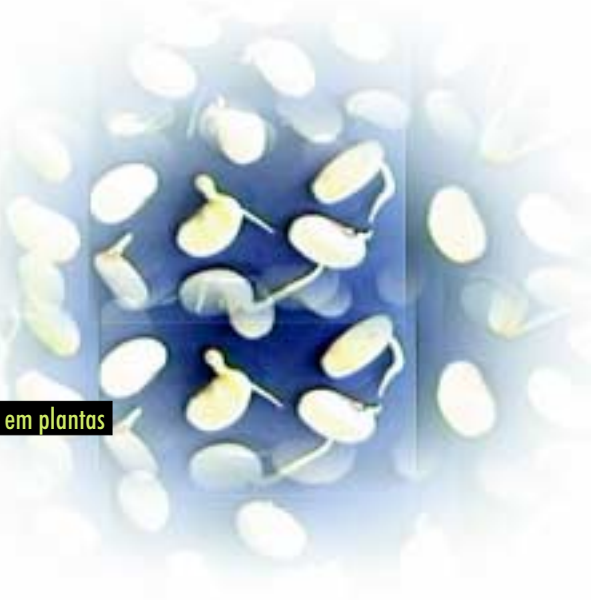
Pesquisa

INSULINA DE PLANTAS



Hormônio peptídico em plantas

Antonia Elenir Amâncio de Oliveira
(Doutoranda, UENF)

Cassiana Rocha Azevedo
(Iniciação Científica, UENF)

Thiago Motta Venâncio
(Iniciação Científica, UENF)

Luciana Belarmindo da Silva
(Mestranda, UENF)

Marco Antônio Lopes Cruz
(Mestrando, UENF)

Olga Lima Tavares Machado
(Professora Associada, UENF – Olga@uenf.br)

Maura da Cunha
(Professora Associada, UENF – maura@uenf.br)

Viviane de Oliveira Santos
(Iniciação Científica, UENF)

Cristiane Paulain Cavalcante
(Iniciação Científica, UA)

Adriana Ferreira Uchoa
(Doutoranda, UENF)

Kátia Valevski Sales Fernandes
(Professora Associada, UENF – coupkat@uenf.br)

Valdirene Moreira Gomes
(Professora Associada, UENF – valmg@uenf.br)

Spartaco Astolfi Filho
(Professor Titular, UA – sastolfi@fua.br)

José Xavier-Filho
(Professor Titular, UENF – xavier@uenf.br)

Fotos cedidas pelos autores

Diabetes e Insulina

O diabetes, caracterizado por elevados níveis de glicose no sangue e excesso de urina com sabor adocicado é, atualmente, uma das doenças mais importantes que afetam a humanidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem 142 milhões de diabéticos no mundo. A estimativa é que, até 2005, o número alcance 300 mi1hões (O Globo, 1998). A doença é conhecida desde a antiguidade. há mais de 1500 anos A.C. os antigos egípcios tinham alguns remédios para combater o excesso de urina, e os hindus observaram que insetos e moscas eram atraídos para a urina de algumas pessoas e que isso estava associado a certas doenças. Mil anos A.C. o pai da medicina na Índia, Susruta, diagnosticou o diabetes. Os Gregos antigos não tinham tratamento para a doença e, em várias partes do mundo, acreditava-se que ela fosse causada por calor excessivo nas vísceras, por variações humorais ou pelo excesso de bebidas. No fim do século XVIII, Matthew Dobson provou que o sabor da urina no diabetes era devido à presença de açúcar e mostrou o excesso de açúcar no sangue; na mesma época, John Rollo observou o odor de acetona nos pacientes com diabetes (Pike, 1999).

