



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE DUAS
CISTATINAS RECOMBINANTES DE FEIJÃO-CAUPI

FORTALEZA-CE

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE DUAS
CISTATINAS RECOMBINANTES DE FEIJÃO-CAUPI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

FORTALEZA-CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

M777c Monteiro Júnior, José Edvar.
Caracterização bioquímica, funcional e estrutural de duas cistinas recombinantes de feijão - caupi /
José Edvar Monteiro Júnior – 2012.
179 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.
Co-orientação: Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro

1. *Vigna unguiculata*. 2. *Escherichia coli*. 3. Bruquídeos. I. Título.

CDD 574-192

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE DUAS
CISTATINAS RECOMBINANTES DE FEIJÃO-CAUPI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Tese aprovada em: 23 / 03 / 2012

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Cristina Paiva da Silveira Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a. Dr.^a. Adriana Ferreira Uchôa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedico à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus por ter dado força e perseverança ao longo de toda a vida acadêmica.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Cristina Paiva da Silveira Carvalho, pelos ensinamentos passados, conversas, discussões e reflexões científicas que tivemos ao longo deste período e pela forma sempre aberta, sincera e dedicada com que conduziu a orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, por ter disponibilizado integralmente o Laboratório de Genética Molecular, (Departamento de Biologia – Universidade Federal do Ceará), pelos ensinamentos, críticas, discussões e sugestões imprescindíveis para realização deste trabalho. Agradeço ainda pela pronta aceitação em participar da avaliação do mesmo.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Ferreira Uchôa, por ter gentilmente cedido o Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas Prof. Maurício Pereira de Sales, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram realizados ensaios de inibição de enzimas proteolíticas de bruquídeos, além de outras atividades e por ter aceitado participar da avaliação deste trabalho.

Aos demais professores que compunham a banca examinadora deste trabalho, Prof. Dr. José Hélio Costa, com o qual tive a possibilidade de iniciar os estudos com Bioinformática, particularmente através das aulas ministradas na disciplina de Introdução à Bioinformática e ao Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira, por ter prontamente aceitado e se disponibilizado a participar da avaliação do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Nádia Accioly e à estudante de doutorado Andréia Bessa, ambas do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Ceará, pela ajuda com os experimentos de avaliação de efeitos antimicrobianos.

À Prof.^a Dr.^a Letícia Lotufo e ao pesquisador Delano Marinho, ambos do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, que prestaram excelente apoio nos experimentos com células tumorais.

Aos Professores, Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Nonato e Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho, ambos da Universidade de São Paulo, e seus estudantes Joanne e Ricardo e o pós-doutorando Fábio Dyszy, que foram muito receptivos e fundamentais na realização de ensaios preliminares de cristalização, bem como nas análises espectroscópicas realizadas por dicroísmo circular.

Aos pesquisadores, Dr. Humberto Pereira D’Muniz e Dr. Napoleão Fonseca Valadares ambos do Instituto de Física de São Carlos (USP), que participaram ativamente na realização dos experimentos de cristalização, difração de raios X e solução de estruturas.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas Prof. Maurício Pereira de Sales por toda a ajuda e atenção dadas e, em especial aos colegas, Dr^a. Adeliana Oliveira, Luanna e Jonalson.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, Gabriela, Ivna, Rosa, Beatriz, Andreia, Révila, Stéfanie, Luiz Carlos, Marco, Deiviélison, Júnior, Ítalo, Vitória e Camila, por toda amizade e ajuda prestada.

Agradeço a todos os companheiros do Laboratório de Genética Molecular e citogenética da Universidade Federal do Ceará, Patrícia, Sandra, Suelen, Priscila, Raul, Bruno, Juliana, Renata, Paloma, Raissa, Marcel e Lucas, em especial, Marina, Denise e Prof.^a Aparecida.

Aos companheiros do laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa da Universidade Federal do Ceará, em especial, Fredy, Vladimir e Pedro.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, por seus ensinamentos e colaboração.

Agradeço à doutoranda e técnica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, a colega de graduação Eliane Araújo, que por inúmeras vezes prestou grande auxílio técnico na realização deste trabalho.

Agradeço em especial aos amigos Cícero Silvano Teixeira, Emmanuel de Sousa Jereissati, Raphael de Carvalho Mendes, Thiago Lustosa Jucá e Ygor Raphael Gomes Eloy.

Por fim, agradeço à minha família, em especial a meus pais, Edvar Monteiro e Isabel Cristina, meus irmãos Kelveia Kelen, Carlos André, Rosana Cristina e Moura Neto, meu afilhado/sobrinho, Luís Fabiano, por sempre terem proporcionando um ambiente familiar amável e de muito respeito e motivação e à Simone Martins, por todo o carinho, apoio e otimismo dados durante todo este período.

APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro das seguintes agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Cearense de Pesquisa e Cultura (FCPC), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

As atividades aqui descritas foram realizadas predominantemente na Universidade Federal do Ceará (UFC), contudo, parte dos ensaios biológicos, bem com os experimentos cristalográficos foram desenvolvidos na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e Universidade de São Paulo (USP), respectivamente.

“Try to learn something about everything and everything about something”

Thomas Henry Huxley
(Biólogo britânico, 1825-1895)

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE DUAS CISTATINAS RECOMBINANTES DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

Sequências de mRNA que codificam para duas cistatinas foram isoladas de folhas de plantas de feijão-caupi cultivadas em sistema hidropônico. As sequências foram ligadas no vetor de expressão pET302NT-His, o qual foi introduzido em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3). A indução da expressão foi realizada por meio de adição de IPTG (0,5 mM) e as proteínas recombinantes VuCys1 – (cistatina de um domínio de *Vigna unguiculata*) e VuCys2 – (cistatina de dois domínios de *V. unguiculata*) ambas fusionadas a uma cauda de histidina N-terminal, foram purificadas por homogeneidade em matriz de afinidade constituída de Ni²⁺ imobilizado à Sepharose. VuCys1 apresentou uma massa molecular aparente de 14 kDa e um rendimento de 10 mgP.L⁻¹ de meio de cultura, já a proteína VuCys2 mostrou uma massa molecular aparente de 26 kDa e um rendimento de 22 mgP.L⁻¹ de meio de cultura. As duas proteínas foram fortemente ativas contra as proteinases papaína e quimopapaína, moderadamente ativas contra bromelaína e apenas fracamente ativas contra catepsina B, enquanto que nenhuma atividade inibitória foi detectada contra a proteinase serínica tripsina. Ensaio de estabilidade térmica mostraram que as duas cistatinas são proteínas termoestáveis, uma vez que, mesmo após incubação a 100 °C por 60 minutos apresentam atividade inibitória residual contra papaína superior a 95% (VuCys1) e superior a 85% (VuCys2). Resultados similares de estabilidade também foram obtidos quando as proteínas foram testadas quanto à capacidade de inibir a atividade de papaína, após incubação em valores de pH variando de 2,0 a 11,0. Análises espectroscópicas de dicroísmo circular revelaram que o padrão de estruturas secundárias de ambos inibidores sofre pouca alteração após incubação em temperaturas variando de 10 a 90 °C e em valores de pH variando de 2,0 a 11,0. Estes dados estão de acordo com os resultados de elevada estabilidade térmica e a extremos de pH previamente obtidos nos ensaios de inibição *in vitro* de papaína. Ensaio biológicos realizados com diferentes espécies de fungos fitopatogênicos não mostraram nenhum efeito negativo das proteínas sobre a germinação de esporos ou crescimento micelial dos fungos testados. Os inibidores também não se mostraram ativos contra diferentes patógenos humanos, incluindo a levedura patogênica *Candida albicans*. Alguns relatos científicos propõem o uso de cistatinas como agentes em potencial no controle e inibição da atividade de proteinases cisteínicas relacionados a processos carcinogênicos. Contudo, testes

de citotoxicidade dos inibidores para três diferentes linhagens de células tumorais não mostraram potencial citotóxico. Os inibidores também foram testados quanto à capacidade de inibir a atividade de enzimas digestivas isoladas do intestino de larvas de terceiro instar dos insetos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, duas importantes pragas do feijão-caupi. Ambas as cistatinas apresentaram elevado potencial inibitório contra as enzimas de *C. maculatus* sendo, porém, fracamente ativas contra as de *Z. subfasciatus*. Bioensaios foram realizados nos quais as cistatinas foram inseridas em sementes artificiais nas concentrações finais de 0,025; 0,05 e 0,1% e administradas a *C. maculatus*. Apesar da inibição *in vitro* das enzimas digestivas das larvas de *C. maculatus*, os resultados do bioensaio sugerem que, tanto larvas como insetos adultos, parecem desenvolver mecanismos adaptativos à administração dos inibidores que os tornam insensíveis à sua ingestão. Estudos cristalográficos foram realizados na tentativa de solucionar a estrutura tridimensional das cistatinas. 576 condições de cristalização foram testadas das quais três levaram à formação e crescimento de cristais difratáveis de VuCys1. Os cristais pertencem ao grupo espacial ortorrômbico, $P2_12_12_1$, e a célula unitária apresentou dimensões de $a = 41,48$; $b = 64,68$ e $c = 87,91$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. VuCys1 apresenta uma estrutura molecular de dímero de domínios trocados a qual foi resolvida a uma resolução de 1,95 Å. Cristais de VuCys2 não foram obtidos nas condições testadas. O significado fisiológico desta estrutura para a planta, a estabilidade estrutural de ambos inibidores e os resultados referentes aos diferentes bioensaios são discutidos no presente trabalho.

Palavras chave: Proteinases, bruquídeos, *Vigna unguiculata*, *Escherichia coli*, dímero de domínios trocados.

BIOCHEMICAL, FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF TWO COWPEA RECOMBINANT CYSTATINS

ABSTRACT

mRNA sequences coding for two cystatins were isolated from leaves of hydroponically growing cowpea plants. The sequences were ligated in the expression vector pET302NT-HIS, which was introduced into *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3) cells. The expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG and the recombinant proteins VuCys1 (*Vigna unguiculata* one-domain cystatin) and VuCys2 (*Vigna unguiculata* two-domain cystatin), both fused to an N-terminal 6x-His tag, were purified by homogeneity using an affinity matrix containing Ni²⁺ immobilized to Sepharose. The apparent molecular masses for VuCys1 (yield of 10 mgP.L⁻¹ culture) and VuCys2 (yield of 22 mgP.mL⁻¹ culture) were 14 and 26 kDa, respectively. Both inhibitors were strongly active against the proteinases papain and chymopapain, while bromelain and particularly cathepsin B were less susceptible to *in vitro* inhibition. No inhibition was detected against the serine proteinase trypsin. Thermal stability tests revealed that both cystatins are thermostable proteins able to achieve a minimum residual proteolytic inhibition activity against papain of 95% (VuCys1) and 85% (VuCys2) when incubated at 100 °C for 60 minutes. Similar stability results were also obtained when the proteins were tested to the ability of to inhibit papain activity after incubation in pH values ranging from 2.0 to 11.0. Circular dichroism spectroscopy measurements demonstrated that the secondary structure arrangement of both cystatins undergoes only fewer alterations when both proteins were incubated in temperatures varying from 10 to 90 °C and pH values varying from 2.0 to 11.0, as well. These data are in agreement with the thermal and pH stability results previously obtained on papain inhibition assays. Biological assays conducted with different phytopathogenic fungi didn't show any negative impact on spore germination as well as on mycelial growth of the tested fungi. Different human pathogens, including the pathogenic yeast *Candida albicans* were shown to be insensible to VuCys1 and VuCys2. Some scientific reports have proposed the use of cystatins as potential molecules in the control and inhibition of the activity of cysteine proteinases related to carcinogenic process. However, cytotoxicity assays performed on three tumor cell lineages revealed no toxic effects of VuCys1 and VuCys2. Inhibitor activities were also tested against digestive enzymes isolated from third instar larvae of the bruchid insects *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*, two major cowpea plagues. Both cystatins were able to cause high inhibition of *C. maculatus*

enzymes; however they were poorly active against *Z. subfasciatus* counterpart. Feeding tests were conducted in which both cystatins were added to artificial seeds at final concentrations of 0.025, 0.05 and 0.1% and supplied to *C. maculatus*. Despite the *in vitro* inhibition of *C. maculatus* larvae enzymes, the bioassay data suggest that larvae and adult insects appear to develop adaptive mechanisms which can make them insensible to the ingestion of the inhibitors. Crystallographic studies were carried out in order to solve the tridimensional structure of cystatins. 576 different crystallization conditions were tested in which three were favorable to the formation and growth of diffractable crystals of VuCys1 protein. These crystals belong to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ and the unit cell dimension was $a = 41.48 \text{ \AA}$; $b = 64.68 \text{ \AA}$ and $c = 87.91 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. *V. unguiculata* one-domain cystatin presents a typical 3D domain swapped dimer molecular structure, which was solved at 1.95 $\text{\AA}$ resolution. No crystals were obtained for VuCys2. The physiological importance of this structure to the plant, the structural stability of both inhibitors and the results raised from biological assays are all discussed in this work.

Keywords: Proteinases, bruchid, *Vigna unguiculata*, *Escherichia coli*, domain swapped dimer.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	LEGENDA RESUMIDA	PÁGINA
1	Sumário de algumas das principais funções biológicas desempenhadas por diferentes classes de proteinases na planta modelo <i>Arabidopsis</i> .	32
2	Modelo molecular de interação de duas cistatinas com papaína.	37
3	Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos de PCR amplificados utilizando cDNA e DNA genômico como templates, ambos extraídos de folhas de plantas de feijão-caupi com 12 dias de idade.	81
4	Alinhamento múltiplo das sequências primárias de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA determinadas para 8 clones de <i>VuCys1</i> (clones 1,3,4,6,7,8,9 e 10) utilizando o software CLC Sequence Viewer, v. 6.5.4	82
5	Alinhamento múltiplo das sequências primárias de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA determinadas para 8 clones de <i>VuCys2</i> (clones 1,2,3,4,5,6,7 e 8) utilizando o software CLC Sequence Viewer, v. 6.5.4.	84
6	Alinhamento gerado entre a sequência nucleotídica determinada para o clone 7 (<i>E. coli</i> , TOP10F' - pGEM-T Easy -DNA genômico <i>VuCys1</i>) referida na figura como “gDNA.VuCys1” e a sequência nucleotídica gerada a partir de cDNA, clone 10 (<i>E. coli</i> , TOP10F' - pGEM-T Easy -cDNA <i>VuCys1</i>), referida na figura como “cDNA.VuCys1”.	85
7	Alinhamento gerado entre a sequência nucleotídica determinada para o clone 7 (<i>E. coli</i> , TOP10F' - pGEM-T Easy -DNA genômico <i>VuCys2</i>) referida na figura como “gDNA.VuCys2” e a sequência nucleotídica gerada a partir de cDNA, clone 4 (<i>E. coli</i> , TOP10F' - pGEM-T Easy -cDNA <i>VuCys2</i>), referida na figura como “cDNA.VuCys2”.	87
8	Relação entre a sequência de cDNA que codifica para <i>VuCys1</i> (destacada em preto), o DNA genômico (cDNA mais íntron destacado em verde) e a sequência de aminoácidos da proteína (<i>VuCys1</i>) destacada em azul.	89
9	Relação entre a sequência de cDNA que codifica para <i>VuCys2</i> (destacada em preto), o DNA genômico (cDNA mais íntron destacado em verde) e a sequência de aminoácidos da proteína (<i>VuCys2</i>) destacada em azul.	90
10	Análise temporal (0 a 24h) da indução da expressão da sequência de cDNA codificadora para um inibidor de proteinases cisteínicas de único domínio de <i>Vigna unguiculata</i> (<i>VuCys1</i>) em células de <i>Escherichia coli</i> , ArcticExpress (DE3).	92
11	Análise temporal (0 a 24h) da indução da expressão da sequência de cDNA codificadora para um inibidor de proteinases cisteínicas de dois domínios de <i>Vigna unguiculata</i> (<i>VuCys2</i>) em células de <i>Escherichia coli</i> , ArcticExpress (DE3).	93

12	Eletofóreses em gel de poliacrilamida (15 %) realizadas na presença de SDS e β -mercaptoetanol indicando a presença das proteínas recombinantes <i>VuCys1</i> (gel superior) e <i>VuCys2</i> (gel inferior) detectadas com o kit His-Tag Invision.	94
13	Eletofórese em gel poliacrilamida a 17,5% realizada na presença de SDS e β -mercaptoetanol evidenciando a purificação de duas cistatinas recombinantes de feijão-caupi, <i>VuCys1</i> (coluna 1) e <i>VuCys2</i> (coluna 2).	97
14	Diferentes imagens representativas do padrão de difração de cristais de <i>VuCys1</i> , submetidos a feixe produzido por um difratômetro MicroMax 007 (Rigaku) no comprimento de onda de 1,54 Å.	141
15	Estrutura cristalográfica do dímero de domínios trocados da cistatina de feijão-caupi resolvida a uma resolução de 1,95 Å.	143
16	Estrutura molecular do dímero de domínios trocados do inibidor recombinante <i>VuCys1</i> de feijão-caupi representado no modo “line”, ilustração (a) e no modo “superfície”, ilustração (b).	144
17	Comparação entre as estruturas tridimensionais de cistatinas de plantas resolvidas até o momento, com a estrutura da cistatina de feijão-caupi resolvida no presente trabalho.	145
18	Alteração na conformação do loop inibitório (L1) durante a formação do dímero de domínios trocados.	148
19	Detalhe da alteração conformacional sofrida no loop L1 de duas cistatinas que se associam formando dímeros de domínios trocados.	149
20	Ilustração mostrando a intensa rede de pontes de hidrogênio (destacadas em preto) estabelecida entre as duas cadeias (vermelha e azul) que compõem o dímero de domínios trocados.	151
21	Mecanismo hipotético proposto com base na estrutura cristalográfica do inibidor <i>VuCys1</i> para tentar explicar a estabilidade térmica da proteína.	152

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	LEGENDA RESUMIDA	PÁGINA
1	Atividade proteolítica residual sobre o substrato sintético BANA, no caso das proteinases cisteínicas e BApNA, no caso da proteinase serínica tripsina, após incubação com as cistatinas recombinantes de feijão-caupi.	100
2	Estabilidade térmica das cistatinas recombinantes de feijão-caupi.	103
3	Atividade inibitória de proteinases cisteínicas residual após incubação de VuCys1 e VuCys2 em diferentes condições de pH.	104
4	Curvas de desnaturação térmica de VuCys1 (a) e VuCys2 (b), solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 ambas a uma concentração final de 0,2 mg.mL ⁻¹ , determinadas por espectroscopia de dicroísmo circular.	106
5	Curvas de desnaturação por pH de VuCys1 (a) e VuCys2 (b), solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 ambas a uma concentração final de 0,2 mg.mL ⁻¹ , determinadas por espectroscopia de dicroísmo circular.	109
6	Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (a) e <i>Penicilium herquei</i> (b).	113
7	Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos <i>Fusarium oxysporum</i> (a) e <i>Rhizoctonia solani</i> (b).	114
8	Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinante de feijão-caupi, VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (a) e <i>Fusarium solani</i> (b).	115
9	Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinante de feijão-caupi, VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum musae</i> .	116
10	Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (a) e <i>Penicilium herquei</i> (b).	117
11	Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos <i>Fusarium oxysporum</i> (a) e <i>Rhizoctonia solani</i> (b).	118
12	Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys2 sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (a) e <i>Fusarium solani</i> (b).	119

13	Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys2 sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum musae</i> .	120
14	Potencial antimicrobiano (concentração inibitória mínima - CIM) de VuCys1 contra diferentes cepas bacterianas e uma de levedura, avaliado pelo método de microdiluição em caldo, (CLSI, 2003b).	123
15	Potencial antimicrobiano (concentração inibitória mínima - CIM) de VuCys2 contra diferentes cepas bacterianas e uma de levedura, avaliado pelo método de microdiluição em caldo, (CLSI, 2003b).	124
16	Atividade proteolítica residual das enzimas isoladas de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> (a) e <i>Zabrotes subfasciatus</i> (b), após incubação com diferentes doses do inibidor recombinante de feijão-caupi, VuCys1.	130
17	Atividade proteolítica residual das enzimas isoladas de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> (a) e <i>Zabrotes subfasciatus</i> (b), após incubação com diferentes doses do inibidor recombinante de feijão-caupi, VuCys2.	131
18	Número cumulativo de adultos emergentes ao longo de todo o período experimental.	136

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
1	Famílias das proteínas relacionadas a patogêneses de plantas	28
2	Classificação das peptidases quanto ao local de clivagem proteolítica	30
3	Rendimento protéico das cistatinas de <i>Vigna unguiculata</i> , por litro de meio de cultura (mgP.L ⁻¹), bem como de outras fitocistatinas expressas em <i>Escherichia coli</i> utilizando diferentes vetores de expressão	99
4	Atividade inibitória de proteinases (percentual) contra diferentes enzimas proteolíticas comerciais	100
5	Avaliação do potencial citotóxico dos inibidores recombinantes de feijão-caupi (VuCys1 e VuCys2) sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas, onde doxorrubicina foi usada como controle positivo e a CI ₅₀ foi estimada pelo método do MTT após 72 horas de incubação	127
6	Ação inibitória da cistatina recombinante de feijão-caupi, VuCys1, sobre enzimas proteolíticas extraídas do intestino de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	130
7	Ação inibitória da cistatina recombinante de feijão-caupi, VuCys2, sobre enzimas proteolíticas extraídas do intestino de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	131
8	Parâmetros avaliados em ensaio biológico onde as cistatinas VuCys1 e VuCys2 foram incorporadas em sementes artificiais e administradas a <i>Callosobruchus maculatus</i>	135
9	Coleta dos dados e estatística do refinamento da estrutura do dímero de domínios trocados da cistatina de feijão-caupi, VuCys1	142

LISTA DE QUADROS

QUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Iniciadores utilizados na clonagem das cistatinas de feijão-caupi	50
2	Iniciadores utilizados no seqüenciamento de DNA genômico e cDNA, amplificados a partir de mRNA isolado de folhas de feijão-caupi, genótipo CE-31, utilizando iniciadores específicos para anelamento e amplificação de sequências codificadoras para <i>VuCys1</i> e <i>VuCys2</i>	52
3	Expressão matemática utilizada para conversão dos dados de CD para elipticidade residual média [θ]	62
4	Fórmulas matemáticas utilizadas na avaliação dos efeitos das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre os parâmetros biológicos (M_L) - mortalidade de larvas (%), (T_{md}) - tempo médio de desenvolvimento (dias), (E_a) - emergência de adultos (%) e (P_m) peso médio de adultos emergidos (%) de <i>Callosobruchus maculatus</i>	75

PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Coleção de cultura do tipo americana – “ <i>American type culture collection</i> ”
BANA	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
BApNA	N-Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida
CD	Dicroísmo circular – “ <i>circular dichroism</i> ”
CIM	Concentração inibitória mínima
DMACA	p-dimetilaminocinamaldeído
E.C.	Número da comissão de enzimas – “ <i>Enzyme commission</i> ”
IPTG	Isopropil, β -D, tiogalactopiranosídeo
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonil
DMSO	Dimetil sulfóxido
VuCys1	Cistatina de um domínio de <i>Vigna unguiculata</i>
VuCys2	Cistatina de dois domínios de <i>Vigna unguiculata</i>
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
mgP.mL ⁻¹	Miligrama de proteína por mililitro
mgP.L ⁻¹	Miligrama de proteína por litro de meio de cultura
M/mM/ μ M/nM	Molar/milimolar/micromolar/nanomolar
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium]
MW	Marcador de massa molecular – “ <i>Molecular weight</i> ”
PDB	Banco de dados de proteínas - “ <i>Protein Data Bank</i> ”
RPMI	Meio de cultura de células e tecidos humanos, cujo nome foi dado em homenagem ao “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
SD	Desvio padrão – “ <i>Standard deviation</i> ”

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE QUADROS	xvii
PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1 INTRODUÇÃO	24
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 As plantas e seus mecanismos de defesa	26
2.1.1 <i>Moléculas sinalizadoras relacionadas à SAR</i>	26
2.1.2 <i>PR-proteínas: Descoberta e funções</i>	28
2.2 Enzimas proteolíticas: Definições e classificação	29
2.2.1 <i>Endopeptidases: Proteinases</i>	31
2.3 Inibidores protéicos de proteinases	31
2.3.1 <i>Cistatinas: Descoberta e classificação</i>	33
2.3.1.1 <i>Caracterização estrutural</i>	35
2.3.1.2 <i>Mecanismo de interação com enzimas proteolíticas</i>	36
2.3.2 <i>Cistatinas de plantas: Fitocistatinas</i>	36
2.3.2.1 <i>Estruturas moleculares de cistatinas de plantas</i>	39
2.3.2.2 <i>Papéis biológicos das fitocistatinas</i>	39
2.3.2.3 <i>Expressão heteróloga de fitocistatinas em <u>Escherichia coli</u></i>	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 MATERIAIS	43
4.1 Plasmídeos, cepas de bactérias de <i>Escherichia coli</i> e reagentes para biologia molecular (geral)	43
4.2 Reagentes específicos para determinação de atividade inibitória de proteinases	43
4.3 Reagentes para cristalização	43

4.4	Demais reagentes/materiais biológicos	43
5	MÉTODOS	44
5.1	Obtenção e preparo de sementes de feijão-caupi	44
5.1.2	<i>Semeio e cultivo do feijão-caupi</i>	44
5.2	Extração do RNA e síntese da primeira fita de cDNA	44
5.2.1	<i>Tratamento com DNase</i>	46
5.2.2	<i>Purificação do mRNA</i>	46
5.2.3	<i>Transcrição Reversa (RT - “Reverse Transcription”)</i>	47
5.3	Extração de DNA genômico	47
5.4	Desenho de iniciadores a partir de sequências codificadoras de cistatinas de feijão-caupi	48
5.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR - “polymerase chain reaction”) e clonagem	49
5.6	Seqüenciamento de cDNA, DNA genômico e análise das sequências	51
5.7	Subclonagem no vetor de expressão, pET302NT-His	53
5.7.1	<i>Transformação de células de expressão, <u>E. coli</u> ArcticExpress (DE3)</i>	53
5.7.2	<i>Determinação das condições de indução da expressão das proteínas recombinantes</i>	54
5.8	Avaliação da presença da cauda histidina nas proteínas recombinantes	55
5.8.1	<i>Indução em larga escala, lise e purificação</i>	55
5.8.2	<i>Estimativa da concentração de proteínas</i>	56
5.8.3	<i>Eletroforeses em gel de poliacrilamida</i>	56
5.9	Determinação da atividade inibitória contra diferentes enzimas proteolíticas	59
5.10	Efeito da temperatura sobre a estabilidade de VuCys1 e VuCys2	60
5.11	Efeito do pH sobre a estabilidade de VuCys1 e VuCys2	60
5.12	Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism)	61
5.12.1	<i>Avaliação do efeito da temperatura sobre o padrão de estruturas secundárias dos inibidores</i>	61
5.12.2	<i>Avaliação do efeito do pH sobre o padrão de estruturas secundárias dos inibidores</i>	61
5.13	Avaliação do potencial antifúngico das cistatinas recombinantes de feijão-caupi	64

5.13.1	<i>Preparo das proteínas</i>	64
5.13.2	<i>Obtenção e manutenção dos fungos</i>	64
5.13.2.1	<i>Preparo das suspensões de esporos</i>	64
5.13.2.2	<i>Determinação do efeito das cistatinas sobre a germinação de esporos</i>	65
5.13.2.3	<i>Determinação do efeito das cistatinas sobre crescimento vegetativo</i>	66
5.14	<i>Avaliação do potencial antimicrobiano das cistatinas recombinantes de feijão-caupi</i>	67
5.14.1	<i>Cepas bacterianas e levedura</i>	67
5.14.2	<i>Preparo das proteínas</i>	67
5.14.3	<i>Atividade antimicrobiana - Método de microdiluição em caldo de cultura</i>	67
5.15	<i>Avaliação do potencial citotóxico in vitro das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas</i>	69
5.15.1	<i>Preparo das proteínas</i>	69
5.15.2	<i>Linhagens de células tumorais: tipos e origem</i>	69
5.15.3	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	69
5.16	<i>Avaliação dos efeitos in vitro das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre enzimas digestivas de Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus</i>	71
5.16.1	<i>Insetos: Callosobruchus maculatus e Zabrotes subfasciatus</i>	71
5.16.2	<i>Extração e preparo das enzimas digestivas</i>	71
5.16.3	<i>Atividades enzimáticas e atividade inibitória de proteinases</i>	71
5.17	<i>Avaliação dos efeitos in vivo das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre Callosobruchus maculatus</i>	73
5.17.1	<i>Origem dos insetos</i>	73
5.17.1.1	<i>Manutenção dos insetos</i>	73
5.17.2	<i>Preparo das sementes artificiais</i>	73
5.17.3	<i>Delineamento experimental e parâmetros de estudo</i>	74
5.18	<i>Cristalização e resolução de estruturas</i>	77
5.18.1	<i>Determinação das condições de cristalização</i>	77
5.18.2	<i>Difração de raios X e análise dos dados</i>	77
5.18.2.1	<i>Resolução da estrutura e refinamento do modelo final</i>	78

6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	79
6.1	Clonagem, análise de sequências e indução da expressão das proteínas recombinantes	80
6.1.1	<i>Clonagem e sequenciamento de DNA</i>	80
6.1.2	<i>Análise de cDNA</i>	80
6.1.3	<i>Análise de DNA genômico</i>	83
6.1.4	<i>Caracterização dos íntrons das sequências genômicas que codificam para VuCys1 e VuCys2</i>	88
6.1.5	<i>Indução da expressão das proteínas recombinantes</i>	91
6.1.5.1	<i>Verificação da presença da cauda de Histidina</i>	91
6.2	Purificação e caracterização bioquímica	96
6.2.1	<i>Purificação das cistatinas recombinantes e rendimento protéico</i>	96
6.2.2	<i>Avaliação da atividade inibitória in vitro contra diferentes enzimas proteolíticas</i>	98
6.2.3	<i>Estabilidade térmica e de pH</i>	101
6.2.4	<i>Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism) - Temperatura</i>	105
6.2.5	<i>Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism) - pH</i>	108
6.3	Estudo da ação das cistatinas sobre diferentes fungos fitopatogênicos	112
6.3.1	<i>Germinação de esporos</i>	112
6.3.2	<i>Crescimento micelial (vegetativo)</i>	112
6.4	Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos patogênicos	122
6.5	<i>Avaliação do potencial citotóxico dos inibidores recombinantes de feijão-caupi</i>	126
6.6	<i>Avaliação dos efeitos das cistatinas sobre bruquídeos e suas enzimas</i>	129
6.6.1	<i>Avaliação do efeito sobre as enzimas digestivas dos insetos</i>	129
6.7	<i>Avaliação dos efeitos in vivo de VuCys1 e VuCys2 sobre Callosobruchus maculatus</i>	134
6.8	<i>Cristalização e resolução da estrutura do inibidor VuCys1</i>	140
6.8.1	<i>A estrutura tridimensional do inibidor VuCys1 de feijão-caupi</i>	140
6.8.2	<i>O dímero de domínios trocados</i>	146
6.8.2.1	<i>Na forma dimérica o inibidor é quimicamente inativo</i>	146

6.8.3	<i>Significado fisiológico</i>	147
6.8.3.1	<i>Defesa contra estresses abióticos</i>	147
6.8.3.2	<i>Defesa contra estresses bióticos</i>	154
7	CONCLUSÕES	156
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1 INTRODUÇÃO

Inibidores de proteinases cisteínicas, cistatinas, representam uma superfamília de proteínas capazes de inibir reversivelmente e modular a atividade de proteinases cisteínicas. Estes inibidores são relacionados entre si, evolutiva e estruturalmente, a um inibidor isolado da clara do ovo em 1968 e são encontrados em microrganismos, animais e vegetais, podendo ser considerados, portanto, proteínas ubíquas na natureza. Algumas cistatinas apresentam inibição do tipo competitiva, ao passo que outras são inibidores tipicamente não competitivos.

Do ponto de vista biológico, cistatinas parecem desempenhar papéis múltiplos e décadas de pesquisas sugerem a participação destas proteínas em diversos processos fisiológicos e patológicos, particularmente em animais, e, mais recentemente em plantas.

Cistatinas de plantas foram analisadas quanto a aspectos estruturais e de organização genômica e, com base em tais estudos foram agrupadas como uma família à parte de cistatinas, sendo denominadas fitocistatinas.

Nos vegetais os papéis destes inibidores vão desde o controle e regulação da atividade de proteinases cisteínicas endógenas relacionadas à mobilização de reservas de sementes, além de outros processos fisiológicos. Em adição, fitocistatinas podem atuar diretamente nos mecanismos de defesa das plantas agindo sobre proteinases originadas de patógenos, como fitonematóides, podem atuar direta ou indiretamente sobre fungos fitopatogênicos e bactérias, e ainda sobre insetos fitófagos, particularmente aqueles cuja dieta é primariamente baseada no uso de proteinases cisteínicas. Além destas funções muitos trabalhos têm mostrado que fitocistatinas são induzidas em condições de estresse abiótico, como déficit hídrico, extremos de temperatura (frio e calor), danos mecânicos, dentre outros, achados que sugerem a participação destas proteínas nos intrincados mecanismos bioquímicos de ajuste do vegetal ao estresse abiótico.

Duas cistatinas foram previamente clonadas a partir de mRNA isolado de sementes (FERNANDES *et al.*, 1993 e AGUIAR *et al.*, 2006) e folhas (DIOP *et al.*, 2004) de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], expressas em *Escherichia coli* e purificadas. As proteínas recombinantes foram caracterizadas com relação a diferentes parâmetros bioquímicos e biológicos nos trabalhos citados.

No presente estudo, estes dois inibidores foram novamente expressos em *E. coli*, agora, porém ambas as proteínas foram clonadas a partir de mRNA isolado de folhas de *V. unguiculata* (Genótipo CE-31), utilizando um novo sistema de expressão, que se mostrou uma excelente escolha para clonagem, produção e purificação das proteínas recombinantes.

A título de nomenclatura os inibidores receberam denominações específicas e relacionadas às suas estruturas. Uma das proteínas foi chamada VuCys1 (Cistatina de único domínio inibitório de *V. unguiculata*) que é uma proteína codificada exatamente pela mesma sequência de DNA clonada nos trabalhos de Fernandes *et al.*, (1993) e Aguiar *et al.*, (2006). Este inibidor é caracterizado estruturalmente por apresentar um único domínio inibitório e por isso a denominação. A outra cistatina foi chamada VuCys2 (cistatina de dois domínios inibitórios de *V. unguiculata*) e o polipeptídeo maduro é ligeiramente diferente daquele obtido no trabalho de Diop *et al.*, (2006) e apresenta dois domínios inibitórios, sendo considerada uma multicistatina.

Os detalhes estruturais acerca das sequências de aminoácidos das proteínas, bem como às sequências de cDNA que codificam para ambas e análises realizadas por sequenciamento de DNA genômico, serão abordados de forma aprofundada no presente trabalho que trata, além da análise de sequências, da caracterização de VuCys1 e VuCys2 quanto a aspectos bioquímicos, biológicos e estruturais.

Os resultados aqui apresentados e discutidos certamente contribuirão para um melhor entendimento do funcionamento destas proteínas no vegetal, bem como para uma maior exploração de seus potenciais biotecnológicos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 As plantas e seus mecanismos de defesa

As plantas, diferentemente de animais, são sésseis e, desta forma, continuamente expostas a desafios ambientais como escassez de componentes essenciais para seu desenvolvimento ou ainda a presença de predadores ou pragas capazes de danificar seus órgãos comprometendo sua produtividade, sem a possibilidade de se locomoverem a longas distâncias à busca de suprimentos ou ambientes mais favoráveis (MAZID *et al.*, 2011).

A ideia de extrema vulnerabilidade das plantas a ambientes desfavoráveis, contudo, não está correta, pois apesar da incapacidade de locomoção as plantas desenvolveram ao longo de seu processo evolutivo mecanismos físicos e bioquímicos, constitutivos e induzíveis de respostas de defesa e adaptação às diversas intempéries ambientais que lhes são apresentadas no decorrer de sua existência (TREWAVAS, 2003).

O achado de que plantas, de modo semelhante a mamíferos, apresentam um sistema de defesa e proteção levou à descoberta, particularmente do ponto de vista da defesa bioquímica, de compostos biologicamente ativos capazes de atuar como antimicrobianos, como as fitoalexinas e fitoanticipinas (ZINOV'EVA *et al.*, 2004), por exemplo.

