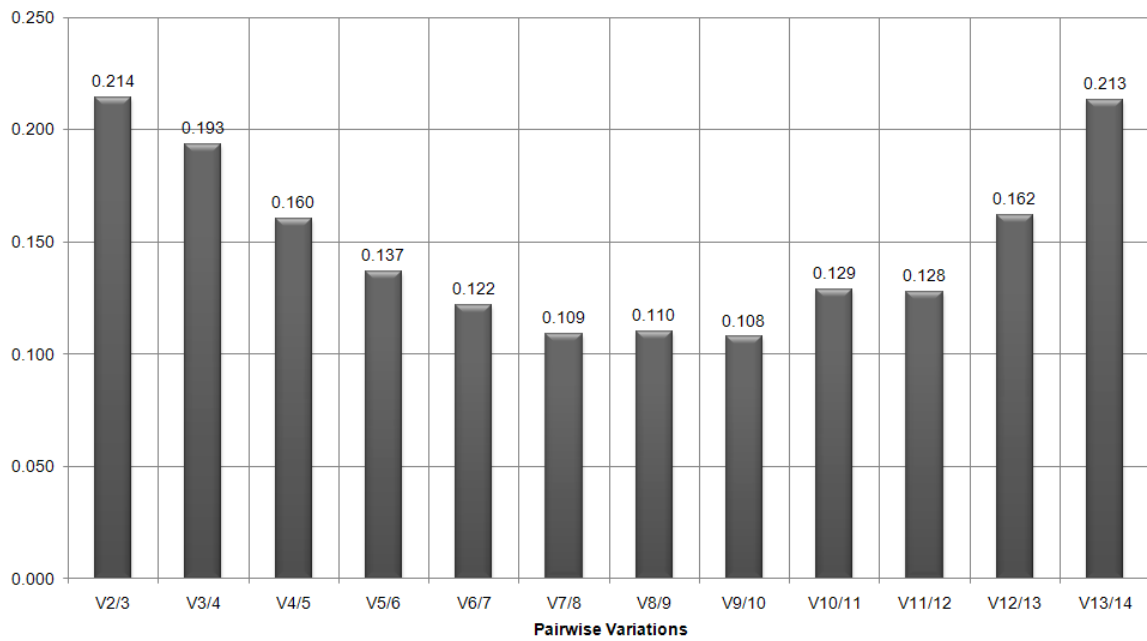
Dentre os 14 genes avaliados, as análises com o programa geNorm consideram os genes Act 2/7 e EF1  $\beta$  os mais estáveis, com o valor “M” de 0,64, seguidos por Ubi, Tip e UBC, com valores de “M” de 0,69, 0,76 e 0,83 respectivamente (Figura 14). Os genes Tub  $\beta$ , Tub  $\alpha$  e Act 11 foram os menos estáveis, apresentando valores de estabilidade de 1,65, 1,40 e 1,24, respectivamente.



**Figura 14.** Análise da estabilidade de expressão dos 14 genes potenciais de referência pelo programa GeNorm. Valores de estabilidade de expressão média “M” indicados para cada gene analisado.

O programa geNorm também permite calcular o número mínimo de genes a serem utilizados como referência para normalização de dados de expressão gênica (Figura 15). É sugerida a utilização de 0,15 como valor de exclusão para cada par de genes, ou seja, se os dois genes mais estáveis apresentarem um valor acima de 0,15 é necessário a introdução de mais um gene para utilização na normalização de dados de expressão. A adição de genes de referência para posteriores análises deve proceder até atingir o valor de 0,15.

Entre os 14 genes avaliados, a análise do programa geNorm identificou que os cinco primeiros genes (Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, Tip e UBC) atingiriam uma variação inferior a 0,15 (0,137). Estes cinco genes foram os de escolha como genes de referência para normalização de experimentos de RT-qPCR (Figura 15).

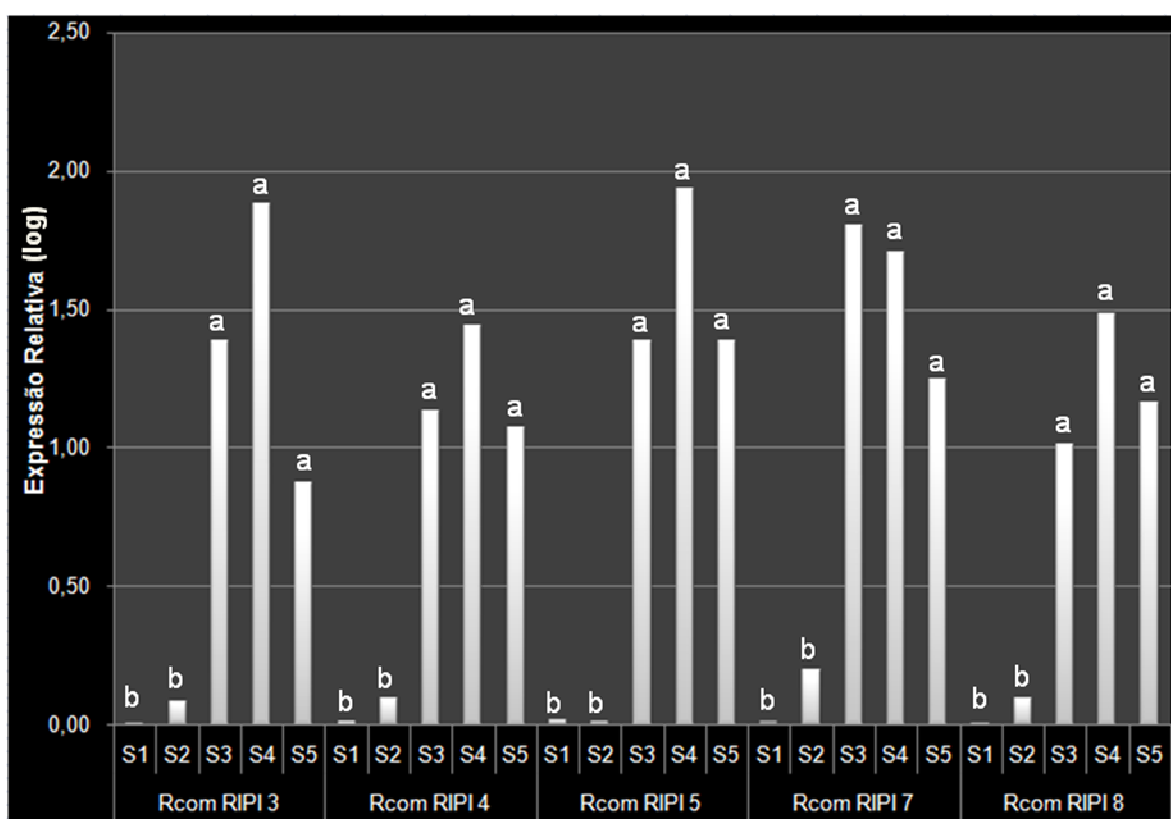


**Figura 15.** Número mínimo de genes a serem utilizados, dentre os 14 possíveis genes de referência, na normalização de dados de expressão gênica nos cinco estádios da semente de *R. communis*.

#### 4.5.2 Expressão gênica das *Rcom* RIPs em cinco estádios do desenvolvimento de semente, por RT-qPCR

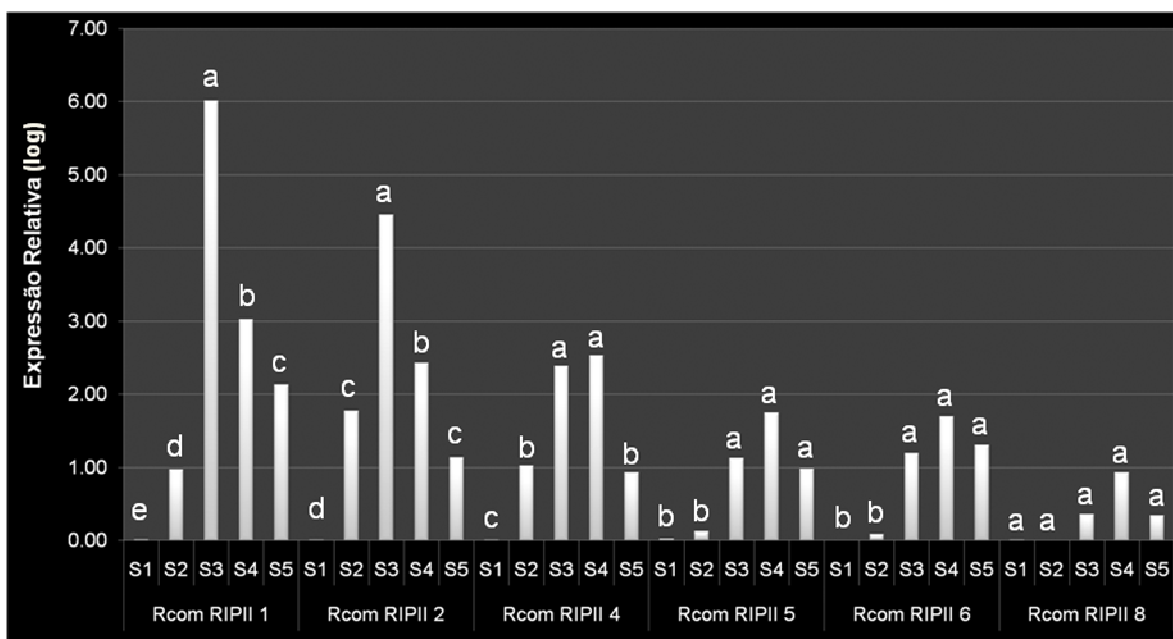
Dentre todas as 20 *Rcom* RIPs, somente as *Rcom* RIPI 3, 4, 5, 7 e 8 e as *Rcom* RIPII 1, 2, 4, 5, 6 e 8 apresentaram expressão gênica relativa, durante os cinco estádios da semente.

As *Rcom* RIPs do tipo I apresentaram um comportamento de expressão muito similar entre elas (Figuras 16), sendo que os maiores níveis de expressão gênica relativa foram representados entre os estádios S3 e S5, os quais diferiram significativamente dos estádios S1 e S2 (Figura 16).



**Figura 16.** Determinação do nível de expressão gênica das *Rcom* RIPI 3, 4, 5, 7 e 8 nos cinco estádios de semente (S1-S5). O nível de expressão das *Rcom* RIPs do tipo I foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, Tip e UBC. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão das *Rcom* RIPs do tipo I no estádio S1. Dados diferem com significância  $p \leq 0,01$  pelo teste de Scott-Knott.