Figura 1 – Planta e sementes de *Canavalia ensiformis*

Posteriormente, foram feitas descobertas importantíssimas para o melhor entendimento do diabetes. Entre elas a de Von Mering e Oscar Minkowski, em 1899, de que a retirada do pâncreas do cachorro promovia o aparecimento da doença naquele animal. Em 1921, uma equipe liderada por Frederick Banting descobriu, no Canadá, que um peptídeo, a insulina, secretado pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas, causava o abaixamento dos níveis de açúcar do sangue. Em 1926, esse peptídeo foi cristalizado por J. J. Abel e, em 1955, Frederick Sanger determinou sua seqüência de aminoácidos (Turkenburg-van Diepen, 1996).

Sabe-se, atualmente, que a insulina exerce seus efeitos quando se liga ao seu receptor na parte externa da membrana celular. Essa ligação inicia uma cascata de fosforilação no interior da célula, que, entre outras coisas, promove a fosforilação e conseqüente ativação de transportadores de glicose. Isso faz com que essa molécula penetre na célula e participe dos processos metabólicos em que está envolvida. São conhecidos também outros efeitos da ação de insulina sobre o metabolismo e ativação de genes na célula animal.

Figura 2 – Seqüências de aminoácidos de insulinas bovinas e de plantas

Tratamento do diabetes

Diabetes não tem cura. Seu tratamento é feito, principalmente, à base de injeções de insulina, sendo sua ingestão ineficaz. O hormônio tem uma importância enorme no controle dessa afecção. Entretanto, o sofrimento decorrente das múltiplas injeções diárias a que são submetidos os pacientes tem sido um estímulo para a busca de substitutivos, principalmente os que exerçam seus efeitos por via oral. Alguns desses são pequenas moléculas que, de uma forma ou de outra, mimetizam a ação da insulina em pacientes diabéticos. Exemplo de composto anti-hiperglicêmico do tipo acima é o metformin (N, N-dimetil guanidina) originalmente detectado em uma planta, *Galega officinalis*, da família das leguminosas.

Extratos de partes de plantas, como folhas, raízes ou sementes, têm sido utilizados, através dos tempos, pela medicina popular de, praticamente, todas as populações humanas no tratamento do diabetes. Entretanto, após a descoberta da insulina e com sua extensa comercialização, estudos sobre a utilização de remédios populares originados de plantas diminuíram seja por não serem considerados de valor comercial seja por estarem, aparentemente, associados a uma ciência de segunda categoria. Vale ressaltar que muito poucos remédios ditos naturais para o tratamento do diabetes tiveram seu valor terapêutico comprovado.

Insulina de Plantas

Logo após a realização dos estudos que levaram à descoberta da insulina no pâncreas de cães, dois dos cientistas envolvidos (Collip, 1923; Best et al., 1924) com a descoberta apresentaram resultados nos quais sugeriam a presença de substâncias possivelmente similares à insulina em extratos das mais diversas plantas. Collip chegou a dar ao seu produto o nome de glucocinina, pois imaginou que um produto derivado de plantas não poderia ter o nome de insulina (originado da palavra latina que significa ilhota, referência às ilhotas de Langerhans do pâncreas). Em 1976, Khann et al. forneceram indícios mais concretos sobre a presença de insulina em plantas. Eles isolaram de frutos e de sementes de *Momordica charantia* (melão-de-São Caetano) uma fração protéica com massa molecular de, aproximadamente, 6,0 kDa, que reagia com anticorpo contra a insulina humana. Os estudos desse grupo foram baseados nas experiências da medicina popular indiana, que indica serem os frutos e sementes dessa cucurbitácea de grande valor no tratamento do diabetes.

Posteriormente, Collier et al. (1987) relataram o isolamento de proteínas de folhas de espinafre e de centeio e de plantas de *Lemna gibba* G3, que apresentaram pesos moleculares semelhantes aos das insulinas animais, reagiram com anticorpo antiinsulina suína e exibiam a propriedade de ligação ao receptor de insulina humana. Nenhuma informação estrutural foi fornecida na ocasião ou posteriormente.

Não há registros posteriores a esses relatos na literatura científica sobre a presença de insulina em plantas. Mas há, no entanto, um registro contínuo na literatura, dos efeitos benéficos de uma enorme quantidade de extratos de folhas e de sementes das mais variadas plantas sobre o diabetes, e cujas propriedades sugerem a presença de proteínas ativas.