Além disso, foi observado que este sistema de defesa de plantas é bem sofisticado e é caracterizado pela capacidade de comunicação “*cross talking*” através de um elaborado sistema de sinalização bioquímica, que inicia com pequenas trocas de sinais entre algumas células, mas que se expande para todo o vegetal (HEI e TON, 2008; KOORNEEF e PIETERSE, 2008). Como resultado, regiões da planta que não estejam sendo diretamente afetadas por um patógeno, por exemplo, são rapidamente “comunicadas” da presença da ameaça e assim, produzem respostas de defesa antes mesmo da chegada do invasor. Esta resposta funciona como uma espécie de imunização e foi denominada resposta ou resistência sistêmica adquirida - SAR (STICHER *et al.*, 1997; VAN LON *et al.*, 1998).

2.1.1 Moléculas sinalizadoras relacionadas à SAR

Algumas moléculas têm sido mostradas como sendo a “linguagem molecular” através da qual células e tecidos vegetais conseguem se comunicar durante a SAR e dentre estas são destacados o peróxido de hidrogênio, o ácido salicílico e o ácido jasmônico, além de outras (KUNKEL e BROOKS, 2002).

O peróxido de hidrogênio está muito relacionado a uma resposta local de defesa conhecida como resposta hipersensitiva (HR – hypersensitive response) (HÜCKELHOVEN *et al.*, 1999). A HR consiste basicamente em um mecanismo de explosão oxidativa, seguido de degradação proteolítica, no qual as células que estão sofrendo tal fenômeno morrem e levam ao confinamento do invasor / patógeno (HORBACH *et al.*, 2011). É uma resposta muito eficiente contra patógenos biotróficos, por exemplo, uma vez que tais patógenos necessitam de tecidos vivos para sobrevivência. Patógenos necrotróficos, ou hemibiotróficos, como algumas espécies de fungos fitopatogênicos, muitas vezes conseguem “driblar” esse mecanismo de defesa (MEHDY, 1994).

Ácido salicílico e ácidos jasmônico são sinais de longa distância podendo trafegar ao longo de vários tecidos vegetais desencadeando respostas bioquímicas de defesa em pontos distintos da planta. E dentre as moléculas que podem ser induzidas por tais compostos estão um grupo particular de proteínas descoberto na década de 1970, por dois grupos de pesquisa (GIANINAZZI *et al.*, 1970; VAN LOON e VAN KAMMEN, 1970) trabalhando, de modo independente, com plantas de *Nicotiana tabacum* infectadas com o vírus do mosaico do tabaco, conhecidas como PR-proteínas, proteínas relacionadas à patogênese (*PR- proteins - pathogenesis related proteins*).

2.1.2 PR-proteínas: Descoberta e funções

PR-proteínas são um grupo heterogêneo de proteínas vegetais, ou seja, são consideradas PR-proteínas, moléculas com diferentes características estruturais sendo consideradas as sequências primárias de aminoácidos e estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, e moléculas com diferentes propriedades catalíticas e de atividade. Assim, alguns exemplos de PR-proteínas são: 1) quitinases, enzimas hidrolíticas capazes de decompor quitina, um polímero de N-acetil, D-glucosamina presente nas paredes celulares de alguns fungos fitopatogênicos, bem como na membrana peritrófica de alguns insetos; 2) β -1,3-glucanases, enzimas capazes de hidrolizar polímeros de β -1,3-glucanos, que também podem fazer parte da composição das paredes celulares de algumas espécies de fungos fitopatogênicos; 3) proteínas inativadoras de ribossomos; 4) peroxidases; 5) inibidores de proteinases, dentre outras (VAN LOON *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; SELS *et al.*, 2008; ALMAGRO *et al.*, 2009). A lista completa das 17 famílias de proteínas que compõem o grupo das PR-proteínas é mostrada na Tabela 1 retirada da revisão de Van Loon *et al.*, (2006).

Tabela 1. Famílias das proteínas relacionadas a patogêneses de plantas

Família	Membro Tipo	Propriedades	Símbolo do gene
PR-1	Tabaco PR-1a	Proteína antifúngica	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco PR-1a	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i>
PR-3	Tabaco PQ	Quitinases tipo I, II, IV, VI e VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabaco 'R'	Quitinases tipo I e II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabaco S	Semelhante à taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inibidor de tomate I	Inibidor de proteinase	<i>Ypr6, Pis</i>
PR-7	Tomate O ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinase de Pepino	Quitinase tipo III	<i>Ypr8, Chib</i>
PR-9	Peroxidase formadora de lignina (tabaco)	Peroxidase	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	PR-1 Salsa	Semelhante à ribonuclease	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinase classe V de tabaco	Quitinase tipo I	<i>Ypr11, Chi</i>
PR-12	RS-AFP3 "Radish"	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	THI2.1 <i>Arabidopsis</i>	Tionina	<i>Ypr13, Thi</i>
PR-14	LTP4 cevada	Proteína transferidora de lipídios	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	OxOa cevada	Oxidase do oxalato	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP cevada	Semelhante à oxidase do oxalato	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 Tabaco	Desconhecida	<i>Ypr17</i>

Fonte: Van Loon *et al.*, (2006).

Apesar desta diversidade de funções e papéis biológicos no vegetal, o que estas proteínas têm mais em comum é a capacidade de terem seus níveis de transcritos primários e protéicos aumentados em condições de patogêneses, ou relacionadas, de acordo com o definido por Van Loon *et al.*, (1999).

Como pode ser observado na Tabela 1. A família 6 de PR-proteínas é formada por inibidores de proteinases, que, como o próprio nome sugere, inibem a atividade de enzimas proteolíticas. Antes que a discussão sobre inibidores de proteinases seja iniciada, o próximo tópico tratará inicialmente das enzimas proteolíticas, suas definições e classificações.

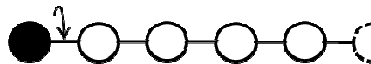
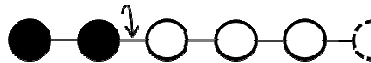
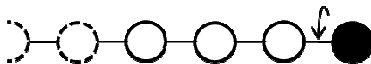
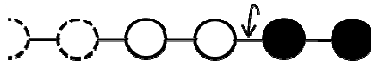
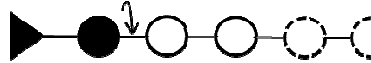
2.2 Enzimas proteolíticas: Definições e classificação

Proteases ou peptidases são um grupo de hidrolases capazes de degradar ou digerir proteínas e pequenos polipeptídeos. Um método bastante simples de classificação destas proteínas permite separá-las em dois grandes grupos, sendo estes o das exopeptidases, enzimas proteolíticas que digerem os polipeptídeos a partir das extremidades amino ou carboxi-terminais, ou ambas, daí derivando os termos aminopeptidases, carboxipeptidases e ômegapeptidases (BARRET, 1994; VAN DER HOORN, 2008) e o grupo das endopeptidases, que compreende a grande maioria das peptidases (RAWLINGS e BARRETT, 1999), sendo estas capazes de digerir o polipeptídeo em regiões internas localizadas distantes das extremidades N e C-terminais (Tabela 2).

O termo “protease”, portanto, pode ser utilizado tanto para exo como endopeptidases, no entanto, a fim de diferenciar os dois grupos de enzimas proteolíticas foi criada a palavra “proteinase”, que é usada exclusivamente para designar endopeptidases (BARRET e McDONALD, 1985). Como exemplo de endopeptidases (proteinases) há as enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina e pepsina, além das enzimas vegetais papaína, bromelaína, ficina, dentre outras (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

Um sistema de classificação mais detalhado (MEROPS) foi proposto no qual proteases homólogas consideradas bioquimicamente indistinguíveis recebem o mesmo identificador e são agrupadas em famílias. Famílias que demonstram descender de um ancestral comum, principalmente com base em comparação de estruturas terciárias, são agrupadas em clãs. Posteriormente à sua criação (1996) o banco de dados também passou a agrupar inibidores de diferentes classes de proteases. (RAWLINGS *et al.*, 2004 e RAWLINGS *et al.*, 2008, RAWLINGS *et al.*, 2010).

Tabela 2. Classificação das peptidases quanto ao local de clivagem proteolítica

Tipo de Clivagem	Tipos de Peptidases	Classificação Enzimática
EXOPEPTIDASES - PROTEASES		
	Aminopeptidases	3.4.11
	Dipeptidil-peptidases	3.4.14
	Tripeptidil-peptidases	
	Carboxipeptidases	3.4.16-18
	Peptidil-dipeptidases	3.4.15
	Dipeptidases	3.4.13
	Ômega-peptidases	3.4.19
	Ômega-peptidases	
ENDOPEPTIDASES - PROTEINASES		
	Clivagem interna	3.4.21-24 e 99

Fonte: BARRET (1994) com modificações.

2.2.1 Endopeptidases: Proteinases

Como já mencionado as proteinases (daqui em diante este será o termo utilizado para designar todas as endopeptidases) representam a grande maioria das peptidases e são atualmente divididas em 5 grandes grupos, de acordo com o mecanismo catalítico de ação, homologia de sequência de aminoácidos, pH ótimo de atividade e inativação por diferentes inibidores (BARRET *et al.*, 2003). As cinco principais classes de proteinases são: proteinases serínicas, proteinases cisteínicas, proteinases aspárticas, metalo-proteinases e treonina-proteinases (VAN DER HOORN e JONES, 2004).

Proteinases desempenham importantes papéis biológicos tanto em animais e microrganismos, como em plantas atuando não só como catalisadores inespecíficos da degradação protéica, como também como agentes altamente seletivos responsáveis pela modulação de diferentes eventos fisiológicos (NEURATH, 1984 *apud* PAGE e CERA, 2008; YADAV *et al.*, 2011).

Algumas das principais funções gerais propostas e outras já bem elucidadas para proteinases incluem a digestão de proteínas alimentares (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002), participação em determinados aspectos do mecanismo de defesa vegetal (VAN DER HORN e JONES, 2004; HSIANG e GOODWIN, 2006) e ativação do processo de morte celular programada em animais e da resposta hipersensitiva de plantas (DENAULT e SALVESEN, 2002; HOORN e JONES, 2004). Além destas funções alguns tipos de proteinases cisteínicas humanas, como as catepsinas, por exemplo, podem atuar regulando o desenvolvimento de tumores durante processos de angiogênese, apoptose, invasão celular e metástase (ROOPRAI E MCCORMICK, 1997; BOUTTÉ *et al.*, 2011).

As funções biológicas de proteinases de plantas foram extensivamente revisadas em artigo recente publicado por Van Der Hoorn, (2008) e são sumarizadas na Figura 1, retirada desta mesma revisão.

2.3 Inibidores protéicos de proteinases

A atividade de proteinases pode ser regulada tanto no nível transcricional, onde seus níveis de expressão são controlados por fatores de transcrição, como no nível de proteína, através da interação com inibidores e cofatores específicos, bem como por meio da ativação de zimogênios (MARTÍNEZ *et al.*, 2012).

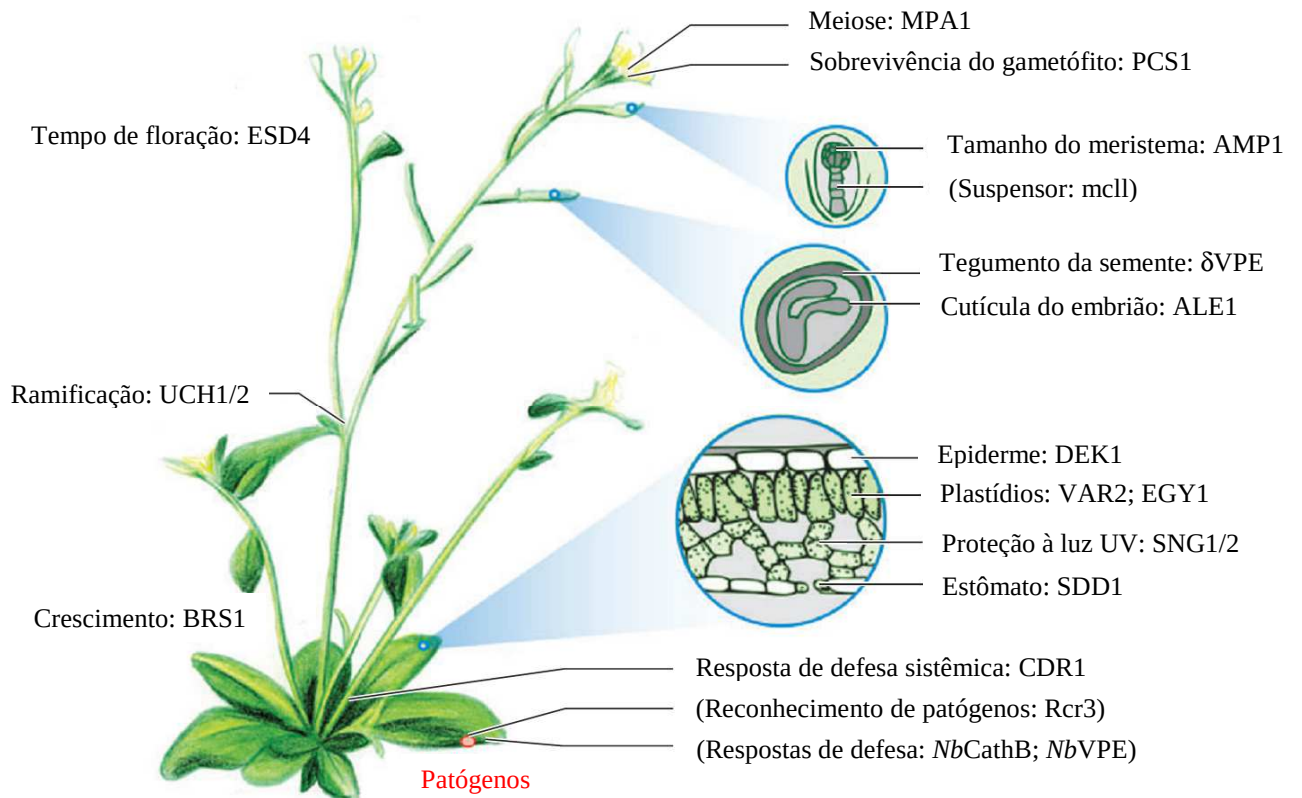


Figura 1. Sumário de algumas das principais funções biológicas desempenhadas por diferentes classes de proteinases na planta modelo *Arabidopsis*. Estudos realizados em outros vegetais estão destacados entre parênteses.

Fonte: Van Der Hoorn, (2008).

De modo semelhante ao que ocorre com enzimas proteolíticas, inibidores protéicos de proteinases podem ser agrupados em famílias e estas, por sua vez, em clãs, com base nas sequências de aminoácidos e nos seus padrões de estruturas secundárias e terciárias (HABIB e FAZILI, 2007). Além disso, um modo bastante comum de classificar tais inibidores é baseado primariamente no tipo e classe mecanicística das enzimas proteolíticas sobre as quais desempenham seus papéis. Assim, inibidores que formam complexos especificamente com proteinases do tipo serínicas, são classificados como inibidores de proteinases serínicas, muitos dos quais recebem a denominação de serpinas e o mesmo tipo de classificação é aplicado para inibidores de proteinases cisteínicas, que por sua vez são chamados cistatinas. Serpinas e cistatinas são alvos de vários estudos, em função de suas diversas propriedades biológicas. Esta classificação com base na classe mecanicística da enzima alvo, contudo, pode gerar certo conflito, uma vez que algumas serpinas, por exemplo, podem se mostrar ativas contra proteinases cisteínicas, o mesmo ocorrendo com determinados inibidores de proteinases serínicas do tipo Kunitz, que podem apresentar atividade contra proteinases cisteínicas sendo, portanto, denominados inibidores bifuncionais. Este é o caso, por exemplo, do inibidor do tipo Kunitz isolado de sementes de *Pithecellobium dumosum* que além de inibir a atividade de tripsina (uma proteinase serínica) também é ativo contra papaína (proteinase cisteínica) (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.3.1 Cistatinas: Descoberta e classificação

Dentre o grande grupo de inibidores protéicos de proteinases estão os inibidores de proteinases cisteínicas, conhecidos como cistatinas. Estes inibidores compreendem uma superfamília de proteínas evolutiva e estruturalmente relacionados, capazes de inibir reversivelmente proteinases cisteínicas pertencentes às famílias C1A da papaína e C13 da legumaína (BARRET, 1987; BENCHABANE, 2010). Cistatinas podem se comportar como inibidores competitivos ou não competitivos, sendo amplamente distribuídas em animais, plantas e microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O primeiro membro bem estudado deste grupo foi uma proteína isolada da clara do ovo de galinha (FOSSUM e WHITAKER, 1968) sendo, por esta razão, historicamente denominada cistatina da clara do ovo “*chicken egg white cystatin*”. Este inibidor foi inicialmente caracterizado por ter a capacidade de inibir as proteinases cisteínicas ficina e papaína e por estar concentrado na clara do ovo. Trabalho posterior mostrou que além de estar

presente na clara do ovo, esta cistatina também podia ser detectada no soro de galináceos (machos e fêmeas) (ANASTASI *et al.*, 1983).

A superfamília das cistatinas foi inicialmente dividida em três famílias principais comumente referidas como famílias das “cistatinas animais” representadas pela família I (família das estefinas), família II (família das cistatinas) e família III (família dos quininogênios ou cininogênios) (BARRET *et al.*, 1996). Detalhes estruturais acerca de cada uma das três famílias de cistatinas são abaixo descritos.

Estefinas (família I) são inibidores que apresentam uma única cadeia polipeptídica composta por cerca de 100 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares próximas de 11 kDa. Não apresentam pontes dissulfeto nem glicosilação. Cistatinas A e B e suas variantes encontrados em humanos e ratos são exemplos de membros da família I (TURK e BODE, 1991; GRUDKOWSKA e ZAGDANSKA, 2004).

Cistatinas (família II) são inibidores mais complexos que as estefinas, apresentando cerca de 115 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares próximas de 13 kDa. Cistatinas normalmente possuem duas pontes dissulfeto intramoleculares localizadas na região C-terminal e podem ou não ser glicosiladas ou fosforiladas. São membros desta família as cistatinas C humana (encontradas no plasma seminal humano e fluido cérebro-espinhal), cistatina S humana, a cistatina da clara do ovo, dentre outros inibidores (BARRET *et al.*, 1986).

Quininogênios são inibidores tipicamente encontrados no plasma sanguíneo onde desempenham papel nas cascatas de coagulação e são caracterizados por apresentarem o maior grau de complexidade estrutural de todas as cistatinas. Estes inibidores são categorizados em três grupos, designados como quininogênios de alta massa molecular (quininogênios-H), com massas moleculares próximas de 120 kDa; quininogênios de baixa massa molecular (quininogênios-L), com massas moleculares de cerca de 60 kDa e quininogênios-T, com massas moleculares aproximadas de 68 kDa. Quininogênios podem ser glicosilados e, em alguns casos, apresentam até nove pontes dissulfeto como ocorre com o inibidor humano de proteinases do tipo α_1 -tiol, por exemplo. Normalmente os quininogênios possuem três domínios inibitórios que, do ponto de vista evolutivo, parecem ser resultado de eventos de duplicação de DNA de cistatinas da família II (BARRET, 1987 e TURK e BODE, 1991).

2.3.1.1 Caracterização estrutural

Cistatinas são conhecidas por compartilharem entre suas sequências primárias de aminoácidos três regiões que interagem entre si dando origem a um arranjo tridimensional conhecido como ponta em forma de cunha (“*wedge shaped edge*”), a qual é complementar ao sítio ativo de proteinases alvo. Estas regiões são: 1) Um resíduo de G localizado na região N-terminal do inibidor, 2) o primeiro loop inibitório, loop L1, formado pelos aminoácidos ([Q]-[X]-[V]-[X]-[G]) onde [X] pode ser qualquer um dos seguintes aminoácidos, V, A, E, D, S e I e 3) o segundo loop inibitório, loop L2, no qual é conservado um resíduo de W localizado na porção C-terminal da proteína (ABRAHANSOM *et al.*, 1987; BODE *et al.*, 1988; NYCANDER e BJORK, 1990; MARTIN *et al.*, 1995; HONG *et al.*, 2007; SHAH e BANO, 2009).

Vários trabalhos têm sido realizados, desde a descoberta da cistatina da clara do ovo, onde estudos cristalográficos e de ressonância magnética nuclear permitiram resolver com precisão a estrutura tridimensional de cistatinas de diferentes fontes animais e vegetais. Pesquisa realizada no presente momento (2012) utilizando o termo “cystatin” na base de dados PDB (*Protein Data Bank*) revela que cerca de 64 estruturas envolvendo cistatinas nas suas formas monoméricas, diméricas ou em complexos com diferentes proteinases, além de proteínas desconhecidas, mas com domínios tipo-cistatina, “*cystatin-like fold*” foram depositadas. Deste total, 50 foram solucionadas por cristalografia de raios X com resoluções variando de 0,25 a 5,0 Å e 14 foram resolvidas por ressonância magnética nuclear.

A estrutura tridimensional da cistatina da clara do ovo, o primeiro inibidor da superfamília a ser purificado e caracterizado, (FOSSUM e WHITAKER, 1968), só foi solucionada duas décadas após descoberta do inibidor (BODE *et al.*, 1988), a despeito de a proteína ter sido cristalizada cerca de 3 anos antes (BODE, 1985). A cistatina da clara do ovo foi, portanto, o primeiro inibidor de proteinases cisteínicas a ser estudado e caracterizado, o primeiro a ser cristalizado e o primeiro a ter sua estrutura molecular resolvida. Apenas em 1994, contudo, a estrutura tridimensional da proteína foi depositada na base de dados do PDB, sob código de acesso 1CEW.

Os estudos cristalográficos pioneiros realizados com a cistatina da clara do ovo (BODE *et al.*, 1988) demonstraram que a proteína apresenta um total de cinco folhas- β do tipo anti-paralelas, parcialmente cercadas por uma hélice- α e dois loops em forma de grampo, L1 e L2 formados por resíduos de aminoácidos bastante conservados entre todos os membros da superfamília, como mencionado anteriormente. Análise de modelagem molecular por

“dock” mostraram detalhes importantes do mecanismo de interação deste inibidor com a papaína.

2.3.1.2 Mecanismo de interação com enzimas proteolíticas

No mecanismo de interação proposto pelos estudos de Bode *et al.*, (1988) a cistatina posiciona-se sobre a fenda ativa da papaína acomodando-se de modo estericamente complementar a esta. Neste modelo de interação o loop (L2) do inibidor formado pelos resíduos de Pro103 e Trp104 se posiciona em íntimo contato com a porção mais hidrofóbica e larga da fenda ativa da papaína (parte mais superior da fenda). Nesta interação o anel indol do Trp104 do inibidor empilha-se sobre a cadeia lateral do Trp177 da enzima. Já a região N-terminal do inibidor é acomodada sobre o ponto mais estreito da fenda do sítio ativo (parte mais profunda), de modo que a Gly9 do N-terminal do inibidor fica próxima da Cys25 do sítio ativo da papaína. O loop (L1) posiciona-se mais ao fundo da fenda do sítio ativo da papaína próximo aos resíduos Cys25 e Trp 177 e as cadeias laterais hidrofóbicas de Leu54 e Val55 deste loop, que no caso da cistatina da clara do ovo é formado pela sequência (**Gln**53-**Leu**54-**Val**55-**Ser**56-**Gly**57), interagem com as cadeias laterais hidrofóbicas de Ala136, Ala137 e Gly23 da fenda do sítio ativo da papaína. Desta forma é que se dá a interação entre a “ponta em forma de cunha” do inibidor e a fenda do sítio ativo da proteinase (Figura 2).

A publicação em 1990 (STUBBS *et al.*, 1990) da estrutura molecular resolvida da cistatina humana estefina B complexada com papaína, confirmou que as predições anteriormente feitas por análise de modelagem e dock relativas ao mecanismo de interação da papaína com a cistatina da clara do ovo, (BODE *et al.*, 1988) estavam essencialmente corretas.

2.3.2 Cistatinas de plantas: Fitocistatinas

Em 1985 um grupo de pesquisa japoneses trabalhando com sementes de arroz relatou pela primeira vez o procedimento de purificação de uma proteína vegetal capaz de inibir a atividade de papaína e outras proteinases cisteínicas relacionadas (ABE e ARAI, 1985). Este foi o primeiro relato da purificação de uma cistatina de origem vegetal, aproximadamente 17 anos após a publicação da purificação da cistatina da clara do ovo. Trabalhos posteriores reportaram o isolamento de sequências de cDNA codificadoras para cistatinas de sementes de arroz e as sequências de aminoácidos deduzidas a partir do cDNA

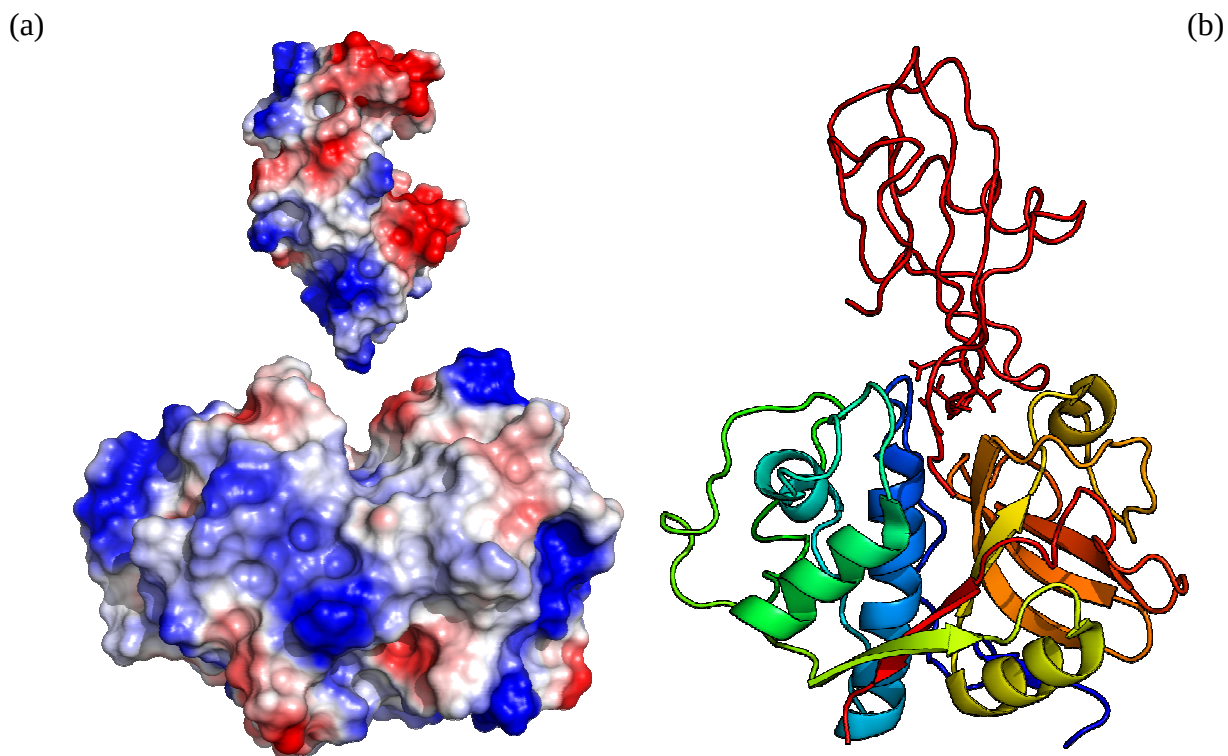


Figura 2. Modelo molecular de interação de duas cistatinas com papaína. a) Modelo tridimensional da estrutura molecular da cistatina da clara do ovo, PDB C1EW (superior) e papaína, PDB 9PAP (inferior) visualizado através do método de vácuo eletrostático. A figura foi manualmente montada utilizando os dois modelos (PDB C1EW) e (PDB 9PAP). Como é possível observar a porção inferior do inibidor forma uma “ponta em forma de cunha” e esta região é complementar à fenda do sítio ativo da papaína, que tem uma forma de “V”. b) Estrutura molecular do complexo estefina B humana e papaína (PDB 1STF) visualizado no modo “cartoon”. Todas as imagens foram preparadas utilizando os modelos depositados no *Protein Data Bank*, com o programa PyMol Delano Scientific.

foram então comparadas àquelas obtidas para cistatinas animais. (ABE *et al.*, 1987 e KONDO *et al.*, 1990). Estes inibidores foram denominados orizacistatina-I (OC-I) e orizacistatina-II (OC-II) e são historicamente reconhecidos como as primeiras cistatinas de origem vegetal a serem detalhadamente caracterizadas (ABE *et al.*, 1991).

A identificação e análise filogenética comparativa de novas cistatinas de uma variedade de fontes vegetais propiciaram a descoberta de peculiaridades estruturais, arranjos genômicos e diversidade intrínseca que mostraram que estes inibidores pertenciam a um ramo evolutivo diversificado da superfamília das cistatinas, o que levou à necessidade de criação de um novo grupo, o qual foi devidamente denominado família das fitocistatinas (KONDO *et al.*, 1991 e MARGIS *et al.*, 1998).

Em termos de estrutura geral, fitocistatinas são mais relacionadas às cistatinas animais pertencentes às famílias I e II do que com os membros da família III (HABIB e FAZILI, 2007) e podem ser subdivididas em 3 grupos (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 2008). O grupo I é formado por inibidores que possuem um único domínio inibitório do tipo cistatina, “*cystatin-like domain*” e massas moleculares variando de 12 a 16 kDa. Fitocistatinas do grupo II apresentam massa molecular de cerca de 23 kDa, devido à presença de uma extensão C-terminal não encontrada em membros dos outros dois grupos. No grupo III estão as multicistatinas, inibidores que apresentam dois ou mais domínios inibitórios repetidos lado a lado. Os representantes mais conhecidos deste grupo são a multicistatina da batata (WALSH e STRICKLAND, 1993) e a multicistatina de folhas de tomate (SIGUQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002 e WU e HARD, 2000), ambas com oito domínios inibitórios. Além destes dois inibidores, também foram relatadas a purificação de uma multicistatina de sementes de girassol, apresentando três domínios inibitórios (KOUZUMA *et al.*, 2000) e uma multicistatina de folhas de feijão-caupi, com dois domínios inibitórios (DIOP *et al.*, 2004).

Estes inibidores compartilham com os demais membros da superfamília das cistatinas, todas as três regiões necessárias para formação do complexo enzima:inibidor mencionadas anteriormente, entretanto, além destas regiões cistatinas de plantas apresentam a sequência conservada formada pelos resíduos de aminoácidos ([LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N) a qual faz parte da porção central de uma hélice- α localizada na região N-terminal da proteína. Esta singularidade de sequência diferencia este grupo de inibidores dos membros das demais famílias e funciona como uma espécie de “assinatura” de fitocistatinas (HABIB e FAZILI, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2007).

2.3.2.1 Estruturas moleculares de cistatinas de plantas

Apesar dos estudos cristalográficos realizados por décadas com cistatinas animais, apenas em 1998 foram publicados os dados preliminares de cristalização da cistatina do arroz, orizacistatina-I (OC-I). Contudo, apenas em 2000 a estrutura tridimensional da orizacistatina-I (OC-I), a primeira cistatina de origem vegetal bem caracterizada (ABE *et al.*, 1991) foi solucionada, através de experimentos de ressonância magnética nuclear realizados por Nagata *et al.*, (2000), e foi depositada no “*protein data bank*” sob código de acesso, PDB 1EQK.

Desde então, algumas outras cistatinas vegetais tiveram sua estrutura molecular resolvida, sendo estas um dos oito domínios inibitórios da multicistatina da batata (NISEEN *et al.*, 2009), PDB 2W9Q, a cistatina de taro em complexo com papaína (CHU *et al.*, 2011), PDB 3IMA e a cistatina de abacaxi, PDB 2L4v (resultados ainda não publicados).

2.3.2.2 Papéis biológicos das fitocistatinas

Os papéis biológicos de cistatinas de plantas derivam primariamente de sua capacidade de interagir com proteinases cisteínicas endógenas do vegetal modulando sua atividade, e ainda da capacidade destes inibidores de bloquearem proteinases cisteínicas exógenas, sejam estas provenientes de patógenos ou predadores de plantas. Assim, duas linhas de pesquisa objetivando definir os papéis das cistatinas nas plantas, têm emergido desde a descoberta das cistatinas do arroz em meados dos anos 80. A primeira abordagem está relacionada ao estudo da ação destes inibidores como proteínas reguladoras da atividade de proteinases relacionadas à mobilização de reservas, durante o processo de germinação de sementes (ABE *et al.*, 1987; ABE *et al.*, 1992; XAVIER-FILHO, 1992; SZEWIŃSKA *et al.*, 2012). Outros trabalhos têm estudado o papel destes inibidores no processo de renovação das proteínas celulares (*protein turnover*) e no processo de morte celular programada (SOLOMON *et al.*, 1999; BELENGHI *et al.*, 2003), bem como em processos de organogênese e de divisão celular (TIAN *et al.*, 2009). O funcionamento de grande parte destes processos, como já mencionado, está intimamente relacionado à ação de diferentes classes de proteinases, dentre as quais as proteinases cisteínicas recebem destaque.

A outra linha de pesquisa tem focado no papel direto ou indireto das fitocistatinas como proteínas integrantes do mecanismo de defesa das plantas. O papel direto deriva, obviamente, da capacidade destes inibidores de reconhecerem e diminuir a atividade de enzimas proteolíticas do tipo cisteínicas utilizadas por microrganismos como nematóides,

fungos e bactérias, bem como de sua capacidade de inibir a ação de proteinases cisteínicas presentes no intestino de insetos fitófagos (PERNAS *et al.*, 1998; PERNAS *et al.*, 1999; MOSLOV e VALUEVA, 2008; CHI *et al.*, 2009; KONRAD *et al.*, 2009; CARRILO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

O papel indireto das cistatinas de plantas na defesa vegetal tem sido relatado em experimentos onde aumentos significativos nos níveis de transcritos primários destas proteínas foram observados em plantas submetidas a condições de estresses abióticos, como estresse hídrico, condições de elevada salinidade, estresse oxidativo, extremos de temperatura (frio e calor), anaerobiose e escuridão, bem como após tratamento com indutores químicos de respostas de defesa de plantas, como ácido jasmônico (metil jasmonato) e aplicação de injúrias mecânicas a tecidos foliares, por exemplo (BOTELLA *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 1996; PERNAS *et al.*, 2000; GADDOUR *et al.*, 2001; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; BELENGHI *et al.*, 2003; MASSONNEAU *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). Estes são exemplos de situações típicas do mecanismo de defesa das plantas onde os meios bioquímicos pelos quais as cistatinas conferem resistência ainda não foram muito bem esclarecidos e, portanto, são aqui arbitrariamente classificados como mecanismos indiretos de proteção. É importante, porém que seja feita a ressalva de que a indução da expressão não só de cistatinas, mas também de inibidores de proteinases serínicas por meio da aplicação de metil jasmonato já é algo bioquimicamente bem compreendido e bastante estudado (OROZCO-CARDENAS, 1993; LI *et al.*, 2002), sendo, portanto, a exceção ao que foi dito anteriormente.

Por fim, experimentos diversos utilizando plantas transgênicas superexpressando sequências codificadoras para fitocistatinas isoladas de uma variedade de plantas confirmaram a participação positiva destes inibidores no mecanismo de defesa vegetal, mostrando que na maioria dos casos as plantas transformadas apresentaram tolerância às diferentes condições de estresse biótico e abiótico as quais foram submetidas (WALKER *et al.*, 1999; URWIN *et al.*, 1997; URWIN *et al.*, 2003; LILLEY *et al.*, 2004; KONRAD *et al.*, 2009; CARRILO *et al.*, 2011).

2.3.2.3 Expressão heteróloga de fitocistatinas em Escherichia coli

A compreensão do mecanismo de ação e das relações filogenéticas apresentadas por diferentes cistatinas de plantas têm sido possíveis, em grande parte, graças aos experimentos de clonagem e expressão heteróloga destes inibidores. Sequências codificadoras

para fitocistatinas foram isoladas de um grande número de culturas vegetais, clonadas e expressas em *Escherichia coli*.