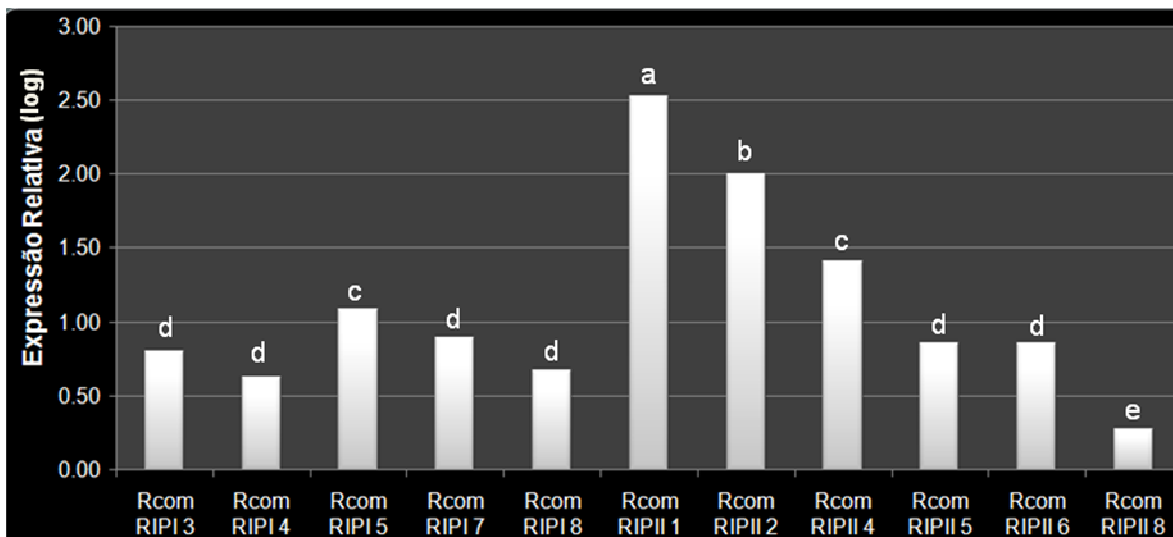
O perfil de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II em semente pode ser separado em dois grupos: (i) *Rcom* RIPII 1 (ricina) e *Rcom* RIPII 2 (aglutinina) as quais apresentam o perfil de expressão do estágio S3 muito mais expresso do que os demais, apresentando diferença significativa entre todos os estádios (Figura 17); (ii) *Rcom* RIPII 4, 5, 6 e 8 que apresentam uma expressão relativa menor que o grupo anterior, menos agudo (S3), onde inclusive a *Rcom* RIPII 8 não apresenta expressão gênica relativa com diferenças significativas entre os cinco estádios (Figura 17).



**Figura 17.** Determinação do nível de expressão gênica das *Rcom* RIPII 1, 2, 4, 5, 6 e 8 nos cinco estádios de semente (S1-S5). O nível de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, Tip e UBC. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II no estágio S1. Dados diferem com significância  $p \leq 0,01$  pelo teste de Scott-Knott.

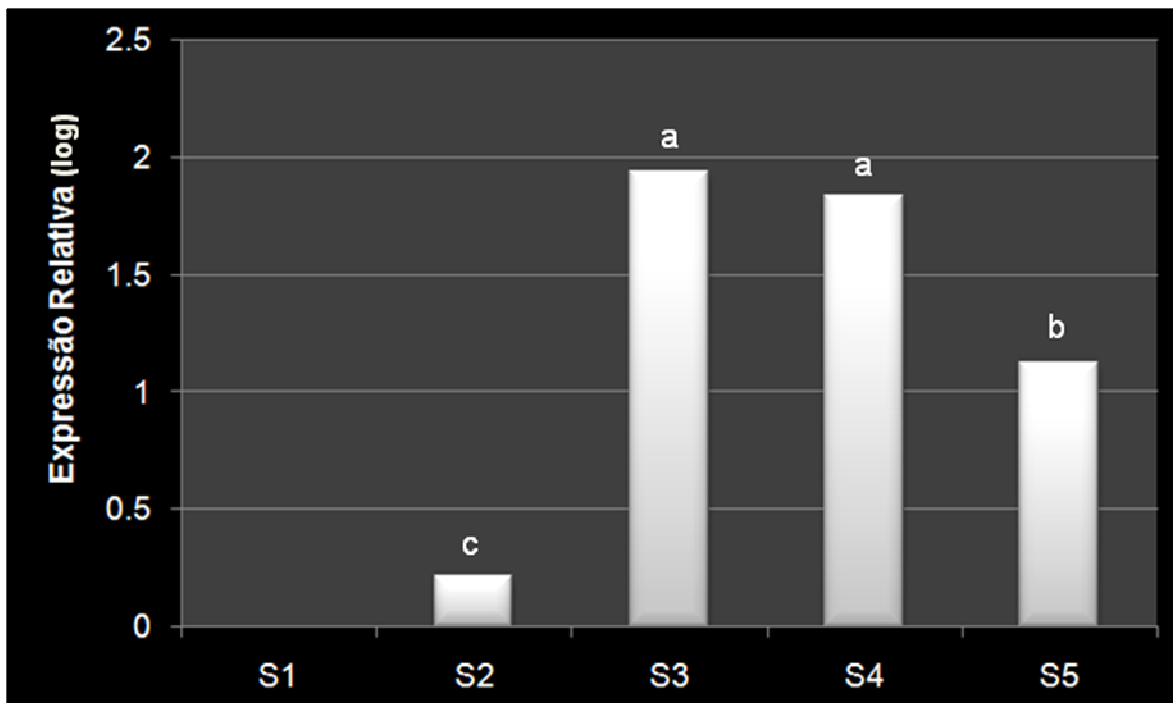


As análises de comparação entre as médias de expressão de todos estádios para cada uma das 11 *Rcom* RIPs expressas em semente indicaram que existe diferença significativa entre essas (Figura 18). A *Rcom* RIPII 1 (ricina) foi a mais expressa, seguida da *Rcom* RIPII 2 (aglutinina) e as demais *Rcom* (Figura 18).



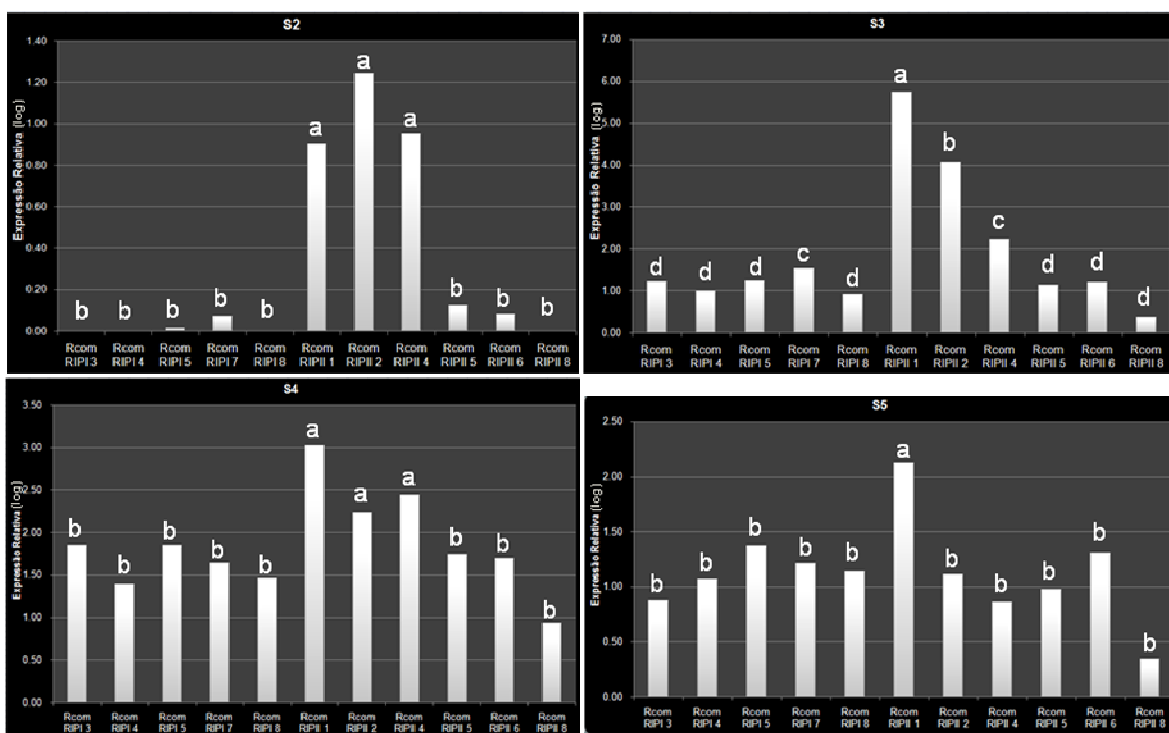
**Figura 18.** Médias das expressões relativas das onze *Rcom* RIPs expressas na semente (S1-S5). O nível de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes Act 2/7, EF  $\beta$ , Ubi, Tip e UBC. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II no estádio S1. Dados diferem com significância  $p \leq 0,01$  pelo teste de Scott-Knott.

A comparação entre os níveis de expressão gênica média, para cada estágio, revelou que os estádios S3 e S4 foram significativamente os que apresentaram maior expressão relativa entre os genes (Figura 19).



**Figura 19.** Média da expressão gênica para os estádios da semente de mamona S1-S5. O nível de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *Act 2/7*, *EF β*, *Ubi*, *Tip* e *UBC*. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II no estágio S1. Dados diferem com significância  $p \leq 0,01$  pelo teste de Scott-Knott.

O gene *Rcom* RIPII 1 (ricina) apresentou o maior nível de expressão independentemente do estágio (Figura 20), sendo que este e os genes *Rcom* RIPII 2 e 4 foram os que mais contribuíram para que os maiores índices de expressão gênica média estivessem nos estádios S3 e S4 (Figura 19, 20). Devido ao primeiro estágio (S1) ser o utilizado para normalização dos resultados de RT-qPCR, não foi possível verificar diferenças significativas entre os genes (dados não mostrados).



**Figura 20.** Expressão gênica relativa das *Rcom* RIPs nos estádios da semente de mamona S2, S3, S4 e S5. O nível de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II foi normalizado em relação ao nível de expressão dos genes *Act 2/7*, *EF β*, *Ubi*, *Tip* e *UBC*. A normalização dos resultados de expressão foi feita em relação aos níveis de expressão das *Rcom* RIPs do tipo II no estágio S1. Dados diferem com significância  $p \leq 0,01$  pelo teste de Scott-Knott.

## 5.0 DISCUSSÃO:

### 5.1 Resgate e anotação das *Rcom* RIPs

Utilizando uma estratégia similar a descrita por Jiang e colaboradores para a identificação de Proteínas Inativadoras de Ribossomos em arroz (JIANG *et al.*, 2008), no presente trabalho foram encontradas, em mamona, vinte genes que codificam RIPs, denominados *Rcom* RIPs, sendo que 8 *Rcom* RIPs do tipo I e 12 *Rcom* RIPs do tipo II. O recente trabalho de Leshin e colaboradores (2009), o qual também utilizou a ferramenta BLAST, descreve a identificação de seis genes codificando proteínas similares à ricina, denominadas de “Ricin-Like- Proteins” (RLP) (LESHIN *et al.*, 2009).

Alinhamentos entre as RLP, descritas por Leshin e colaboradores (2009), e as *Rcom* RIPs, do presente trabalho, demonstraram que as RLP 1, 2, 3, 4, 5 e 6 equivalem às *Rcom* RIPII 8, 7, 3, 4, 10 e 6, respectivamente. Apesar de utilizarmos uma estratégia de bioinformática similar para identificação de genes que codificam RIPs de mamona, nossa análise demonstrou ser mais sensível e acurada que a utilizada por Leshin e colaboradores (2009), pois possibilitou a identificação de outras quatro RIPs do tipo II e oito RIPs do tipo I.

A última versão liberada do banco de sequências do “Castor Bean Database” apresentou algumas divergências quanto aos códigos de acesso em relação à primeira liberação, como a substituição do acesso que representava a *Rcom* RIPII 1 (44148.m000007 e 59679.m000011) por 60629.m00002. Este fato confirmou a nossa hipótese inicial de que esses dois acessos representavam uma única sequência. Contudo, a segunda versão também extinguiu os códigos 28274.m000037 (*Rcom* RIPII 9) e 29995.m000177 (*Rcom* RIPII 12), as quais representavam *Rcom* RIPs, que posteriormente foram validadas por PCR e sequenciamento.

Sete sequências, encontradas por BLAST, na versão I foram anotadas como “gelonin precursor”. A gelonina (NOLAN *et al.*, 1993) é uma RIP do tipo de *Gelonium multiflorum* (Euphorbiaceae), planta de mesma família da mamona. Curiosamente, todas as sete sequências, foram posteriormente caracterizadas

como *Rcom* RIPs do tipo I. O mesmo fato também ocorreu com a sequência designada pelo código de acesso 29942.m000749, a qual foi descrita como “nigrin-b precursor”. A nigrina (VAN DAMME *et al.*, 1996) é uma RIP do tipo II de baixa toxidez de *Sambucus nigra* (Fabaceae). Posteriormente, essa sequência também foi caracterizada como sendo um representante das *Rcom* RIPs do tipo II.