A despeito dessa grande quantidade de informação, que sugere a presença de insulina em plantas, parece haver um paradigma que estabelece que as plantas não se valem de hormônios peptídicos, como insulina, para seus processos metabólicos. Há, conseqüentemente, descrença de que os vegetais possam se valer de insulina, por exemplo, para o controle da metabolização de açúcar em suas células.

Como exemplo dessa descrença, há afirmações facilmente encontradas, como a que se segue (Brach, 2000):

"Uma vez que insulina é um hormônio em animais, as plantas certamente não teriam um 'uso' para ela; assim ela pode não ter qualquer efeito sobre as mesmas (.....)" .

Há um enorme interesse em se utilizarem plantas como produtoras de proteínas animais de difícil preparação ou daquelas requeridas em grandes quantidades, a preços acessíveis. Como exemplo disso, há tentativas de produção de hormônio do crescimento em plantas transformadas adequadamente (Staub et al, 2000). As famosas plantas produtoras de vacinas estão freqüentemente anunciadas na literatura (Yu & Langridge, 2000). No caso da insulina, sua produção utilizando-se a chamada tecnologia do DNA recombinante já é uma indústria importante. A indústria brasileira BIOBRÁS, de Montes Claros, Minas Gerais, produz insulina humana, não propriamente utilizando células de vegetais, mas a partir de células de *Escherichia coli* transformadas com um gene da proinsulina humana (BIOBRÁS, 1998). Há uma iniciativa do Professor Adilson Leite, da Universidade de Campinas, que procura transformar plantas de fumo com um gene de insulina humana para produção do hormônio em sementes (FAPESP, 2000), além de registro sobre transformação de batata com um gene de insulina humana (Arakawa et al, 1998).

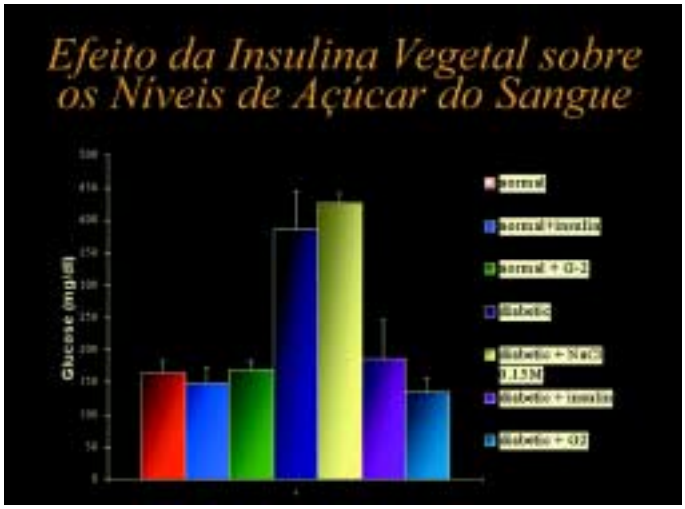
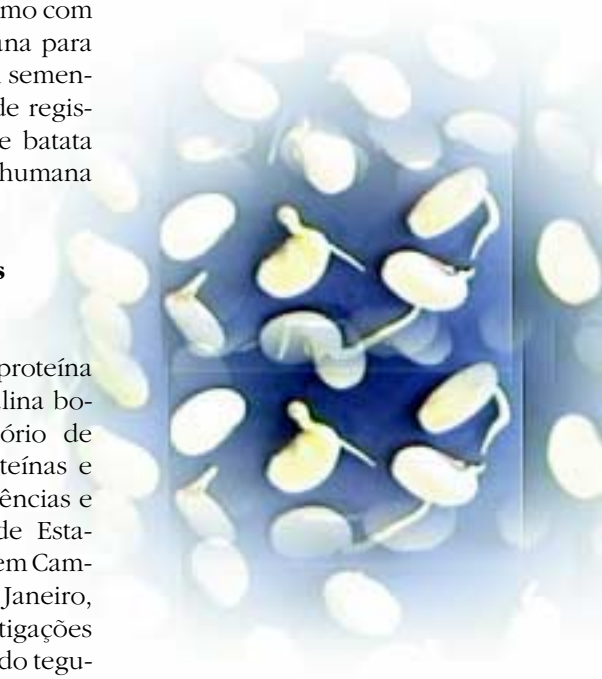