Na maioria dos trabalhos não apenas os genes dos inibidores foram clonados e caracterizados, como também as proteínas recombinantes foram purificadas e caracterizadas em diferentes níveis bioquímicos e funcionais. Algumas das culturas para as quais uma ou mais isoformas de cistatinas foram detectadas, heterologamente expressas e purificadas são as cistatinas de: Arroz (ABE *et al.*, 1987; KONDO *et al.*, 1990), *Amaranthus* (VALDÉZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (BELENGHI *et al.*, 2003), cacauero (PIROVANI *et al.*, 2010), feijão-caupi (FERNANDES *et al.*, 1993, DIOP *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2006), cana-de-açúcar (SOARES-COSTA *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2004; GIANOTTI *et al.*, 2006), cevada (CARRILO *et al.*, 2011), *Ficus* (SHYU *et al.*, 2011), girassol (KOUZUMA *et al.*, 2000), *Hevea* (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011), maçã, (RYAN *et al.*, 2003), milho (ABE *et al.*, 1992; ABE *et al.*, 1994), morango (MARTINEZ *et al.*, 2005), taro (YANG e YEH, 2005) etc.

Além disso, trabalhos têm relatado a purificação de fitocistatinas diretamente a partir dos órgãos vegetais de ocorrência, como a multicistatina do tomate (WU e HAARD, 2000) que foi isolada das folhas do vegetal, a cistatina de *Phaseolus lunatus* (LAWRENCE e NIELSEN, 2001) e a cistatina de maçã (RYAN *et al.*, 2003), por exemplo.

O presente estudo trata da clonagem molecular em *E. coli*, ArcticExpress (DE3), expressão, purificação e caracterização, sob aspectos bioquímicos, estruturais e biológicos de duas cistatinas codificadas a partir de moléculas de mRNA isoladas de folhas de *Vigna unguiculata*, genótipo CE-31.

Novos achados, como uma elevada estabilidade estrutural e as implicações da estrutura molecular tridimensional de um dos inibidores para o vegetal, bem como seus potenciais biotecnológicos no controle de fungos, bactérias, insetos bruquídeos e células tumorais humanas são discutidos no presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar aspectos bioquímicos, funcionais e estruturais de duas cistatinas recombinantes de feijão-caupi.

3.2 Objetivos específicos

Realizar a clonagem molecular das sequências codificadoras para duas cistatinas de feijão-caupi, bem como o sequenciamento de cDNA e DNA genômico relativos aos inibidores;

Induzir a expressão das proteínas recombinantes de forma solúvel em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3) e purificá-las em cromatografia de afinidade contendo níquel imobilizado;

Avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade estrutural dos inibidores através de métodos convencionais de determinação de atividade inibitória *in vitro* e por meio de espectroscopia de dicroísmo circular;

Determinar o potencial de ação das proteínas recombinantes sobre diferentes sistemas biológicos, a saber: fungos fitopatogênicos, microrganismos patogênicos para humanos, células tumorais e sobre as enzimas proteolíticas de duas espécies de bruquídeos, bem como seus efeitos em ensaios *in vivo*;

Realizar estudo cristalográfico com o fim de se obter cristais protéicos difratáveis e resolver a estrutura molecular tridimensional das proteínas recombinantes. Fazer inferências, relacionando as estruturas cristalográficas com a atividade e papéis biológicos dos inibidores no vegetal.

4 MATERIAIS

4.1 Plasmídeos, cepas de bactérias *Escherichia coli* e reagentes para biologia molecular (geral)

Os plasmídeos pGEM-T Easy (vetor de clonagem) e pET302NT-His (vetor de expressão) foram obtidos da Promega (Madison, WI, USA) e Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), respectivamente. Células de *E. coli*, TOP10F' (hospedeiro para clonagem) e *E. coli*, ArcticExpress (DE3) (hospedeiro de expressão) foram obtidas de Invitrogen e Stratagene (La Jolla, CA, USA), respectivamente. O reagente para extração de RNA, Concert Plant RNA Reagent foi obtido da Invitrogen. Os iniciadores utilizados para clonagem das cistatinas (cDNA e DNA genômico) foram todos obtidos da IDT Technologies. Os iniciadores universais para sequenciamento de DNA, senso M13 (-40) e reverso M13 (-46) foram obtidos de Invitrogen e IDT Technologies, respectivamente. Os demais reagentes para manipulação de DNA, RNA e análise de sequências foram todos de grau analíticos.

4.2 Reagentes específicos para determinação de atividade inibitória de proteinases

Os reagentes BANA (N-Benzoyl-DL-Arginina-2-Naftilamida), BApNA (N-Benzoyl-DL-Arginina-p-Nitroanilida), DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído), as proteinases cisteínicas papaína (E.C. 3.4.22.2), quimopapaína (E.C. 3.4.22.6), bromelaína (E.C. 3.4.22.32), catepsina B (E.C. 3.4.22.1) e a proteinase serínica tripsina (E.C. 3.4.21.4) foram todos obtidos da SIGMA (St. Louis). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.3 Reagentes para cristalização

Os kits de cristalização Classic I, Classic II, PEG I, PEG II e Cryo foram obtidas da Qiagen, enquanto que o kit SaltRX foi obtido da Hampton Research.

4.4 Demais reagentes/materiais biológicos

A procedência dos demais materiais químicos e/ou biológicos aqui não listados é referenciada no tópico a seguir, “métodos”. Aqueles não citados foram todos de elevada pureza/grau analítico.

5 MÉTODOS

Transformação de células de Escherichia coli com as sequências codificadoras para dois inibidores de proteinases cisteínicas de feijão-caupi: Clonagem molecular, análise de sequências, expressão e purificação das proteínas recombinantes

5.1 Obtenção e preparo de sementes de feijão-caupi

Sementes de feijão-caupi, genótipo CE-31 (pitiúba), foram cedidas pelo Banco de Sementes da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fitotecnia e desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% de cloro ativo, por cinco minutos. O excesso de hipoclorito de sódio foi removido por lavagens sucessivas em água destilada. A quebra de dormência das sementes foi realizada por imersão em água destilada por uma hora.

5.1.2 Semeio e cultivo do feijão-caupi

Sementes desinfetadas foram semeadas em papel de germinação (Germitest®), de acordo com o descrito por Martins-Miranda, (2002), e permitidas germinar em câmara de germinação com fotoperíodo controlado de 12 h (luz/escuro), temperatura de 27 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 8\%$ e luminosidade de $240 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (1 E = 1 mol de fótons). Três dias após semeadura as plântulas foram transferidas para potes plásticos com capacidade de 1,0 litro, preenchidos com solução nutritiva de Hoagland e Arnon, (1938) a $\frac{1}{4}$ de força (25%), e mantidas em casa de vegetação até projeção e expansão do primeiro conjunto de folhas trifoliolares (LIMA, 2007). Folhas de plantas com onze dias de idade com os trifolíolos já totalmente expandidos, foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido sendo mantidas em ultra freezer (Sanyo) a - 80 °C até o momento das extrações.

5.2 Extração do RNA e síntese da primeira fita de cDNA

O reagente de extração, Concert Plant RNA Reagent - Invitrogen™ foi utilizado para extração de RNA total de folhas de plantas de feijão-caupi, seguindo instruções do fabricante. Tecidos foliares foram inicialmente pulverizados na presença de nitrogênio líquido. O reagente de extração (0,5 mL), previamente resfriado, foi adicionado a este pó (100 mg). Este extrato bruto foi vigorosamente agitado, com auxílio de vortex e deixado em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a $12.000 \times g$, por cinco minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, 100 μL de uma solução de NaCl 5 M e 300 μL de uma solução de clorofórmio P.A foram adicionados ao sobrenadante da centrifugação. Após adição destas soluções uma nova centrifugação, agora a $12.000 \times g$, 4 °C, por 10 minutos foi realizada. O sobrenadante deste último passo de centrifugação foi acrescido de igual volume de isopropanol P.A., mantido em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente e novamente

centrifugado a $12.000 \times g$, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado conservado. O último passo da extração consistiu na “lavagem” do precipitado, por meio da adição de 1 mL de etanol 75% e centrifugação a $12.000 \times g$, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Após a centrifugação o etanol foi cuidadosamente removido e o RNA precipitado foi recuperado por dissolução em aproximadamente 30 μL de água Grau Milli-Q estéril livre de RNases (previamente tratada com dietilpirocarbonato – DEPC, a 0,1%). Além da água tratada com DEPC a 0,1% os demais materiais e soluções utilizados no procedimento de extração e manipulação do RNA foram adequadamente tratados para remoção de RNases.

A concentração do RNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) foi estimada utilizando espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia), com base nas leituras das absorbâncias das amostras no comprimento de onda de 260 nm. O grau de pureza deste RNA também foi avaliado neste equipamento, por meio da verificação da presença de carboidratos (relação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 230 nm) e/ou proteínas (relação das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm). A ausência ou ocorrência de degradação dos RNA obtidos foi verificada por sua aplicação em eletroforeses em gel de agarose, realizadas de acordo com Sambrook *et al* (1989).

5.2.1 Tratamento com DNase

A primeira etapa no processo de purificação do RNA consistiu na eliminação de DNA genômico por tratamento com a enzima RQ 1 RNase Free DNase (Promega). A reação de digestão foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). 15 μg de RNA total foram incubados com 15 μl (15 U – $1\text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) de DNase, 3 μl de tampão RQ1 DNase 10x Reaction Buffer e água Grau Milli-Q estéril livre de RNases, q.s.p. 30 μl (volume reacional final), por período de 30 minutos à temperatura de 37°C . Após esta etapa a solução DNase Stop Solution (Promega) foi adicionada em cada tubo. Finalmente, RNA total digerido mais DNase (RQ 1 RNase Free DNase) e solução de parada (DNase Stop Solution) foram incubados a 65°C por 10 minutos para total inativação da DNase.

5.2.2 Purificação do RNA total

O procedimento de purificação do RNA total foi realizado utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, o volume da reação de digestão foi ajustado para 100 μl com água Grau Milli-Q estéril e livre de RNases.

Uma alíquota de 350 µl do tampão RLT, que acompanha o kit, foi adicionada e a solução vigorosamente homogeneizada. Em seguida, foi feita a adição de 250 µl de etanol P.A. à solução a qual foi homogeneizada e transferida (700 µl) para colunas do tipo RNeasy Mini Spin, previamente acopladas a tubos de coleta de 2,0 mL. Esse material foi submetido a “spin” de 8.000 x *g* por 15 segundos, à temperatura ambiente. O material que passou e ficou retido no tubo de coleta foi descartado. Em seguida, 500 µl de tampão RPE, que acompanha o kit, foram adicionados ao topo da minicoluna que foi novamente centrifugada a 8.000 x *g* por 15 segundos, à temperatura ambiente. O material que passou foi descartado e 500 µl de tampão RPE foram novamente adicionados seguido de centrifugação a 8.000 x *g* por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após esta centrifugação a mini coluna foi transferida para novo tubo de coleta (tipo Eppendorf de 1,5 mL tratado com DEPC 0,1%) e 30 µl de água livre de RNases (Qiagen) foram adicionados a seu topo. Uma última centrifugação foi realizada a 12.000 x *g* por 1 minuto, à temperatura ambiente. O material retido no tubo de coleta constituiu o RNA purificado através da mini coluna de sílica.

5.2.3 Transcrição Reversa (RT - “Reverse Transcription”)

O sistema Impron II-Reverse Transcription (Promega) foi utilizado na síntese da primeira fita de cDNA. As reações de RT foram desenvolvidas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Inicialmente, 10,6 µl da amostra de RNA purificada de acordo com o descrito acima foram incubados com 1 µl (500 ng) de iniciador Oligo(dT)₁₈ (Fermentas) na concentração de 0,5 µg.µL⁻¹, por um tempo de 5 minutos à temperatura de 70 °C e depois a 4 °C por mais cinco minutos. Em seguida, 8,4 µl de uma mistura reacional (Mix), encerrando 4 µl de tampão de transcrição reversa (5x), 2,4 µl de MgCl₂ 0,025 M, 1 µl de uma mistura de dNTP 0,010 M (Fermentas) e 1 µl da enzima Improm-II Reverse Transcriptase (transcriptase reversa) foram adicionados à amostra de RNA e esta mistura incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos, 70 °C por 15 minutos (inativação da transcriptase reversa) e, finalmente, 4 °C (fim da reação). Os produtos das reações de RT (cDNA de fita simples), foram armazenados em ultra freezer a -85 °C para posterior manipulação.

5.3 Extração de DNA genômico

Folhas de plantas de feijão-caupi (CE-31) cultivadas como descrito anteriormente foram coletadas e submetidas à extração de DNA genômico através do método descrito por

Warner *et al.*, (1996), utilizando o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB - “*cetyltrimethylammonium bromide*”). Aproximadamente 3 g de folhas frescas foram maceradas na presença de nitrogênio líquido até obtenção de um fino pó. Este pó foi transferido para tubo de polipropileno contendo 15 mL de tampão CTAB contendo β -mercaptoetanol a 2%, previamente aquecido a 65 °C. Este material foi incubado a 65 °C por aproximadamente 90 minutos, sendo levemente agitado a cada 10 minutos. Ao final desta incubação o extrato foi centrifugado a 5.000 x *g* por 10 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa obtida após centrifugação (sobrenadante) foi cuidadosamente transferida para novo tubo e a extração foi repetida, agora, porém, na presença de uma mistura de clorofórmio P.A. com álcool isoamílico P.A. seguindo proporção de 24:1 (v/v). Ao final RNase A foi adicionada a uma concentração final de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o material foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, 2,5 volumes de álcool etílico P.A. gelado foram adicionados à mistura que foi suavemente agitada por inversão leve do tubo. Após homogeneização o material foi centrifugado a 10.000 x *g* por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com volume apropriado de álcool etílico a 70%. O excesso de etanol foi removido e o precipitado permitido secar por inversão do tubo. Ao final da secagem este precipitado foi ressuspensionado em 300 μL de tampão TE e incubado a 4 °C por meia hora, sendo em seguida, armazenado para procedimentos posteriores.

5.4 Desenho de iniciadores a partir de sequências codificadoras de cistatinas de feijão-caupi

As sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados do NCBI “*National Center for Biotechnology Information*”, sob códigos de acesso Z21954.1 e AF278573.1, serviram como base para desenho de iniciadores que foram utilizados tanto para clonagem de cDNA, como de DNA genômico de feijão-caupi. Estas sequências codificam para dois inibidores de proteinases cisteínicas (cistatinas). O primeiro código de acesso corresponde a uma sequência nucleotídica que codifica uma cistatina de um único domínio inibitório, que foi aqui denominada VuCys1 (“*Vigna unguiculata* one-domain cystatin”). A sequência que codifica este inibidor foi inicialmente detectada em uma biblioteca de cDNA construída a partir de RNA isolado de sementes de feijão-caupi, genótipo IT81D 1045 (FERNANDES *et al.*, (1993). Recentemente a sequência que codifica este inibidor foi clonada no trabalho de Aguiar *et al.*, (2006). O segundo número de acesso depositado no NCBI compreende uma sequência nucleotídica que codifica para uma cistatina de dois domínios inibitórios, denominada neste trabalho, VuCys2 (“*Vigna unguiculata* two-domain cystatin”) inicialmente

estudada em folhas de feijão-caupi, genótipo EPACE-10, sendo considerada uma multicistatina, (DIOP *et al.*, 2004). As sequências dos iniciadores utilizados são mostradas no quadro 1.

5.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR - “*polymerase chain reaction*”) e clonagem

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf). 640 ng de cDNA ou 500 ng de DNA genômico isolados como descrito anteriormente foram incubados em uma mistura reacional (mix) consistindo de 0,25 µl (1,25 U) de GoTaq DNA Polymerase, 5U.µl⁻¹, (Promega), 2 µl de tampão 5x Colorless Reaction Buffer (Promega), 2 µl de uma mistura de dNTP 0,001 M, 1 µl de cada iniciador (senso e reverso) e água Grau Milli-Q estéril, q.s.p. 10 µl. Os ciclos reacionais de PCR consistiram em uma etapa inicial de aquecimento a 95 °C por 2 minutos, 65 °C por 1 minuto (anelamento dos iniciadores), 72 °C por 1 minuto (extensão) e 33 ciclos adicionais caracterizados cada por uma etapa de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, seguida de anelamento de iniciadores a 65 °C por 1 minuto e extensão de produtos a 72 °C por 1 minuto. Ao final dos 33 ciclos uma etapa de extensão adicional a 72 °C por 9 minutos foi implementada.

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 0,8%, purificados seguindo as instruções do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e inseridos em vetor de clonagem, pGEM-T Easy Vector (Promega). Para tanto, 1,5 µl de cada produto de PCR purificado, foram misturados a 1 µl (50 ng) de pGEM-T Easy Vector. 5 µl do tampão 2x Rapid Ligation Buffer foram adicionados à mistura reacional, seguido da adição de 1 µl da enzima T4-DNA Ligase (Promega) e água Grau Milli-Q estéril q.s.p. 10 µl. A reação foi desenvolvida à temperatura de 4 °C por 16 horas em termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf).

Após reação de ligação os plasmídeos foram utilizados na transformação de células eletrocompetentes de *E. coli*, Top10F' (Invitrogen), utilizando eletroporador, Electroporator 2510 (Eppendorf) a uma voltagem de 2,5 KW.

A seleção dos clones transformados foi realizada por “*screening*” em meio sólido LB agar (25 ml), contendo isopropil-β,D-tiogalatopiranosídeo (IPTG) na concentração de 0,5 mM, X-Gal (80 µg.µl⁻¹), estreptomicina (30 µg.µl⁻¹) e carbenicilina (100 µg.µl⁻¹) distribuído em placa de Petri (120 x 10 mm). Os clones positivamente transformados

Quadro 1. Iniciadores utilizados na clonagem das cistatinas de feijão-caupi

Iniciadores para VuCys1

Primer senso (*Forward*) 5' - CCGCTCGAG**ATGG**CAGCACTCGGTGGCAAT - 3'

Primer reverso (*Reward*) 5' - CGCGGATCC**CTAT**GCAGGTGCATCTCCAACATG - 3'

Iniciadores para VuCys2

Primer senso (*Forward*) 5' - CCGCTCGAG**ATGG**CAACAGCAACAGTAACT - 3'

Primer reverso (*Reward*) 5' - CGCGGATC**CTCAA**ACAGCAACATCCACAGG - 3'

Os sítios de restrição para as enzimas *Xho*I (primer senso) e *Bam*HI (primer reverso) igualmente incorporados em ambos os iniciadores foram sublinhados nas sequências acima. Os códons de iniciação (ATG) e de terminação (CTA – complemento reverso do códon TAG) para VuCys1 e (TCA – complemento reverso do códon TGA) para VuCys2 foram destacados em negrito.

foram inoculados em meio líquido LB caldo (5 ml) contendo estreptomicina ($30 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$) e carbenicilina ($100 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$) e mantidos sob agitação constante a 180 rpm e temperatura controlada de 37°C , por 16 horas em incubadora com agitação orbital.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do método da lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, estes plasmídeos foram digeridos em duas etapas utilizando as enzimas de restrição *XhoI* (Fermentas) e *BamHI* (Fermentas). Na primeira etapa, $6 \mu\text{g}$ de DNA plasmidial foram incubados com $1 \mu\text{l}$ da enzima *XhoI*, $1 \mu\text{l}$ do tampão 10x Reaction Buffer (Fermentas) e água Grau Milli-Q estéril, q.s.p. $10 \mu\text{l}$. A reação foi desenvolvida a 37°C por 1 hora e terminada por inativação térmica da enzima de restrição a 80°C por 20 minutos. Na segunda etapa reacional foram adicionados $1 \mu\text{l}$ da enzima *BamHI*, $0,5 \mu\text{l}$ do tampão Buffer R (Fermentas), $1 \mu\text{l}$ de NaCl 1 M, $1,5 \mu\text{l}$ de albumina sérica bovina, BSA, (Jena Biosciences) na concentração de $1 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ e água Grau Milli-Q, q.s.p. $5 \mu\text{l}$. A reação foi desenvolvida a 37°C por 2 horas e terminada por inativação térmica da enzima de restrição a 65°C por 20 minutos. A confirmação da transformação foi feita pela aplicação dos produtos de digestão em eletroforeses em gel de agarose a 0,8% e por reações de PCR, realizadas de acordo com condições previamente descritas, utilizando como molde os vetores recombinantes VuCys1-pGEM-T Easy e VuCys2-pGEM-T Easy preparados a partir de cDNA e DNA genômico.

5.6 Sequenciamento de cDNA, DNA genômico e análise das sequências

Os clones positivos foram seqüenciados utilizando o kit DYEnamic ET Dye terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) sendo seguidas as instruções do fabricante. As reações de amplificação para seqüenciamento de DNA foram conduzidas em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf), utilizando iniciadores universais M13(-40) senso (Invitrogen) e M13(-45) reverso (IDT Technologies), quadro 2.

As reações de sequenciamento foram analisadas em um sequenciador automatizado de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os parâmetros utilizados nas corridas foram: injeção a 3 kV por 50 s, seguida de eletroforese a 6 kV por 200 minutos. Os eletroferogramas foram visualizados utilizando o software Sequence Analyzer v 3.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). As sequências completas foram montadas e checadas quanto à qualidade utilizando o pacote Phred/Phrap/Consed (EWING e GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998; GORDON *et al.*, 1998). A busca por homologia foi realizada

Quadro 2. Iniciadores utilizados no seqüenciamento de DNA genômico e cDNA, amplificados a partir de mRNA isolado de folhas de feijão-caupi, genótipo CE-31, utilizando iniciadores específicos para anelamento e amplificação de seqüências codificadoras para *VuCys1* e *VuCys2*

Iniciadores utilizados no seqüenciamento de DNA genômico e cDNA

Primer senso (*Forward*) - M13(-40) 5' - GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA - 3'

Primer reverso (*Reward*) - M13(-45) 5' - GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG - 3'

Os vetores recombinantes *VuCys1*-pGEM-T Easy e *VuCys2*-pGEM-T Easy foram seqüenciados utilizando iniciadores universais M13(-40) (Fermentas) e M13(-46) (IDT Technologies).

utilizando o filtro de busca BLASTp do banco de dados do NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Alinhamentos múltiplos de sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram gerados e manualmente editados utilizando os programas Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994), BioEdit (Hall, 1999) e CLC Sequence Viewer v.6.5.4.

5.7 Subclonagem no vetor de expressão, pET302NT-His

Plasmídeos de clones de *E. coli* Top10 F', cujas sequências codificadoras para VuCys1 e VuCys2 (amplificados a partir de cDNA) foram compatíveis com as depositadas no NCBI, como verificado por sequenciamento de DNA, foram extraídos e digeridos com as enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI, conforme protocolo de digestão previamente descrito. As regiões codificadoras para VuCys1 e VuCys2 foram purificadas utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e então inseridas no múltiplo sítio de clonagem do vetor de expressão, pET302NT-His, previamente linearizado com *Xho*I e *Bam*HI, em frame com uma sequência codificadora para uma cauda de histidina (6xHis-tag). O promotor *T7lac promoter* localizado na sequência do vetor pET302NT-His foi utilizado para o controle da expressão de VuCys1 e VuCys2.

As reações de ligação da sequência codificadora para VuCys1 no vetor pET302NT-His foram conduzidas a uma temperatura de 4 °C, overnight, utilizando 1 µl da enzima T4 DNA Ligase (Promega), 1,5 µl do tampão 10x Reaction Buffer (Promega), 10 µl do inserto VuCys1, 2 µl do vetor pET302NT-His, previamente linearizado (proporção 5:1 v/v, inserto:vetor) e água Grau Milli-Q, q.s.p. 15 µl.

As condições de ligação da sequência codificadora para VuCys2 no mesmo vetor foram diferentes daquelas utilizadas para VuCys1. Estas condições consistiram na incubação de 1 µl da enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), 1 µl do tampão 10x Reaction Buffer (Fermentas), 4 µl do inserto VuCys2 e 4 µl do vetor pET302NT-His previamente linearizado (proporção 1:1 v/v, inserto:vetor) a uma temperatura de 22 °C por aproximadamente 16 horas. Ao final da reação a enzima foi termicamente inativada a 65 °C por 10 minutos.

5.7.1 Transformação de células de expressão, *E. coli* ArcticExpress (DE3)

As sequências de cDNA codificadoras para VuCys1 e VuCys2 ligadas ao vetor de expressão, pET302NT-His foram inseridas em células de expressão eletrocompetentes, *E.*

coli, ArcticExpress (DE3) (Stratagene), utilizando eletroporador, Electroporator 2510 (Eppendorf) a uma voltagem de 2,5 KW.

As células foram semeadas em meio sólido LB-agar contendo gentamicina a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e carbenicilina a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ distribuído em placas de Petri (120 x 20 mm) e incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas para seleção dos clones transformados.

5.7.2 Determinação das condições de indução da expressão das proteínas recombinantes

Experimentos preliminares foram realizados nos quais a indução das proteínas recombinantes foi feita pela inoculação de colônias de *E. coli* ArcticExpress (DE3), provenientes de clones transformados, em meio LB-caldo contendo gentamicina a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e carbenicilina a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seguida de incubação em incubadora com agitação orbital Sartorius à temperatura controlada de 37 °C e agitação de 180-200 rpm por 16 horas.

Alíquotas de 500 μL destas culturas foram inoculadas em 50 mL de meio LB-caldo contendo gentamicina a 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e carbenicilina a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, em seguida, incubadas a 37 °C e 180 rpm, até atingirem um desvio óptico (D.O.) de 0,4-0,6 no comprimento de onda, $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Após atingirem a D.O. ideal os frascos contendo as células receberam soluções de IPTG (isopropil- β ,D-tiogalactopiranosídeo), nas concentrações finais de 0,1 e 0,5 mM e foram incubados a 12 °C e rotação variando de 180-190 rpm por até 24 horas em agitador orbital refrigerado TECNAL. Diferentes coletas foram realizadas a fim de avaliar o grau de expressão ao longo do tempo de VuCys1 e VuCys2, nos tempos de 0 hora (antes da adição do IPTG) e 4, 8, 10, 20 e 24 horas após adição do indutor. Células de *E. coli* ArcticExpress (DE3) transformadas apenas com o plasmídeo pET302NT-His foram utilizadas como controle negativo da expressão.

Após coleta as células foram imediatamente submetidas ao procedimento de lise para extração das proteínas solúveis através do seguinte método: Um volume de 1,5 mL foi aliquotado de cada indução nos diferentes tempos e concentrações de IPTG, bem como da cultura controle encerrando células transformadas apenas com o vetor de expressão pET302NT-His. Este material foi aplicado em tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 x *g* por 5 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados preservados. Um volume de 150 μL do tampão de lise, Tris-HCl 0,05 M, pH 8,

contendo NaCl 0,5 M e EDTA 2 mM foram adicionados aos precipitados. Em seguida, lisozima foi adicionada aos tubos a uma concentração final de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta mistura foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e resfriada à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido mais uma vez. Ao atingirem a temperatura ambiente as células receberam alíquotas de $1,5 \mu\text{L}$ de DNase A (GE-Healthcare), MgCl_2 na concentração final de 8 mM e CaCl_2 na concentração final de 10 mM, para quebra da viscosidade. As amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes (fração solúvel de células) e os precipitados (fração insolúvel) foram armazenados a 4°C .

A análise da expressão das proteínas recombinantes foi realizada por avaliação dos perfis eletroforéticos em géis de poliacrilamida, preparados como descrito mais à frente, das frações solúveis e insolúveis de extratos totais de *E. coli* ArcticExpress (DE3) coletadas nas diferentes condições de indução.

5.8 Avaliação da presença da cauda histidina nas proteínas recombinantes

A presença da cauda de histidina nas proteínas recombinantes foi verificada utilizando o kit Invision His-tag In-gel Stain (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

5.8.1 Indução em larga escala, lise e purificação

A indução da expressão de VuCys1 e VuCys2, em larga escala, foi realizada de modo semelhante aos experimentos preliminares acima descritos sendo padronizado, porém, o tempo de coleta (24 horas) e a concentração de IPTG (0,5 mM).

Os procedimentos de lise celular também foram realizados de modo semelhante ao anteriormente descrito, sendo utilizados maiores volumes, mas sendo mantidas as concentrações finais de lisozima, MgCl_2 e CaCl_2 . Além disso, nos procedimentos realizados em larga escala foi adicionado PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) a uma concentração final de 100 mM, para prevenir a possível ação de proteinases serínicas (da própria *E. coli*) sobre as proteínas recombinantes.

Os extratos solúveis de *E. coli* ArcticExpress (DE3) em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo NaCl 0,5 M, EDTA 2 mM e PMSF 100 mM foram aplicados em matriz de afinidade, Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE-Healthcare) previamente equilibrada com tampão

Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo NaCl 0,5 M e imidazol 10 mM. As proteínas recombinantes foram purificadas por adição de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo NaCl 0,5 M e imidazol 100 mM.

Após eluição as proteínas foram dialisadas contra água Milli-Q, utilizando dispositivo de filtração do tipo Vivaspin 20000 (GE-Healthcare) com cutoff de 5kDa através de diferentes ciclos de centrifugação a $8.000 \times g$, 4 °C por 20 minutos. Após diálise as proteínas foram liofilizadas e armazenadas para ensaios posteriores.

5.8.2 Estimativa da concentração de proteínas

Quando necessária, a estimativa da concentração das proteínas solúveis foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como referência para construção de curva padrão de calibração do reagente.

Alternativamente, a concentração das proteínas (particularmente das proteínas purificadas) foi também estimada com base na absorbância de soluções de proteína no comprimento de onda $\lambda = 280$ nm. Nestes casos, as concentrações foram determinadas utilizando o coeficiente de extinção molar de cada inibidor calculado com a ferramenta “on line”, PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>), com base nas sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA previamente determinadas.

5.8.3 Eletroforeses em gel de poliacrilamida

Eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas seguindo o método descrito por Schägger e Von Jagow (1987). Tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10%, persulfato de amônio a 10%, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino) P.A. e uma solução de acrilamida mais bis-acrilamida a uma concentração final de 3,5% consistiu no gel de acomodação (*stacking gel*). O gel de separação (*main gel*) foi preparado com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo SDS a 10%, persulfato de amônio a 10%, TEMED P.A. e solução de acrilamida mais bis-acrilamida em concentrações finais de 12,5; 15 ou 17%.

As eletroforeses foram realizadas sob condições desnaturantes (SDS) e redutoras (β -mercaptoetanol), de acordo com o descrito por LAEMMLI, (1970) em um sistema miniVE Electrophoresis Systems (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.). As proteínas (purificadas ou provenientes de extratos totais de *E. coli*) foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,062 M, pH

6,8, contendo SDS a 2%, β -mercaptoetanol a 5%, glicerol a 20% e azul de bromofenol a 0,001 % e visualizadas e coradas com o corante azul brilhante de Coomassie R-250 a uma concentração final de 0,2% em metanol 50% e ácido acético 10% por aproximadamente 16 horas. Os géis foram visualizados após serem descorados com solução de isopropanol a 12,5% e ácido acético 10%.

Caracterização Bioquímica: Determinação da atividade inibitória contra papaína e diferentes enzimas proteolíticas e avaliação dos efeitos da temperatura e do pH sobre a estabilidade dos inibidores por meio de atividade inibitória e espectroscopia de dicroísmo circular

5.9 Determinação da atividade inibitória contra diferentes enzimas proteolíticas

A atividade inibitória *in vitro* das cistatinas recombinantes VuCys1 e VuCys2 foi testada contra as proteinases cisteínicas papaína, quimopapaína, catepsina B e bromelaína, utilizando BANA (N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida) como substrato, de acordo com o protocolo descrito por Abe *et al.*, 1992. Em todas as reações, 1 µg de VuCys1 ou VuCys2, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6, foi pré-incubado com as proteinases cisteínicas em solução de ativação (tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6, contendo EDTA 2 mM e DTT 3 mM) a 37 °C por 10 minutos. Alíquotas de 200 µL de uma solução do substrato BANA a 1 mM em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6 foram em seguida adicionadas aos tubos e as reações desenvolveram-se a 37 °C por 20 minutos. Após este período, as reações foram paradas pela adição de 500 µL de solução de parada (HCl 2% diluído em etanol P.A.). Produtos reacionais coloridos foram desenvolvidos após adição de 500 µL de uma solução a 0,06% de DMACA (p-dimetilaminocinamaldeído) em etanol P.A. Após 40 minutos de repouso, à temperatura ambiente, as absorbâncias dos produtos reacionais finais foram monitoradas no comprimento de onda, $\lambda = 540$ nm. A atividade inibitória de proteinases cisteínicas foi arbitrariamente expressa em termos de percentual inibitório da atividade das enzimas proteolíticas nas reações ocorridas na presença dos inibidores em relação a reações desenvolvidas em sua ausência (curvas padrão de atividade das enzimas proteolíticas). Além das curvas padrão, reações “em branco” foram conduzidas nas quais a adição do substrato BANA só foi feita após desnaturação das enzimas mais os inibidores pela adição da solução de parada (HCl a 2%). Estas reações funcionaram como “brancos” das amostras VuCys1 e VuCys2 e auxiliaram na determinação dos percentuais inibitórios das cistatinas.

A atividade inibitória também foi avaliada contra a proteinase serínica tripsina, utilizando BApNA (N-Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida) como substrato, de acordo com o protocolo descrito por Oliveira *et al.*, 2007. Um total de 7 µg de VuCys1 ou VuCys2, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6, foi pré-incubado com tripsina em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo CaCl₂ a 0,02 M a 37 °C por 10 minutos. Alíquotas de 250 µL de uma solução do substrato BApNA a 1,25 mM em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 foram adicionadas aos tubos os quais foram permitidos reagir por 15 minutos a 37 °C. As reações foram interrompidas pela adição de 60 µL de solução de parada (Ácido acético a 30%). Curvas padrão foram realizadas nas quais tripsina foi incubada apenas com o BApNA sem os inibidores. Reações em “branco” foram conduzidas onde a adição do substrato BApNA só foi feita após desnaturação

da tripsina mais os inibidores pela adição de ácido acético a 30%. Estas reações funcionaram como “brancos” das amostras *VuCys1* e *VuCys2*. As absorbâncias dos produtos reacionais finais foram monitoradas no comprimento de onda, $\lambda = 410$ nm e, de modo semelhante ao descrito nos ensaios de atividade inibitória de proteinases cisteínicas, a atividade inibitória contra tripsina foi expressa em termos percentuais, com relação à curva padrão da tripsina e às reações dos “brancos” das amostras.

5.10 Efeito da temperatura sobre a estabilidade de *VuCys1* e *VuCys2*

Duas metodologias diferentes foram empregadas para avaliação da estabilidade térmica dos inibidores recombinantes. O primeiro teste consistiu na incubação de *VuCys1* e *VuCys2*, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6, nas temperaturas de 24, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 °C por 10 minutos. Após 10 minutos de incubação em cada temperatura acima mencionada as amostras foram resfriadas a 4 °C e depois de atingirem a temperatura ambiente (~24 °C), submetidas a ensaio de inibição de atividade de proteinases cisteínicas (conforme descrito no subitem 5.9) contra a proteinase cisteínica papaína.

O segundo teste consistiu no aquecimento dos inibidores a uma temperatura de 100 °C pelos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. De modo idêntico ao primeiro teste, após incubação as amostras foram resfriadas a 4 °C e depois de atingirem a temperatura ambiente, foram testadas quanto à capacidade de inibir a atividade de papaína.

5.11 Efeito do pH sobre a estabilidade de *VuCys1* e *VuCys2*

Além da temperatura os inibidores foram testados quanto à capacidade de inibir a atividade de papaína após incubação em diferentes condições de pH. O ensaio foi realizado da seguinte forma: alíquotas de 5 µL de *VuCys1* e *VuCys2*, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6, foram misturadas com 45 µL dos tampões glicina-HCl, pH 2,2; acetato de sódio, pH 5,21; fosfato de sódio, pH 6,00 e pH 7,34; Tris-HCl, pH 8,01 e glicina-NaOH, pH 11, todos na concentração de 0,05 M e as misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida, a atividade inibitória residual contra papaína foi testada de acordo com ensaio de atividade inibitória, descrito anteriormente.

5.12 Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism)

Amostras liofilizadas de VuCys1 e VuCys2 foram solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 a uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹. As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO, modelo J-815 (Jasco Inc., Maryland, US) em parceria com o grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). O equipamento foi calibrado com ácido (+)-10-canforsulfônico, de acordo com os seguintes ajustes: “*data pitch*”, 0,2 nm; “*scan speed*”; 50 nm.min⁻¹; “*response*”, 1s e “*band width*”, 1 nm. Os valores de CD em variados comprimentos de onda foram convertidos para elipticidade residual média $[\theta]$, de acordo com a fórmula (1), (Quadro 3).