As anotações de sequências da segunda versão designaram todas *Rcom* RIPs do tipo I como pertencentes à família da ricina e aglutinina (RIPs do tipo II), porém nossas análises confirmaram que estas RIPs de mamona são na verdade pertencentes a família de RIPs do tipo I.

Existem também dois acessos (60638.m00019 e 29988.m000128) da versão II que foram designados como sendo homólogos parciais da ricina. Análises nos alinhamentos dessas duas *Rcom* RIPs, com as demais do seu tipo, identificaram que estas apresentavam um códon de término anterior ao da ricina, resultando em uma proteína menor que esta. Possivelmente, este foi o motivo da designação de parcial para estas duas sequências.

## **5.2 Análises das sequências das *Rcom* RIPs e *Rcom* Lecs e conservação dos aminoácidos críticos para atividade RIP e lipolíticas**

O banco de dados InterPro, através da ferramenta InterProScan (QUEVILLON *et al.*, 2005), a qual promove uma busca abrangente em um conjunto de 14 bancos de dados foi empregada com sucesso para classificar domínios do tipo “RING-finger” no genoma de *Arabidopsis* (KOSAREV *et al.*, 2002) e permitiu a identificação de proteínas “Heat Shock” de *Laminaria japonica* (FU *et al.*, 2009).

As análises da ricina, aglutinina e das demais 18 *Rcom* RIPs pela ferramenta InterProScan, demonstraram que, assim como a ricina e aglutinina, as 18 *Rcom* RIPs apresentavam assinaturas de RIPs em no mínimo cinco bancos de dados, resultando em fortes evidências de que as 18 possíveis *Rcom* RIPs, pertençam à classe das Proteínas Inativadoras de Ribossomos.

O trabalho de Girbés e colaboradores (2004), demonstrou que o peso molecular da RIPs do tipo I de plantas varia de 21 a 37 kDa e das RIPs do tipo II entre 56 a 68 kDa (GIRBES *et al.*, 2004). A grande maioria das *Rcom* RIPs apresentou peso molecular predito dentro desta faixa.

O alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das 20 *Rcom* RIPs revelou que oito *Rcom* RIPs eram mais curtas (as mesmas que receberam a anotação de “gelonin precursor”) e não apresentavam a região relativa à cadeia  $\beta$ , sugerindo que estas proteínas pertençam ao tipo I. Essas proteínas receberam o acrônimo de *Rcom* RIPI, com subclassificação com numeração arábica de 1 até 8. As 12 restantes foram classificadas como *Rcom* RIPII e numeradas de 1 até 12, devido à presença da cadeia  $\beta$ .

A análise da conservação dos resíduos de aminoácidos críticos para a atividade RIP revelou que as duas tirosinas importantes para o posicionamento da adenina (DAY *et al.*, 1996) são muito conservadas, com algumas substituições por Asparagina. Ambos resíduos são classificados como aminoácidos polares não carregados e a substituição de Tyr por Asn pode estar relacionada à especificidade da atividade de glicosidase em relação a outros ácidos nucleicos (BARBIERI *et al.*, 1997, BOLOGNESI *et al.*, 1997), contudo, essa hipótese precisa de confirmação.

Os resíduos presentes no sítio ativo são muito conservados. Day e colaboradores (1996) demonstraram que a substituição de Arg por His reduz fortemente a atividade de glicosidase da ricina (DAY *et al.*, 1996). O resíduo de arginina da *Rcom* RIPII 11 está ausente, o que pode sugerir que esta RIP seja um membro não funcional; porém a atividade de RNA glicosidase da *Rcom* RIPII 11 ainda não foi caracterizada. O resíduo de Trp, caracterizado como essencial para manter a estrutura do sítio ativo (DING *et al.*, 2003), está totalmente conservado, comprovando a sua importância para manter a conformação do sítio ativo.

O motivo L-Q-R presente na porção amino-terminal da fitohematoglutina, caracterizado como responsável pelo direcionamento vacuolar da invertase em levedura, também está presente na faseolina, concanavalina-A, lectina de soja e amendoim, favina e a ricina (TAGUE *et al.*, 1990) e também está presente nas *Rcom* RIPII 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9. Curiosamente, esse motivo L-Q-R está localizado

na cadeia  $\alpha$  destas *Rcom* RIPs. Contudo, a influência deste motivo no direcionamento destas RIPs ainda não foi estudada.

As *Rcom* RIPI 1, 2, 4, 5, 7 e *Rcom* RIPII 10 possuem uma substituição de um resíduo de aminoácido polar positivo (Arg) por um polar negativo (Asp). Assim como as demais *Rcom* RIPs, as quais possuem o motivo íntegro, a influência dessa substituição no direcionamento vacuolar, caso ocorra, ainda não é conhecido.

Os doze resíduos de aminoácidos do peptídeo de ligação, importante para direcionamento vacuolar da ricina e que é removido para ativação da toxina, estão ausentes em todas *Rcom* RIPs do tipo I, mas possuem alto nível de conservação dentro das *Rcom* RIPs do tipo II, com exceção das *Rcom* RIPII 5, 11 e 12 que não possuem estes 12 aminoácidos. A ausência deste peptídeo de ligação nas *Rcom* RIPII 11 e 12 pode implicar em uma ativação diferente destas *Rcom* RIPs, ou mais provavelmente a ausência deste peptídeo seja um indício que de estas sejam membros não-funcionais. Alinhamentos com a *Rcom* Lec 1 e as *Rcom* RIPs, revelaram que essa também possui um sequência com alta similaridade com o peptídeo de ligação.

O resíduo de isoleucina deste peptídeo de ligação foi caracterizado como crítico para o direcionamento vacuolar, sendo que a substituição de Ile por Gly reduz a translocação da ricina para o vacúolo (FRIGERIO *et al.*, 2001). Dentre as *Rcom* RIPs que possuem este peptídeo, somente *Rcom* RIPII 8 apresenta uma substituição de Ile por Ala. O resíduo de alanina é um aminoácido apolar assim como a glicina. Essa substituição na *Rcom* RIPII 8 pode estar implicada em um processamento ou direcionamento vacuolar diferente.

O peptídeo de direcionamento vacuolar, também foi descrito como o primeiro exemplo de um sinal sequencia-específica de direcionamento vacuolar localizado dentro de um propeptídeo (FRIGERIO *et al.*, 2001).

As evidências de que as *Rcom* RIPs do tipo I, não possuem equivalência de sequência com os 12 resíduos de aminoácidos na região relativa ao posicionamento deste peptídeo (C-terminal), que a remoção proteolítica de sinais de direcionamento vacuolar é mais comum quando localizados na extremidade amino-terminal da proteína (HATTORI *et al.*, 1987) e que a *Rcom* Lec 1 apresenta

uma sequência equivalente ao peptídeo de ligação reforçam nossa hipótese que este sinal de direcionamento vacuolar na região medial do propeptídeo seja, na verdade, um sinal amino-terminal de uma lectina ancestral que se fusionou a uma RIP do tipo I, originando as RIPs do tipo II.

Os resíduos responsáveis pela atividade lipolítica da ricina apresentam alto grau de conservação. Porém existem algumas substituições ou até mesmo deleções que podem interferir na atividade lipolítica.

A histidina está ausente nas *Rcom* RIPII 5 e 9, e foi substituída por Tyr e Asp nas *Rcom* RIPI 3, 4, 5 e 8, respectivamente. O resíduo de serina foi substituído por alanina na *Rcom* RIPI 2, sendo que essa substituição resulta perda da atividade lipolítica (MORLON-GUYOT *et al.*, 2003). Contudo, todas essas substituições estão localizadas em *Rcom* RIPs do tipo I, as quais não apresentam o resíduo de aspartato presente na cadeia  $\beta$ . Este fato não permite às *Rcom* RIPs do tipo I apresentar atividade lipolítica e, conseqüentemente a pressão seletiva para manter estes aminoácidos ou equivalentes em dada posição é menor.

Para a terceira posição do sítio ativo existe a necessidade de que este resíduo corresponda a um aminoácido ácido (CONTRERAS *et al.*, 1996), sendo que a substituição de Asp por Glu está relacionada à especificidade de substratos (CHANG *et al.*, 1996). Esse fato pode sugerir que a *Rcom* RIPII 10 atue em substratos diferentes das demais.

A conservação de Asp também foi avaliada nas *Rcom* Lecs, onde as *Rcom* Lec 1 e 2 apresentam este resíduo na mesma posição. Devido a este fato, hipotetizamos que, assim como nas *Rcom* RIPs do tipo II, estas *Rcom* Lecs poderiam formar a tríade catalítica com RIPs do tipo I (*Rcom* RIPI 1, 6 e 7), desempenhando atividade similar as do tipo II, porém, esta hipótese ainda não foi testada.

A influência dos dois resíduos de Cys da *Rcom* RIPII 2 (aglutinina), na formação do tertrâmero ( $\beta\alpha\alpha\beta$ ) ainda não foi testada experimentalmente, contudo, a *Rcom* RIPII 2 é a única das 12 *Rcom* RIPs que sabidamente apresenta esta conformação tetramérica e é a única que possui estes resíduos de Cisteína conservados.



### 5.3 Análises filogenéticas das *Rcom* RIPs e *Rcom* Lecs

A construção de árvores filogenéticas contendo todas as RIPs conhecidas (GIRBES *et al.*, 2004, JIANG *et al.*, 2008), assim como a árvore filogenética de todas as RIPs de Magnolipsida desenvolvida pelo presente trabalho, sugerem que RIPs do tipo II foram originadas a partir de eventos múltiplos e independentes. Olsnes (2004) cita que a quantidade de RIPs do tipo I é mais abundante do que as do tipo II (OLSNES, 2004). Esse levantamento é esperado devido à raridade destes eventos de duplicação e posterior fusão gênica que originaram as RIPs do tipo II. Contudo, mesmo as RIPs do tipo I, ditas mais comuns, não são encontradas em plantas modelo como *arabidopsis* e álamo.

A árvore filogenética contendo todas as Proteínas Inativadoras de Ribossomo de mamona apresentou bom suporte das análises filogenéticas e demonstrou que, mesmo dentro da mesma espécie, os eventos de duplicação entre as *Rcom* RIPs do tipo I e II são independentes, resultando na formação de dois grupos distintos, correspondendo a cada tipo de RIP.

A posição basal da *Rcom* RIPI 8, sugere que este gene possa ser a forma atual do ancestral que originou tanto as *Rcom* RIP do tipo I, quanto *Rcom* RIP dos tipo II ao se fundir com uma lectina ancestral. Outra hipótese, que não pode ser descartada, é que a *Rcom* RIP8 possa ser um membro mais divergente tanto das *Rcom* RIPs do tipo I quanto das do tipo II, podendo ter se especializado, devido à total conservação dos resíduos críticos para atividade RIP e a substituição dos resíduos necessários para a atividade lipolítica, ou estar sofrendo processo de formação de pseudogene.

As *Rcom* RIPII 11 e 12 ainda apresentam as assinaturas de Proteínas Inativadoras de Ribossomos, contudo estas apresentam grandes modificações nos resíduos de aminoácidos críticos para atividade RIP e lipolítica. Além do mais, *Rcom* RIPII 11 apresenta uma estrutura gênica (quantidade de íntrons) muito diferente do que as demais, isso poderia ser reflexo de uma pressão seletiva menor em manter sua integridade gênica, devido à introdução/deleção de sequências durante a evolução, processo o qual é comum para formação de pseudogenes. Contudo, essa hipótese não foi confirmada experimentalmente.