Figura 3 – Efeitos de insulinas sobre os níveis de glicose no sangue

Nossos resultados

Acaso

A descoberta de uma proteína com características da insulina bovina foi feita no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, por acaso, durante investigações sobre o efeito de proteínas do tegumento de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (Figura 1) na sobrevivência do caruncho ou gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Resultados já publicados (Oliveira et al., 1999) mostram que a proteína tem massa molecular idêntica e seqüência primária exatamente igual à da insulina bovina (Figura 2). Além disso, a proteína isolada reage com anticorpos antiinsulina (humana e bovina) da mesma maneira que insulina bovina. Mostramos também que a insulina isolada tem os mesmos efeitos que a animal no abaixamento dos níveis de glicose em animais diabéticos (Figura 3).



Demonstramos, posteriormente, que a insulina de sementes de feijão-de-porco localiza-se exclusivamente no tegumento e, neste, em uma camada de células que delimita o espaço entre esse tecido e os cotilédones (Figura 4). Sabe-se que essa camada de células está envolvida no transporte de açúcar das partes aéreas da planta para a semente durante a formação desta última. Juntamente com a molécula de insulina, detectamos um fragmento de proteína que apresentou homologia de seqüência com o receptor de insulina humana.

Em experimentos feitos com a utilização de anticorpos antiinsulina e anti-receptor de insulina, mostramos que essas duas proteínas exercem um efeito marcante durante as primeiras etapas da germinação, quando se dá a embebição de água pela semente. A presença de insulina estimula a emersão da radícula que é bloqueada quando se adiciona anticorpo antiinsulina ao meio (Figura 5). Os experimentos sugerem fortemente que a insulina possa estar exercendo papel de sinalizador para a entrada de glicose nas células.

Posteriormente, mas ainda não publicados, resultados obtidos mostram que as sementes de *Canavalia braziliensis* (feijão-de-boi), uma espécie relacionada a *C. ensiformis*, também contêm insulina e seu receptor.

A idéia de que o papel da insulina em plantas possa estar ligado a processos de sinalização necessários para a metabolização de glicose semelhantes aos existentes em animais nos levou à procura da molécula em diferentes plantas.

Plantas antidiabéticas

As vagens verdes de feijões são recomendadas como sendo úteis

no tratamento do diabetes. As vagens são utilizadas para a preparação de chás ou consumidas como saladas. Folhas de diversas plantas são também bastante utilizadas para o tratamento dessa afecção. Diante dos resultados obtidos com as sementes de feijão-de-porco, passamos a investigar as vagens de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) e as folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), duas plantas bastante utilizadas no Brasil (Panizza, 1997).

Além de evidenciada a presença de insulina em vagens e tegumentos de sementes de feijão-de-corda em formação, mostramos sua presença também nas folhas dessa leguminosa (Venâncio et al, 2000). A presença do hormônio também foi comprovada nas folhas de pata-de-vaca. Neste último caso, conseguimos mostrar que a insulina se encontra predominantemente associada aos cloroplastos que são as organelas responsáveis pelos processos fotossintéticos que se dão nas folhas verdes (Azevedo, 2000).

Figura 4 – Imunolocalização de insulina no tegumento de *Canavalia ensiformis*

Preparação de insulinas de plantas

A descoberta de insulina em tegumentos de feijão-de-porco foi feita utilizando-se preparações obtidas a partir de extratos feitos com tampões fosfato de potássio (50 mM, pH 7,6). Essas preparações eram cromatografadas em colunas de troca iônica e de filtração molecular e a sua pureza verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Após a constatação de que nossa preparação continha insulina, feita inicialmente pelo seqüenciamento de amino ácidos, passamos a utilizar técnicas de imunoquímica para a detecção da proteína. Utilizamos um anticorpo policlonal contra insulina humana e empregamos técnicas de ELISA e de "Western blot".