5.12.1 Avaliação do efeito da temperatura sobre o padrão de estruturas secundárias dos inibidores

A desnaturação térmica de ambos inibidores foi monitorada como uma média de 5 “*scans*” para cada proteína em solução de tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6, contendo EDTA 3 mM e DTT 1 mM. As proteínas foram aquecidas de 10 em 10 °C, permanecendo 1 minuto em cada temperatura, partindo-se da temperatura de 10 °C até a temperatura de 90 °C. As medidas de CD foram registradas exatamente ao final de cada tempo de incubação.

As curvas de transição térmica foram determinadas pelo monitoramento dos sinais de CD nos comprimentos de onda, $\lambda = 217$ nm e $\lambda = 222$ nm. Os espectros foram obtidos utilizando cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm na região do ultravioleta distante (195 – 250 nm).

5.12.2 Avaliação do efeito do pH sobre o padrão de estruturas secundárias dos inibidores

O efeito do pH sobre o arranjo conformacional das cistatinas foi monitorado utilizando-se os mesmos parâmetros empregados nos estudos de estabilidade térmica. Neste caso, porém, os resultados grafados são médias de 10 varreduras para cada proteína, em solução tampão fosfato-borato-citrato 10 mM, contendo NaCl 100 mM nos valores de pH 2,0; 5,3; 7,2; 9,0 e 11,0 também realizados na região do ultravioleta distante (195 – 250 nm).

Neste caso as amostras ficaram incubadas em cada pH por intervalo de tempo variando de 1,5 a 2 minutos após o qual as medidas de CD foram feitas.

Quadro 3. Expressão matemática utilizada para conversão dos dados de CD para elipticidade residual média $[\theta]$

$$[\theta]\lambda = \frac{(\theta.M0)}{10.l.C} \quad (1)$$

Onde, $[\theta]\lambda$ é a elipticidade observada em miligraus; M0 é a massa média por resíduo de aminoácido (M0 = 115); C é a concentração da proteína (mg.mL⁻¹) e l é o caminho óptico (cm).

Caracterização biológica das cistatinas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2

5.13 Avaliação do potencial antifúngico das cistatinas recombinantes de feijão-caupi

5.13.1 Preparo das proteínas

Os inibidores recombinantes, produzidos e purificados conforme previamente descrito, foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e passados através de uma membrana de ultra filtração (Milli-Pore) com poro de 0,22 μm . O procedimento de filtração final foi realizado sob condições estéreis no interior de uma câmara de fluxo laminar. A concentração final de cada inibidor foi ajustada para 0,3 mg.mL^{-1} .

5.13.2 Obtenção e manutenção dos fungos

Fungos fitopatogênicos pertencentes às espécies: *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* e *Penicillium herquei* foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Estes fungos foram mantidos em 25 mL de meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em placas de Petri (120 x 15 mm) e permitidos germinar e crescer em câmara para desenvolvimento de organismos biológicos do tipo B.O.D. (*biological organisms development*) a uma temperatura controlada de 26 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12 h (luz/escuro). A cultura foi renovada a cada 2 a 3 semanas de cultivo por meio de repique de fragmentos miceliais mais jovens para placas contendo meio BDA novo em câmara de fluxo laminar.

5.13.2.1 Preparo das suspensões de esporos

Suspensões de esporos dos fungos testados foram obtidas de acordo com o procedimento descrito por Araújo-Filho *et al.*, (2010). Culturas frescas de fungos com 7 dias de cultivo, após repicagem, foram individualmente lavadas com 10 mL de água destilada estéril, por meio de movimento gentil utilizando alça de Drigalski de ponta triangular. Através deste movimento os esporos foram liberados e mantidos sob a água. A suspensão contendo esporos e restos miceliais e de hifas foi passada através de um tecido de algodão de trama fina esterilizado e devidamente posicionado sobre um funil de vidro também previamente esterilizado. Todo o procedimento foi realizado sob condições assépticas em câmara de fluxo

laminar. A contagem do número de esporos foi realizada com auxílio de câmara de Neubauer e um microscópio de luz (Olympus-BX 60), acoplado a um sistema de foto-documentação. A estimativa da concentração de esporos na solução filtrada foi realizada por meio da determinação do número de esporos em uma alíquota de volume conhecido retirada do material filtrado. As suspensões tiveram suas concentrações finais determinadas e ajustadas para 2×10^5 esporos.mL⁻¹.

5.13.2.2 Determinação do efeito das cistatinas sobre a germinação de esporos

A avaliação do efeito das cistatinas recombinantes sobre a germinação de esporos de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos foi realizada de modo semelhante ao descrito por Broekaert *et al.* (1990). Alíquotas de 10 µL de cada suspensão de esporos (2×10^5 esporos.mL⁻¹), encerrando, portanto, 1000 esporos foram depositadas em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato contendo 96 poços (estéreis). Em seguida, 100 µL de soluções das proteínas recombinantes, ambas na concentração de 0,3 mg.mL⁻¹, foram imediatamente adicionados. Meio líquido YPD (*yeast peptone dextrose*), em alíquotas de 100 µL, foi distribuído sobre os poços, perfazendo um volume final de 210 µL. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água Grau Milli-Q estéril, foram utilizados como controles negativo do ensaio, enquanto que peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,5 M), também em volumes de 100 µL, foi utilizado como controle positivo (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010).

As placas foram mantidas hermeticamente seladas em ambiente escuro e úmido, a uma temperatura aproximada de 27 °C. A avaliação do efeito dos inibidores sobre a germinação de esporos foi realizada por meio da determinação da densidade óptica do meio YPD na ausência e na presença das cistatinas ao longo de todo o período de incubação. As medições das absorbâncias foram realizadas em uma leitora de microplacas, modelo EL_X 800 (BIO-TEK Instruments) no comprimento de onda, $\lambda = 630$ nm, em intervalo de tempo que variou de 0 a 80 h de incubação após início dos experimentos. O inibidor VuCys1 foi testado contra as espécies de fungos fitopatogênicos, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *P. herquei*, enquanto que o inibidor VuCys2 foi testado contra as espécies *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *C. musae*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani* e *P. herquei*.

5.13.2.3 Determinação do efeito das cistatinas sobre crescimento vegetativo

O efeito dos inibidores sobre o crescimento micelial dos fungos em estudo foi avaliado de modo semelhante ao descrito para o efeito sobre a germinação de esporos, segundo Broekaert *et al.* (1990). A diferença é que no ensaio de inibição de crescimento vegetativo os fungos foram permitidos germinar por incubação das placas de microtitulação a 27 °C, na ausência de luz, por, aproximadamente, 12 h. Após este período, que corresponde, em média, ao tempo necessário para que os esporos dos fungos testados possam germinar, alíquotas de 100 µL contendo as proteínas VuCys1 e VuCys2, ambas a uma concentração de 0,3 mg.mL⁻¹, foram adicionadas aos poços.

A avaliação do efeito sobre o crescimento foi realizada de modo idêntico ao utilizado na avaliação do efeito sobre germinação de esporos, por meio da medida das absorbâncias das placas em leitora de microplacas, modelo EL_x 800 (BIO-TEK Instruments) no comprimento de onda, λ = 630 nm. O intervalo de tempo examinado variou de 0 a 40 h após adição das proteínas e os fungos testados foram os mesmos utilizados nos ensaios de inibição de germinação de esporos.

A avaliação do potencial antifúngico das proteínas recombinantes, tanto nos ensaios de inibição de germinação de esporos, como nos ensaios de inibição de crescimento, foi realizada pela análise e comparação da taxa de germinação e das curvas de crescimento dos fungos testados, de amostras incubadas na presença dos inibidores com aquelas incubadas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,21, água Grau Milli-Q e peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,5 M).

5.14 Avaliação do potencial antimicrobiano das cistatinas recombinantes de feijão-caupi

5.14.1 Cepas bacterianas e levedura

Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231 provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os experimentos aqui descritos foram realizados em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará.

5.14.2 Preparo das proteínas

Os inibidores recombinantes, produzidos e purificados conforme previamente descrito, foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0 e passados através de uma membrana de ultra filtração (Milli-Pore) com poro de 0,22 μm . O procedimento de filtração final foi realizado sob condições estéreis no interior de uma câmara de fluxo laminar. Todo o procedimento foi realizado de modo idêntico ao descrito no preparo das amostras para avaliação da atividade antifúngica. As concentrações testadas dos inibidores são descritas logo abaixo.

5.14.3 Atividade antimicrobiana - Método de microdiluição em caldo de cultura

A avaliação do potencial antimicrobiano dos inibidores foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo de cultura, de acordo com o protocolo descrito pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2003), a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) capaz de causar morte ou estacionamento de proliferação dos microrganismos testados. As diferentes cepas microbianas puras, mantidas em agar estoque sob refrigeração, foram repicadas em caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Merck) e incubadas a 35 °C até atingirem fase de crescimento exponencial (6 a 8h de crescimento).

Após este período as culturas tiveram sua densidade celular ajustada de modo a se obter uma turvação visível equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland, utilizando solução salina 0,85% estéril. A suspensão celular obtida foi diluída 100 vezes, em solução salina 0,85% estéril, resultando em uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹.

Alíquotas de 100 µL desta suspensão foram adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, já preenchidos com 125 µL de caldo BHI ou caldo Sabouraud (Merck). Em seguida, alíquotas de 25 µL de *Vu*Cys1 nas concentrações de 3,96; 1,98; 0,99; 0,49; 0,24; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015; 0,007; 0,0038 e 0,0019 mg.mL⁻¹, *Vu*Cys2 nas concentrações de 2,94; 1,47; 0,735; 0,36; 0,18; 0,09; 0,045; 0,023; 0,011; 0,005; 0,0028 e 0,0014 mg.mL⁻¹, dos agentes antimicrobianos de uso clínico, Amicacina (1,2 mg.mL⁻¹) e Cetoconazol (2,0 mg.mL⁻¹), foram adicionadas totalizando um volume final de 250 µL por poço. Amicacina e Cetoconazol foram os controles positivos (C+) do ensaio. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6 e meio de cultura mais inóculo (M+I), foram utilizados como controles negativos (C-). As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 35 °C.

Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e registro das absorbâncias em leitora de microplacas, no comprimento onda, $\lambda = 492$ nm.

5.15 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro* das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas

5.15.1 Preparo das proteínas

As cistatinas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2, foram solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e, em seguida, passadas através de membrana de ultra filtração (Milli-Pore) com poro de 0,22 μm . Este material foi submetido a um total de oito diluições seriadas feitas a partir das concentrações iniciais de 3,01 μM para VuCys1 e 3,15 μM para VuCys2.

5.15.2 Linhagens de células tumorais: tipos e origem

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de citotoxicidade *in vitro* dos inibidores foram: MDA-435 (Melanoma – humano), HCT-8 (cólon – humano) e SF295 (cérebro – humano). Estas células foram obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD) e os ensaios de citotoxicidade aqui descritos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

5.15.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Os experimentos de citotoxicidade foram realizados segundo o método do MTT (MOSMANN, 1983). O ensaio consistiu na análise colorimétrica da reação catalisada pela enzima succinil-desidrogenase sobre o sal MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium] (MTT)] a qual leva à formação de cristais insolúveis de formazan, na mitocôndria de células viáveis (MOSMANN, 1983). Após adição do solvente orgânico dimetil sulfóxido (DMSO), o MTT convertido em formazan é solubilizado e seu acúmulo pode ser quantificado por espectrofotometria. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula sendo, portanto, bastante útil para determinar o grau de citotoxicidade de uma determinada substância.

As diferentes linhagens celulares acima descritas foram cultivadas em frascos plásticos para cultura do tipo “Corning” (25 cm^2 , volume de 50 mL) contendo meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos

(penicilina/estreptomicina). Estas células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada de 5% de CO₂, observadas quanto ao crescimento celular, com auxílio de microscópio de inversão a cada 24 horas e sendo repicadas para novos meios de cultura, sempre que necessário, mantendo-se uma concentração de 0,5 a 1,0 x 10⁶ células.mL⁻¹. Este material foi distribuído em placas de microtitulação de 96 poços numa densidade de 0,7 x 10⁵ células.mL⁻¹.

As diferentes diluições de VuCys1 e VuCys2, bem como soluções estoque (concentradas) foram incubadas por período de 72 horas. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após este período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 rpm, à temperatura ambiente por 15 minutos e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, 200 µL de uma solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) foram adicionados a cada poço da placa de microtitulação, a qual foi mantida em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ por 3 horas. Ao final da incubação, este material foi centrifugado a 3000 rpm, à temperatura ambiente por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 150 µL de DMSO.

A determinação da citotoxicidade foi realizada por meio da comparação das leituras das absorbâncias, no comprimento de onda $\lambda = 595$ nm, obtidas de placas incubadas com os inibidores com os valores de absorbância obtidos de placas incubadas com o controle positivo (Doxorrubicina), utilizando uma leitora de microplacas EL_X 800 (BIO-TEK Instruments).

5.16 Avaliação dos efeitos *in vitro* das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre enzimas digestivas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

5.16.1 Insetos: *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

Os espécimes de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* utilizados nos ensaios aqui descritos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas Prof. Maurício Pereira de Sales, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

5.16.2 Extração e preparo das enzimas digestivas

Enzimas proteolíticas de larvas dos bruquídeos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foram obtidas de acordo com o método descrito por Oliveira *et al.*, (2007). Inicialmente, intestinos médios de larvas de terceiro instar de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foram cirurgicamente removidos com auxílio de pinças de precisão e um microscópio estereoscópico. O intestinos foram imediatamente colocados em contato com solução salina iso-osmótica (NaCl 0,15 M), sob banho de gelo e transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL onde foram macerados na presença da solução salina. O extrato bruto obtido foi centrifugado a 14.000 x *g*, 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante utilizado nos ensaios enzimáticos.

5.16.3 Atividades enzimáticas e atividade inibitória de proteinases

A atividade proteolítica total dos homogenatos intestinais foi determinada utilizando azocaseína como substrato, de acordo com o descrito por Xavier-Filho *et al.*, (1989). Inicialmente, uma quantidade apropriada de cada homogenato intestinal foi incubada a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos com o substrato azocaseína a 1%, preparada em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6, contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM. As reações foram interrompidas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 20% e, em seguida, centrifugadas a 14.000 x *g* por 15 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram coletados e neutralizados com igual volume de uma solução de NaOH 2 N. Os tubos foram mantidos em repouso por aproximadamente cinco minutos e as absorbâncias das reações foram monitoradas no comprimento de onda $\lambda = 440$ nm. A capacidade das cistatinas

recombinantes de inibir a atividade das enzimas intestinais dos insetos foi verificada por meio da pré-incubação de quantidades crescentes (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 µg) de *VuCys1* e *VuCys2* em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 com os homogenatos a 37 °C por 15 minutos, antes da adição de azocaseína a 1%. A atividade proteolítica residual dos homogenatos foi então expressa em valores percentuais com referência nos ensaios proteolíticos realizados na ausência dos inibidores (curvas padrão). Brancos das amostras *VuCys1* e *VuCys2* foram realizados nos quais as misturas formadas por homogenatos e inibidores foram previamente incubadas com TCA a 20%, antes da adição da azocaseína. A quantidade de homogenato intestinal utilizada em cada ensaio foi previamente estabelecida com base em curvas de atividade proteolítica realizadas na ausência dos inibidores, utilizando diferentes volumes de homogenatos intestinais, de modo semelhante ao descrito por Siqueira-Júnior *et al.*, (2002).

5.17 Avaliação dos efeitos *in vivo* das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre *Callosobruchus maculatus*

5.17.1 Origem dos insetos

Os espécimes de *Callosobruchus maculatus* utilizados no bioensaio (atividade *in vivo*) foram provenientes de colônia local estabelecida e mantida no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.17.1.1 Manutenção dos insetos

Indivíduos adultos (machos e fêmeas) de *Callosobruchus maculatus* foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura controlada de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro, em potes plásticos devidamente perfurados. Os insetos foram permitidos acasalar e ovopositar sobre sementes de uma cultivar susceptível de feijão-caupi obtida em mercado local. Aproximadamente 24 a 30 dias após início de cada colônia, os insetos emergidos foram transferidos para potes plásticos contendo sementes novas e mantidos sob as mesmas condições que os insetos parentais. Este procedimento de manutenção das colônias foi repetido até o final dos experimentos.

5.17.2 Preparo das sementes artificiais

Sementes comerciais de feijão-caupi (mesma cultivar utilizada na manutenção da colônia) foram manualmente descascadas e trituradas em liquidificador. Após isso, a farinha resultante foi processada em moedor elétrico de café até obtenção de um fino pó o qual foi inserido no interior de cápsulas gelatinosas N° 2 (2 cm x 0,7 cm) com auxílio de um encapsulador N° 2. Os tratamentos controles consistiram na utilização de cápsulas preenchidas apenas com farinha de feijão, ao passo que os tratamentos teste foram preparados por meio da mistura de farinha de feijão com os inibidores recombinantes liofilizados (VuCys1 e VuCys2), nas concentrações finais de 0,025, 0,05 e 0,1% (m/m).

5.17.3 Delineamento experimental e parâmetros de estudo

As sementes artificiais foram colocadas em potes plásticos idênticos aos utilizados na manutenção da colônia dos insetos, num total de 10 sementes por pote ($n = 10$). Fêmeas de *C. maculatus* previamente fertilizadas (48 h) foram inseridas nos potes plásticos, incubadas à temperatura de 24 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h luz/escuro e permitidas ovopositar por 24 horas. Após este período os insetos foram removidos e o número de ovos por semente foi manualmente padronizado para cinco.

O experimento foi realizado em triplicatas, sendo cada repetição composta por 1 pote plástico encerrando 10 sementes infestadas com 5 ovos cada. Um total de 12 gramas de farinha de feijão pura ou misturada com inibidor liofilizado foi utilizado para o preenchimento das 30 cápsulas. Os parâmetros biológicos avaliados foram: (1) Mortalidade de larvas (%), (2) tempo médio de desenvolvimento (dias), (3) emergência de adultos (%), (4) peso médio de adultos emergidos (mg), calculados de acordo com as fórmulas expostas no quadro 4 e (5), número cumulativo de adultos emergidos ao longo de todo o período experimental.

O delineamento experimental empregado foi do tipo inteiramente casualizado e os dados obtidos foram sujeitos à Análise de Variância (ANOVA) sendo as médias comparadas através do Teste de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Os parâmetros biológicos acima avaliados, bem como as fórmulas matemáticas utilizadas foram todos baseados no trabalho de Leite *et al.*, (2005).

Quadro 4. Fórmulas matemáticas utilizadas na avaliação dos efeitos das cistatinas recombinantes de feijão-caupi sobre os parâmetros biológicos (M_L) - mortalidade de larvas (%), (T_{md}) - tempo médio de desenvolvimento (dias), (E_a) - emergência de adultos (%) e (P_m) peso médio de adultos emergidos (%) de *Callosobruchus maculatus*

$$M_L = \frac{N^{\circ} \text{ larvas eclodidas} - N^{\circ} \text{ adultos emergidos}}{N^{\circ} \text{ larvas eclodidas}} \quad (1)$$

$$T_{md} = \frac{\sum D_i N_i}{N} \quad (2)$$

$$E_a = \frac{N^{\circ} \text{ adultos emergidos}}{N^{\circ} \text{ larvas eclodidas}} \times 100 \quad (3)$$

$$P_m = \frac{\sum M_i}{N} \quad (4)$$

N° : Lê-se “número de”; D_i : lê-se “dia (i) no qual o número (N_i) de insetos emergiu, tendo como referência o início da ovoposição”; N_i : lê-se “número de insetos emergidos no dia (i)”; N : lê-se “número total de adultos emergidos por replicata”; M_i : lê-se “massa fresca de cada adulto emergido no dia (i)”.

Caracterização estrutural: Estudos cristalográficos e de difração de raios-X

5.18 Cristalização e resolução de estruturas

5.18.1 Determinação das condições de cristalização

Os estudos preliminares de cristalização dos inibidores e de difração de raios X foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural localizado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP). Amostras de inibidor recombinante foram purificadas a partir de células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3) e liofilizadas, como descrito anteriormente. Os ensaios de cristalização foram realizados através do método de difusão de vapor, modalidade gota sentada, “*sitting drop*” a uma temperatura controlada de 298 K em placas de cultura de tecido de 96 poços (Linbro, ICN, Biomedicals, Inc, USA).

As condições iniciais de cristalização foram determinadas por meio de triagem piloto utilizando os kits de cristalização Classic I, Classic II, PEG I, PEG II e Cryo (Qiagen) e SaltRX (Hampton Research). Cada kit é composto de 96 soluções, perfazendo um total de 576 diferentes condições de cristalização. Cada condição foi avaliada por meio da mistura de 1 μL da solução de cristalização com 1 μL do inibidor VuCys1 solubilizado em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,4 contendo NaCl 0,2 M a uma concentração final de 10 mg.mL^{-1} ou 1 μL do inibidor VuCys2 solubilizado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 contendo NaCl 200 mM a uma concentração final de 20 mg.mL^{-1} , utilizando o sistema robotizado de pipetagem, Cartesian Dispensing Robot (Genomic Solutions). Alíquotas de 80 μL das soluções de cristalização foram adicionadas aos fundos dos poços.

5.18.2 Difração de raios X e análise dos dados

Aproximadamente de três a quatro semanas após o início dos experimentos, três, das 576 condições testadas, levaram à formação e crescimento de cristais difratáveis da cistatina VuCys1. As condições foram: Sulfato de amônio 0,2 M e PEG 4000 20% (condição 58 de 96, kit PEG II, Qiagen), acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 contendo sulfato de amônio 0,2 M e PEG4000 25% (condição 65 de 96, kit PEG II, Qiagen) e sulfato de amônio 0,2 M e PEG4000 30% (condição 69 de 96, kit PEG II, Qiagen). Cristais da proteína VuCys2 não foram obtidos nas condições experimentais testadas, *i.e.*, concentração de proteína, temperatura e soluções de cristalização.

Cristais de VuCys1 originados das 3 condições citadas foram crioprotégidos em solução de etilenoglicol 20% (v/v) e incididos com feixe de raios X proveniente de ânodo rotatório gerador, difratômetro MicroMax 007 (Rigaku) equipado com um sistema detector RaxisIV++ (Rigaku), no comprimento de onda, $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ em temperatura criogênica, 100 K. Um conjunto de dados foi coletado para cada condição.

5.18.2.1 Resolução da estrutura e refinamento do modelo final

A estrutura tridimensional do inibidor VuCys1 foi resolvida pelo método de substituição molecular utilizando como molde a cadeia B da estrutura cristalográfica da cistatina de taro (CHU *et al.*, 2011), PDB 3IMA, com auxílio do programa Phaser (MCCOY *et al.*, 2007).

O refinamento final da estrutura foi realizado utilizando os programas Coot (EMSLEY *et al.*, 2010) no qual foram analisados os mapas de densidade eletrônica e Phenix (ADAMS *et al.*, 2010). Imagens das estruturas cristalográficas foram preparadas utilizando os softwares PyMol e UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004).

Além de imagens geradas para o modelo tridimensional obtido a partir da resolução da estrutura de VuCys1, imagens de outras cistatinas e proteinases foram geradas com base em seus arquivos “PDB” depositados no “*Protein Data Bank*” - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, utilizando o software PyMol.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Clonagem molecular e indução da expressão das cistatinas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2

Experimentos de isolamento de RNA, transcrição reversa, clonagem molecular, sequenciamento de DNA e análise de sequências foram realizados como etapas iniciais necessárias para expressão e produção das cistatinas recombinantes e para validação e caracterização das sequências de DNA que codificam para os inibidores VuCys1 e VuCys2.

6.1 Clonagem, análise de sequências e indução da expressão das proteínas recombinantes

6.1.1 Clonagem e sequenciamento de DNA

As sequências codificadoras para duas cistatinas de feijão-caupi amplificadas a partir de cDNA e DNA genômico extraídos de folhas de plantas com doze dias de idade, cultivadas sob sistema hidropônico, foram amplificadas por PCR (Figura 3). Os tamanhos aparentes para os produtos de PCR amplificados a partir de cDNA como molde foram 310 e 591 bp, para *VuCys1* e *VuCys2*, respectivamente e estão em acordo com os trabalhos de Fernandes *et al.*, (1993) e Diop *et al.*, (2004). Já aqueles produtos de PCR amplificados a partir de DNA genômico apresentaram tamanhos aparentes de 1317 e 743 bp, para *VuCys1* e *VuCys2*, respectivamente, sugerindo a presença de sequências intrônicas.

Tanto as sequências provenientes de ampliações realizadas a partir de cDNA, como as obtidas a partir de DNA genômico foram ligadas no vetor de clonagem pGEM-T Easy e eletroporadas em células de *Escherichia coli* TOP10F'. Após extração de plasmídeos e confirmação da transformação por PCR e digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I, as sequências de cDNA que codificam para *VuCys1* e *VuCys2*, bem como as sequências maiores amplificadas a partir de DNA genômico foram determinadas em um sequenciador automatizado de DNA, MegaBACE 1000.

6.1.2 Análise de cDNA

Dos dez clones de *E. coli* TOP10F', cujos ensaios de digestão e de PCR mostraram que o processo de transformação com o vetor pGEM-T Easy ligado à sequência codificadora para *VuCys1* (cDNA) foi bem sucedido, dois apresentaram sequências de baixa qualidade e dos oito restantes, apenas os clones 9 e 10 não apresentaram nenhuma alteração na sequência de nucleotídeos em relação àquela depositada no NCBI sob código de acesso, Z21954.1. A Figura 4 ilustra o alinhamento múltiplo realizado entre as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA dos oito clones aqui determinadas e a sequência de aminoácidos deduzida a partir da referência depositada no NCBI.

Com relação à *VuCys2*, oito dos 10 clones transformados a partir de cDNA apresentaram sequência de ótima qualidade condizentes com a depositada no NCBI, AF278573.1. Entretanto, o alinhamento múltiplo realizado entre as sequências de

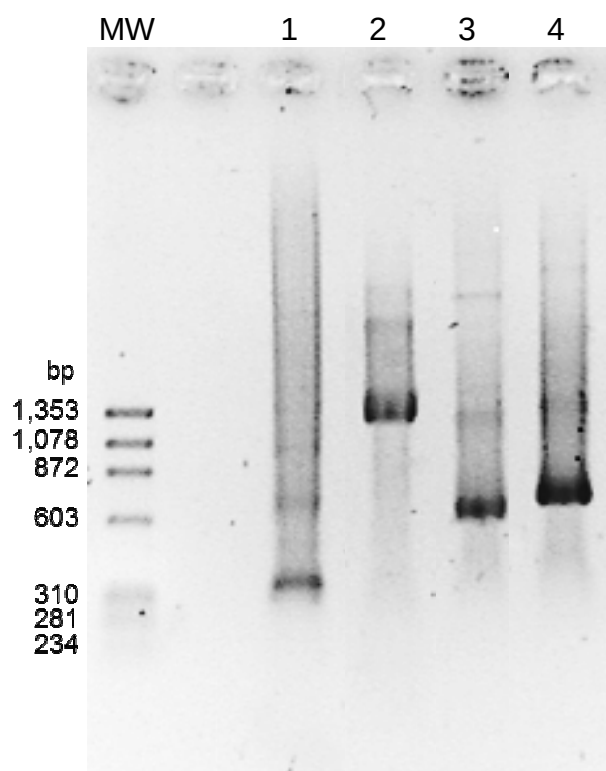


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos de PCR amplificados utilizando cDNA e DNA genômico como templates, ambos extraídos de folhas de plantas de feijão-caupi com 12 dias de idade. 1 - Produto de PCR (~ 310 bp) amplificado a partir de cDNA de feijão utilizando iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys1*. 2 - Produto de PCR (~ 1317 bp) amplificado a partir de DNA genômico de feijão utilizando iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys1*. 3 - Produto de PCR (~ 591) bp amplificado a partir de cDNA de feijão utilizando iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys2*. 4 - Produto de PCR (~ 743 bp) amplificado a partir de DNA genômico de feijão utilizando iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys2*. MW - Marcador de massa molecular, Φ X174. Os tamanhos aproximados dos produtos de PCR foram calculadas utilizando o software E-Capt, tendo como referência o marcador Φ X174.

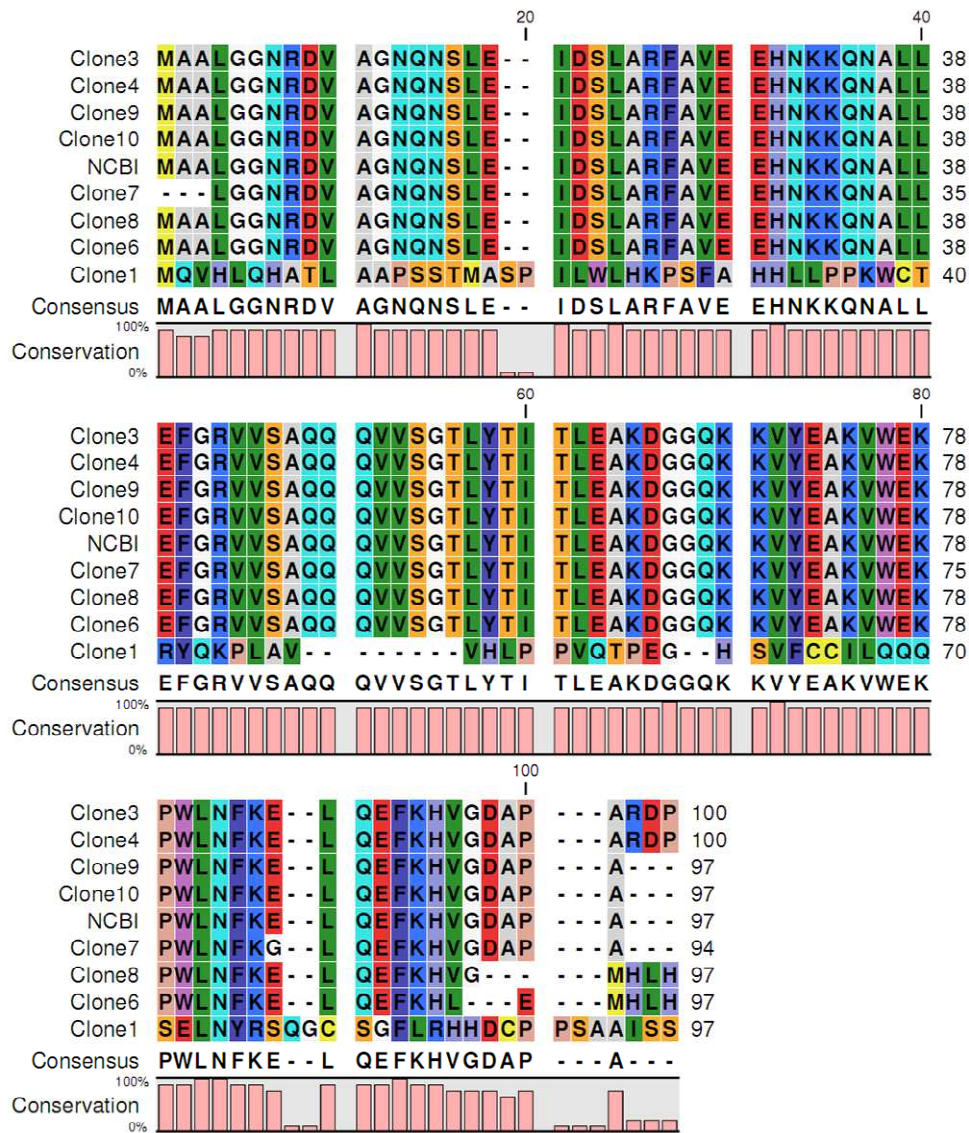


Figura 4. Alinhamento múltiplo das sequências primárias de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA determinadas para 8 clones de VuCys1 (clones 1,3,4,6,7,8,9 e 10) utilizando o software CLC Sequence Viewer, v. 6.5.4 A sequência de referência Z21954.1 está identificada na figura simplesmente como NCBI e apresenta um total de 97 aminoácidos. Os clones 2 e 5 não apresentaram sequências de boa qualidade e por isso foram excluídos do alinhamento. Diversos tipos de alterações foram observadas entre as sequências dos diferentes clones, à exceção das sequências provenientes dos clones 9 e 10 que apresentaram 100% de identidade com a sequência de referência Z21954.1.

aminoácidos deduzidas a partir das sequências de cDNA provenientes destes 8 clones com aquela deduzida a partir da sequência de referência depositada no NCBI, acesso AF278573.1, mostrou que nenhuma das 8 sequências determinadas neste trabalho é 100% idêntica à depositada (Figura 5). Isso é importante por que pode ser um indício de que isoformas do inibidor *VuCys2* estão presentes em diferentes genótipos de feijão-caupi.

Dentre as oito sequências de ótima qualidade de *VuCys2*, três, provenientes dos clones 1, 4 e 5 são idênticas entre si e divergem da sequência de referência por apresentarem as seguintes substituições (referência / clones 1, 4 e 5): **(Leu-8 / Val-8); (Ala-17 / Ser-17); (Gly-102 / Gln-102); (Ala-172 / Val-172)**. Portanto, pode ser concluído que os clones de *VuCys2* 1, 4 e 5 são idênticos entre si, mas divergem em diferentes números de aminoácidos em relação aos demais clones sequenciados e diferem em um total de quatro aminoácidos, particularmente em relação à sequência de referência.

Os demais experimentos, envolvendo a subclonagem das amostras de cDNA no vetor de expressão pET302NT-His foram realizados utilizando o clone 10 de *VuCys1* e o clone 4 de *VuCys2*. Esta discussão será retomada no subitem 6.1.5.

6.1.3 Análise de DNA genômico

Dez clones positivos também foram obtidos para células de *E. coli* TOP10F' transformadas com pGEM-T Easy ligado aos produtos de reações de PCR realizadas com iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys1*, mas utilizando DNA genômico de CE-31 como molde. Destes dez clones, um não pode ser confirmado quanto à presença do inserto, sendo descartado e os nove restantes foram submetidos ao sequenciamento de DNA. Dos nove clones sequenciados, três (clones 7, 9 e 10) foram selecionados para análises posteriores.

O resultado do sequenciamento mostrou que os clones 7, 9 e 10 apresentam um único íntron de 955 bp o qual é flaqueado por dois éxons. A presença e caracterização deste íntron, contudo, não foi descrita no trabalho de Fernandes *et al.*, (1993). O alinhamento realizado entre a sequência de DNA genômico, obtida a partir do clone 7, com a sequência de cDNA do clone 10 é mostrado na Figura 6. Como pode ser observado neste alinhamento a sequência nucleotídica do clone 10 (proveniente de cDNA – *VuCys1*) é exatamente idêntica àquela sequência determinada para o clone 7 (DNA genômico – *VuCys1*), à exceção da região onde está presente o íntron. Isto que sugere que a sequência de cDNA do clone 10 derivou da sequência completa de DNA genômico do clone 7.