A topologia da árvore filogenética contendo as cadeias  $\beta$  das *Rcom* RIP do tipo II e as *Rcom* Lecs não permitiu a identificação da lectina ancestral que teria originado as cadeias  $\beta$ . Contudo, a disposição das cadeias  $\beta$  e das *Rcom* Lecs, permite inferir, que dentro da mesma espécie, os eventos de duplicação e posterior fusão são múltiplos e independentes, mesmo se as *Rcom* Lecs não sejam os ancestrais das cadeias  $\beta$ , e sim os produtos de duplicação gênica.

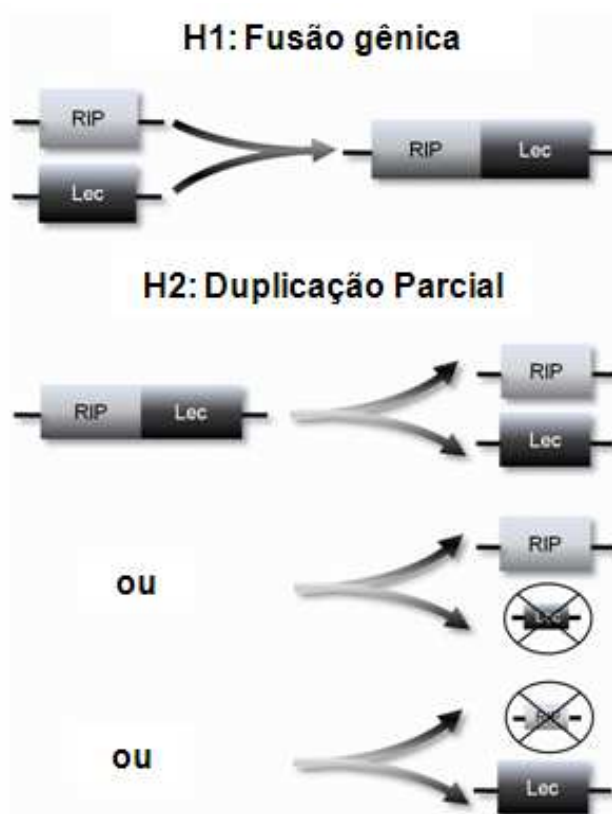
Interessantemente, a árvore filogenética construída somente com cadeias  $\alpha$ , apresenta as *Rcom* RIPII 1 e 2 mais próximas entre si, do que na árvore filogenética construída somente com as cadeias  $\beta$ , onde a *Rcom* RIPII1 é mais próxima da *Rcom* RIPII 3. Este fato sugere que as *Rcom* RIPII 1 e 3 são produtos de um evento de duplicação gênica, anterior ao evento que originou a *Rcom* RIPII 2, sendo que a cadeia  $\alpha$  da *Rcom* RIPII 3 deve ter se especializado, assim com a cadeia  $\beta$  da *Rcom* RIPII 2, o que causaria a diferenças de sequências e subseqüente modificações na topologia das árvores filogenéticas.

Diante dos padrões filogenéticos das *Rcom* RIPs, assim como sua evolução através de eventos de duplicação múltiplos e independentes e baseando-se nos indícios do surgimento das *Rcom* RIPs do tipo II por fusão de uma lectina ancestral com uma RIP do tipo I ancestral, propomos dois modelos evolutivos hipotéticos possíveis para o surgimento das *Rcom* RIPs (Figura 21).

O primeiro modelo, ou “modelo de fusão gênica”, sugere o surgimento das *Rcom* RIPs do tipo II através da fusão de uma lectina ancestral com uma *Rcom* RIP do tipo I ancestral, o qual também pode ser extrapolada para o surgimento de outras RIPs do tipo II em plantas. Os indícios de que o peptídeo de ligação das *Rcom* RIPs do tipo II seja um sinal para direcionamento vacuolar da região amino-terminal da lectina ancestral, fortalecem essa hipótese.

O segundo modelo hipotético, ou “modelo de duplicação parcial”, postula um processo de duplicação parcial, onde ocorre a duplicação de somente uma das cadeias, ou de ambas com posterior perda de uma delas. Este modelo justificaria o surgimento das *Rcom* RIPII 3, onde uma parte da cadeia  $\beta$  (referente a um dos lóbulos) foi perdida, *Rcom* RIPII 5, onde parte da cadeia  $\alpha$  e toda a cadeia  $\beta$  foi perdida, *Rcom* RIPII 7 que perdeu a extremidade carboxi-terminal da cadeia  $\beta$  e a *Rcom* RIPII 9 que perdeu as extremidades amino e carboxi terminal.

Mais ainda, a *Rcom* RIPII 5 foi utilizada para uma reação de PCR com seu oligonucleotídeo senso e anti-senso da *Rcom* RIPII 4 (dados não mostrados), a qual possibilitaria a amplificação de uma possível cadeia  $\beta$ . Interessantemente, ocorreu a formação de um produto de PCR, o qual foi sequenciado, revelando que a *Rcom* RIPII 5 apresenta uma região com sequência muito similar com a cadeia  $\beta$  da *Rcom* RIPII 4, mas que não é traduzida, devido a algumas deleções, e, principalmente a introdução de uma guanina, que resultou na formação de um códon de término. A duplicação pode não ter sido de fato parcial neste caso, mas a introdução de uma simples base durante esse evento resultou em uma proteína do tipo II truncada.



**Figura 21.** Modelos evolutivos das *Rcom* RIPs baseado em duas hipóteses. H1) Evento de fusão gênica que teria originado as *Rcom* RIPs do tipo II. H2) Evento de duplicação parcial, onde ambas as cadeias seriam duplicadas independentemente, com possibilidade de degeneração de uma delas.

#### **5.4 Confirmação da existência das *Rcom* RIPs**

As PCRs realizadas em DNA genômico e cDNAs de folhas e semente maduras, resultaram em produtos de acordo com o tamanho esperado para todas as 20 *Rcom* RIPs, sendo que as reações de sequenciamento validaram as sequências presentes no “Castor Bean Genome Database” , incluindo aquelas excluídas na segunda liberação. As reações de sequenciamento, também validaram a especificidade dos oligos.

As reações de RT-PCR em sementes e folhas possibilitaram a determinação da presença/ausência de transcritos ativos para cada uma das 20 *Rcom* RIPs. Contudo, esse método é de baixa sensibilidade, necessitando uma metodologia de quantificação de transcritos mais robusta, como RT-qPCR.

#### **5.5 Escolha de genes de normalização**

A estabilidade de expressão gênica de 14 potenciais genes de referência em cinco estádios das sementes de mamona foi analisada com o programa geNorm, revelando que os cinco genes mais estáveis (*Act 2/7*, *EF $\beta$* , *Ubi*, *Tip* e *UBC*) são necessários para normalização de dados de expressão por RT-qPCR.

Os genes de referência ideais devem apresentar níveis de expressão constantes em toda planta, e não ter os seus perfis de expressão influenciados por tratamento exógenos (HU *et al.*, 2009).

A grande maioria dos trabalhos contendo padronização de genes de referência abrange tratamentos exógenos como tolerância a cádmio e cobre (REMANS *et al.*, 2008), ou por estresses, como o salino (CHEN *et al.*, 2010), frio, (NICOT *et al.*, 2005) , excesso de ozônio ou dióxido de carbono (OLBRICH *et al.*, 2008), ou ataque do patógenos como o *Phytophthora parasitica* (YAN & LIU, 2006). Trabalhos que analisam a estabilidade de expressão gênica em órgãos/tecidos (YANG *et al.*, 2009), geralmente incluem somente um estágio de desenvolvimento final da semente.

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho analisando a padronização de genes de referência em *R. communis* e o primeiro que analisou a estabilidade de genes de referência candidatos durante o desenvolvimento da semente.

## 5.6 Expressão das *Rcom* RIPs nos cinco estádios da semente

Devido a semente da mamona ser a matéria prima para a extração de ácido ricinoléico (OGUNNIYI, 2006) e historicamente relacionada à extração da ricina e aglutinina (OLSNES, 2004), a análise de expressão relativa da ricina, aglutinina e demais *Rcom* RIPs foi analisada.

Tregear e colaboradores (1992) foram os primeiros a analisar o padrão de expressão da ricina na semente, onde viram que ocorre acúmulo do transcrito da ricina em um estágio “pós-testa” (TREGEAR & ROBERTS, 1992), o qual corresponde ao estágio S5 no presente trabalho. Assim como o trabalho de Tregear e colaboradores, a nossa análise também identificou expressão da ricina neste estágio. No entanto, o estágio em que a ricina é mais expressa corresponde ao S3.

Lu e colaboradores (2007) desenvolveram uma biblioteca de 4720 cDNAs completos (full-length cDNA) a partir do endosperma da semente da mamona, e demonstraram que a aglutinina e a ricina eram o sexto e sétimo genes mais representados na biblioteca, respectivamente (LU *et al.*, 2007).

No presente trabalho demonstramos que além da ricina e aglutinina, 5 *Rcom* RIPs do tipo I e 4 *Rcom* RIPs do tipo II, também são expressas na semente, essas as quais possivelmente, tenham sido erroneamente indentificadas como ricina ou aglutinina pelo trabalho de Lu e colaboradores (2007).

Jiang e colaboradores (2008) caracterizaram o perfil de expressão de 30 RIPs de arroz. Porém, arroz possui somente RIPs do tipo I, e a expressão destas não foram avaliadas nos grãos (JIANG *et al.*, 2008). Ao analisar o padrão de expressão gênica das *Rcom* RIPs do tipo I, identificamos que as *Rcom* RIPI 3, 4, 5, 7 e 8 são expressas em semente, mesmo que essa expressão seja baixa ao comparar com a expressão observada para as RIPs do tipo II.

O perfil de expressão similar entre as *Rcom* RIPs do tipo I pode ser considerado um indicativo de redundância de função. Dentre as *Rcom* RIPs do tipo II, existe a subdivisão de dois grupos com perfil de expressão disitintos que podem indicar especialização de função. O segundo grupo apresenta perfil similar

às *Rcom* RIPs do tipo I, possivelmente atuando de forma redundantemente a essas. Contudo, essa hipótese não foi ainda testada experimentalmente.

A comparação dos maiores níveis de expressão de cada *Rcom* RIP em semente, indentificou que a *Rcom* RIPII 1 (ricina) e a *Rcom* RIPII 2 são as mais expressas. A maior disponibilidade da ricina e aglutinina nas sementes, quando comparada com as demais *Rcom* RIPs pode ser um dos motivos que fizeram a ricina e aglutinina serem as primeiras RIPs purificadas e caracterizadas.

Possivelmente, ao purificar a ricina e aglutinina a partir de extratos de sementes da mamona, as *Rcom* RIPs do tipo I tenham sido confundidas, com as cadeias  $\alpha$ , oriundas da desnaturação do dímero ( $\alpha\beta$ ) da ricina e do tetrâmero ( $\beta\alpha\alpha\beta$ ) da aglutinina, resultando no descarte destas, postergando sua identificação, como membros verdadeiros das RIPs de mamona, até o presente trabalho.

## 6.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram identificadas RIPs parálogas a ricina e aglutinina e RIPs do tipo I de mamona, sob o acrônimo de *Rcom* RIPs, sendo o primeiro trabalho que descreve e valida molecularmente a existência de RIPs de ambos os tipos em uma mesma espécie.

As análises de conservação de motivos e resíduos críticos para atividade glicosidase e lipolítica das *Rcom* RIPs revelaram que estes são conservados, à exceção das *Rcom* RIPII 11 e 12, as quais possivelmente não sejam funcionais, possivelmente se tratando de pseudogenes.