As insulinas de folhas das diversas plantas estudadas foram detectadas seja por extração com tampões alcalinos (fosfato ou borato) seja por uma metodologia de extração que emprega uma mistura de etanol e água e acidificação com ácido forte. Essa metodologia é semelhante à que se emprega para preparação de insulina a partir de tecido pancreático (bovino ou de outro animal). Em alguns casos, lança-se mão do método desenvolvido por Khann et al. (1976), que utiliza extrações com misturas de álcool e clorofórmio, nas etapas iniciais. As etapas posteriores de purificação, quando foram necessárias, foram feitas por meio de técnicas comuns de química de proteínas, como cromatografia em troca iônica e filtração molecular. A identidade da insulina foi sempre mostrada por ELISA ou por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida de "Western blot".

Conservação evolucionária

Diante dos resultados obtidos no LQFPP com plantas da família das leguminosas, e tendo em vista os resultados de outros, com plantas de outras famílias (ver Collier et al., 1987, e Khann et al., 1976), passamos a examinar, utilizando técnicas de imunoquímica (ELISA, Western blot), folhas de plantas de um maior número de espécies. Essas foram selecionadas não somente por sua conhecida ação antihiperglicêmica relatada na medicina popular, mas para cobrir um grande número de espécies dos diferentes grupos de vegetais. Foram também incluídas plantas típicas da Região Amazônica, conhecida por sua grande biodiversidade.

Os resultados obtidos mostram que a maioria dos extratos de folhas examinados contêm moléculas imunoreativas, seja em um ensaio em meio líquido (ELISA) seja sobre membranas (Western blot). Neste último caso, os resultados apontam para a presença de moléculas de insulina que apresentam a mesma massa molecular das insulinas animais. Grande parte dos resultados aponta também para a complexação da molécula de insulina de plantas com compostos de natureza glicídica.

A fim de tentar estabelecer a presença de insulina (ou antígenos que se associam a anticorpos antiinsulina) em grupos mais primitivos, mostramos que essa molécula está presente em uma cianobactéria (*Spirulina* sp). Esses organismos tiveram origem em época anterior à formação dos cloroplastos das plantas verdes (Cavalier-Smith, 2000).

O conhecimento que se tem da extensão da presença de insulina em animais (Chan & Steiner, 2000) associado aos resultados obtidos por nós sobre a presença de insulina em plantas e cianobactérias e àqueles resultados dos que relatam a presença desse hormônio em bactérias (LeRoith et al., 1985) e fungos (LeRoith et al., 1980), nos levam a crer que essa molécula foi conservada durante a evolução, sugerindo que ela esteja associada aos processos de metabolização de glicose em todos os seres vivos.

As investigações realizadas por nós, além de sugerirem que a insulina está presente em plantas e é uma molécula evolucionariamente conservada, também apontam para a validação de produtos da medicina popular utilizados no tratamento do diabetes. Esforços estão sendo dirigidos para compreender porque as insulinas de folhas de plantas são eficazes mesmo quando administradas oralmente.