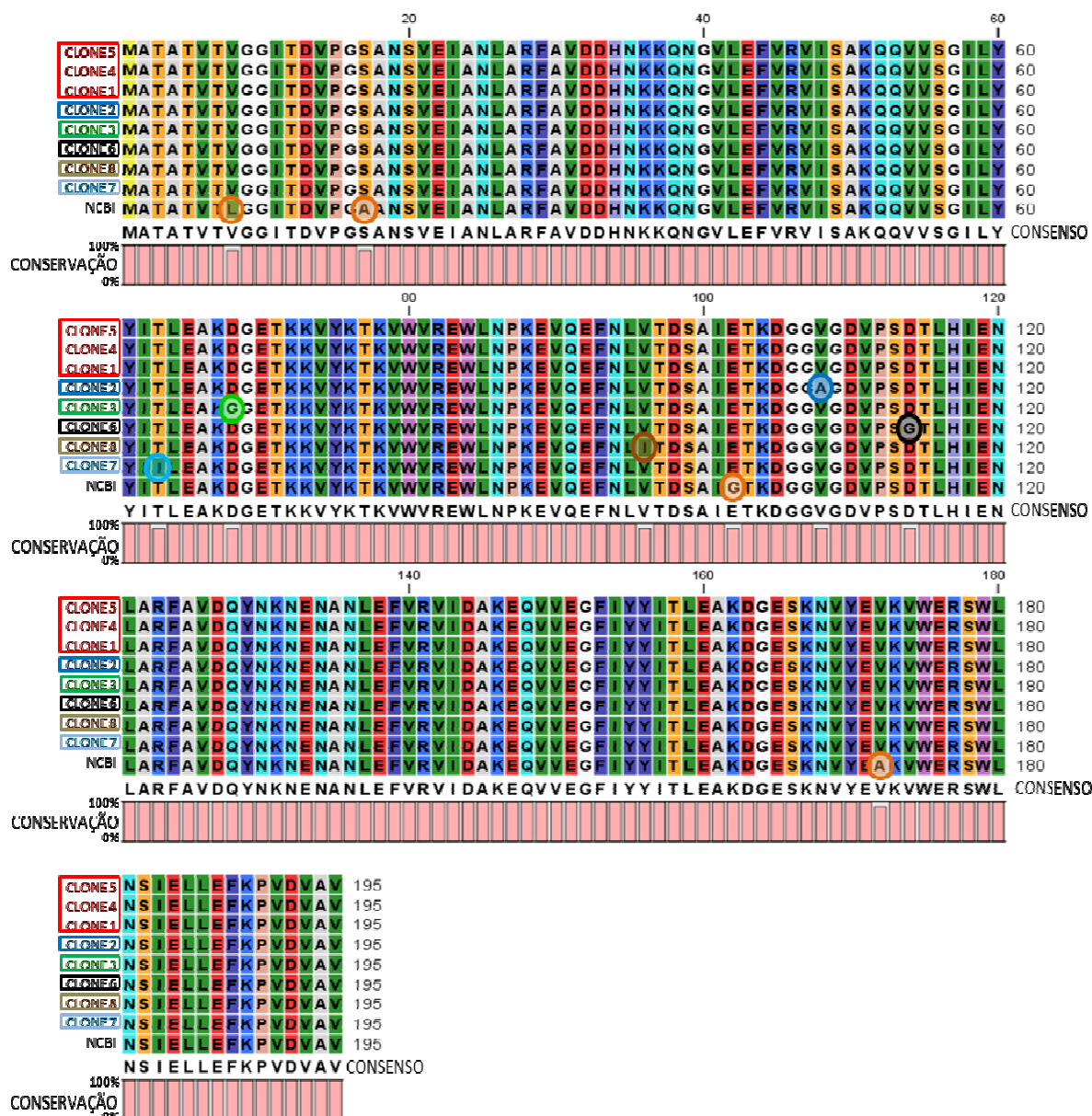


Figura 5. Alinhamento múltiplo das seqüências primárias de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências de cDNA determinadas para oito clones de VuCys2 (clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) utilizando o software CLC Sequence Viewer, v. 6.5.4 A seqüência de referência AF278573.1 está identificada na figura simplesmente como NCBI e apresenta um total de 195 aminoácidos. Os clones 9 e 10 não apresentaram seqüências de boa qualidade e por isso foram excluídos do alinhamento. Diversos tipos de substituições de aminoácidos foram observadas entre as seqüências dos diferentes clones e a seqüência de referência AF278573.1, o que mostra que provavelmente há isoformas desta proteína no genoma de feijão-caupi, diferentemente do que foi observado para o inibidor VuCys1. Importante notar que entre os diferentes clones, aqueles de números 1, 4 e 5 destacam-se por apresentarem 100% de identidade entre si e como esta seqüência foi a mais proeminente na população de clones ela foi selecionada para os estudos posteriores.

Figura 6. Alinhamento gerado entre a sequência nucleotídica determinada para o clone 7 (*E. coli*, TOP10F' - pGEM-T Easy -DNA genômico *VuCys1*) referida na figura como “gDNA.VuCys1” e a sequência nucleotídica gerada a partir de cDNA, clone 10 (*E. coli*, TOP10F' - pGEM-T Easy -cDNA *VuCys1*), referida na figura como “cDNA.VuCys1”. O íntron é destacado pela região tracejada onde não há alinhamento entre “gDNA.VuCys1” e “cDNA.VuCys1”. O alinhamento foi gerado com o software CLC Sequence Viewer, v.6.5.4.

A sequência completa, formada pela junção dos éxons 1 e 2, com tamanhos de 102 e 192 bp, respectivamente e do íntron de 995 bp apresenta um tamanho de 1289 bp, o que é condizente com os valores aproximados estimados por PCR (Figura 3). Sendo importante destacar que estes valores ainda podem ser mais próximos visto que, na análise do sequenciamento mostrada na Figura 6, os sítios de restrição para *Bam*HI e *Xho*I não foram incluídos.

O mesmo tipo de análise descrito acima foi realizado para os clones provenientes de células de *E. coli* TOP10F' transformadas com pGEM-T Easy ligado ao produto de reações de PCR realizadas com iniciadores específicos para a sequência codificadora para *VuCys2*, utilizando DNA genômico de feijão-caupi, genótipo CE-31 como molde.

Um total de dez clones positivos foi obtido e destes, o clone número 3 apresentou um baixo rendimento e por isso não pode ser submetido ao sequenciamento de DNA. Já os clones 1, 5 e 9 apresentaram, ou deleção, ou adição de bases que prejudicam a qualidade do alinhamento com os demais clones e com a sequência de cDNA escolhida para comparação (clone 4 de cDNA – *VuCys2*). Os demais clones apresentaram sequências com variados graus de substituição de bases, entretanto, todos foram caracterizados pela presença de dois éxons e um íntron.

O éxon 1 apresenta um tamanho de 399 bp, enquanto que o éxon 2 possui 189 bp. Já o íntron tem um comprimento aproximadamente 10x menor que aquele encontrado na sequência genômica de *VuCys1*, sendo constituído de apenas 91 bp. Do mesmo modo que o íntron de *VuCys1*, o íntron da sequência genômica de *VuCys2* é iniciado com o dinucleotídeo GT e termina com o dinucleotídeo AG. A sequência completa tem um tamanho de 679 bp, um valor coerente com o encontrado por eletroforese dos produtos de PCR (Figura 3) onde foi observado um valor aparente de 743 bp. A sequência formada pela soma dos éxons (sem o íntron) tem um tamanho de 588 bp e está de acordo com o valor estimado para o produto obtido a partir de PCR realizada com cDNA como molde (Figura 3), que apresentou 591 bp e com a sequência obtida a partir do sequenciamento do cDNA.

De todas as sequências codificadoras para *VuCys2*, obtidas a partir de DNA genômico, apenas aquela correspondente ao clone 7 apresentou 100% de identidade entre os éxons 1 e 2 e a sequência de cDNA sequenciada a partir do clone 4 de *VuCys2* (clone tomado como referência para cDNA), o que sugere que a sequência de cDNA do clone 4 derivou da sequência completa de DNA genômico do clone 7 (Figura 7).

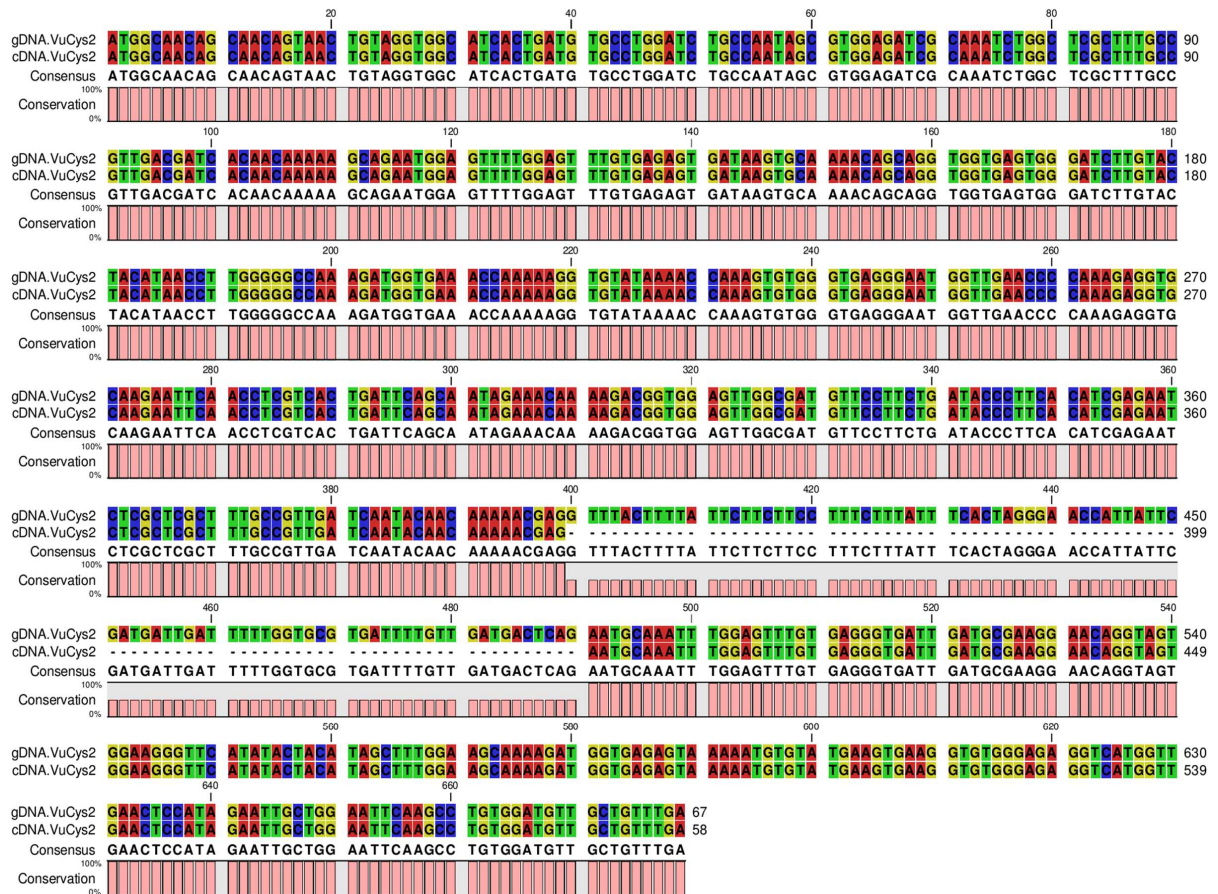


Figura 7. Alinhamento gerado entre a sequência nucleotídica determinada para o clone 7 (*E. coli*, TOP10F' - pGEM-T Easy -DNA genômico VuCys2) referida na figura como “gDNA.VuCys2” e a sequência nucleotídica gerada a partir de cDNA, clone 4 (*E. coli*, TOP10F' - pGEM-T Easy -cDNA VuCys2), referida na figura como “cDNA.VuCys2”. O íntron é destacado pela região tracejada onde não há alinhamento entre “gDNA.VuCys2” e “cDNA.VuCys2”. O alinhamento foi gerado com o software CLC Sequence Viewer, v.6.5.4.

6.1.4 Caracterização dos íntrons das sequências genômicas que codificam para VuCys1 e VuCys2

De modo semelhante ao encontrado neste trabalho, a sequência da ORF que codifica para a cistatina de *Hevea brasiliensis* apresenta um único íntron, que inicia com o dinucleotídeo GT e termina com AT, com comprimento total de 317 bp sendo flanqueado por dois éxons (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011). O mesmo tipo de organização também foi encontrado para o gene que codifica a cistatina de cevada (HvCPI) (MARTÍNEZ *et al.*, 2005) o qual é formado por um único íntron com 91 bp, exatamente o mesmo comprimento encontrado para o íntron de VuCys2, que também inicia com o dinucleotídeo GT e termina com AT.

Outros tipos de organização “íntron-éxon” são encontrados dentro dos genes que codificam para cistatinas e na busca por algum grau de relação evolutiva entre tais sequências Martínez *et al.*, (2005) propuseram a divisão dos genes de fitocistatinas em 3 categorias, com base em uma análise filogenética comparativa de genes e “genes em potencial”, deduzidos a partir de “etiquetas de sequências expressas” (EST - *Expressed sequence tag*) que codificam para cistatinas putativas em *Arabidopsis*, arroz e cevada. O primeiro grupo é formado por genes ou ORFs que não são interrompidos por nenhum íntron. O segundo grupo compreende genes ou ORFs de cistatinas interrompidos por um único íntron e este íntron normalmente separa os domínios conservados (vide fundamentação teórica) ([L]-[A]-[R]-[F]-[A]-[V]) e ([Q]-X-[V]-X-[Q]). O terceiro grupo é composto de genes ou ORFs de cistatinas de plantas interrompidos por três ou mais íntrons e que normalmente apresentam uma sequência nucleotídica adicional que codifica para uma extensão C-terminal não presente nos dois primeiros grupos. Com base nesta classificação os genes ou ORFs que codificam para VuCys1 e VuCys2 podem ser classificados como pertencentes ao segundo grupo, uma vez que a sequência de DNA completa que codifica para VuCys1 e VuCys2, como verificado por sequenciamento de DNA, é composta por um íntron e dois éxons e este íntron separa o éxon que codifica para o motivo ([L]-[A]-[R]-[F]-[A]-[V]) - éxon 1- da sequência nucleotídica que codifica para a região conservada do “loop” L1, ([Q]-X-[V]-X-[Q]) - exon 2.

As figuras 8 e 9 ilustram de um modo mais completo a relação entre a sequência de cDNA, a sequência obtida a partir de DNA genômico (onde são destacados os íntrons em verde) e a sequência de aminoácidos (destacada em azul) derivada do cDNA de VuCys1 (Figura 6) e VuCys2 (Figura 7).



Figura 8. Relação entre a sequência de cDNA que codifica para VuCys1 (destacada em preto), o DNA genômico (cDNA mais íntron destacado em verde) e a sequência de aminoácidos da proteína (VuCys1) destacada em azul. As regiões conservadas na sequência de aminoácidos que caracterizam o inibidor como uma cistatina estão destacadas em negrito e a sequência “LARFAV” está sublinhada. Os éxons que codificam para os motivos LARFAV e QVVSG são separados por um íntron de 995 bp. Este tipo de arranjo é característico de genes/ORFs de fitocistatinas pertencentes ao grupo 2, com base na classificação de Martínez *et al.*, (2005).

1	ATGGCAACAGCAACAGTAACTGTAGGTGGCATCACTGATGTGCCTGGATCTGCCAATAGC	
	M A T A T V T V G G I T D V P G S A N S	20
61	GTGGAGATCGCAAATCTGGCTCGCTTTGCCGTTGACGATCACAACAAAAAGCAGAATGGA	
	V E I A N <u>L A R F A V</u> D D H N K K Q N G	40
121	GTTTTGGAGTTTGTGAGAGTGATAAGTGCAAAACAGCAGGTGGTGAGTGGGATCTTGTAC	
	V L E F V R V I S A K Q Q V V S G I L Y	60
181	TACATAACCTTGGAGGCCAAAGATGGTGAAACCAAAAAGGTGTATAAAACCAAAGTGTGG	
	Y I T L E A K D G E T K K V Y K T K V W	80
241	GTGAGGGAATGGTTGAACCCCAAAGAGGTGCAAGAATTCAACCTCGTCACTGATTCAGCA	
	V R E W L N P K E V Q E F N L V T D S A	100
301	ATAGAAACAAAAGACGGTGGAGTTGGCGATGTTCTTCTGATACCTTCACATCGAGAAT	
	I E T K D G G V G D V P S D T L H I E N	120
361	CTCGCTCGCTTTGCCGTTGATCAATACAACAAAACGAGgtttacttttattcttcttcctttc	
	<u>L A R F A V</u> D Q Y N K N E	133
425	tttatttcactaggggaaccattattcgatgattgatttttggcggtgattttgttgatgactcagAATGCA	
	N A	135
497	AATTTGGAGTTTGTGAGGGTGATTGATGCGAAGGAACAGGTAGTGGAAAGGGTTCATATAC	
	N L E F V R V I D A K E Q V V E G F I Y	155
557	TACATAACTTTGGAAGCAAAAAGATGGTGAGAGTAAAAATGTGTATGAAGTGAAGGTGTGG	
	Y I T L E A K D G E S K N V Y E V K V W	175
617	GAGAGGTCATGGTTGAACTCCATAGAATTGCTGGAATTCAAGCCTGTGGATGTTGCTGTT	
	E R S W L N S I E L L E F K P V D V A V	195
677	TGA	
	-	

Figura 9. Relação entre a sequência de cDNA que codifica para *VuCys2* (destacada em preto), o DNA genômico (cDNA mais íntron destacado em verde) e a sequência de aminoácidos da proteína (*VuCys2*) destacada em azul. As regiões conservadas na sequência de aminoácidos que caracterizam o inibidor como uma cistatina estão destacadas em negrito. Importante notar que, diferentemente de *VuCys1*, o inibidor acima representado possui dois domínios inibitórios. Apesar de ser uma cistatina de dois domínios, o gene/ORF que codifica para *VuCys2* pertence ao mesmo grupo do gene/ORF que codifica para *VuCys1*, uma vez que há apenas um íntron (91 bp) o qual separa os éxons que codificam para os motivos LARFAV e QVVEG (ambos do segundo domínio inibitório).

6.1.5 Indução da expressão das proteínas recombinantes

A indução da expressão de VuCys1 e VuCys2 em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3) foi realizada utilizando IPTG nas concentrações finais de 0,1 e 0,5 mM, nos intervalos de tempo de 0, 4, 8, 10, 20 e 24 h após adição do indutor. Como verificado na figura 10 foi observado um acúmulo do tipo tempo-dependente na expressão de VuCys1 em frações solúveis de *E. coli*, tanto utilizando 0,1 mM, como 0,5 mM de IPTG, figuras 10 *a* e 10 *b*, respectivamente. O mesmo padrão de expressão (tempo-dependente) foi observado para VuCys2 em ambas as concentrações utilizadas de IPTG (Figuras 11 *a* e *b*). Em ambos os casos, figura 10 e figura 11, foi possível observar um perfil de expressão muito semelhante quando as induções foram realizadas com 0,1 e 0,5 mM de IPTG. Entretanto, os experimentos posteriores de indução da expressão das proteínas recombinantes em larga escala foram realizados utilizando-se IPTG a 0,5 mM e um tempo de coleta de 24 horas, período no qual foram observados os maiores acúmulos de proteína recombinante nas induções preliminares (Figuras 10 e 11).

A análise das frações insolúveis de *E. coli*, também revelou a presença de VuCys1 e VuCys2 (resultados não mostrados), contudo, em quantidade muito inferior àquela observada nas frações solúveis, o que descartou a necessidade de se trabalhar com corpos de inclusão (fração insolúvel).

6.1.5.1 Verificação da presença da cauda de Histidina

Antes do início dos passos cromatográficos as cistatinas foram testadas quanto à capacidade de interagirem com anticorpos que reconhecem especificamente caudas de histidina, obtidos comercialmente. Como é possível observar na figura 12, tanto VuCys1 (12 *a*), como VuCys2 (12 *b*) reagiram positivamente à revelação com o reagente e as bandas mais intensas foram verificados nos tempos de 20 e 24 horas após aplicação de IPTG a 0,5 mM (vide setas brancas). O conjunto de bandas mais fortes que aparece acima da banda de VuCys1 é produto de interação inespecífica do reagente com a enzima lisozima utilizada no procedimento de lise das células.

A interação das cistatinas recombinantes com o reagente mostrou que as proteínas estavam sendo expressas com as caudas de histidinas preservadas, sendo assim, potencialmente passíveis de interagir com matriz de afinidade contendo níquel imobilizado.

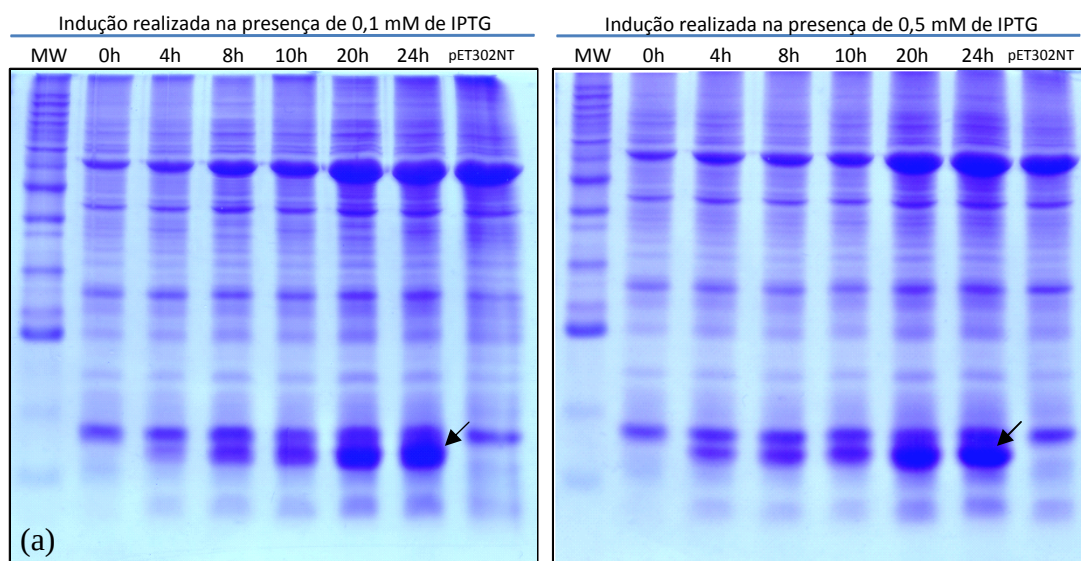


Figura 10. Análise temporal (0 a 24h) da indução da expressão da sequência de cDNA codificadora para um inibidor de proteinases cisteínicas de único domínio de *Vigna unguiculata* (VuCys1) em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3). (A): indução da expressão de VuCys1 realizada na presença de isopropil- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,1 mM. (B): indução da expressão de VuCys1 realizada na presença de IPTG a uma concentração final de 0,5 mM. MW representa os marcadores protéicos de massa molecular. pET302NT corresponde a clones transformados com vetores de expressão (pET302NT-His) desprovidos da sequência codificadora de VuCys1.

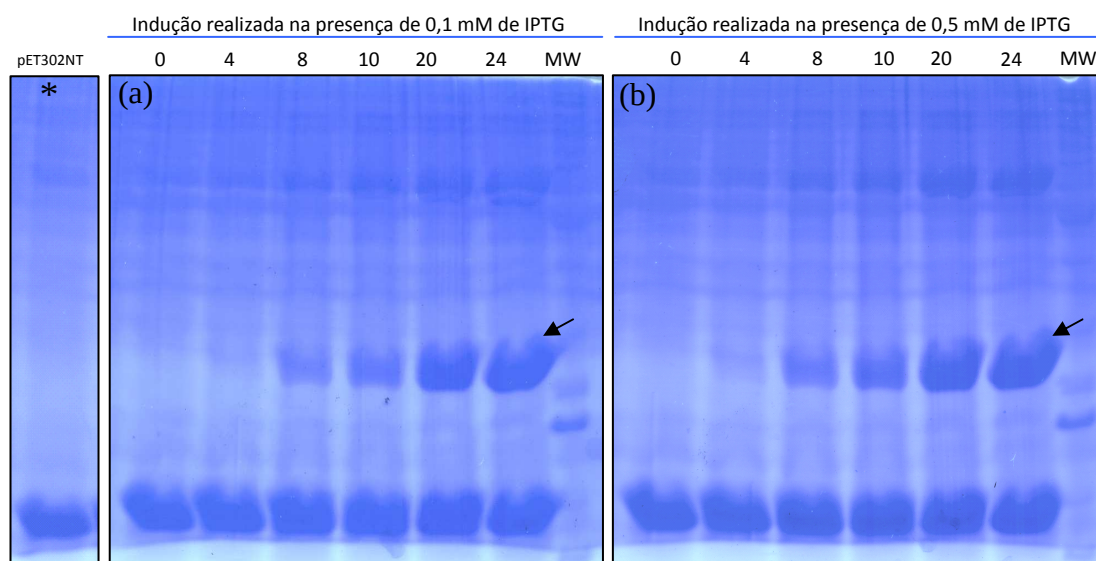


Figura 11. Análise temporal (0 a 24h) da indução da expressão da sequência de cDNA codificadora para um inibidor de proteinases cisteínicas de dois domínios de *Vigna unguiculata* (*VuCys2*) em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3). (A): indução da expressão de *VuCys2* realizada na presença de isopropil- β -D-galactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 0,1 mM. (B): indução da expressão de *VuCys2* realizada na presença de IPTG a uma concentração final de 0,5 mM. MW representa os marcadores protéicos de massa molecular. (*): corresponde a clones transformados com vetores de expressão (pET302NT-His) desprovidos da sequência codificadora de *VuCys2*.

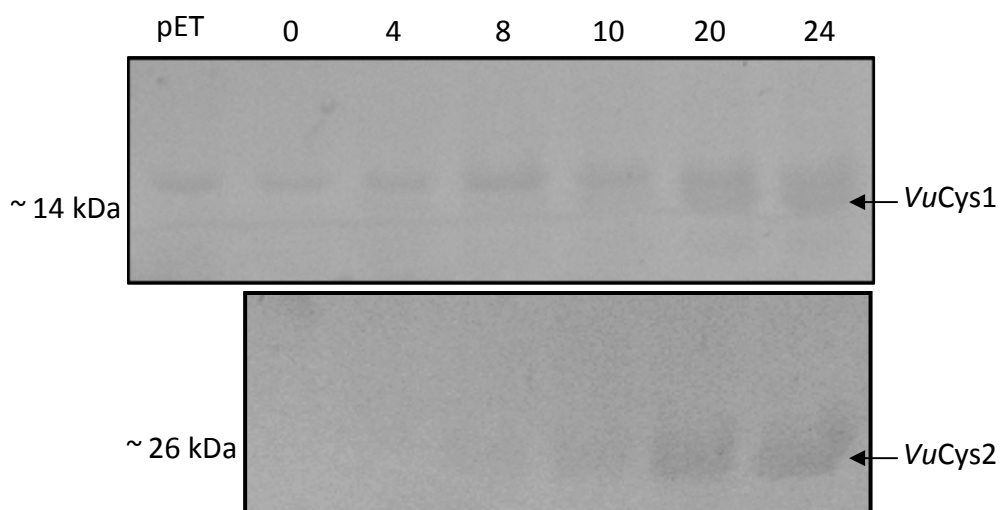


Figura 12. Eletroforeses em gel de poliacrilamida (15%) realizadas na presença de SDS e β -mercaptoetanol indicando a presença das proteínas recombinantes VuCys1 (gel superior) e VuCys2 (gel inferior) detectadas com o kit His-Tag Invision. O método de revelação utilizado é específico para detecção de proteínas com cauda de histidina. As amostras foram submetidas à indução da expressão das proteínas recombinantes com IPTG na concentração final de 0,5 mM, à exceção do tempo 0h. A indução foi realizada à temperatura de 12 °C, 140 rpm e 24h. pET = pET302NT-His. 0, 4, 8, 10, 20 e 24 são os tempos de coleta em horas.

Caracterização bioquímica

Uma vez que VuCys1 e VuCys2 foram corretamente processadas em células de Escherichia coli, como verificado pelos experimentos de clonagem molecular e sequenciamento e análise de DNA, experimentos posteriores foram realizados onde as proteínas recombinantes foram expressas, purificadas e utilizadas nas seguintes atividades:

- ✓ Avaliação do espectro de ação das cistatinas sobre diferentes enzimas proteolíticas*
- ✓ Avaliação da estabilidade térmica e de pH dos inibidores via ensaio de inibição in vitro*
- ✓ Avaliação da estabilidade térmica e de pH por espectroscopia de dicroísmo circular*

6.2 Purificação e caracterização bioquímica

6.2.1 Purificação das cistatinas recombinantes e rendimento protéico

As sequências codificadoras para as cistatinas de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 foram inseridas no vetor de expressão pET302NT-His o qual foi usado na transformação de células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3). A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG 0,5 mM por período de 24 horas, e os polipeptídios maduros foram expressos fusionados a uma cauda de histidina (6xHis-tag) seguida do pentapeptídeo (Val-Asn-Ser-Leu-Glu), ambas (6xHis-tag e o pentapeptídeo) codificadas pelo vetor pET302NT-His e localizadas na região N-terminal das proteínas recombinantes. A presença da cauda de His possibilitou a purificação dos inibidores por meio de passagem do extrato celular obtido de *E. coli* ArcticExpress DE3 transformadas, em matriz cromatográfica de afinidade Ni-Sepharose 6 Fast Flow. As proteínas retidas na matriz foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8, contendo NaCl 0,5 M e imidazol 0,1 M (Figura 13).

As proteínas apresentaram massas moleculares aparentes de 14 kDa (VuCys1) e 26 kDa (VuCys2), como estimado por eletroforeses em gel de poliacrilamida a 17,5% realizadas sob condições desnaturantes (SDS) e redutoras (β -mercaptoetanol). As massas exatas das proteínas recombinantes, calculadas a partir das sequências de aminoácidos depositadas no NCBI e tendo em consideração a presença da cauda de His e do pentapeptídeo Val-Asn-Ser-Leu-Glu são de 12,12 e 23,25 kDa, para VuCys1 e VuCys2, respectivamente e estão em conformidade com os valores aparentes obtidos por SDS-PAGE e com os descritos por Aguiar *et al.*, (2006) e Diop *et al.*, (2004). As massas moleculares aparentes de VuCys1 e VuCys2 estão dentro dos valores observados para a maioria das fitocistatinas, uma vez que estes inibidores apresentam massas variando de 11 a até 23 kDa, à exceção das multicistatinas da batata e do tomate, que possuem massas moleculares superiores a 80 kDa (WALSH e STRICKLAND, 1993; BOLTER, 1993).

O rendimento protéico obtido para cada inibidor foi estimado como sendo da ordem de 10 mgP.L⁻¹ de meio de cultura para VuCys1 e 22 mg.L⁻¹ de meio de cultura para VuCys2. A cistatina recombinante de “Jelly-Flig” (*Ficus awkeotsang* Makino) foi expressa em *E. coli* fundida a uma cauda de histidina (6xHis-tag) de forma solúvel a um rendimento de 1.3 mgP. L⁻¹ de meio de cultura, utilizando-se o vetor pET28a (SHYU *et al.*, 2011). Por outro lado, os níveis de expressão obtidos neste trabalho estão de um modo geral, próximos dos reportados para outras fitocistatinas recombinantes. Uma cistatina da cana-de-açúcar

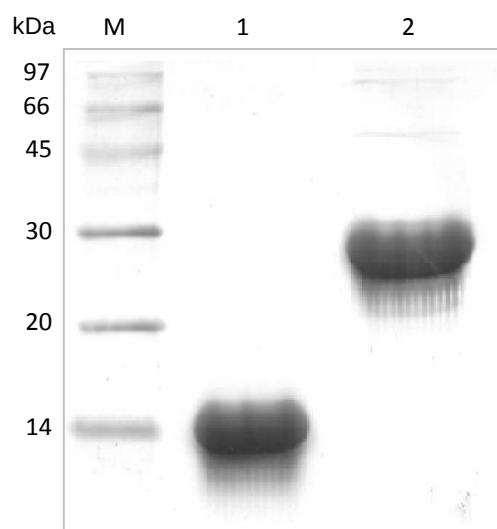


Figura 13. Eletroforese em gel poliacrilamida a 17,5% realizada na presença de SDS e β -mercaptoetanol evidenciando a purificação de duas cistatinas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 (coluna 1) e VuCys2 (coluna 2). As proteínas foram expressas em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3) transformadas com as construções VuCys1-pET302NT-His e VuCys2-pET302NT-His. Um total de 20 μ g de inibidor purificado foi aplicado em cada poço. As proteínas foram coradas com o reagente azul brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue*) e apresentaram massas moleculares aparentes de 14 e 26 kDa, VuCys1 e VuCys2, respectivamente. Os marcadores de massa molecular utilizados (coluna M) foram: Fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

(*sugarcane cystatin*), por exemplo, apresentou rendimento de 10 mgP.L⁻¹ de meio de cultura (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), exatamente o rendimento protéico final obtido para VuCys1 no presente trabalho. Duas isoformas deste inibidor posteriormente expressas em *E. coli* e purificadas, as cistatinas da cana-de-açúcar 2 (*canecystatin 2* – CPI-2) e 3 (*canecystatin 3* – CPI-3) foram expressas em níveis de 20 e 22 mgP.L⁻¹ de meio de cultura, respectivamente (GIANOTTI *et al.*, 2006), semelhante ao obtido para VuCys2. Os dois trabalhos relatando a expressão e purificação de três isoformas de cistatinas da cana-de-açúcar utilizaram o vetor de expressão pET28a. Contudo, é importante destacar que outros trabalhos obtiveram rendimentos ainda maiores. A cistatina recombinante da árvore laticífera *Hevea brasiliensis*, por exemplo, foi produzida em células de *E. coli* em níveis de 30 mgP.L⁻¹ de meio de cultura utilizando o vetor de expressão pQE-40 (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011). Em um nível mais acima (*overexpression*) está o trabalho de Valdez-Rodríguez *et al.*, (2010), que relatou um rendimento extraordinariamente elevado de 266 mgP.L⁻¹ de meio de cultura da forma recombinante do inibidor de *Amaranthus*, utilizando o vetor de expressão pQE-2. A tabela 3 resume de modo comparativo os dados de rendimento aqui apresentados.

Estes dados mostram que o sistema de expressão utilizado no presente trabalho, cistatinas de feijão-caupi, células de *E. coli*, ArcticExpress (DE3) e o vetor de expressão pET302NT-His, apresentou um rendimento satisfatório, o que permitiu, além da purificação na forma solúvel, a realização de estudos posteriores com as proteínas recombinantes.

6.2.2 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* contra diferentes enzimas proteolíticas

A funcionalidade das proteínas recombinantes, bem como seus espectros de inibição sobre diferentes enzimas, foram verificadas por meio de ensaios de inibição de diferentes atividades proteolíticas *in vitro*, utilizando proteinases purificadas obtidas comercialmente. Quatro proteinases cisteínicas foram utilizadas, sendo estas: papaína, quimopapaína, bromelaína e catépsina B e uma proteinase serínica, tripsina. A tabela 4 mostra o percentual inibitório obtido quando VuCys1 e VuCys2 foram incubados com as diferentes enzimas e o gráfico 1 apresenta estes dados em termos de atividade proteolítica residual após incubação das diferentes enzimas com os inibidores.

Como verificado, os inibidores VuCys1 e VuCys2 na quantidade de 1 µg foram capazes de inibir completamente a atividade proteolítica de papaína. Nesta mesma quantidade as proteínas apresentaram um percentual inibitório de 85,9% (VuCys1) e 91,5% (VuCys2) para a atividade proteolítica de quimopapaína. Inibições moderadas, 27,9%

Tabela 3. Rendimento protéico das cistatinas de *Vigna unguiculata*, por litro de meio de cultura (mgP.L⁻¹), bem como de outras fitocistatinas expressas em *Escherichia coli* utilizando diferentes vetores de expressão

Inibidor	Espécie vegetal	Vetor	Rendimento (mgP.mL ⁻¹)	Referência
VuCys1*	<i>Vigna unguiculata</i>	pET302NT-His	10	**
VuCys2*	<i>Vigna unguiculata</i>	pET302NT-His	22	**
FaCYS	<i>Ficus awkeotsang</i>	pET28a	1,3	(Shyu <i>et al.</i> , 2011)
Canecistatina	<i>Saccharum sp.</i>	pET28a	10	(Soares-Costa <i>et al.</i> , 2002)
CPI-2	<i>Saccharum officinarum</i>	pET28a	20	(Gianotti <i>et al.</i> , 2006)
CPI-3	<i>Saccharum officinarum</i>	pET28a	22	(Gianotti <i>et al.</i> , 2006)
HbCPI	<i>Hevea brasiliensis</i>	pQE-40	30	Bangrak e Chotigeat, (2011)
AhCPI	<i>Amaranthus hypocondriacus</i>	pQE-2	266	Valdez-Rodríguez <i>et al.</i> , (2010)

* VuCys1 - Cistatina de único domínio inibitório de feijão-caupi, VuCys2 - Cistatina de dois domínios inibitórios de feijão-caupi. As sequências codificadoras para ambas as proteínas foram expressas em células de *Escherichia coli*, ArcticExpress (DE3)

**Dados da Tese (MONTEIRO-JÚNIOR, 2012).

Tabela 4. Atividade inibitória de proteinases (percentual) contra diferentes enzimas proteolíticas comerciais

Amostra	Papaína	Quimopapaína	Catepsina B	Bromelaína	Tripsina
VuCys1 [*]	100,4 ± 1,2	85,9 ± 1,9	16,9 ± 1,8	27,9 ± 1,2	nd
VuCys2 [*]	100,2 ± 0,5	91,5 ± 1,1	14,8 ± 0,8	47,3 ± 3,1	nd
Tampão ¹	nd	nd	nd	nd	nd

Os valores apresentados são as médias de três replicatas independentes, $\pm$ SD.