As análises filogenéticas dão suporte a uma hipótese de evolução independente e de múltiplas origens das RIPs de mamona, sendo que o modelo de surgimento das *Rcom* RIPs do tipo II, a partir de fusão gênica é aceitável, devido ao padrão das árvores filogenéticas, aos indícios que o peptídeo de ligação, seja na verdade um peptídeo de direcionamento vacuolar localizado na extremidade amino terminal de um lectina ancestral e à identificação de uma sequência muito similar ao do peptídeo de ligação na *Rcom* Lec 1. Contudo, a existência de *Rcom* RIPs mais curtas também possibilita a sugestão de um segundo modelo baseado na hipótese de duplicação parcial.

O presente trabalho apresentou a primeira análise de genes de referência para normalização de dados de RT-qPCR em mamona, onde os genes que codificam a Actina 2/7, Fator de alongação  $\beta$ , Ubiquitina, Transportador de Fosfato e a Proteína de Conjugação de Ubiquitina foram identificados como os que apresetaram os perfis de expressão mais estáveis.

O padrão de expressão de 11 das 20 *Rcom* RIPs de *R. communis* foi caracterizado em cinco estádios do desenvolvimento da semente, onde a ricina foi o gene de maior expressão.

Experimentos para a análise da expressão dos 14 genes de referência e das 20 *Rcom* RIPs, em outros tecidos e órgão da mamona estão sendo projetados.

A atividade lipolítica da ricina e possivelmente outras *Rcom* RIPs pode estar relacionada ao metabolismo de lipídeos da planta, uma hipótese que ainda

necessita de mais estudos. Neste sentido, a atividade de lipase da ricina e outras RIPs serão testadas com diferentes substratos, a partir de proteínas expressas em sistema heterólogo.



## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y. J. & CHEN, G. Q. Temporal and spatial expression of 2S albumin in castor (*Ricinus communis* L.). *J Agric Food Chem*, 55 (24): 10043-10049, 2007.

ALAM, A.;NAKHURU, K. S. SINGHA, L. I. Carcinogenesis response modulation induced by gelonin encapsulated in liposome. *Mol Cell Biochem*, 315 (1-2): 85-95, 2008.

ALTSCHUL, S. F.;GISH, W.;MILLER, W.;MYERS, E. W. LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215 (3): 403-410, 1990.

ASSOCIATION, E. N. Ricin. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12704323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12704323)> Acesso em: 2 de novembro de 2009.

AZZINII, A.;SALGADOI, A. L. B.;FILHO, A. S. BANZATTO, N. V. Agricultural residues of castor bean (*Ricinus communis* L.) crops as a raw material for pulp production. *Bragantia*, 40 (1): 1981.

BARBIERI, L.;BATTELLI, M. G. STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta*, 1154 (3-4): 237-282, 1993.

BARBIERI, L.;VALBONESI, P.;BONORA, E.;GORINI, P.;BOLOGNESI, A. STIRPE, F. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, 25 (3): 518-522, 1997.

BARNES, D. J.;BALDWIN, B. S. BRAASCH, D. A. Ricin accumulation and degradation during castor seed development and late germination. *Industrial Crops and Products*, 30 (2): 254-258, 2009.

BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F.;SEVERINO, F. E.;MALUF, M. P. MAIA, I. G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Mol Biol*, 10 1, 2009.

BECHER, F.;DURIEZ, E.;VOLLAND, H.;TABET, J. C. EZAN, E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 79 (2): 659-665, 2007.

BERGMANN, L.;AAMDAL, S.;MARREAUD, S.;LACOMBE, D.;HEROLD, M.;YAMAGUCHI, T.;WILHELM-OGUNBIYI, K.;LENTZEN, H. ZWIERZINA, H. Phase I trial of r viscummin (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). *Eur J Cancer*, 44 (12): 1657-1662, 2008.

BIODIESELBR A história da mamona. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/historia-mamona.htm>> Acesso em: 11 Novembro 2009.

BOLOGNESI, A.;POLITO, L.;OLIVIERI, F.;VALBONESI, P.;BARBIERI, L.;BATTELLI, M. G.;CARUSI, M. V.;BENVENUTO, E.;DEL VECCHIO BLANCO, F.;DI MARO, A.;PARENTE, A.;DI LORETO, M. STIRPE, F. New ribosome-inactivating proteins with polynucleotide:adenosine glycosidase and antiviral activities from *Basella rubra* L. and *Bougainvillea spectabilis* Willd. *Planta*, 203 (4): 422-429, 1997.

BRADLEY, J. L. & MCGUIRE, P. M. Site-directed mutagenesis of ricin A chain Trp 211 to Phe. *Int J Pept Protein Res*, 35 (4): 365-366, 1990.

BRIGOTTI, M.;RAMBELLI, F.;ZAMBONI, M.;MONTANARO, L. SPERTI, S. Effect of alpha-sarcin and ribosome-inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem J*, 257 (3): 723-727, 1989.

BRINKWORTH, C. S.;PIGOTT, E. J. BOURNE, D. J. Detection of intact ricin in crude and purified extracts from castor beans using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 81 (4): 1529-1535, 2009.

BROWN, J. C.;JOLLIFFE, N. A.;FRIGERIO, L. ROBERTS, L. M. Sequence-specific, Golgi-dependent vacuolar targeting of castor bean 2S albumin. *Plant Journal*, 36 (5): 711-719, 2003.

BRUNNER, A. M.;YAKOVLEV, I. A. STRAUSS, S. H. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 4 14, 2004.

BURDOCK, G. A.;CARABIN, I. G. GRIFFITHS, J. C. Toxicology and pharmacology of sodium ricinoleate. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (10): 1689-1698, 2006.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?-The case for MIQE. *Methods*, 2009.

BUSTIN, S. A.;BENES, V.;GARSON, J. A.;HELLEMANS, J.;HUGGETT, J.;KUBISTA, M.;MUELLER, R.;NOLAN, T.;PFAFFL, M. W.;SHIPLEY, G. L.;VANDESOMPELE, J. WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4): 611-622, 2009.

BUTTERWORTH, A. G. & LORD, J. M. Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur J Biochem*, 137 (1-2): 57-65, 1983.

CAZAL, C. D.;BATALHAO, J. R.;DOMINGUES, V. D.;BUENO, O. C.;RODRIGUES, E.;FORIM, M. R.;DA SILVA, M. F. G. F.;VIEIRA, P. C. FERNANDES, J. B. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. *Journal of Chromatography A*, 1216 (19): 4290-4294, 2009.

CHANG, R. C.;CHEN, J. C. SHAW, J. F. Studying the active site pocket of *Staphylococcus hyicus* lipase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 229 (1): 6-10, 1996.

CHEN, G. Q.;HE, X. H.;LIAO, L. P. MCKEON, T. A. 2S albumin gene expression in castor plant (*Ricinus communis* L.). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81 (9): 867-872, 2004.

CHEN, L.;REN, F.;ZHONG, H.;FENG, Y.;JIANG, W. LI, X. Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42 (2): 154-164, 2010.

CIKOS, S. & KOPPEL, J. Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. *Anal Biochem*, 384 (1): 1-10, 2009.

CONTRERAS, J. A.;KARLSSON, M.;OSTERLUND, T.;LAURELL, H.;SVENSSON, A. HOLM, C. Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 271 (49): 31426-31430, 1996.

COOPMAN, V.;DE LEEUW, M.;CORDONNIER, J. JACOBS, W. Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). *Forensic Sci Int*, 189 (1-3): e13-20, 2009.

CZECHOWSKI, T.;STITT, M.;ALTMANN, T.;UDVARDI, M. K. SCHEIBLE, W. R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 139 (1): 5-17, 2005.

DAY, P. J.;ERNST, S. R.;FRANKEL, A. E.;MONZINGO, A. F.;PASCAL, J. M.;MOLINA-SVINTH, M. C. ROBERTUS, J. D. Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain. *Biochemistry*, 35 (34): 11098-11103, 1996.

DING, Y.;TOO, H.;WANG, Z.;LIU, Y.;BARTLAM, M.;DONG, Y.;WONG, K.;SHAW, P. RAO, Z. The structural basis of Trp192 and the C-terminal region in trichosanthin for activity and conformational stability. *Protein Eng*, 16 (5): 351-356, 2003.

DONAYRE TORRES, A. J.;ESQUIVEL SOTO, E.;GUTIERREZ XICOTENCATL, M. D.;ESQUIVEL GUADARRAMA, F. R. GOMEZ LIM, M. A. Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in E. coli. *Virology*, 6 (1): 17, 2009.

DUNAEVA, M.;GOEBEL, C.;WASTERACK, C.;PARTHIER, B. GOERSCHEN, E. The jasmonate-induced 60 kDa protein of barley exhibits N-glycosidase activity in vivo. *FEBS Lett*, 452 (3): 263-266, 1999.

EMBRAPA Sistema de Produção da Mamona. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/referencias.htm>> Acesso em: 12 Novembro de 2009.

ENDO, Y.;GLUCK, A. WOOL, I. G. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J Mol Biol*, 221 (1): 193-207, 1991.

ENDO, Y. & TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem*, 262 (17): 8128-8130, 1987.

EXPOSITO-RODRIGUEZ, M.;BORGES, A. A.;BORGES-PEREZ, A. PEREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol*, 8 131, 2008.

FRIGERIO, L.;JOLLIFFE, N. A.;DI COLA, A.;FELIPE, D. H.;PARIS, N.;NEUHAUS, J. M.;LORD, J. M.;CERIOTTI, A. ROBERTS, L. M. The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiol*, 126 (1): 167-175, 2001.

FRIGERIO, L. & ROBERTS, L. M. The enemy within: ricin and plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 49 (326): 1473-1480, 1998.

FRIGERIO, L.;VITALE, A.;LORD, J. M.;CERIOTTI, A. ROBERTS, L. M. Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J Biol Chem*, 273 (23): 14194-14199, 1998.

FU, W.;YAO, J.;WANG, X.;LIU, F.;FU, G. DUAN, D. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from *Laminaria japonica* (Laminariaceae, Phaeophyta). *Mar Biotechnol (NY)*, 11 (6): 738-747, 2009.

GARBER, E. A.;EPPLEY, R. M.;STACK, M. E.;MCLAUGHLIN, M. A. PARK, D. L. Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food. *J Food Prot*, 68 (6): 1294-1301, 2005.

GARBER, E. A. & O'BRIEN, T. W. Detection of ricin in food using electrochemiluminescence-based technology. *J AOAC Int*, 91 (2): 376-382, 2008.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.;MARTINS, C. C. NAKAGAWAIII, J. Preparation methods for the castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) tetrazolium test. *Rev. bras. sementes*, 31 (1): 7, 2009.

GIBSON, U. E.;HEID, C. A. WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6 (10): 995-1001, 1996.

GIRBES, T.;FERRERAS, J. M.;ARIAS, F. J. STIRPE, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev Med Chem*, 4 (5): 461-476, 2004.

GREENWOOD, J. S. & BEWLEY, J. D. Seed Development in *Ricinus communis* (Castor Bean) .1. Descriptive Morphology. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 60 (9): 1751-1760, 1982.

GUEx, N. & PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18 (15): 2714-2723, 1997.

GUGLIELMO-VIRET, V. & THULLIER, P. Comparison of an electrochemiluminescence assay in plate format over a colorimetric ELISA, for the detection of ricin B chain (RCA-B). *J Immunol Methods*, 328 (1-2): 70-78, 2007.

HALLING, K. C.;HALLING, A. C.;MURRAY, E. E.;LADIN, B. F.;HOUSTON, L. L. WEAVER, R. F. Genomic Cloning and Characterization of a Ricin Gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Research*, 13 (22): 8019-8033, 1985.

HATTORI, T.;ICHIHARA, S. NAKAMURA, K. Processing of a plant vacuolar protein precursor in vitro. *Eur J Biochem*, 166 (3): 533-538, 1987.