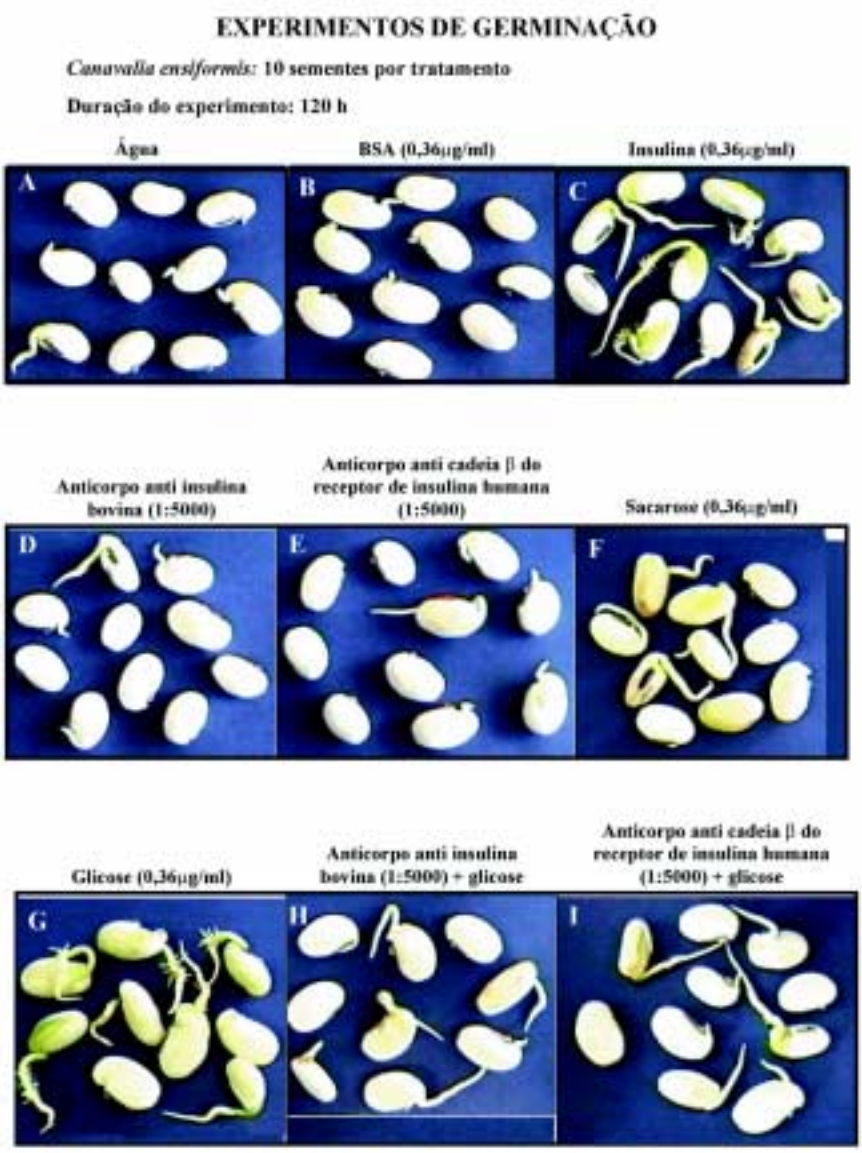


Figura 5 – Influência de insulina e anticorpo sobre a germinação de *Canavalia ensiformis*

Referências Bibliográficas

Arakawa T., Yu J., Chong D.K., Hough J., Engen P.C. & Langridge W.H. - A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nat Biotechnol. 16: 934-938 (1998)

Azevedo, C. R. -Investigações sobre a presença de insulina em folhas de Bauhinia forficata (pata-de-vaca) utilizadas no tratamento do diabetes (Monografia de graduação, UENF) 2000

Best C. H., Smith R. G. & Scott D. A. – An insulin-like material in various tissues of the normal and diabetic animal. Amer. J. Physiol. 68: 161-182 (1924)

BIOBRÁS - Uma Nova Era no Tratamento do Diabético Brasileiro.

http://www.biobras.com.br/releases_04.htm (1998)

Brach, A.R. - Plants and Insulin http://www.herbaria.harvard.edu/~brach/ (2000)

Cavalier-Smith, T. - Membrane heredity and early chloroplast evolution. Trends Plant Sci. 5: 174-182 (2000)

Chan, S. J. & Steiner, D. – Insulin through the ages: Phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. Amer. Zool. 40: 213-222 (2000)

Collier E., Watkinson A., Cleland C. F. & Roth J. - Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. J. Biol. Chem. 262: 6238-6247 (1987).

Collip J. B. – Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. J. Biol. Chem. 56, 513-543 (1923).