¹ Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21

nd - Atividade inibitória não detectada

* VuCys1 - Cistatina de único domínio de feijão-caupi, VuCys2 - Cistatina de dois domínios de feijão-caupi

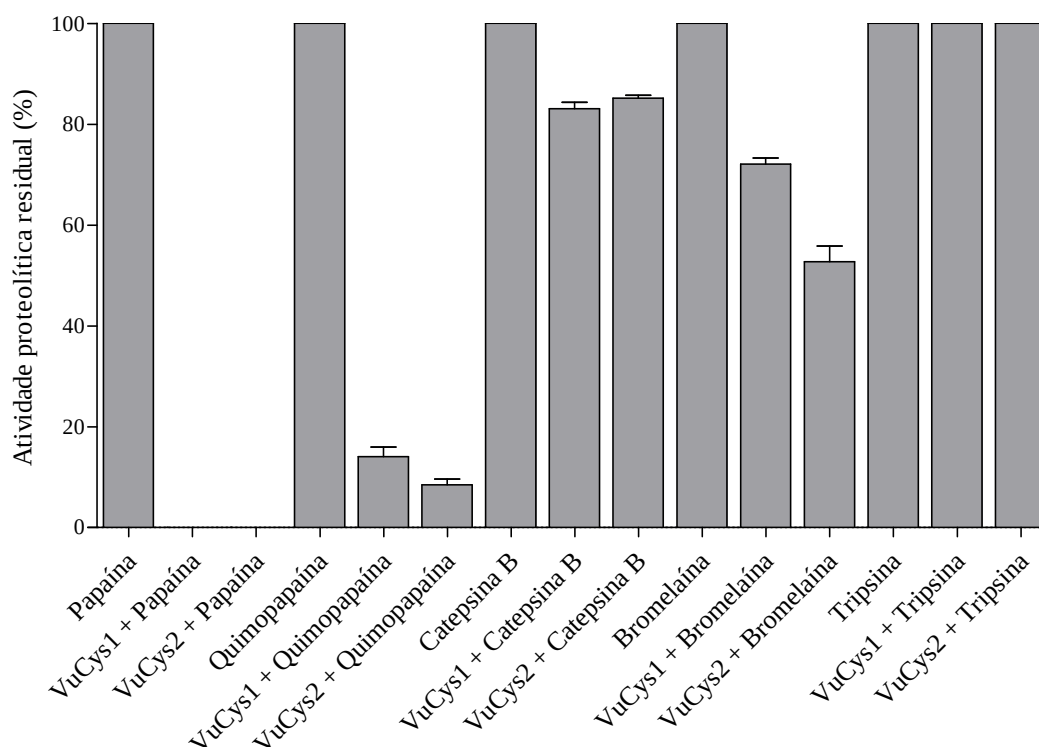


Gráfico 1. Atividade proteolítica residual, expressa em termos percentuais, sobre o substrato sintético BANA, no caso das proteinases cisteínicas e BApNA, no caso da proteinase serínica tripsina, após incubação com as cistatinas recombinantes de feijão-caupi. A atividade proteolítica mensurada a partir da incubação das enzimas com os substratos sintéticos na ausência dos inibidores foi utilizada como referência para cálculo da atividade proteolítica residual. A quantidade de 1 μ g de cada inibidor foi utilizado nos ensaios contra proteinases cisteínicas e 7 μ g no ensaio realizado contra tripsina. Os volumes das enzimas proteolíticas utilizadas nos ensaios foram previamente estabelecidos com base em curvas-padrão realizadas na ausência dos inibidores. Os valores apresentados são uma média de três ensaios independentes $\pm$ SD.

(VuCys1) e 47,3% (VuCys2) foram detectadas após incubação com bromelaína. Os inibidores apresentaram-se apenas fracamente ativos contra a enzima catepsina B onde foram detectados percentuais inibitórios de 16,9% (VuCys1) e 14,8% (VuCys2). Apesar de os inibidores em estudo serem cistatinas, há alguns relatos na literatura de inibidores protéicos bifuncionais (OLIVEIRA *et al.*, 2007), capazes de inibir tanto proteinases cisteínicas como serínicas. A fim de verificar a possível presença de bifuncionalidade, as cistatinas recombinantes VuCys1 e VuCy2 foram permitidas reagir com tripsina. No entanto, mesmo utilizando uma quantidade de cistatina 7x maior que a utilizada contra proteinases cisteínicas nenhuma atividade contra tripsina foi detectada (Tabela 4, Gráfico 1).

A detecção de elevada atividade contra papaína é um indício de que os inibidores foram corretamente processados por *E. coli*, bem como de que a presença da cauda de histidina associada ao pentapeptídeo N-terminal dos inibidores não interferiram com a atividade destas moléculas. O efeito moderado contra bromelaína e a quase ausência de atividade contra catepsina B, em detrimento das elevadas atividades contra papaína e quimopapaína são características de seletividade e especificidade de ação também descritas para outras cistatinas. Algumas formas de cistatinas são mais ativas sobre determinadas proteinases cisteínicas do que outras. Semelhante ao que encontramos duas isoformas de cistatinas do arroz, orizacistatina-I (OC-I) e orizacistatina-II (OC-II) foram inativas contra catepsina-B, no entanto fortemente ativas contra papaína (KONDO *et al.*, 1990).

Esta seletividade / especificidade de atividade de cistatinas, portanto, é um fato já bem relatado na literatura e as possíveis implicações decorrentes especialmente da baixa atividade sobre catepsina B humana aqui encontrada serão discutidas mais à frente, nos ensaios biológicos.

6.2.3 Estabilidade térmica e de pH

O efeito da temperatura sobre a estabilidade dos inibidores foi avaliado de acordo com duas metodologias. Inicialmente, as proteínas foram incubadas nas temperaturas de 24, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 °C por 10 minutos e, após resfriamento a 24 °C submetidas a ensaio padrão de inibição da atividade de papaína.

Como observado no gráfico 2 (a e b) os inibidores foram capazes de se manterem ativos mesmo após fervura por 10 minutos. A fim de avaliar os efeitos de um período de incubação mais prolongado (segunda metodologia) as proteínas foram aquecidas a 100 °C em

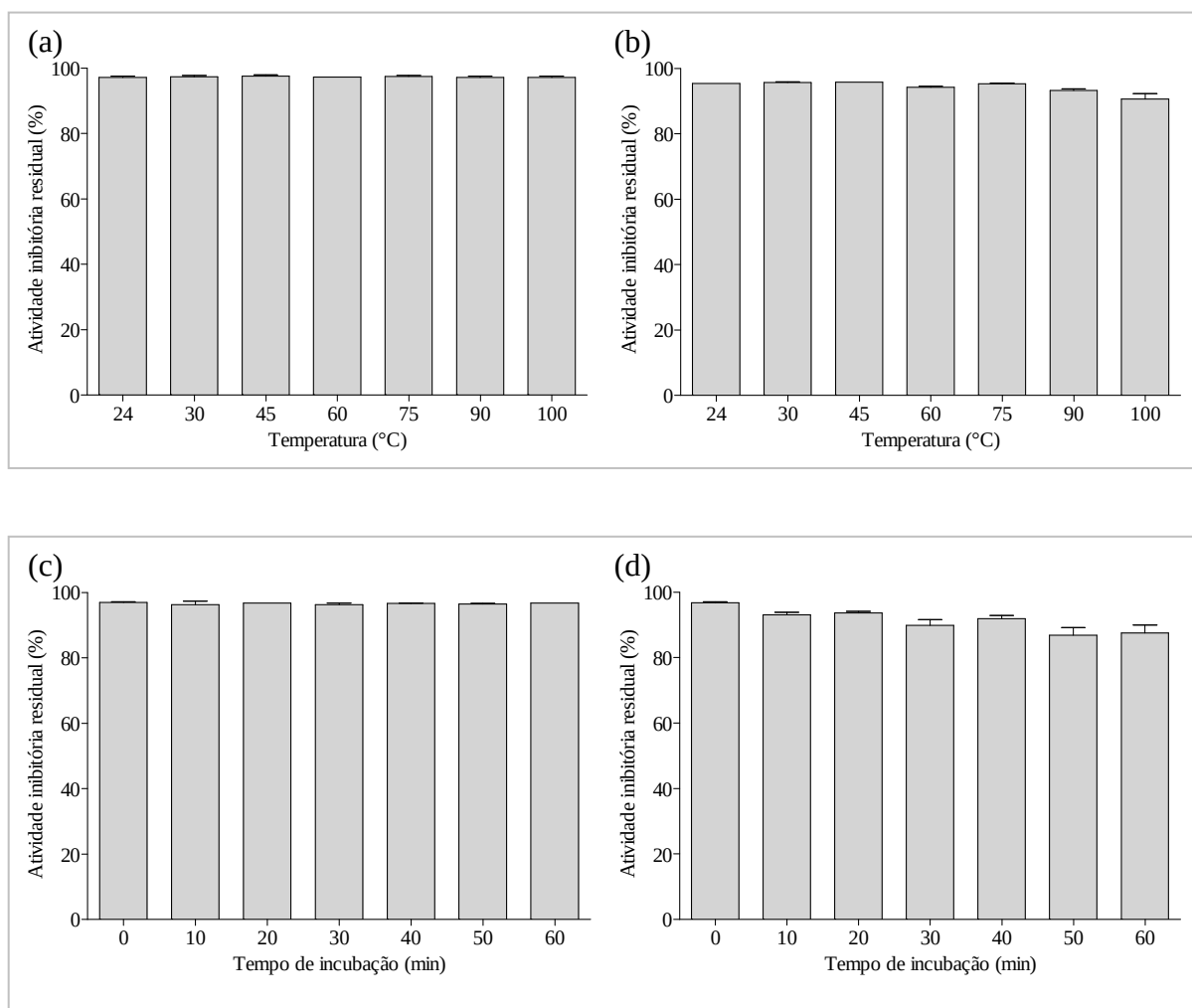


Gráfico 2. Estabilidade térmica das cistatinas recombinantes de feijão-caupi. *VuCys1* (a) e *VuCys2* (b) em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6.0 foram incubadas nas temperaturas de 24, 30, 45, 60, 75, 90 e 100 °C por 10 minutos (primeira metodologia). Adicionalmente, *VuCys1* (c) e *VuCys2* (d) foram incubados a 100 °C por intervalos de tempo variando de 10 a 60 minutos (segunda metodologia). Após incubação nos tempos apropriados as proteínas foram resfriadas a 4 °C e, após atingirem a temperatura ambiente, submetidas à ensaio padrão de inibição da atividade de papaína. A elevada estabilidade térmica dos inibidores é evidenciada pelo alto percentual de inibição da atividade papainásica, mesmo após fervura por 1 hora. Os valores apresentados são uma média de 3 ensaios independentes $\pm$ SD.

intervalos de tempo que variaram de 10 a 60 minutos. Mais uma vez os efeitos observados sobre a atividade inibitória residual foram pequenos (Gráfico 2 c e d) e levemente mais proeminentes sobre VuCys2 que apresentou redução máxima de aproximadamente 9% na atividade inibitória. Praticamente nenhuma redução na atividade de VuCys1 foi observada.

O efeito do pH foi o segundo parâmetro utilizado para avaliação da estabilidade das cistatinas recombinantes. VuCys1 e VuCys2 foram incubadas em condições de pH variando de uma condição mais ácida, pH 2,2 até condições mais alcalinas, pH 9, 10 e 11 (Gráfico 3). Como observado no gráfico 3 (a), nem as condições mais acídicas, nem tão pouco as mais alcalinas foram suficientes para reduzir a atividade inibitória residual de VuCys1 para valores inferiores a 90%. Resultado muito semelhante foi obtido para VuCys2 onde a maior redução de atividade inibitória constatada foi observada no valor de pH 2,2 no qual o inibidor ainda apresentou 92,3% de atividade inibitória residual (Gráfico 3 b).

Elevada tolerância a extremos de temperatura e pH é uma característica um tanto incomum para proteínas, uma vez que estas condições extremas normalmente causam desarranjos estruturais na molécula de proteína podendo levá-la à desnaturação e perda de atividade. Contudo, algumas cistatinas tem sido descritas como proteínas termo tolerantes e estáveis em diferentes condições de pH. Por exemplo, experimentos de desnaturação térmica semelhantes aos empregados neste trabalho, realizados com a cistatina recombinante do arroz OC-I, já mencionada anteriormente, mostraram que o inibidor mantém-se totalmente ativo após aquecimento a 100 °C por 30 minutos e mesmo quando aquecido a 120 °C por 30 minutos a atividade inibitória da proteína sobre papaína manteve-se em um patamar acima de 50% (ABE *et al.*, 1987; ARAI *et al.*, 2002). Este mesmo inibidor mostrou-se bastante ativo após incubação em uma escala de pH variando de 2 a 12, mostrando apenas pequena perda de atividade quando incubado em valores de pH de 11 e 12. Outra cistatina de arroz (neste caso o trabalho foi realizado com uma fração enriquecida com o inibidor nativo da semente do vegetal e não a forma recombinante) mostrou-se totalmente ativa após incubação a 100 °C por 60 minutos tendo sua atividade levemente comprometida quando incubada a 120 °C por 60 minutos (IZQUIERDO-PULIDO *et al.*, 1994). A cistatina recombinante de *H. brasiliensis* já discutida, (BANGRAK e CHOTIGEAT, 2011) também foi caracterizada como um inibidor termo tolerante mantendo-se totalmente ativa contra papaína após incubação em temperaturas inferiores e iguais a 90 °C e sofrendo leve redução nesta atividade quando incubada a 100 °C. Entretanto, outros membros de cistatinas são bem menos estáveis. A multicistatina isolada de folhas de plantas de tomate tratadas com metil jasmonato, por exemplo, (WU e HAARD, 2000), é um inibidor bem menos estável a

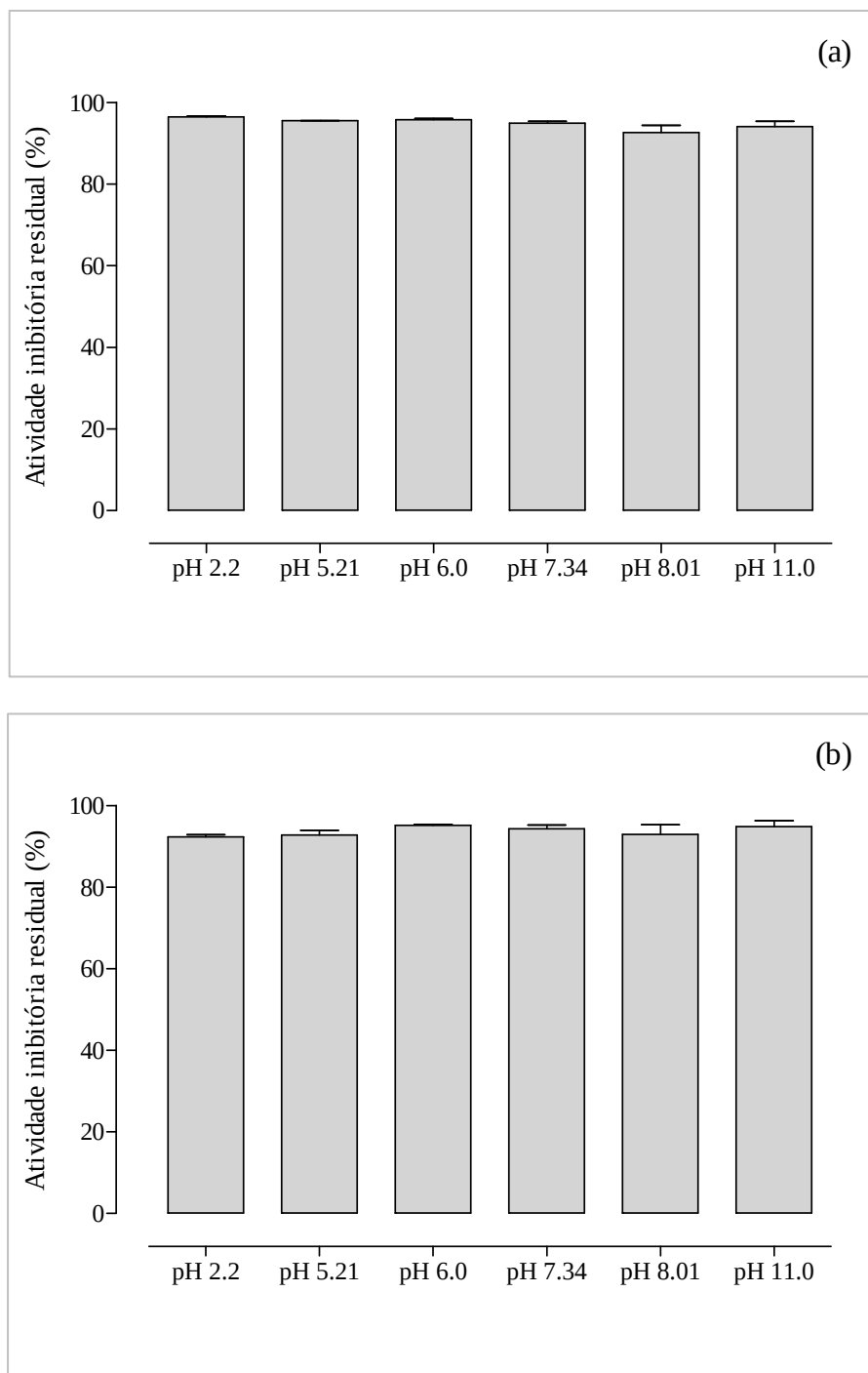


Gráfico 3. Atividade inibitória de proteinases cisteínicas residual após incubação de *VuCys1* (a) e *VuCys2* (b) em diferentes condições de pH. Os inibidores foram incubados nos tampões glicina-HCl, pH 2,2; acetato de sódio, pH 5,21; fosfato de sódio, pH 6,00 e pH 7,34; Tris-HCl, pH 8,01 e glicina-NaOH, pH 11, todos na concentração de 0,05 M por 40 minutos e, em seguidas, diluídos no tampão de ensaio de atividade inibitória, fosfato de sódio 0,05 M, pH 6 e avaliados quanto à capacidade de inibir a atividade proteolítica de papaína. Os valores apresentados são uma média de 3 ensaios independentes $\pm$ SD.

extremos de temperatura que as cistatinas de feijão, arroz e *H. brasiliensis* aqui descritas. Quando aquecida a 90 °C por 30 minutos a multicistatina do tomate apresentou uma atividade inibitória residual contra papaína de apenas 12%. Por outro lado, este mesmo inibidor se comportou de modo semelhante a VuCys1 e VuCys2 quando incubado em uma ampla faixa de pH, permanecendo totalmente ativo após incubação em condições variando de pH 4 a 11.

As razões bioquímicas e/ou estruturais pelos quais tais inibidores, particularmente os inibidores recombinantes de feijão-caupi, alvo de estudo deste trabalho, suportam bem condições extremas de temperatura e pH ainda não são, contudo, totalmente claras. Uma vez que as fitocistatinas, com raras exceções, não apresentam resíduos de Cys ao longo de sua sequência primária de aminoácidos e VuCys1 e VuCys2 não fogem à regra, esta estabilidade não pode ser atribuída à formação de pontes dissulfeto estabilizadoras, fato bem conhecido por explicar a alta estabilidade térmica de inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk, por exemplo (LOSSO, 2008, MACEDO *et al.*, 2011).

A impossibilidade de se realizar os ensaios inibitórios exatamente nas condições testadas, isto é, incubando-se os inibidores a 100 °C e medindo sua atividade inibitória nesta temperatura, por exemplo, poderia mascarar um possível processo de desnaturação térmica (que ocorreria na temperatura de 100 °C), seguido de renaturação com o abaixamento da temperatura. Entretanto, como será observado logo à frente nos estudos espectroscópicos de dicroísmo circular, isso não parece ocorrer com VuCys1 e VuCys2.

6.2.4 Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism) - Temperatura

Inicialmente as análises de dicroísmo circular foram realizadas com o propósito de que fosse avaliado se a exposição das cistatinas a temperaturas elevadas como 70, 80 e 90 °C, por exemplo, seria capaz de causar sua desnaturação ou alteração dos seus espectros de dicroísmo circular em relação a temperaturas mais baixas, como 10, 20 e 30 °C, por exemplo.

As cistatinas foram, portanto, aquecidas e ao final de cada etapa de aquecimento os espectros de CD foram registrados. Os gráficos 4 (a e b) mostram os espectros obtidos para VuCys1 e VuCys2, respectivamente. A análise do primeiro gráfico (4 a) revela que VuCys1 mantém sua organização estrutural praticamente inalterada até a temperatura de 70 °C, onde foi registrada queda no sinal de CD em relação às temperaturas inferiores, sendo mantido, porém, o perfil de estruturas secundárias. Nas temperaturas mais elevadas de 80 e 90 °C é possível observar uma alteração tanto na intensidade do sinal dos espectros,

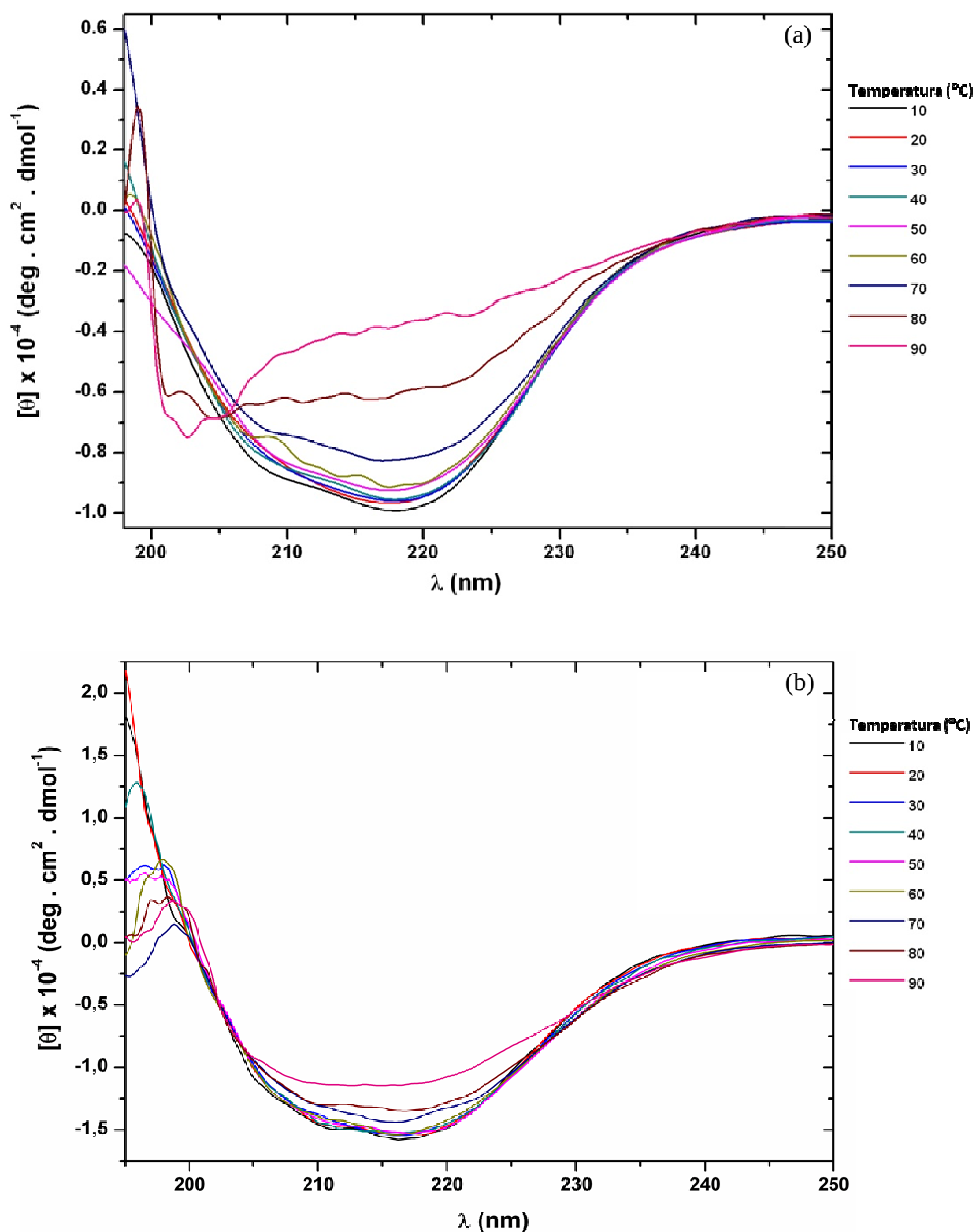


Gráfico 4. Curvas de desnaturação térmica de VuCys1 (a) e VuCys2 (b), solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 ambas a uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹, determinadas por espectroscopia de dicroísmo circular. As medidas foram tomadas em um espectropolarímetro modelo JASCO J-815 na região do UV-distante (195 a 250 nm). As curvas apresentadas são médias de cinco registros (scans) e estão expressos em elipticidade residual média.

como no padrão de estruturas secundárias. No entanto, um dado importante é que, a despeito desta reorganização estrutural, onde os espectros apresentam mínimos de absorção diferentes daqueles obtidos quando a proteína foi aquecida de 10 a 70 °C, os picos de absorção mantêm-se longe da linha do zero, o que é um indicativo de que, mesmo nas temperaturas de 80 e 90 °C, VuCys1 ainda conserva um padrão de organização estrutural característico de proteínas enoveladas. Seriam, portanto, necessárias temperaturas superiores a 90 °C para que o inibidor fosse completamente desnaturado.

A proteína VuCys2 quando aquecida de 10 a 90 °C mostrou uma maior estabilidade estrutural que a observada para VuCys1, gráfico 4 (b). O inibidor (VuCys2) não só manteve-se completamente enovelado, como conservou seu padrão de estruturas secundárias em todas as temperaturas testadas, sendo observadas apenas pequenas alterações na intensidade dos espectros quando aquecido nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C.

De modo complementar às análises de CD, curvas de desnaturação (transição) térmica foram traçadas a partir das quais foi possível estimar a temperatura de desnaturação para 50% das moléculas (T_m) de cada inibidor. VuCys1 apresentou T_m de $83,32 \pm 2,28$ °C e VuCys2, apresentou T_m de $106,59 \pm 16,95$ °C. A título de comparação, estudos calorimétricos mostraram que a temperatura de transição para desnaturação térmica da cistatina humana estefina A, é de 90,8 °C para pH 5,0 e 94,5 °C, tanto para pH 6,5 como para 8,1. Já a estefina B humana apresenta valores de T_m bem inferiores sendo estes de 50,2; 64,9 e 65,9 °C para pH 5,0; 6,5 e 8,1, respectivamente (ZEROVNIK *et al.*, 1992).

Em trabalho mais recente, Esposito *et al.*, (2010) mostraram que o inibidor do arroz, orizacistatina-I apresenta T_m de 93,5 °C a pH 7,0 a qual cai para o valor de 71,6 °C quando o inibidor é aquecido a pH 2,5. Os valores de T_m estimados para VuCys1 e VuCys2, contudo, foram todos determinados a pH 6 (pH no qual é realizada a atividade inibitória de papaína *in vitro*), portanto não é possível afirmar se em outros valores de pH as proteínas apresentariam padrões semelhantes aos obtidos nos espectros de CD determinados a pH 6.

Como mencionado anteriormente é importante notar que VuCys1, VuCys2, OC-I (membros da família IV de cistatinas - fitocistatinas) e estefina A (membro da família I de cistatinas - estefinas) são todos inibidores desprovidas de resíduos de cisteína e não formam, portanto, pontes dissulfeto.

Ainda com relação à estabilidade térmica, foi demonstrado que estefina humana A e B são duas cistatinas que apresentam alta similaridade de aminoácidos, em detrimento de estabilidades térmicas tão diferenciadas. Estudos cristalográficos e de modelagem molecular

atribuem esta diferença de estabilidade a uma maior rede de pontes de hidrogênio nas moléculas de estefina A (JERALA *et al.*, 1994 *apud* MARTIN *et al.*, 1995).

Em um levantamento realizado para tentar explicar os principais fatores bioquímicos relacionados com a termoestabilidade de 16 famílias de proteínas com membros termofílicos, Vogt *et al.*, (1997) demonstraram que 13 das 16 famílias analisadas (~80%), apresentavam um padrão consistente, onde o aumento da estabilidade a elevadas temperaturas estava relacionado a um maior número de pontes de hidrogênio entre os átomos das proteínas e a uma maior quantidade de átomos capazes de formar pontes de hidrogênio com a água em suas superfícies. 11 das 16 famílias analisadas apresentaram uma relação onde o aumento na estabilidade térmica era propiciado por um aumento no número de pares iônicos e pontes salinas. Através do mesmo tipo de abordagem Kumar *et al.*, (2000) analisaram 18 famílias de proteínas, incluindo entre estas, proteínas de organismos termofílicos e mesofílicos a fim de investigar os fatores relacionados à estabilidade térmica. Em resumo, os autores encontraram que o primeiro fator a se correlacionar com a estabilidade térmica foi a quantidade de pontes de hidrogênio formadas entre cadeias laterais dos aminoácidos. Também foi observado neste trabalho que proteínas de termófilos apresentam maiores quantidades de pontes salinas e dos aminoácidos Arg e Tyr e menores quantidades dos aminoácidos termolábeis, Cys e Ser.

Assim, a formação de um intrincado sistema de pontes de hidrogênio, além de outras possíveis interações como as pontes salinas, por exemplo, talvez possam ser alguns dos mecanismos bioquímicos pelos quais VuCys1 e VuCys2 conseguem manter-se estáveis, mesmo sob condições de elevada temperatura.

6.2.5 Análises espectroscópicas de dicroísmo circular - CD (circular dichroism) - pH

Além da avaliação dos efeitos da temperatura sobre o padrão de estruturas secundárias de VuCys1 e VuCys2, medidas de CD também foram realizadas com as proteínas incubadas em diferentes valores de pH (2,0; 5,3; 7,2; 9,0 e 11,0) por tempo variando de 1,5 a 2 minutos. Os gráficos 5 (a e b) representam a média de 10 incubações e registros “scans” diferentes de VuCys1 e VuCys2, respectivamente.

De modo semelhante ao obtido para os estudos de desnaturação térmica os espectros de CD mostram que as proteínas foram tolerantes a condições extremas de pH. Em verdade, foi observado um deslocamento no sinal de CD para o inibidor VuCys1, a pH 2,0 (Gráfico 5 a). Neste mesmo pH VuCys2 sofreu uma pequena queda no sinal sendo mantido,

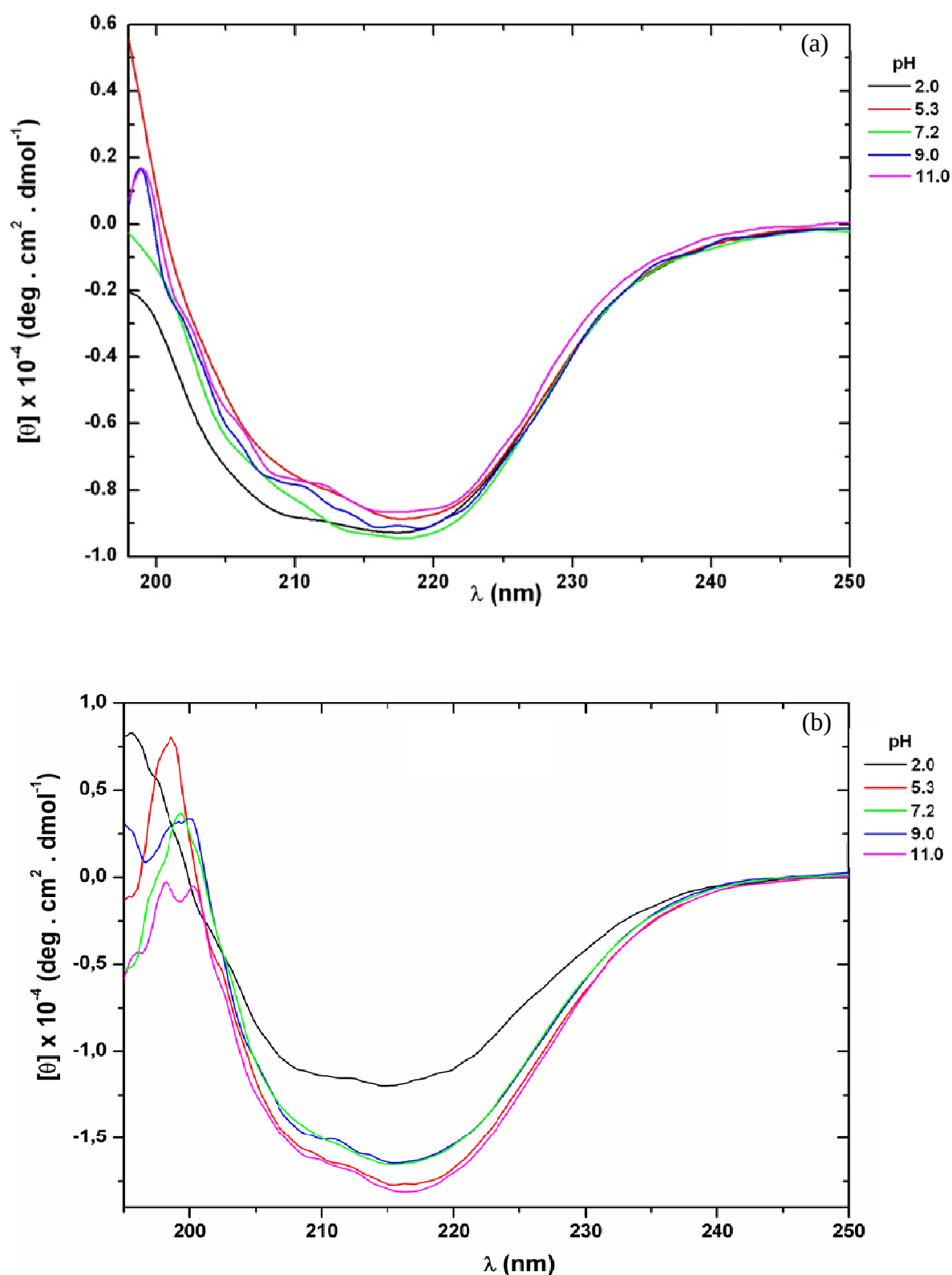


Gráfico 5. Curvas de desnaturação por pH de *VuCys1* (a) e *VuCys2* (b), solubilizadas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 ambas a uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹, determinadas por espectroscopia de dicroísmo circular. As medidas foram tomadas em um espectropolarímetro modelo JASCO J-815 na região do UV-distante (195 a 250 nm). As curvas apresentadas são médias de 10 registros (scans) e estão expressos em elipticidade residual média.

porém, o padrão de estruturas secundárias, com relação aos espectros registrados nos demais valores de pH. Assim, corroborando com os ensaios de atividade inibitória *in vitro* da atividade de papaína, as análises espectroscópicas de dicroísmo circular mostraram que VuCys1 e VuCys2 são proteínas com relativa tolerância a condições extremas de temperatura e pH com apenas pequena perda de atividade inibitória contra papaína e leves alterações nos espectros de CD nestas condições.

As análises de dicroísmo circular sugerem ainda que, mais do que um simples processo de desnaturação seguido de renaturação, os inibidores parecem manter sua estrutura secundária relativamente organizada em condições extremas de temperatura e pH, uma vez que não foram observados espectros característicos de desnaturação.

Hipóteses adicionais são levantadas no tópico “caracterização estrutural” a fim de se tentar explicar com maiores detalhes as razões relacionadas à estabilidade estrutural observada nas análises bioquímicas.

Avaliação do potencial biotecnológico determinada pela realização de diferentes ensaios biológicos

Diferentes atividades biológicas foram realizadas com o propósito de se responder as seguintes questões:

As cistatinas recombinantes de feijão-caupi VuCys1 e VuCys2 seriam proteínas capazes de apresentar efeitos deletérios sobre diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, estirpes diversas de bactérias e leveduras, linhagens de células tumorais, bem como sobre insetos bruquídeos predadores de grãos?