HE, X.;BRANDON, D. L.;CHEN, G. Q.;MCKEON, T. A. CARTER, J. M. Detection of castor contamination by real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem*, 55 (2): 545-550, 2007.

HEGDE, R. & PODDER, S. K. Evolution of tetrameric lectin *Ricinus communis* agglutinin from two variant groups of ricin toxin dimers. *Eur J Biochem*, 254 (3): 596-601, 1998.

HELMY, M.;LOMBARD, S. PIERONI, G. Ricin RCA60: evidence of its phospholipase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 258 (2): 252-255, 1999.

HIRAIWA, N.;KONDO, M.;NISHIMURA, M. HARA-NISHIMURA, I. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *Eur J Biochem*, 246 (1): 133-141, 1997.

HOUSTON, N. L.;HAJDUCH, M. THELEN, J. J. Quantitative proteomics of seed filling in castor: Comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and non-photosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol*, 2009.

HU, R.;FAN, C.;LI, H.;ZHANG, Q. FU, Y. F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Mol Biol*, 10 93, 2009.

HUNTER, S.;APWEILER, R.;ATTWOOD, T. K.;BAIROCH, A.;BATEMAN, A.;BINNS, D.;BORK, P.;DAS, U.;DAUGHERTY, L.;DUQUENNE, L.;FINN, R. D.;GOUGH, J.;HAFT, D.;HULO, N.;KAHN, D.;KELLY, E.;LAUGRAUD, A.;LETUNIC, I.;LONSDALE, D.;LOPEZ, R.;MADERA, M.;MASLEN, J.;MCANULLA, C.;MCDOWALL, J.;MISTRY, J.;MITCHELL, A.;MULDER, N.;NATALE, D.;ORENGO, C.;QUINN, A. F.;SELENGUT, J. D.;SIGRIST, C. J.;THIMMA, M.;THOMAS, P. D.;VALENTIN, F.;WILSON, D.;WU, C. H. YEATS, C. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res*, 37 (Database issue): D211-215, 2009.

IRWIN, S. D. & LORD, J. M. Nucleotide sequence of a *Ricinus communis* 2S albumin precursor gene. *Nucleic Acids Res*, 18 (19): 5890, 1990.



JAIN, M.;NIJHAWAN, A.;TYAGI, A. K. KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (2): 646-651, 2006.

JCVI Castor Bean Genome Database. Disponível em: <<http://castorbean.jcvi.org/>>  
Acesso em: 05 abril 2006.

JIAN, B.;LIU, B.;BI, Y.;HOU, W.;WU, C. HAN, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 9 59, 2008.

JIANG, S. Y.;RAMAMOORTHY, R.;BHALLA, R.;LUAN, H. F.;VENKATESH, P. N.;CAI, M. RAMACHANDRAN, S. Genome-wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol*, 67 (6): 603-614, 2008.

JÚNIOR, J. L.;BOARETTO, R. M.;SOUZA SILVA, J. L.;CABRAL, C. P. MALAVOLTA, E. Deficiencies of macronutrients on nutritional status of castor bean cultivar Iris. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40 2005.

KALB, S. R. & BARR, J. R. Mass spectrometric detection of ricin and its activity in food and clinical samples. *Anal Chem*, 81 (6): 2037-2042, 2009.

KATZIN, B. J.;COLLINS, E. J. ROBERTUS, J. D. Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins*, 10 (3): 251-259, 1991.

KIM, Y.;MLSNA, D.;MONZINGO, A. F.;READY, M. P.;FRANKEL, A. ROBERTUS, J. D. Structure of a ricin mutant showing rescue of activity by a noncatalytic residue. *Biochemistry*, 31 (12): 3294-3296, 1992.

KOSAREV, P.;MAYER, K. F. HARDTKE, C. S. Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biol*, 3 (4): RESEARCH0016, 2002.

LAMB, F. I.;ROBERTS, L. M. LORD, J. M. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. *Eur J Biochem*, 148 (2): 265-270, 1985.

LAPPI, D. A.;KAPMEYER, W.;BEGLAU, J. M.; KAPLAN, N. O. The disulfide bond connecting the chains of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (3): 1096-1100, 1978.

LESHIN, J.;DANIELSEN, M.;CREDLE, J. J.;WEEKS, A.;O'CONNELL, K. P. DRETCHEN, K. Characterization of ricin toxin family members from *Ricinus communis*. *Toxicon*, 55 (2-3): 658-661, 2009.

LIMA, R. L. S.;SEVERINO, L. S.;SILVA, M. I. L.;VALE, L. S. BELTRÃO, N. E. M. Recipients volume and substrate composition for castor seedlings production. *Ciênc. agrotec.*, 30 (3): 2006.

LIN, J. Y.;LIU, K.;CHEN, C. C. TUNG, T. C. Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells. *Cancer Res*, 31 (7): 921-924, 1971.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4): 402-408, 2001.

LORD, J. M.;ROBERTS, L. M. ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J*, 8 (2): 201-208, 1994.

LU, C.;WALLIS, J. G. BROWSE, J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library. *BMC Plant Biol*, 7 42, 2007.

MACKINNON, P. J. & ALDERTON, M. R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. *Toxicon*, 38 (2): 287-291, 2000.

MAHMUD, R.;INOUE, N.;KASAJIMA, S. Y. SHAHEEN, R. Assessment of potential indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic-contaminated areas of Bangladesh. *Int J Phytoremediation*, 10 (2): 117-130, 2008.

MELCHIOR, W. B. & TOLLESON, W. H. A functional quantitative pcr assay for ricin, shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. *Anal Biochem*, 396 (2): 204-211, 2009.

MELO, E. E.;COSTA, E. T.;GUILHERME, L. R.;FAQUIN, V. NASCIMENTO, C. W. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. *J Hazard Mater*, 168 (1): 479-483, 2009.

MELO, W. C.;DOS SANTOS, A. S.;ANNA, L. M. M. S. PEREIRA, N. Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: Detoxification and biodiesel process integration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19 (3): 418-425, 2008.

MONZINGO, A. F. & ROBERTUS, J. D. X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site. *J Mol Biol*, 227 (4): 1136-1145, 1992.

MORLON-GUYOT, J.;HELMY, M.;LOMBARD-FRASCA, S.;PIGNOL, D.;PIERONI, G. BEAUMELLE, B. Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *J Biol Chem*, 278 (19): 17006-17011, 2003.

MOULIN, A.;TEISSERE, M.;BERNARD, C. PIERONI, G. Lipases of the euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias* latex and structure-function relationships with the B chain of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (24): 11328-11332, 1994.

NICOT, N.;HAUSMAN, J. F.;HOFFMANN, L. EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*, 56 (421): 2907-2914, 2005.

NIELSEN, K. & BOSTON, R. S. RIBOSOME-INACTIVATING PROTEINS: A Plant Perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52 785-816, 2001.

NOLAN, P. A.;GARRISON, D. A. BETTER, M. Cloning and expression of a gene encoding gelonin, a ribosome-inactivating protein from *Gelonium multiflorum*. *Gene*, 134 (2): 223-227, 1993.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: vital industrial raw material. *Bioresource Technology*, 97 (9): 1086-1091, 2006.

OLBRICH, M.;GERSTNER, E.;WELZL, G.;FLEISCHMANN, F.;OSSWALD, W.;BAHNWEG, G. ERNST, D. Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. *Z Naturforsch C*, 63 (7-8): 574-582, 2008.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon*, 44 (4): 361-370, 2004.

OLSNES, S. & PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 12 (16): 3121-3126, 1973.

OLVEIRA, I. J. & ZANOTTO, M. D. Recurrent selection efficiency for stature reduction of castor bean (*Ricinus communis* L.) plants. *Ciênc. agrotec.*, 32 (4): 2008.

PAOLACCI, A. R.;TANZARELLA, O. A.;PORCEDDU, E. CIAFFI, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol*, 10 11, 2009.

PEUMANS, W. J.;HAO, Q. VAN DAMME, E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J*, 15 (9): 1493-1506, 2001.

POSADA, D. Using MODELTEST and PAUP\* to select a model of nucleotide substitution. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 6 Unit 6 5, 2003.

QUEVILLON, E.;SILVENTOINEN, V.;PILLAI, S.;HARTE, N.;MULDER, N.;APWEILER, R. LOPEZ, R. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*, 33 (Web Server issue): W116-120, 2005.

READY, M.;WILSON, K.;PIATAK, M. ROBERTUS, J. D. Ricin-like plant toxins are evolutionarily related to single-chain ribosome-inhibiting proteins from *Phytolacca*. *J Biol Chem*, 259 (24): 15252-15256, 1984.

REINBOTHE, S.;REINBOTHE, C.;LEHMANN, J.;BECKER, W.;APEL, K. PARTHIER, B. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (15): 7012-7016, 1994.

REMANS, T.;SMEETS, K.;OPDENAKKER, K.;MATHIJSEN, D.;VANGRONSVELD, J. CUYPERS, A. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta*, 227 (6): 1343-1349, 2008.

RIRIE, K. M.;RASMUSSEN, R. P. WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 245 (2): 154-160, 1997.

ROBERTS, L. M.;LAMB, F. I.;PAPPIN, D. J. LORD, J. M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. *J Biol Chem*, 260 (29): 15682-15686, 1985.

ROBERTUS, J. D. & READY, M. P. Ricin B chain and discoidin I share a common primitive protein fold. *J Biol Chem*, 259 (22): 13953-13956, 1984.

ROMEIRO, S.;LAGÔA, A. M. M. A.;FURLANI, P. R.;ABREU, C. A.;ABREU, M. F. ERISMANN, N. M. Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. *Braz. J. Plant Physiol*, 18 (4): 6, 2007.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19 (12): 1572-1574, 2003.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132 365-386, 2000.

RUGGIERO, A.;DI MARO, A.;SEVERINO, V.;CHAMBERY, A. BERISIO, R. Crystal structure of PD-L1, a ribosome inactivating protein from *Phytolacca dioica* L. Leaves with the property to induce DNA cleavage. *Biopolymers*, 91 (12): 1135-1142, 2009.

RUTENBER, E.;READY, M. ROBERTUS, J. D. Structure and evolution of ricin B chain. *Nature*, 326 (6113): 624-626, 1987.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4 (4): 406-425, 1987.

SCADDEN, D. T.;SCHENKEIN, D. P.;BERNSTEIN, Z.;LUSKEY, B.;DOWEIKO, J.;TULPULE, A. LEVINE, A. M. Immunotoxin combined with chemotherapy for patients with AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*, 83 (12): 2580-2587, 1998.

SCHOLZ, V. & DA SILVA, J. N. Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. *Biomass & Bioenergy*, 32 (2): 95-100, 2008.

SHYU, H. F.;CHIAO, D. J.;LIU, H. W. TANG, S. S. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of ricin. *Hybrid Hybridomics*, 21 (1): 69-73, 2002.

SILVA, S. A.;G., R. S.;BENDER, A. E. N.;TIMM, F. C.;GARCIAS, G. L. MARTINOROTH, M. G. Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbia milii* Des Moulins e *Ricinus communis* L através do teste de *Allium cepa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19 (2a): 4, 2008.

SMALLSHAW, J. E. & VITETTA, E. S. A lyophilized formulation of RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, retains immunogenicity. *Vaccine*, 28 (12): 2428-2435, 2010.

SOKOLSKY-PAPKOV, M.;GOLOVANEVSKI, L.;DOMB, A. J. WEINIGER, C. F. Prolonged local anesthetic action through slow release from poly (lactic acid co castor oil). *Pharm Res*, 26 (1): 32-39, 2009.

SPIVAK, L. & HENDRICKSON, R. G. Ricin. *Crit Care Clin*, 21 (4): 815-824, viii, 2005.

STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 44 (4): 371-383, 2004.

STIRPE, F.;BARBIERI, L.;GORINI, P.;VALBONESI, P.;BOLOGNESI, A. POLITO, L. Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett*, 382 (3): 309-312, 1996.

STIRPE, F. & BATTELLI, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci*, 63 (16): 1850-1866, 2006.

TAGUE, B. W.;DICKINSON, C. D. CHRISPPEELS, M. J. A short domain of the plant vacuolar protein phytohemagglutinin targets invertase to the yeast vacuole. *Plant Cell*, 2 (6): 533-546, 1990.

TAMURA, K.;DUDLEY, J.;NEI, M. KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24 (8): 1596-1599, 2007.

TILL, M. A.;GHETIE, V.;GREGORY, T.;PATZER, E. J.;PORTER, J. P.;UHR, J. W.;CAPON, D. J. VITETTA, E. S. HIV-infected cells are killed by rCD4-ricin A chain. *Science*, 242 (4882): 1166-1168, 1988.

TONG, Z.;GAO, Z.;WANG, F.;ZHOU, J. ZHANG, Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 10 (71): 12-25, 2009.

TREGGAR, J. W. & ROBERTS, L. M. The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. *Plant Mol Biol*, 18 (3): 515-525, 1992.

VAISMAN, B.;MOTIEI, M.;NYSKA, A. DOMB, A. J. Biocompatibility and safety evaluation of a ricinoleic acid-based poly(ester-anhydride) copolymer after implantation in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A (2): 419-431, 2010.

VAN DAMME, E. J.;BARRE, A.;ROUGE, P.;VAN LEUVEN, F. PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrin b), a GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). *Eur J Biochem*, 237 (2): 505-513, 1996.



VANDESOMPELE, J.;DE PRETER, K.;PATTYN, F.;POPPE, B.;VAN ROY, N.;DE PAEPE, A. SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): RESEARCH0034, 2002.

VASCONCELOS, I. M. & OLIVEIRA, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44 (4): 385-403, 2004.

VILLAFRANCA, J. E. & ROBERTUS, J. D. Ricin B chain is a product of gene duplication. *J Biol Chem*, 256 (2): 554-556, 1981.

WALSH, T. A.;MORGAN, A. E. HEY, T. D. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem*, 266 (34): 23422-23427, 1991.

WANG, W. X.;DONG, J. Y.;ZHOU, S. Y.;LI, W. L. ZHAO, Y. Modification of ricin and its hepatotoxicity and activity against hepatocellular cancer in mice. *World J Gastroenterol*, 4 (4): 307-310, 1998.

WANG, Y. X.;JACOB, J.;WINGFIELD, P. T.;PALMER, I.;STAHL, S. J.;KAUFMAN, J. D.;HUANG, P. L.;LEE-HUANG, S. TORCHIA, D. A. Anti-HIV and anti-tumor protein MAP30, a 30 kDa single-strand type-I RIP, shares similar secondary structure and beta-sheet topology with the A chain of ricin, a type-II RIP. *Protein Sci*, 9 (1): 138-144, 2000.

WESCHE, J.;RAPAK, A. OLSNES, S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem*, 274 (48): 34443-34449, 1999.

WILGENBUSCH, J. C. & SWOFFORD, D. Inferring evolutionary trees with PAUP\*. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 6 Unit 6 4, 2003.

WITTEWER, C. T.;HERRMANN, M. G.;MOSS, A. A. RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22 (1): 130-131, 134-138, 1997.

WONG, M. L. & MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-85, 2005.

YAN, H. Z. & LIOU, R. F. Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genet Biol*, 43 (6): 430-438, 2006.

YANG, Y.;HOU, S.;CUI, G.;CHEN, S.;WEI, J. HUANG, L. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep*, 37 (1): 507-513, 2009.

YUE, J. Q.;ZHANG, L. F. YANG, Z. G. Detection of ricin toxin in water using immunoassays. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89 (8-12): 821-833, 2009.

YULDASHEV, P. K. Ricinine and its transformations. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (3): 274-275, 2001.

ZHAN, J. & ZHOU, P. A simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. *Toxicology*, 186 (1-2): 119-123, 2003.

## APÊNDICES

**Tabela 6.** com as famílias botânicas, nome específico, códigos de acesso e Acrônimos, utilizados para construção da árvore filogenética contendo todas as RIPs de Magnolipsida.

Família	Especies	Códigos de Acesso	Acrônimos
Lauraceae	<i>Cinnamomum camphora</i>	AY039801.	<i>Ccam</i> RIPI1
		AY039803.1	<i>Ccam</i> RIPI2
		AY039802.1	<i>Ccam</i> RIPI3
Cucurbitaceae	<i>Benincasa hispida</i>	AF453777.2	<i>Bhis</i> RIPI1
	<i>Bryonia dioica</i>	L42298.1	<i>Bdio</i> RIPI1
	<i>Cucumis figarel</i>	AB045560.1	<i>Cfig</i> RIPI1
	<i>Cucurbita moschata</i>	AY256463.1	<i>Cmos</i> RIPI1
	<i>Cucurbita moschata</i>	AF462349.2	<i>Cmos</i> RIPI2
	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	AY513740.1	<i>Gpen</i> RIPI1
	<i>Luffa cylindrica</i>	EF183475.1	<i>Lcyl</i> RIPI1
		X62371.1	<i>Lcyl</i> RIPI2
	<i>Momordica balsamina</i>	Z12175.1	<i>Mbal</i> RIPI1
	<i>Momordica charantia</i>	X57682.1	<i>Mcha</i> RIPI1
	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	AF055086.1	<i>Tcuc</i> RIPI1
	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	AY584242.1	<i>Tkir</i> RIPI1
	AY584242.1	<i>Tkir</i> RIPI2	
	AB426591.1	<i>Tkir</i> RIPI3	
Fabaceae	<i>Abrus pulchellus</i>	EU008735.1	<i>Apul</i> RIPI1
	<i>Abrus precatorius</i>	X55667.1	<i>Apre</i> RIPI1
		X54872.1	<i>Apre</i> RIPI2
		X54873.1	<i>Apre</i> RIPI3
Euphorbiaceae	<i>Senna occidentalis</i>	EF183472.1	<i>Socc</i> RIPI1
	<i>Euphorbia serrata</i>	AF457875.1	<i>Eser</i> RIPI1
		AF457874.1	<i>Eser</i> RIPI2
	<i>Euphorbia esula</i>	TA19326 3993	<i>Eesu</i> RIPI1
		TA15203 3993	<i>Eesu</i> RIPI2
		TA18195 3993	<i>Eesu</i> RIPI3
		DV149029	<i>Eesu</i> RIPI4
		DV142683	<i>Eesu</i> RIPI5
		DV150739	<i>Eesu</i> RIPI6
		DV145338	<i>Eesu</i> RIPI7
	<i>Jatropha curcas</i>	AY069946.1	<i>Jcur</i> RIPI1
		AF469003.1	<i>Jcur</i> RIPI2
		EU195892.1	<i>Jcur</i> RIPI3
	<i>Gelonium multiflorum</i>	L12243.1	<i>Gmul</i> RIPI1
	<i>Ricinus communis</i>	29638.m000512	<i>Rcom</i> RIPI1
		29638.m000513	<i>Rcom</i> RIPI2
		29995.m000173	<i>Rcom</i> RIPI3
	28842.m000952	<i>Rcom</i> RIPI4	
	29852.m001982	<i>Rcom</i> RIPI5	
	29942.m000748	<i>Rcom</i> RIPI6	
	30113.m001449	<i>Rcom</i> RIPI7	

		29995.m000170	Rcom RIPI8
		59679 m000011	Rcom RIPII1
		44148.m000007	Rcom RIPII1
		28274.m000033	Rcom RIPII2
		29995 m000175	Rcom RIPII3
		29995.m000180	Rcom RIPII4
		29988.m000128	Rcom RIPII5
		29988.m000125	Rcom RIPII6
		29995.m000171	Rcom RIPII7
		28274.m000034	Rcom RIPII8
		28274.m000037	Rcom RIPII9
		29791.m000533	Rcom RIPII10
		29942.m000749	Rcom RIPII11
		29995.m000177	Rcom RIPII12
Olacaceae	<i>Ximenia americana</i>	AM114537.1	Xame RIPII1
Santalaceae	<i>Viscum articulatum</i>	EF620539.1	Vart RIPII1
	<i>Viscum album</i>	DQ011864.1	Valb RIPII1
Caryophyllaceae	<i>Dianthus caryophyllus</i>	X59260.1	Dcar RIPI1
	<i>Dianthus chinensis</i>	AF219237.1	Dchi RIPI1
	<i>Saponaria officinalis</i>	X59256.1	Soff RIPI1
		X15655.1	Soff RIPI2
		DQ105519.1	Soff RIPI3
Amaranthaceae	<i>Amaranthus viridis</i>	U85255.1	Avir RIPI1
		AF004389.1	Avir RIPI2
	<i>Atriplex patens</i>	DQ991968.1	Apat RIPI1
	<i>Beta vulgaris</i>	AM265609.1	Bvul RIPI1
		AM265610.1	Bvul RIPI2
		TA10655 161934	Bvul RIPI3
	<i>Chenopodium album</i>	AF228508.1	Calb RIPI1
		AF230812.1	Calb RIPI2
	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	DQ989495.1	Bspe RIPI1
	<i>Bougainvillea x buttiana</i>	DQ013264.2	Bbut RIPI1
	<i>Spinacia oleracea</i>	AB070925.1	Sole RIPI1
Cucurbitaceae	<i>Cucumis figarel</i>	AB045560.1	Cfig RIPI1
	<i>Luffa cylindrica</i>	EF183475.1	Lcyl RIPI1
		X62371.1	Lcyl RIPI2
Aizoaceae	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	BE036541	Mcry RIPI1
		TA3510 3544	Mcry RIPI2
		TA3186 3544	Mcry RIPI3
		U80072.1	Mcry RIPI4
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca acinosa</i>	AAT12449.1	Paci RIPI1
	<i>Phytolacca americana</i>	AY547315.1	Pame RIPI1
		X78628.1	Pame RIPI2
	<i>Phytolacca heterotepala</i>	AY327475.1	Phet RIPI1
	<i>Phytolacca insularis</i>	AF141331.1	Pins RIPI1
	<i>Phytolacca octandra</i>	AF533515.1	Poct RIPI1
Nyctaginaceae	<i>Mirabilis expansa</i>	AY148091.1	Mexp RIPI1
	<i>Mirabilis jalapa</i>	D10227.1	Mjal RIPI1
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	EF183469.1	Ntab RIPI1
Lamiaceae	<i>Clerodendrum inerme</i>	EU839992.1	Cine RIPI1
	<i>Clerodendrum aculeatum</i>	X96583.1	Cacu RIPI1
Asteraceae	<i>Centaurea maculosa</i>	EH723563	Cmac RIPII1
	<i>Centaurea solstitialis</i>	EH756893	Csol RIPII1
	<i>Helianthus tuberosus</i>	EL455240	Htub RIPII1
Araliaceae	<i>Panax ginseng</i>	DQ683359.1	Pgin RIPII1

Adoxaceae	<i>Sambucus ebulus</i>	AJ400822.1	<i>Sebu</i> RIPII1
	<i>Sambucus sieboldiana</i>	D25317.1	<i>Ssie</i> RIPII1
	<i>Sambucus nigra</i>	AF012899.1	<i>Snig</i> RIPII1
		AF249280.1	<i>Snig</i> RIPII2
		U41299.1	<i>Snig</i> RIPII3
		U27122.1	<i>Snig</i> RIPII4
		U76524.1	<i>Snig</i> RIPII5
		U58358.1	<i>Snig</i> RIPII6
		U58357.1	<i>Snig</i> RIPII7
		U66191.1	<i>Snig</i> RIPII8

**Tabela 7.** contendo as assinaturas das 20 Rcom RIPs e das 7 Rcom Lec obtidas no banco de assinatura InterPro, através da ferramenta InterProScan.