FAPESP-Tabaco produz pró-insulina. PESQUISA FAPESP 54, http://www.fapesp.br/lab54.htm (2000)

Khann P., Nag T. N., Chandrajain S. & Mohan S. United States Patent. 3: 945-988 (1976).

LeRoith D., Shiloach J., Heffron R., Rubinovitz C, Tannebaum R & Roth, J – Insulin-related material in microbes: similarities and differences from mammalian insulins. Can. J. Biochem. Cell Biol. 63: 839-849 (1985)

LeRoith D., Shiloach J., Roth J & Lesniak M. A. – Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular euka-

INSULINA (ANTÍGENO) ESTÁ PRESENTE EM CIANOBACTÉRIAS E PLANTAS VERDES

Cianobactéria		Spirulina sp	+
Briófitas			
Pteridófitas		Psilotaceae	+
		Equisetaceae	+
		Selaginelaceae	+
Gimnospermas		Cycadaceae	+
		Ginkgoaceae	+
		Pinaceae	+
		Cupressaceae	
Angiospermas		Nymphaeales	
		Ceratoophyllales	
		Piperales	
		Aristolochiales	
		Magnoliales	+
		Laurales	+
		Illiciales	
	Monocotiledôneas	Acorales	
		Alismatales	+
		Asparagales	+
		Liliales	
		Dioscoreales	
		Nartheciales	
		Pandanales	
		Arecales	+
		Bromeliales	
		Philydrales	
		Commelinales	
		Typhales	
		Juncales	
		Poales	+
		Zingiberales	+
	Dicotiledôneas	Ranunculales	
		Proteales	
		Vitales	+
		Caryophyllales	+
		Polygonales	
		Saxifragales	
		Santalales	
		Zygophyllales	
		Geraniales	
		Celastrales	
		Malpighiales	+
		Oxalidales	+
		Fabales	+
		Rosales	+
		Cucurbitales	+
		Fagales	
		Myrtales	+
		Brassicales	+
		Malvales	+
		Sapindales	
		Cornales	
		Ericales	
		Garryales	
		Solanales	
		Gentianales	+
		Lamiales	+
		Aquifoliales	+
		Apiales	+
		Dipsacales	+
		Asterales	+

+ indica presença de insulina (antígeno).

ryotes. Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 6184-6188 (1980)

Oliveira A. E. A., Machado O. L. T., Gomes V. M., Xavier Neto J., Pereira A. C., Vieira J. G. H., Fernandes K. V. S. & Xavier-Filho J. - Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. Prot. Pept. Lett. 6: 15-21 (1999).

Organização Mundial da Saude (OMS) - Obesidade está associada a 80% dos casos de diabetes. O Globo, Rio de Janeiro (6/12/1998)

Panizza S. – Plantas que curam (Cheiro de mato). 15ª. ed. IBRASA, São Paulo, 279 pp (1997)

Pyke D.A. - Preamble: the History of Diabetes. John Wiley & Sons, Ltd. http://www.wiley.com/wileychi/diabetes/sample.html (1999)

Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G & Russell DA - High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat Biotechnol 18: 333-338 (2000)

Turkenburg-van Diepen M. G. W. - Crystallographic studies of modified insulin (A Thesis Submitted to the University of York for the Degree of Doctor of Philosophy Department of Chemistry) -http://www.yorvic.york.ac.uk/~mgwt/thesis-tth/chapter1.html (1996)

Venâncio T. M., Azevedo C. R., Oliveira A.E.A., Machado O.L.T., Cunha M. Da, Gomes V. M., Fernandes K. V. S. & Xavier-Filho, J. - Presença de insulina durante o desenvolvimento de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], em sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. e folhas de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link, mororó). 51 Congresso Nacional de Botânica, Brasília. Resumos Pg 14. (2000)

Yu J, Langridge WH - Novel Approaches to Oral Vaccines: Delivery of Antigens by Edible Plants. Curr Infect Dis Rep 2: 73-77 (2000).