6.3 Estudo da ação das cistatinas sobre diferentes fungos fitopatogênicos

Algumas cistatinas de plantas têm sido descritas como proteínas capazes de retardar ou mesmo inibir o desenvolvimento de diversas espécies de fungos fitopatogênicos, como as fitocistatinas da cana-de-açúcar (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), de *Colocasia esculenta* (YANG *et al.*, 2005), de morango (MARTÍNEZ *et al.*, 2005) e a de trigo (CHRISTOVA *et al.*, 2006), por exemplo.

Para avaliar se as cistatinas de feijão-caupi *VuCys1* e *VuCys2* seriam capazes de causar efeitos negativos sobre diferentes espécies de fungos fitopatogênicos ensaios biológicos avaliando o potencial das proteínas recombinantes na inibição da germinação de esporos e crescimento micelial destes fungos foram conduzidos.

6.3.1 Germinação de esporos

Como pode ser observado nos próximos gráficos (Gráficos 6, 7, 8 e 9) os dois inibidores recombinantes, na concentração testada ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$), não foram capazes de causar inibição aparente da germinação de esporos. Na verdade, como pode ser observado nos gráficos, particularmente no gráfico 8 (b), onde o fungo *Fusarium solani* foi testado, o inibidor *VuCys2* causou aumento no crescimento micelial, principalmente nos períodos que variaram de 60 a 80 h após incubação com o inibidor, tomando como referência o controle negativo, água. Por outro lado, tendo como referência o próprio tampão de solubilização das proteínas (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21) não se observa esse mesmo efeito.

6.3.2 Crescimento micelial (vegetativo)

Apesar de no primeiro teste as proteínas não terem desempenhado nenhum efeito inibitório sobre os fungos testados, *VuCys1* e *VuCys2* foram também avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento micelial dos fungos, após estes terem sido permitidos germinar. Mais uma vez os inibidores mostraram-se incapazes de causar qualquer efeito negativo sobre os fungos avaliados (Gráficos 10, 11, 12 e 13).

Os resultados dos testes contra fungos fitopatogênicos sugerem que *VuCys1* e *VuCys2* não são capazes de retardar a germinação de esporos, nem o crescimento micelial dos fungos testados, o que diminui a possibilidade de que tais proteínas possam ser

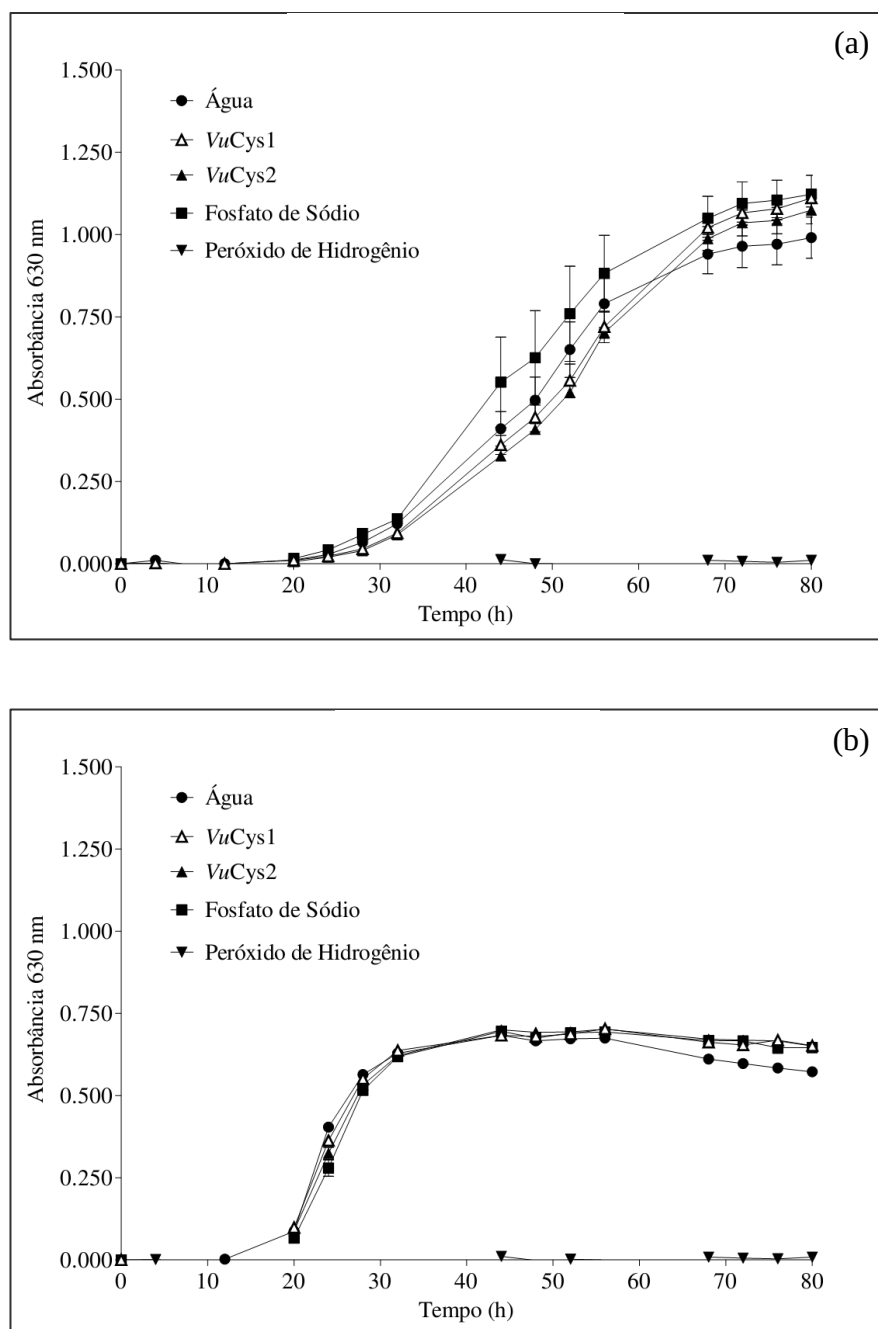


Gráfico 6. Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* (a) e *Penicillium herquei* (b). Aliquotas de 100 μL contendo os inibidores recombinantes ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizados em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$, pH 7,21 foram colocadas em contato com os esporos dos fungos, os quais foram permitidos germinar e crescer em meio YPD (*yeast potato dextrose*). Tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio $0,5 \text{ M}$ foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm \text{SD}$, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

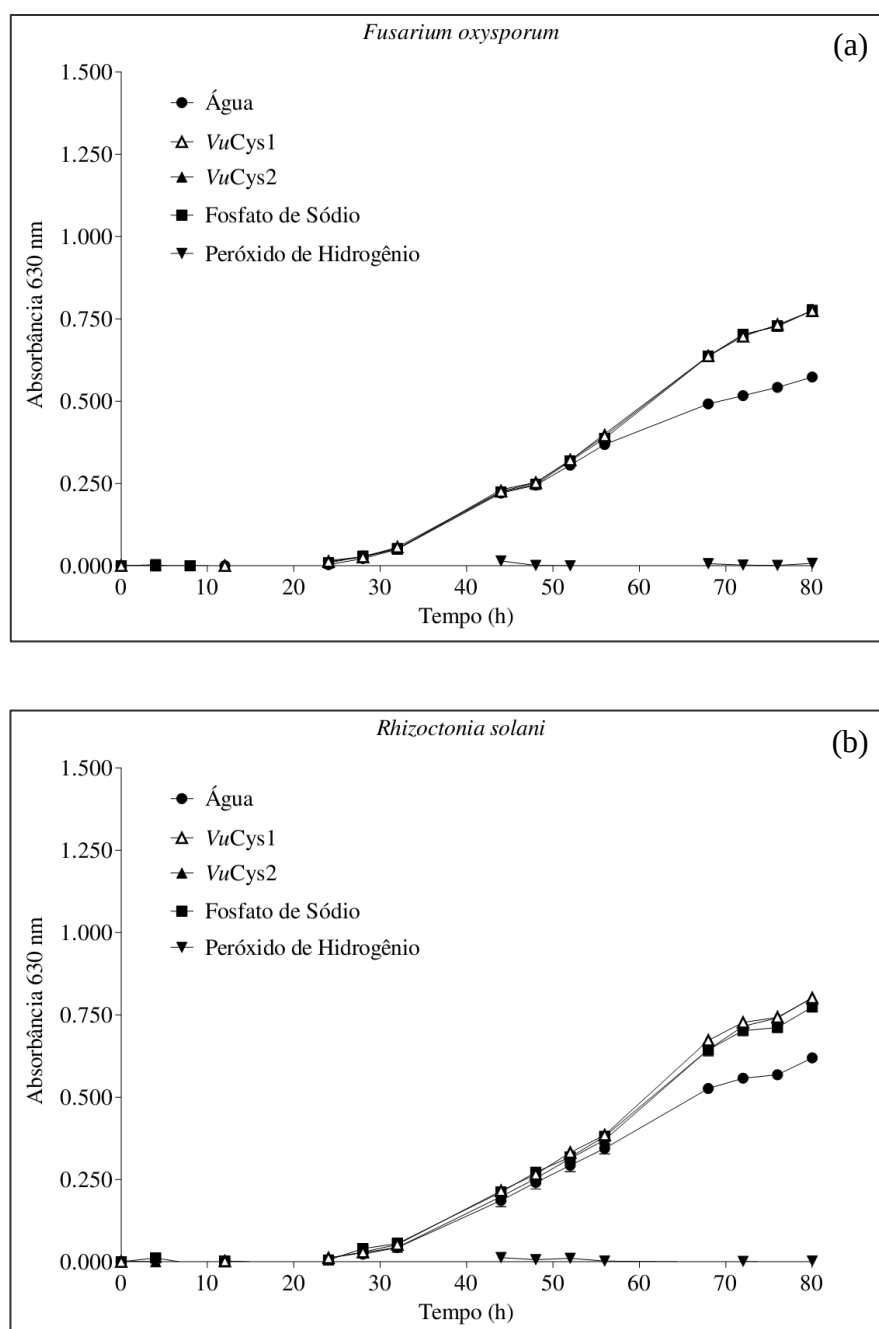


Gráfico 7. Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* (a) e *Rhizoctonia solani* (b). Alíquotas de 100 μ L contendo os inibidores recombinantes ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os esporos dos fungos, os quais foram permitidos germinar e crescer em meio YPD (*yeast potato dextrose*). Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

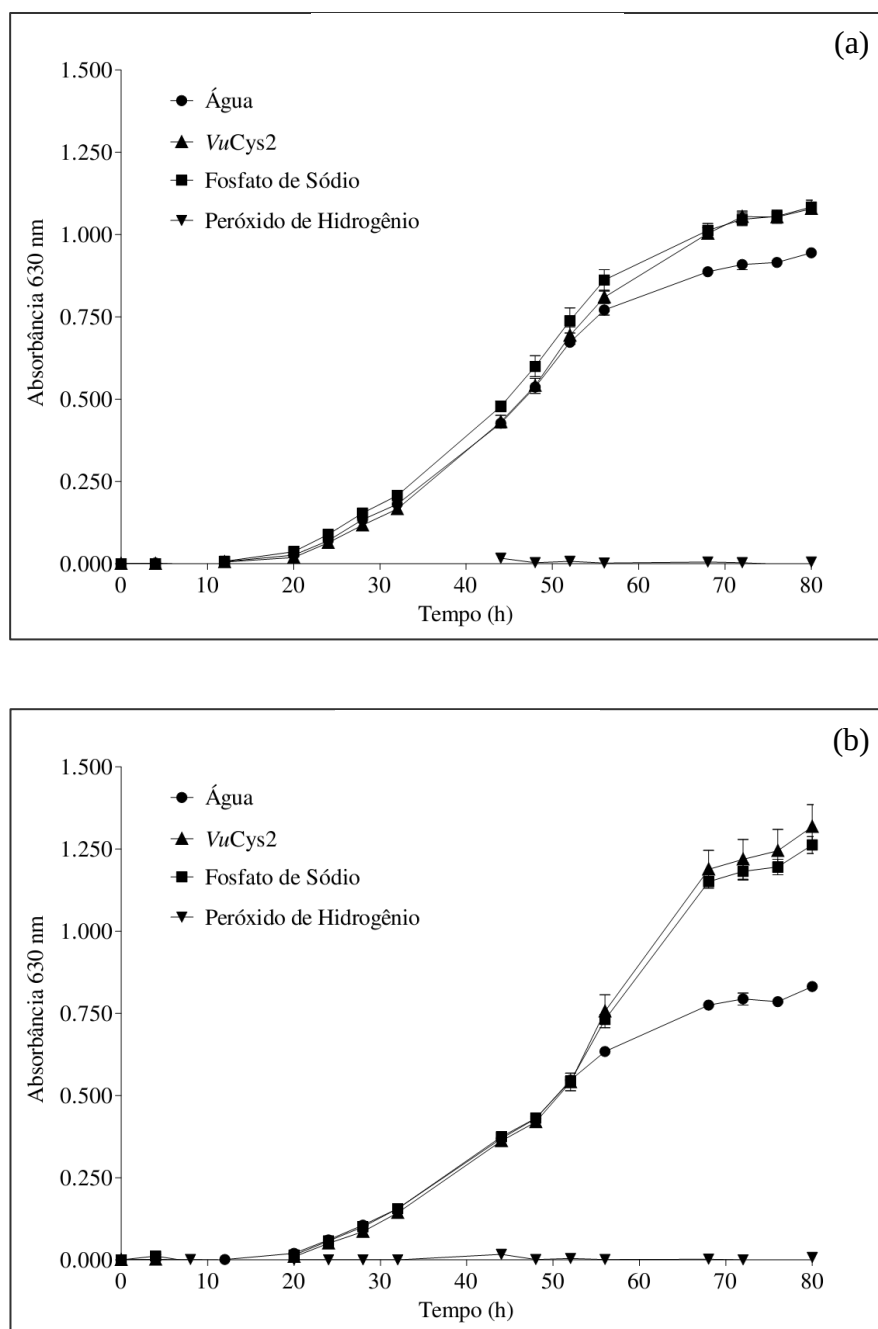


Gráfico 8. Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinante de feijão-caupi, VuCys2 sobre a germinação de esporos dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e *Fusarium solani* (b). Aliquotas de 100 μ L contendo o inibidor recombinante ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os esporos dos fungos, os quais foram permitidos germinar e crescer em meio YPD (*yeast potato dextrose*). Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

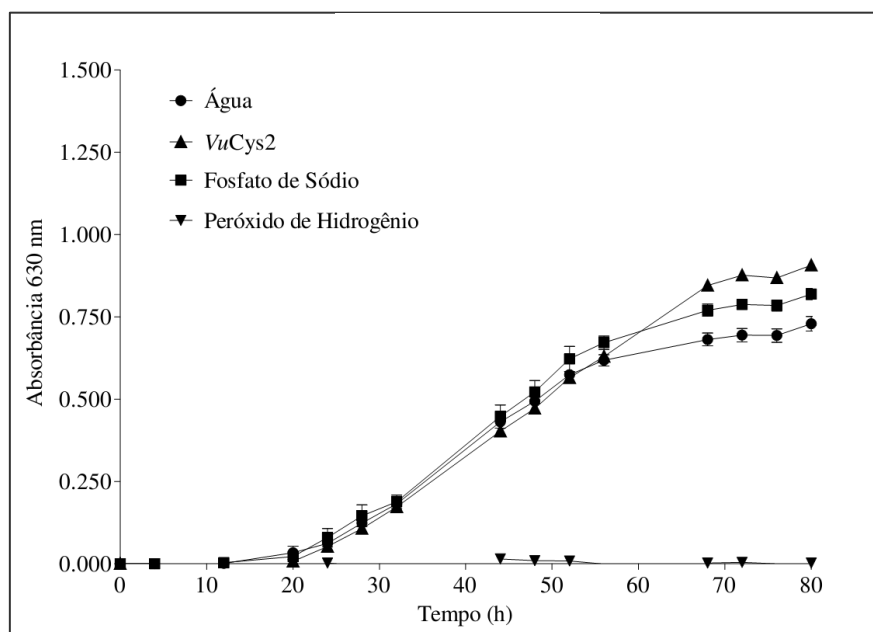


Gráfico 9. Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinante de feijão-caupi, VuCys2 sobre a germinação de esporos do fungo fitopatogênico *Colletotrichum musae*. Aliquotas de 100 μ L contendo o inibidor recombinante ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os esporos dos fungos, os quais foram permitidos germinar e crescer em meio YPD (*yeast potato dextrose*). Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

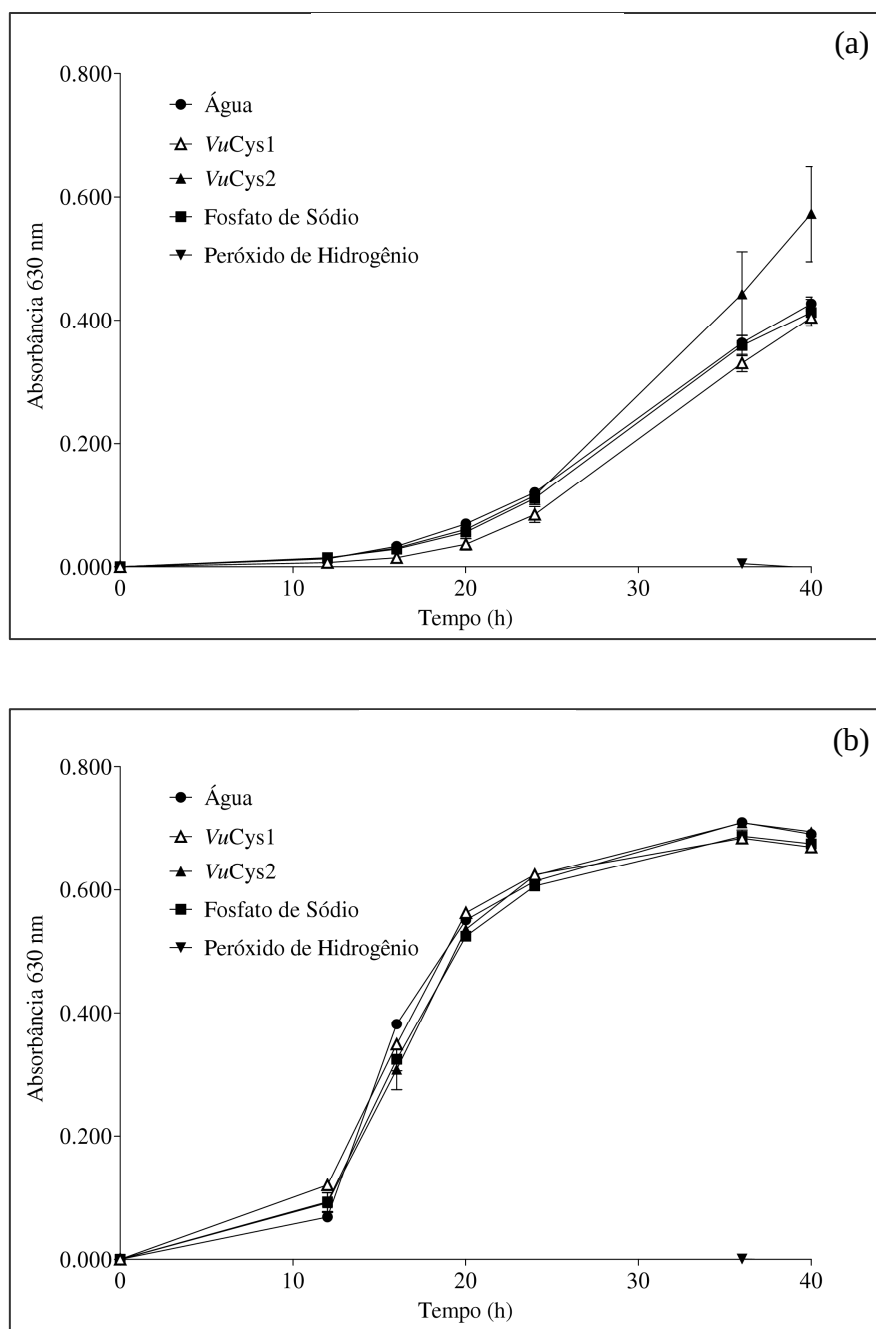


Gráfico 10. Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum lindemuthianum* (a) e *Penicillium herquei* (b). Aliquotas de 100 μ L contendo os inibidores recombinantes ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizados em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os fungos 12 h após inoculação, período necessário para a germinação dos esporos. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

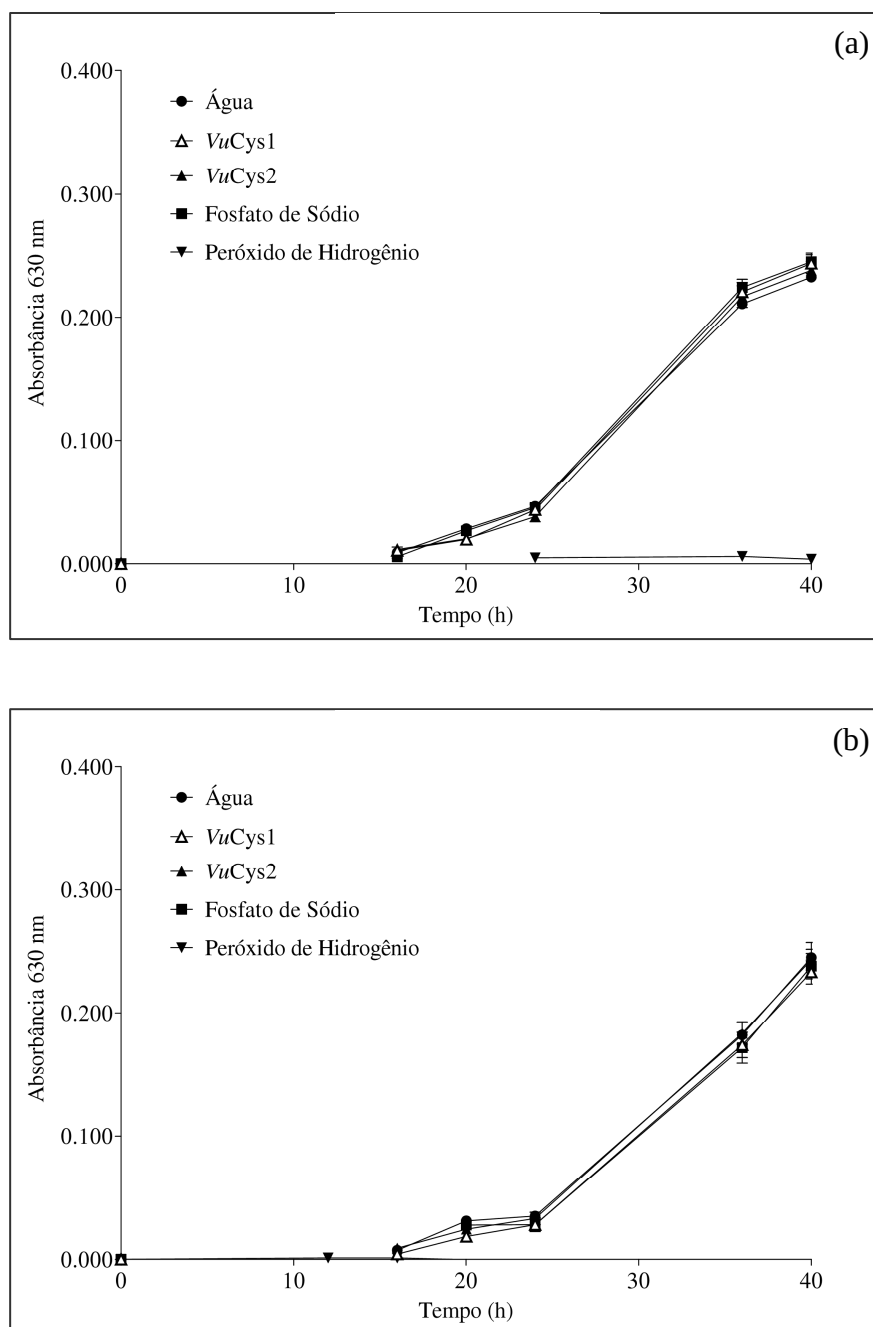


Gráfico 11. Efeito dos inibidores de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys1 e VuCys2 sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* (a) e *Rhizoctonia solani* (b). Alíquotas de 100 μ L contendo os inibidores recombinantes ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizados em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$, pH 7,21 foram colocadas em contato com os fungos 12 h após inoculação, período necessário para a germinação dos esporos. Tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio $0,5 \text{ M}$ foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm \text{SD}$, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

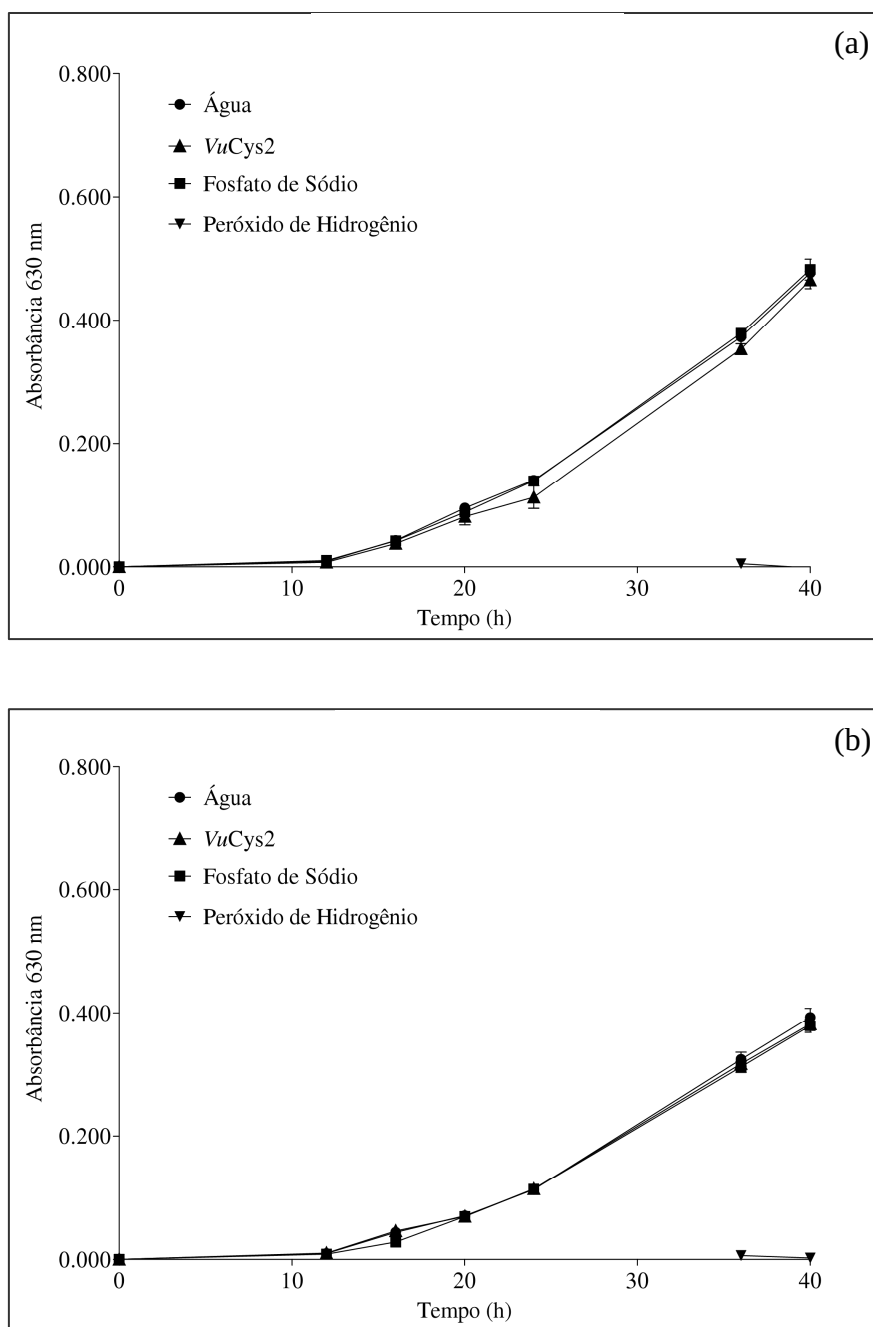


Gráfico 12. Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, *VuCys2* sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e *Fusarium solani* (b). Alíquotas de 100 μ L contendo o inibidor recombinante ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os fungos 12 h após inoculação, período necessário para a germinação dos esporos. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

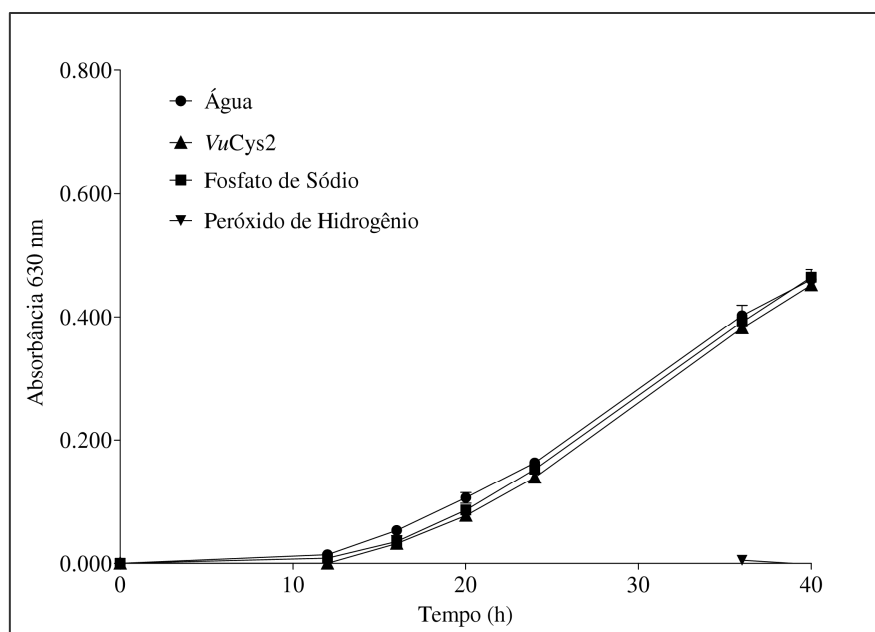


Gráfico 13. Efeito do inibidor de proteinases cisteínicas recombinantes de feijão-caupi, VuCys2 sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Colletotrichum musae*. Aliquotas de 100 μ L contendo o inibidor recombinante ($0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 foram colocadas em contato com os fungos 12 h após inoculação, período necessário para a germinação dos esporos. Tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e água ultra pura foram utilizados como controle negativo, enquanto que peróxido de hidrogênio 0,5 M foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata e os pontos nos gráficos são médias das leituras das absorbâncias $\pm$ SD, no comprimento de onda $\lambda = 630 \text{ nm}$ em diferentes intervalos de tempo.

posteriormente empregadas em programas biotecnológicos voltados ao biocontrole dos fungos testados, em particular. É importante, porém, que seja discutido que, apesar dos relatos mostrando a atividade antifúngica de diferentes fitocistatinas, a grande maioria destes trabalhos não consegue explicar o possível mecanismo de ação dos inibidores.

A cistatina recombinante de cevada, denominada Hv-CPI (GADDOUR *et al.*, 2001), por exemplo, foi capaz de retardar o crescimento micelial de três importantes espécies de fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum graminicola*, *Plectosphaerella cucumerina* e *Botrytis cinerea* e o crescimento do fungo saprofítico *Trichoderma viride* (MARTÍNEZ *et al.*, 2003). Contudo, os autores mostraram, através de estudos de mutagênese sítio-dirigida, que quando aminoácidos rigorosamente necessários para manutenção da atividade inibitória contra proteinases cisteínicas foram substituídos, levando à inativação do inibidor, não se observou perda ou redução da atividade antifúngica. Do mesmo modo, mutações que tornaram a proteína mais potente contra a papaína não resultaram em aumento da atividade antifúngica.

A cistatina de *Castanea sativa* (isolada diretamente da planta) impediu o crescimento dos fungos *Colletotrichum graminicola* e *Septoria nodorum* (PERNAS *et al.*, 1999). O inibidor também foi capaz de inibir a atividade de proteinases presentes em extratos provenientes de micélio do fungo *B. cinerea*. Apesar destes dados, o mecanismo de ação pelo qual o inibidor exerceu sua atividade sobre os fungos estudados não pôde ser elucidado.

Em trabalho recente, Valadéz-Rodríguez *et al.*, (2010) demonstraram que a cistatina recombinante de *Amaranthus* foi capaz de inibir tanto a germinação de esporos, como o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium cepivorum*. Entretanto, semelhante a outros trabalhos, os autores não conseguiram sugerir um mecanismo de ação, tendo em vista o fato de que o inibidor apresentou apenas uma fraca atividade inibitória contra as proteinases secretadas pelos fungos, em detrimento dos seus elevados efeitos tanto sobre a germinação de esporos, como sobre o crescimento micelial.

Uma vez que não se pode especular, com base na literatura, sobre um possível mecanismo de ação através do qual fitocistatinas podem ser tóxicas a fungos fitopatogênicos, ficamos impossibilitados de explicar ou sugerir uma razão para a ausência de efeitos aqui observada.

6.4 Atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos patogênicos

Alguns relatos na literatura têm demonstrado a ação de cistatinas como potentes agentes tóxicos atuando no controle de microrganismos como, bactérias, leveduras e alguns tipos de vírus (NAITO *et al.*, 1995; BLANKENVOORDE *et al.*, 1996; COLLINS e GRUBB, 1998; JASIR *et al.*, 2003), além dos fungos fitopatogênicos anteriormente citados. Entretanto, a vasta maioria destes trabalhos, se não todos, foram realizados utilizando cistatinas animais, à exceção dos trabalhos com os fungos fitopatogênicos.

A ausência de dados sobre a possível ação tóxica de fitocistatinas contra os microrganismos testados, bem como os diferentes trabalhos mostrando a ação de cistatinas animais sobre os mesmos foram fatores que justificaram a realização dos experimentos de inibição microbiana aqui conduzidos.

Além disso, a incidência crescente de infecções causadas por fungos e microrganismos de um modo geral, juntamente com a emergência de novas cepas resistentes às drogas comumente utilizadas justificam a busca pela descoberta e desenvolvimento de novas classes de drogas/moléculas antimicrobianas (KOLACZKOWSKA *et al.*, 2010).

Diante deste contexto, diferentes cepas bacterianas e da levedura patogênica *Candida albicans* (linhagens ATCC) foram desafiadas com as cistatinas VuCys1 e VuCys2, a fim de se verificar o potencial antimicrobiano dos inibidores. As proteínas foram testadas através do método da microdiluição em caldo de cultura para determinação da concentração inibitória mínima, MIC (*Minimum inhibition concentration*), de acordo com o protocolo descrito no CLSI (2003b).

Como pode ser verificado nos gráficos 14 e 15 as cistatinas não causaram nenhum efeito inibitório sobre os microrganismos testados. Em verdade, em alguns casos, um aumento considerável no crescimento microbiano, particularmente no crescimento da cepa de *Escherichia coli*, ATCC 10536 foi observado.