Acrônimos	Código de Acesso InterPro	Descrição	Banco de Dados	Descrição
Rcom RIPII1	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
	IPR008997	Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		Ricin B lectin
Rcom RIPII2	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
		Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		

	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		RIP
	IPR000772	Ricin B lectin	HMPfam	Ricin B lectin
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
Rcom RIPII3	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
	IPR008997	Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
IPR000772	Ricin B lectin	Ricin B lectin		
Rcom RIPII4	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
Rcom RIPII5	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
Rcom RIPII6	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN

	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		RIP
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		Ribosome Inactivating Protein
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
Rcom RIPII7	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		RIP
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
	IPR008997	Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
Rcom RIPII8	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		RIP
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		Ribosome Inactivating Protein
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN

Rcom RIPII9	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
	IPR008997	Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		Ricin B lectin
Rcom RIPII10	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		Ricin B lectin
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
Rcom RIPII11	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		Ricin B lectin
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989			
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like



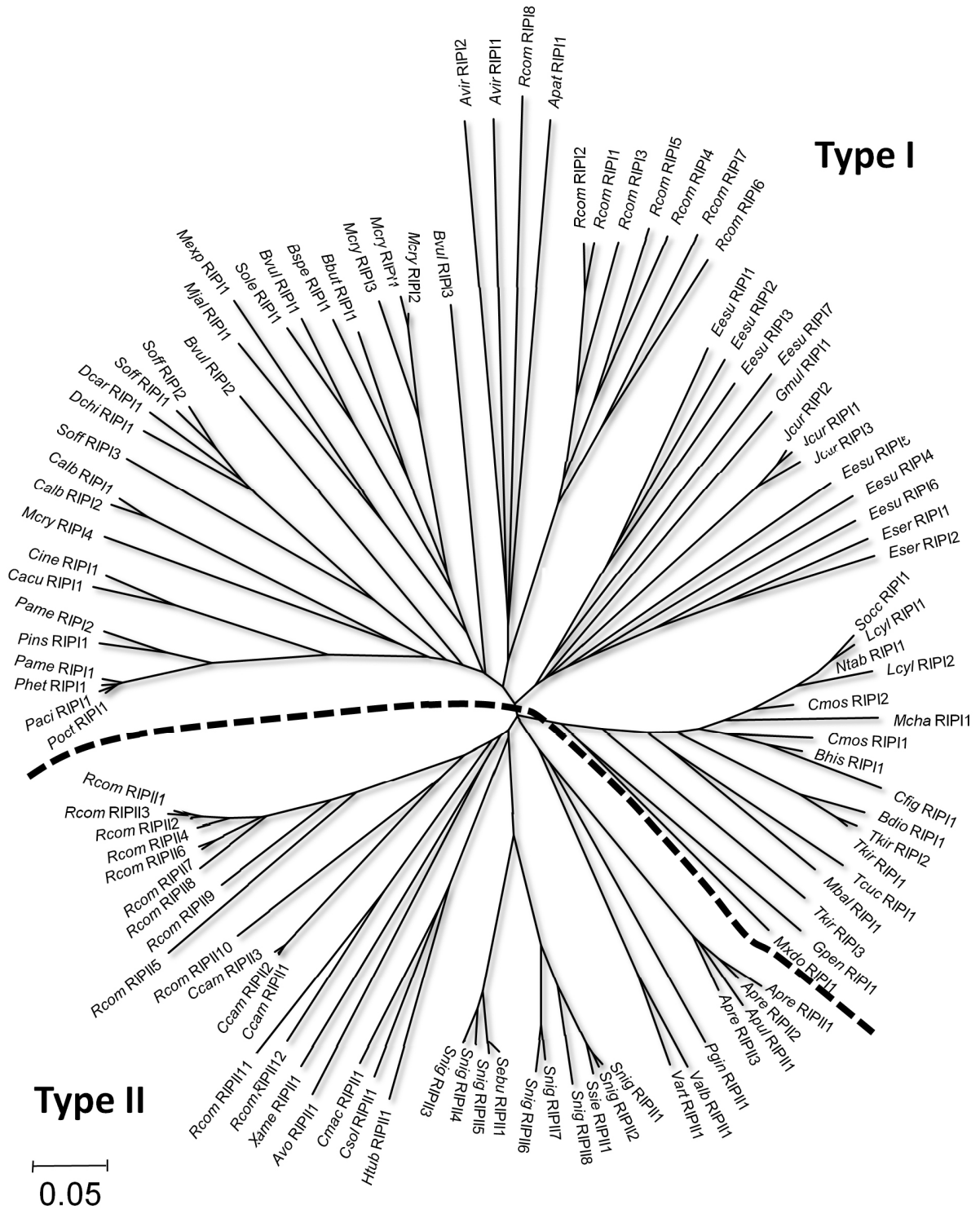
Rcom RIPII12	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
	IPR000772	Ricin B lectin		Ricin B lectin
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Proteins
	IPR008997	Ricin B-related lectin		Ricin B-like lectins
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2		No Description
IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN	
Rcom RIPI1	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
Rcom RIPI2	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMPfam	RIP
Rcom RIPI3	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN

	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom RIPI4	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom RIPI5	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom RIPI6	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom RIPI7	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	Ribosome Inactivating Protein sub2
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1		Ribosome Inactivating Protein sub1
	IPR017988	Ribosome Inactivating Protein conserved site	PatternScan	SHIGA_RICIN
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	Ribosome Inactivating Protein
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN

	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom RIP8	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
	IPR016138	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 1	Gene3D	No Description Ribosome Inactivating Proteins
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	SuperFamily	
	IPR017989	Ribosome Inactivating Protein subgroup	FPrintScan	SHIGARICIN
Rcom Lec 1	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
Rcom Lec 2	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	Ricin B-like lectins Ribosome Inactivating Proteins
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein		RICIN
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR016139	Ribosome Inactivating Protein, subdomain 2	Gene3D	No Description
	IPR001574	Ribosome Inactivating Protein	HMMPfam	RIP
Rcom Lec 3	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	RicinB like
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
Rcom Lec 4	IPR000772	Ricin B lectin	ProfileScan	RICIN B LECTIN
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	Ricin B like
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
Rcom Lec 5	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	Ricin B-like lectins
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
Rcom Lec 6	IPR008997	Ricin B-related lectin	SuperFamily	Ricin B-like lectins
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMPfam	Ricin B lectin
	IPR000772	Ricin B lectin	HMMSmart	RICIN
Rcom Lec 7	IPR000772	Ricin B lectin	Gene3D	G3DSA:2.80.10.50



Figura 19. Árvore filogenética de todas as RIPs de Magnolipsida



**Tabela 8.** Análise de variância dos dados de expressão relativa das Rcom RIPs durante os cinco estádios da semente

FV	GL	SQ	QM	Fc
gene	10	61.422828	6.142283	36.846 *
estádio	4	99.684320	24.921080	149.494 *
gene*estádio	40	45.499452	1.137486	6.823 *
erro	108	18.003951	0.166703	
Total corrigido	162	224.610551		
CV (%) =	37.54			
Média geral:	1.0876243	Número de observações:	163	

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

#### Análise do desdobramento de gene dentro de cada nível de estágio

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc
gene	/1	10	0.000025	0.000003	0.000 NS
gene	/2	10	9.736245	0.973625	5.840 *
gene	/3	10	82.111601	8.211160	49.256 *
gene	/4	10	9.468603	0.946860	5.680 *
gene	/5	10	5.605806	0.560581	3.363 *
Erro		108	18.003951	0.166703	

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Codificação usada para o desdobramento estágio

S1 = 1

S2 = 2

S3 = 3

S4 = 4

S5 = 5

-----  
**Análise do desdobramento de estádio dentro de cada nível de gene**  
 -----

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV		GL	SQ	QM	Fc
estádio	/1	4	8.056688	2.014172	12.082 *
estádio	/2	4	6.505327	1.626332	9.756 *
estádio	/3	4	7.235014	1.808753	10.850 *
estádio	/4	4	7.513758	1.878439	11.268 *
estádio	/6	4	52.607639	13.151910	78.894 *
estádio	/7	4	29.158729	7.289682	43.728 *
estádio	/8	4	11.585888	2.896472	17.375 *
estádio	/9	4	6.962622	1.740656	10.442 *
estádio	/10	4	6.889211	1.722303	10.332*
estádio	/11	4	2.657369	0.664342	3.985*
Erro		108	18.003951	0.166703	

-----  
 Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Codificação usada para o desdobramento

- 1 = *Rcom* RIPI 3
- 2 = *Rcom* RIPI 4
- 3 = *Rcom* RIPI 5
- 4 = *Rcom* RIPI 7
- 5 = *Rcom* RIPI 8
- 6 = *Rcom* RIPII 1
- 7 = *Rcom* RIPII 2
- 8 = *Rcom* RIPII 4
- 9 = *Rcom* RIPII 5
- 10 = *Rcom* RIPII 6
- 11 = *Rcom* RIPII 8

## CURRICULUM VITÆ

### LOSS, G.

#### 1. DADOS PESSOAIS

**Nome:** Guilherme loss de Moraes

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS, Brasil, 22/01/1983

**Email:** guilherme.loss@gmail.com

**2. FORMAÇÃO:** Ciências Biológicas (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul -PUCRS) – 2002 a 2007

#### 3. ESTÁGIOS

Monitor da disciplina Biologia /Celular – 2004/1 – 105h/aula

Monitor da disciplina Histologia Vegetal – 2004/2 – 90h/aula

Monitor do Projeto RECREARE - 2005/1 – 20h/aula

Monitor da disciplina Histologia Vegetal – 2005/1 – 105h/aula

Monitor da disciplina Histologia Vegetal – 2005/2 – 45h/aula

#### 4. PRÊMIOS E DISITNÇÕES

Prêmio Professor Antônio Rodrigues Cordeiro de segundo melhor trabalho intitulado “Phylogenetic and Comparative Analysis of Cator Bean Type I e Type II RIPs”, no II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. Búzios, RJ (31/03/2009- 03/04/2009)

#### 6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. LOSS, Guilherme ; DALMAS, Fernando Rostirolla ; ASTARITA, Leandro Vieira . Microestaquia *in vitro* de *Araucaria angustifolia*. In: BAIRESBIOTEC2005, 2005, Buenos Aires. Libro de resúmenes, 2005



2. LOSS, G ; ETGES, M. F. ; CAGLIARI, A. ; MARGIS-PINHEIRO, M. ; MARGIS, R. . Phylogenetic and comparative analysis of castor bean type I and II RIPS. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Búzios, RJ. Anais do II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009.

3. ZOLET, A. C. T; LOSS, G ; MARGIS-PINHEIRO, M. ; MARGIS, R. . Análise evolutiva dos genes P5CS e indentificação de polimorfismo associado ao estresse hídrico em populações nativas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake(guapuruvu) através de marcadores moleculares (SNPs). In: XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2007, Gramado. Anais do XI Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2007.

4. DALMAS, Fernando Rostirolla ; MORAIS, Guilherme Loss ; ASTARITA, Leandro Vieira . Cultivo *in vitro* de segmentos caulinares de *Araucaria angustifolia* (CONIFERAE). In: 56 Congresso Nacional de Botânica, 2005, Curitiba, 2005.

## **7. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

MARGIS-PINHEIRO, M.; ZOLET, A. C. T.; LOSS, G; PASQUALI, Giancarlo; MARGIS, R. Molecular evolution and diversification of plant cysteine proteinase inhibitors: New insights after the poplar genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p. 349-355, 2008.