Apesar da ausência de efeito antimicrobiano, o dado de que as proteínas induziram o crescimento de *E. coli* é, de certa forma, interessante, uma vez que este microrganismo foi o hospedeiro escolhido neste trabalho para clonagem e expressão das proteínas. A ausência de toxicidade sobre uma cepa de *E. coli* (ATCC 10536), poderia reforçar o fato de que a bactéria é um excelente hospedeiro para a expressão dos inibidores em estudo, tendo em vista que, em muitos casos, a obtenção de um bom rendimento ou mesmo, a produção da proteína na sua

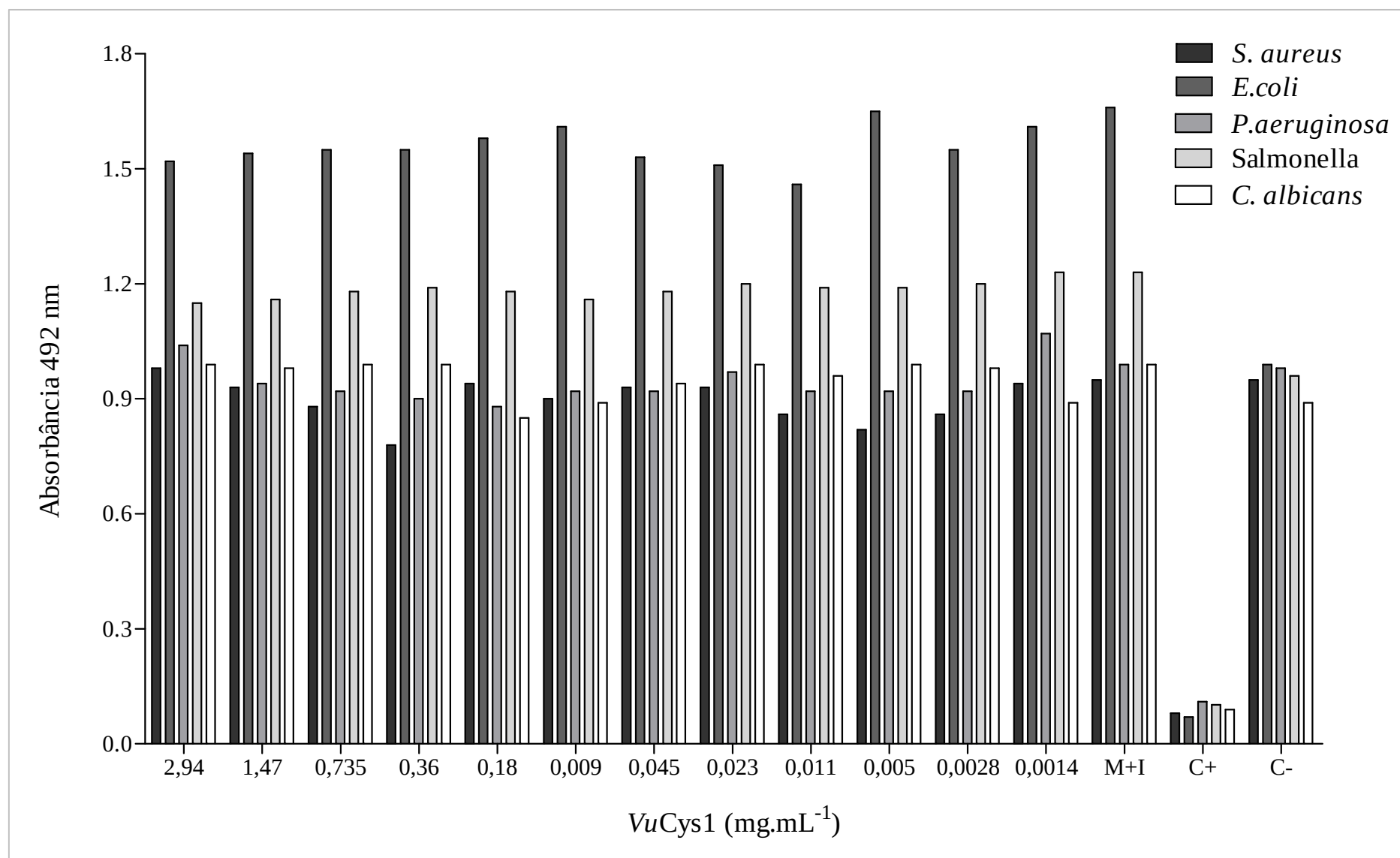


Gráfico 14. Potencial antimicrobiano (concentração inibitória mínima - CIM) de VuCys1 contra diferentes cepas bacterianas e uma de levedura, avaliado pelo método de microdiluição em caldo, (CLSI, 2003b). M+I = meio de cultura com inóculo; C+ = amicacina (1,2 mg.mL⁻¹) e cetoconazol (2,0 mg.mL⁻¹); C- = fosfato de sódio 0,05 M, pH 6.

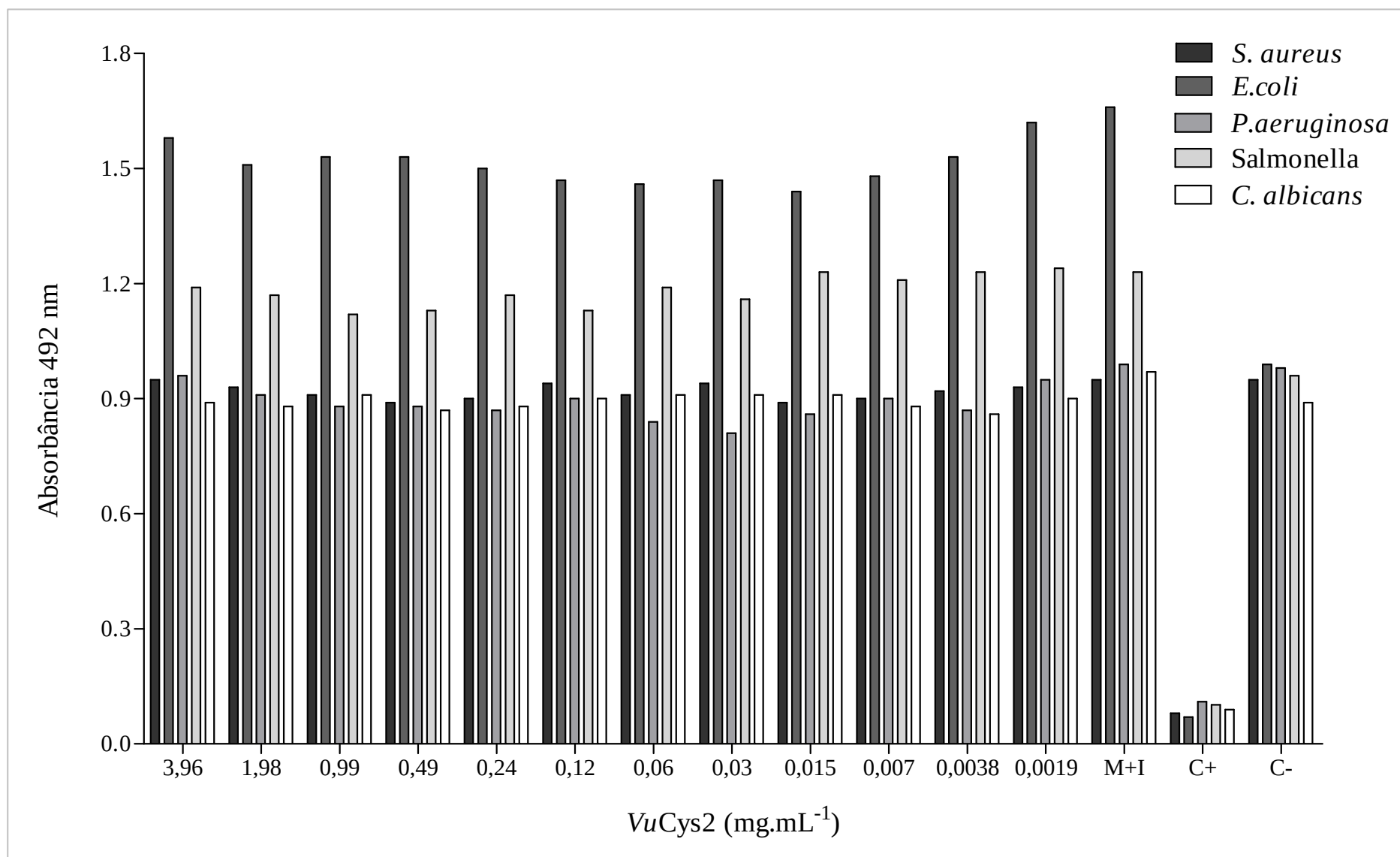


Gráfico 15. Potencial antimicrobiano (concentração inibitória mínima - CIM) de VuCys2 contra diferentes cepas bacterianas e uma de levedura, avaliado pelo método de microdiluição em caldo, (CLSI, 2003b). M+I = meio de cultura com inóculo; C+ = amicacina (1,2 mg.mL⁻¹) e cetoconazol (2,0 mg.mL⁻¹); C- = fosfato de sódio 0,05 M, pH 6.

forma solúvel, são características que podem ser difíceis de serem alcançadas devido ao fato de a proteína recombinante *per si* poder apresentar-se tóxica ao microrganismo hospedeiro (KORANT e RIZZO, 1991; FERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

Contudo, é importante ter em mente que a extrapolação do resultado obtido com a cepa de *E. coli* ATCC 10536 para a *E. coli* utilizada nos experimentos de expressão dos inibidores, ArcticExpress (DE3), não pode ser feita de modo tão direto e caso seja feita é preciso ter o cuidado de se ressaltar que, por serem cepas diferentes, estas bactérias podem apresentar graus bem diferenciados de virulência, tanto quanto de susceptibilidade/resistência aos inibidores. Portanto, a observação de que *VuCys1* e *VuCys2* induziram a proliferação de uma cepa de *E. coli*, algo que chama a atenção pela relação com os experimentos de expressão, pode também tratar-se apenas de uma simples coincidência.

Como reforço ao que foi citado no parágrafo acima, Wełsierska *et al.*, (2005) encontraram que a cistatina da clara do ovo foi um potente bactericida contra *E. coli* ATCC 25922, a despeito deste mesmo inibidor já ter sido clonado utilizando-se *E. coli*, cepa AD494(DE3) pLysS (CHEN *et al.*, 2000).

Além disso, é importante destacar que os gráficos mostram que os inibidores induziram o crescimento de *E. coli*, quando é tomado como referência o controle negativo (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6), mas quando a análise é feita em relação ao controle M+I (meio de cultura com inóculo) é observado um perfil de crescimento semelhante. Assim, o efeito indutor das cistatinas sobre a proliferação de *E. coli* estaria no fato de os inibidores terem aparentemente compensando o efeito inibitório exercido pelo próprio tampão (C-), quando comparado ao controle M+I (Gráficos 14 e 15).

6.5 Avaliação do potencial citotóxico dos inibidores recombinantes de feijão-caupi

*“A principal diferença entre um tumor benigno e um maligno consiste na habilidade da forma maligna de invadir e se espalhar ou sofrer metástases para diferentes locais do corpo. A habilidade de sofrer metástases é que torna o câncer uma doença tão difícil de ser tratada e evidências sugerem que **enzimas proteolíticas** estão envolvidas na sua dispersão... O mecanismo mais comum pelo qual proteases podem mediar o processo de metástase consiste na degradação da matriz extracelular e membranas basais. Assim, pode-se concluir que, se é possível mostrar que proteases desempenham papel na dispersão de cânceres humanos, a inibição destas enzimas pode abrir novas possibilidades de terapia para o controle da malignidade”.*

O texto destacado acima foi retirado do artigo de Duffy, (1987) e ressalta a possibilidade do uso de inibidores de proteinases como moléculas capazes de ajudar no tratamento do câncer. Esta é, portanto, uma das mais importantes promessas relativas ao uso e aplicação biotecnológica de inibidores de proteinases e, em particular, cistatinas, como será discutido adiante.

De acordo com o raciocínio acima, estudos preliminares de avaliação do potencial citotóxico destas proteínas precisam ser realizados a fim de que moléculas com atividade citotóxica para células malignas possam ser identificadas. Desta forma, ensaio biológico através do qual o potencial citotóxico de VuCys1 e VuCys2 contra as linhagens celulares tumorais humanas MDA-435 (Melanoma – humano), HCT-8 (cólon – humano) e SF295 (cérebro – humano) foi investigado.

A tabela 5 mostra que nenhum dos inibidores foi capaz de inviabilizar a conversão do composto MTT à formazan, mesmo na concentração mais elevada, i.e., 3,01 μM (VuCys1) e 3,15 μM (VuCys2). Uma vez que MTT só é convertido à formazan em mitocôndrias de células viáveis (MOSMANN, 1983), o teste mostrou que os inibidores não são citotóxicos às células testadas.

Este é um resultado que, de certo modo, pode condizer com uma observação realizada no início deste trabalho, o fato de que os inibidores apresentaram atividade muito baixa contra a proteinase cisteínica catepsina B humana, em relação às demais enzimas testadas (Gráfico 1).

Já na década de 1990, Hocman, (1990) publicou uma revisão mostrando a possível participação de catepsinas B no processo de proliferação de células tumorais e enfatizou a

Tabela 5. Avaliação do potencial citotóxico dos inibidores recombinantes de feijão-caupi (*VuCys1* e *VuCys2*) sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas, onde doxorrubicina foi usada como controle positivo e a CI_{50} foi estimada pelo método do MTT após 72 horas de incubação

Linhagem celular	Origem	<i>VuCys1</i> CI_{50} (μM)	<i>VuCys2</i> CI_{50} (μM)	Doxorrubicina CI_{50} *** (μM)
HCT-8	Cólon	> 3,01	> 3,15	0,02 (0,02 – 0,03) **
SF295	SNC*	> 3,01	> 3,15	0,4 (0,3 – 0,6)
MDA-MB-435	Melanoma	> 3,01	> 3,15	0,8 (0,6 – 1,1)

*S.N.C. Sistema nervoso central.

**Valores de referência para substâncias com ação reconhecidamente citotóxica sobre as linhagens celulares testadas.

*** CI_{50} : Concentração inibitória necessária para causar 50% de morte celular. Como as proteínas avaliadas não desempenharam citotoxicidade aparente a CI_{50} foi assumida como sendo superior à maior dose testada.

importância de inibidores protéicos naturais, não só de animais, mas também de plantas, no controle destas enzimas em processos malignos. Em revisão mais recente (KOBLINSKI *et al.*, 2000) discutem resultados bem mais conclusivos e menos especulativos, onde a proteinase cisteínica catepsina B parece atuar juntamente com outras enzimas proteolíticas degradando a matriz extracelular que cerca o tumor, bem como a membrana basal, facilitando sua multiplicação e dispersão, dando suporte a aquilo que foi especulado já nos anos de 1980 por Duffy (1987).

Assim, diante dos resultados obtidos e da literatura citada é possível elaborar a hipótese de que a ausência de atividade citotóxica dos inibidores *VuCys1* e *VuCys2* sobre as linhagens de células tumorais testadas possa ser, pelo menos em parte, resultado da fraca inibição de catepsinas B presentes em tais células. Uma das possíveis explicações para a baixa atividade inibitória das cistatinas recombinantes *VuCys1* e *VuCys2* sobre a catepsina B humana seria a incapacidade das cistatinas de caupi de deslocarem o loop de oclusão que restringe o acesso dos inibidores à fenda do sítio ativo da enzima (JIA *et al.*, 1995; NAGLER *et al.*, 1997; NAUDIN *et al.*, 2010 e RENKO *et al.*, 2010).

6.6 Avaliação dos efeitos das cistatinas sobre bruquídeos e suas enzimas

6.6.1 Avaliação do efeito sobre as enzimas digestivas dos insetos

Os últimos modelos biológicos de estudo foram insetos da ordem Coleóptera, os bruquídeos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, importantes pragas para o feijão-caupi e para o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente. No primeiro ensaio os intestinos de larvas de terceiro instar de ambas as espécies de insetos foram cuidadosamente removidos e suas enzimas digestivas extraídas. O efeito de VuCys1 e VuCys2 sobre estas enzimas foi investigado através da análise do potencial dos inibidores em causar inibição *in vitro* das proteinases.

O inibidor recombinante VuCys1 mostrou-se ativo contra as enzimas de larvas de *C. maculatus* causando uma inibição de $80,33\% \pm 2,88$ na atividade das enzimas deste inseto quando 2 μg de proteína foram utilizados no ensaio (Tabela 6). Este mesmo dado pode ser verificado do ponto de vista de atividade proteolítica residual onde se observa um efeito aproximadamente linear até a quantidade de 1 μg de inibidor (Gráfico 16 a). Por outro lado quando este mesmo inibidor foi incubado com as enzimas proteolíticas de larvas do bruquídeo *Z. subfasciatus* o percentual inibitório observado na maior dose de incubação foi de apenas $13,54\% \pm 0,62$, ou seja, a atividade proteolítica residual do extrato de larvas de *Z. subfasciatus* após incubação com VuCys1 manteve-se acima de 85%, mesmo quando incubado na dose mais elevada de cistatina (Gráfico 16 b).

De um modo interessante o inibidor VuCys2 apresentou o mesmo padrão de atividade verificado para VuCys1 sendo mais eficiente em inibir a atividade das enzimas de *C. maculatus* do que a atividade das enzimas de *Z. subfasciatus* (consultar tabela 7 - para percentual inibitório e gráfico 17 a e b - para dados de atividade proteolítica residual). Entretanto, é importante destacar que o efeito inibitório de VuCys2 sobre as enzimas de *Z. subfasciatus* foi consideravelmente maior ($38,43\% \pm 1,85$) que aquele exercido por VuCys1, (Tabela 6, Gráfico 16 b).

Os mesmos efeitos diferenciais observados sobre as enzimas proteolíticas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, onde as cistatinas foram muito mais eficientes em diminuir a atividade proteolítica originadas de larvas de *C. maculatus* do que *Z. subfasciatus* foram observados para uma cistatina de soja incubada com enzimas proteolíticas de diferentes insetos, inclusive os estudadas neste trabalho (HINES *et al.*, 1991). A cistatina da soja foi

Tabela 6. Ação inibitória da cistatina recombinante de feijão-caupi, VuCys1, sobre enzimas proteolíticas extraídas do intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

Inibidor	Inibição (%)	
	<i>Callosobruchus maculatus</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i>
VuCys1 0,00 µg	nd	nd
VuCys1 0,25 µg	18,77 ± 5,42	9,83 ± 7,72
VuCys1 0,50 µg	53,45 ± 0,81	9,83 ± 2,16
VuCys1 1,00 µg	77,91 ± 2,98	12,23 ± 0,62
VuCys1 2,00 µg	80,33 ± 2,88	13,54 ± 0,62

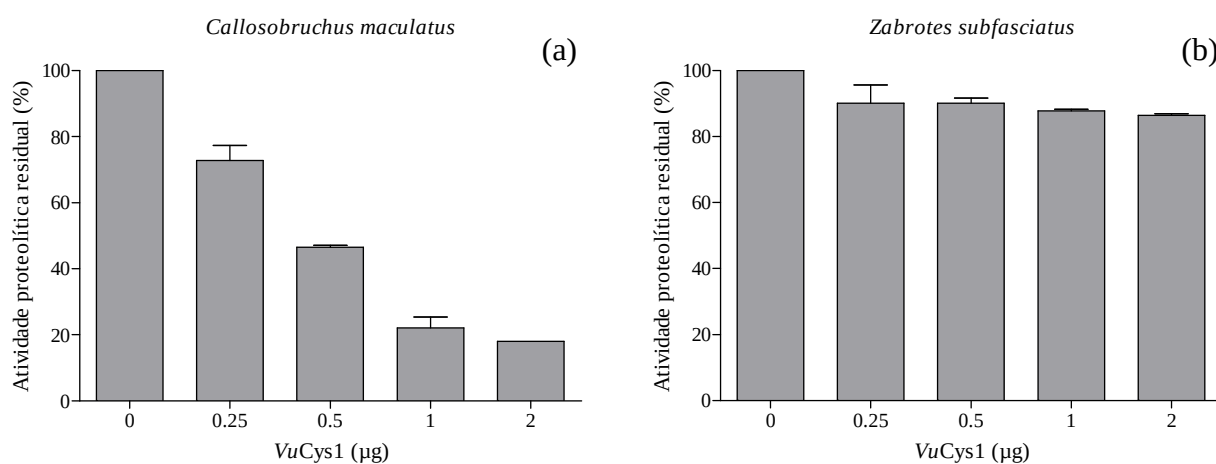


Gráfico 16. Atividade proteolítica residual das enzimas isoladas de larvas de *Callosobruchus maculatus* (a) e *Zabrotes subfasciatus* (b), após incubação com diferentes doses do inibidor recombinante de feijão-caupi, VuCys1. Os valores apresentados são uma média de 3 ensaios independentes ± SD.

Tabela 7. Ação inibitória da cistatina recombinante de feijão-caupi, VuCys2, sobre enzimas proteolíticas extraídas do intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

Inibidor	Inibição (%)	
	<i>Callosobruchus maculatus</i>	<i>Zabrotes subfasciatus</i>
VuCys2 0,00 µg	nd	nd
VuCys2 0,25 µg	21,65 ± 2,44	12,88 ± 1,54
VuCys2 0,50 µg	41,72 ± 0,53	20,09 ± 0,62
VuCys2 1,00 µg	78,74 ± 0,27	18,56 ± 1,54
VuCys2 2,00 µg	85,25 ± 0,81	38,43 ± 1,85

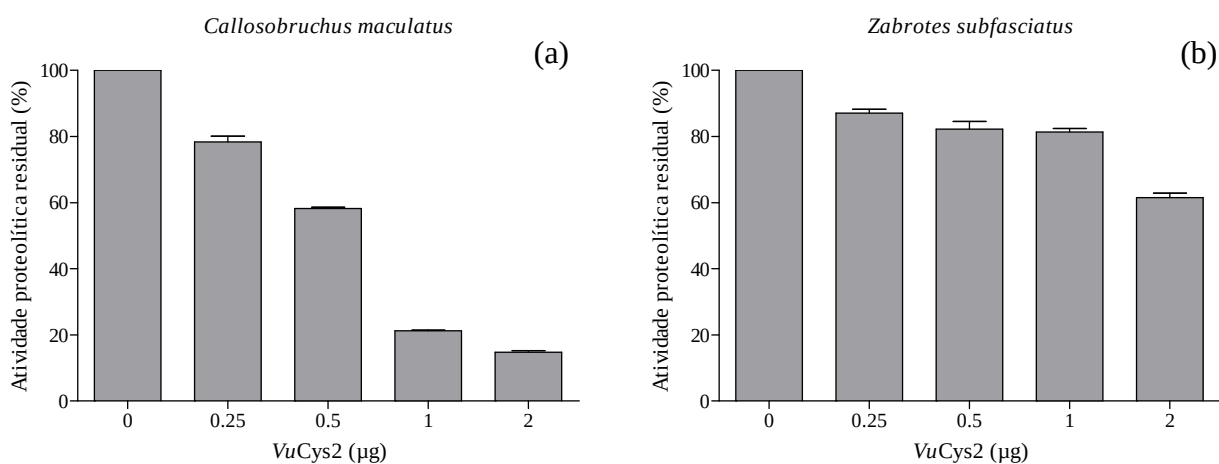


Gráfico 17. Atividade proteolítica residual das enzimas isoladas de larvas de *Callosobruchus maculatus* (a) e *Zabrotes subfasciatus* (b), após incubação com diferentes doses do inibidor recombinante de feijão-caupi, VuCys2. Os valores apresentados são uma média de 3 ensaios independentes ± SD.

capaz de causar uma inibição de 88% na atividade das enzimas de *C. maculatus*, ao passo que seu efeito sobre as enzimas de *Z. subfasciatus* foi de apenas 24,1%, valores muito próximos dos encontrados neste trabalho.

Estes dados sugerem que, apesar de serem espécies relacionadas e apesar de ambos os insetos terem a capacidade de infestar sementes de feijão-caupi o pool de enzimas proteolíticas de *Z. subfasciatus* parece ser mais diversificado do que aquele encontrado no intestino de larvas de *C. maculatus*. De fato, foi demonstrado que larvas de *Z. subfasciatus* apresentam uma diferença singular em relação às larvas de *C. maculatus*, em termos de composição de enzimas digestivas.

Trabalhos clássicos já haviam relatado que larvas de *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* tinham a capacidade de sobreviver em sementes de feijão comum *Phaseolus vulgaris*, mesmo na presença de altos níveis (0,5%) do inibidor de α -amilase 1 (α AI-1) nestas sementes, enquanto que *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis* eram prejudicados por tal inibidor. As larvas de *Z. subfasciatus*, particularmente, tinham a capacidade de degradar o inibidor de α -amilase presente na semente (ISHIMOTO e KIMATURA, 1992 *apud* ISHIMOTO e CHRISPEELS, 1996), sendo portanto, insensíveis à presença da proteína. Posteriormente, trabalhando na busca para encontrar a molécula responsável por tal hidrólise, Ishimoto e Chrispeels (1996) identificaram uma atividade proteolítica do tipo serínica em extratos de larvas de *Z. subfasciatus* que quando inibida por inibidores sintéticos tornava os extratos enzimáticos da larva incapazes de degradar o inibidor α AI-1. Mais tarde, Silva *et al.*, (2001) conseguiram isolar uma proteinase serínica das larvas de *Z. subfasciatus* e por meio de ensaios de digestão *in vitro* demonstraram que tal enzima era capaz de degradar o inibidor α AI-1.

Com base nestes trabalhos, bem como no trabalho clássico da soja (HINES *et al.*, 1991), os resultados aqui apresentados sugerem que, possivelmente, alguma outra atividade proteolítica, provavelmente do tipo serínica, e presente predominantemente em larvas de *Z. subfasciatus* possa compensar o efeito inibitório de VuCys1 e VuCys2 sobre suas proteinases cisteínicas e a especulação feita é de que isso possa ocorrer por três maneiras. A primeira possibilidade é que a inibição das proteinases cisteínicas de *Z. subfasciatus* seja diretamente compensada pela ação desta atividade serínica capaz de hidrolisar a azocaseína, em detrimento das atividades cisteínicas inibidas. Uma segunda possibilidade é a de que, de modo semelhante ao observado para o inibidor de α -amilase 1 (α AI-1) de *Phaseolus vulgaris* esta atividade serínica possa agir diretamente sobre os inibidores de caupi, levando-os à hidrólise. A terceira possibilidade na realidade seria a soma das duas já descritas, ou seja, um

efeito compensatório da ação das cistatinas, tanto por sua hidrólise, como pela ação direta da atividade serínica sobre o substrato azocaseína, utilizado nos ensaios.

Contudo, apesar de toda esta discussão, é importante que seja ressaltado que Aguiar *et al.*, (2006), também trabalhando com a forma recombinante do inibidor VuCys1 de feijão-caupi, reportaram um potente efeito desta cistatina sobre a atividade de enzimas proteolíticas extraídas do intestino de *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*. A explicação para tal inconsistência em relação aos dados aqui obtidos, contudo, foge do escopo deste trabalho.

6.7 Avaliação dos efeitos *in vivo* de VuCys1 e VuCys2 sobre *Callosobruchus maculatus*

Uma vez observada forte ação inibitória de VuCys1 e VuCys2 sobre as enzimas digestivas isoladas de larvas de terceiro instar de *Callosobruchus maculatus*, um bioensaio baseado na administração de uma dieta, via sementes artificiais, contendo os inibidores em diferentes concentrações foi realizado a fim de se avaliar os efeitos *in vivo* da administração das cistatinas sobre diferentes parâmetros de desenvolvimento de larvas e indivíduos adultos.

Os parâmetros biológicos avaliados foram: índice de mortalidade de larvas (%), tempo médio de desenvolvimento de insetos (dias), percentual de emergência de adultos, peso médio dos adultos emergidos e número cumulativo de adultos emergidos ao longo de todo o período experimental. Curiosamente, como pode ser observado na Tabela 8 e no Gráfico 18 (*a* e *b*), a administração de dieta contendo VuCys1 e VuCys2 nas concentrações finais de 0,025; 0,05 e 0,1% não causou nenhum efeito negativo significativo sobre os parâmetros biológicos estudados, quando comparada à dieta controle (farinha de feijão-caupi), a despeito dos elevados efeitos sobre as enzimas proteolíticas das larvas observados no ensaios de inibição *in vitro*.

Algumas proposições são aqui levantadas para tentar explicar o que pode ter acontecido quando VuCys1 e VuCys2 foram ingeridos por larvas de *C. maculatus*, na tentativa de se buscar uma resposta para o fato de as larvas serem insensíveis aos inibidores. O primeiro fator que pode ser explorado é a questão da concentração das proteínas nas sementes artificiais utilizadas no ensaio. Trabalhos relatando o potencial de proteínas como agentes tóxicos para insetos realizados em condições semelhantes à empregada neste trabalho, comumente relatam o uso de concentrações superiores às aqui utilizadas. A lectina de *Gracilaria ornata*, por exemplo, foi incorporada em sementes artificiais e administrada a *C. maculatus* de modo semelhante ao descrito neste trabalho. Contudo, a menor concentração de lectina utilizada (0,1%) foi exatamente a maior concentração utilizada aqui. Apenas na concentração de 1% a lectina foi capaz de causar mortalidade de larvas (65%), afetando, porém, o percentual de emergência de adultos em todas as concentrações utilizadas (0,1 a 1,0%) (LEITE *et al.*, 2005).

Como mencionado anteriormente, Aguiar *et al.*, (2006), encontram uma elevada atividade inibitória do inibidor aqui denominado VuCys1 sobre *Z. subfasciatus*. Além deste dado, os autores também reportaram um forte efeito desta cistatina sobre o desenvolvimento dos insetos *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, em ensaio de dieta artificial, mesmo

Tabela 8. Parâmetros avaliados em ensaio biológico onde as cistatinas VuCys1 e VuCys2 foram incorporadas em sementes artificiais e administradas a *Callosobruchus maculatus*

Amostra	Concentração (%)	Mortalidade de larvas (%)	Tempo médio de desenvolvimento (dias)	Emergência de adultos (%)	Peso médio de adultos recém emergidos (mg)
VuCys1	*0,0	34,55 ± 8,53 a	28,49 ± 0,78 a	65,45 ± 8,53 a	3,71 ± 0,26 a
	0,025	33,77 ± 13,48 a	29,24 ± 0,82 a	66,23 ± 13,48 a	3,17 ± 0,07 a
	0,05	35,04 ± 3,98 a	28,98 ± 0,65 a	64,96 ± 3,98 a	3,40 ± 0,45 a
	0,1	38,06 ± 4,44 a	28,09 ± 0,27 a	61,94 ± 4,44 a	3,48 ± 0,23 a
VuCys2	*0,0	34,55 ± 8,53 a	28,49 ± 0,78 ab	65,45 ± 8,53 a	3,71 ± 0,26 a
	0,025	38,22 ± 7,14 a	27,71 ± 0,54 b	61,78 ± 7,14 a	3,42 ± 0,32 a
	0,05	38,07 ± 12,60 a	29,37 ± 0,74 a	61,93 ± 12,60 a	3,63 ± 0,60 a
	0,1	38,32 ± 11,73 a	29,76 ± 0,13 a	61,68 ± 11,73 a	3,30 ± 0,16 a

*Dieta à base exclusiva de farinha de feijão-caupi. Os demais valores (0,025; 0,05 e 0,1%) representam massa (mg) de inibidor por massa (mg) de semente artificial. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas a um nível de significância de 0,05%.

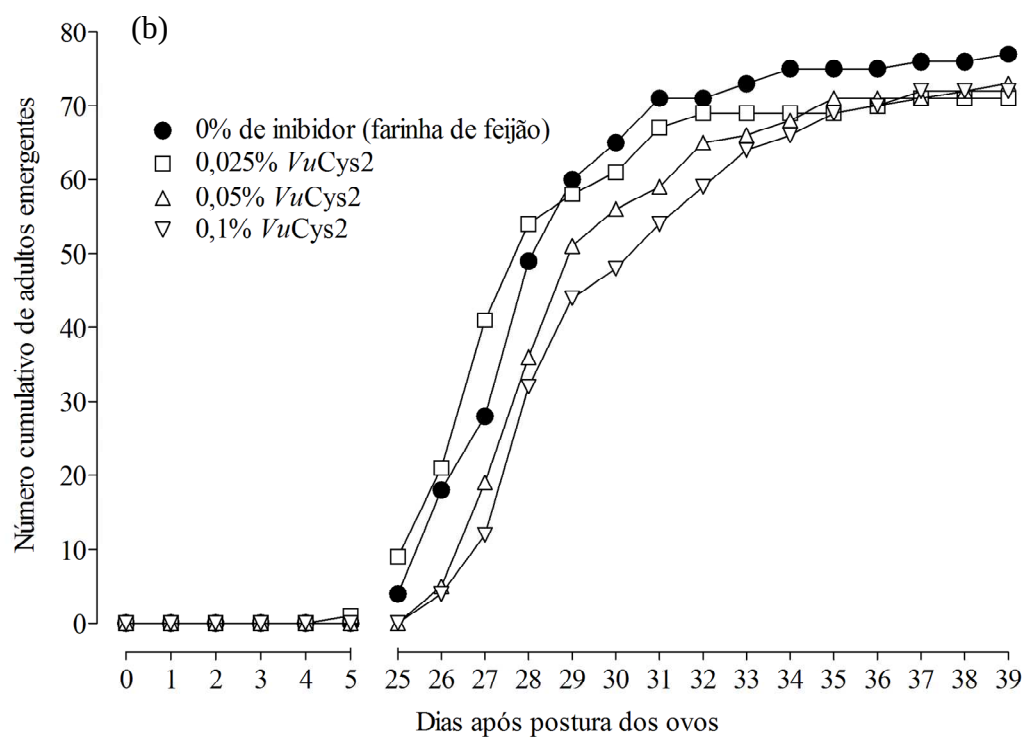
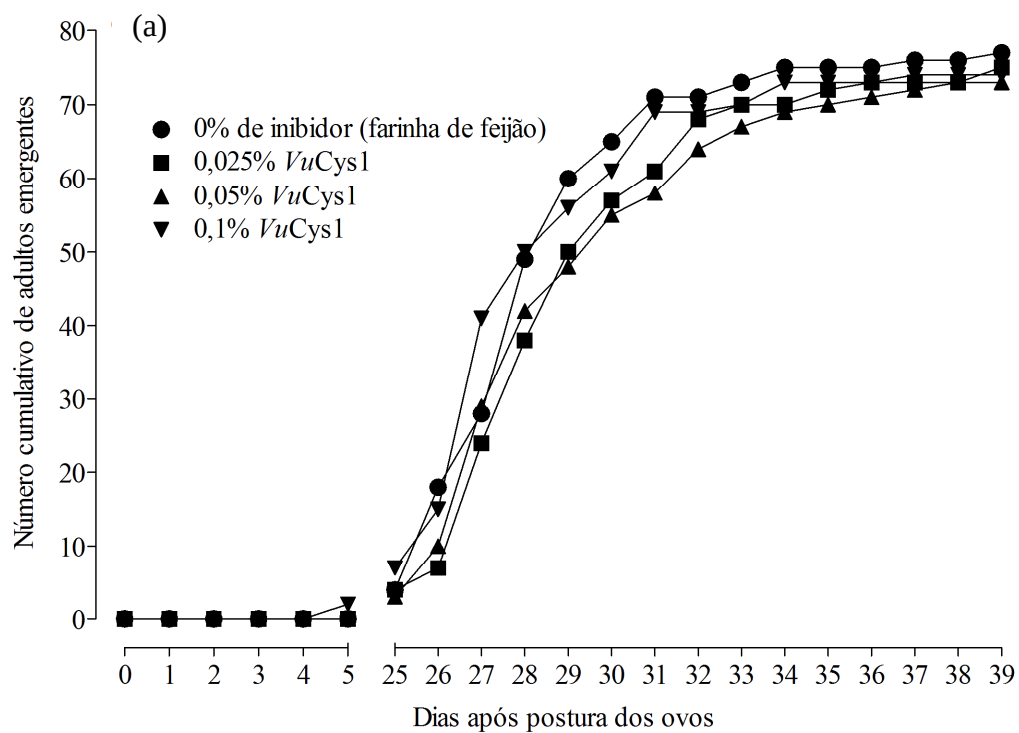


Gráfico 18. Número cumulativo de adultos emergentes ao longo de todo o período experimental. (a) efeito de *VuCys1* em diferentes concentrações (0,025; 0,05 e 0,1%) e (b) *VuCys2*, nas mesmas concentrações, sobre a emergência de insetos adultos.

utilizando sementes contendo o inibidor em concentrações tão baixas quanto 0,025 %. Este trabalho inclusive serviu como referência para os experimentos aqui realizados. Este é um dado importante a ser mencionado e que pode, a certo modo, invalidar a ideia de que a concentração utilizada das proteínas recombinantes tenha sido o motivo preponderante para a ausência de efeitos *in vivo* contra *C. maculatus* apesar de este inseto não ter sido o usado no trabalho citado.

Desta forma, outra possível explicação para os resultados aqui obtidos, talvez possa estar localizada no próprio sistema digestório das larvas de *C. maculatus*. Uma hipótese a ser discutida é a de que mecanismos adaptativos da larva à presença das cistatinas possam ter contribuído para a total anulação dos efeitos dos inibidores.

O prolongado tempo de contato dos inibidores com o intestino das larvas dos insetos pode ter sido longo o bastante para que a larva conseguisse se adaptar à presença das cistatinas por meio da produção de proteinases cisteínicas insensíveis aos inibidores, bem como pela síntese de outras classes de enzimas proteolíticas capazes de causar sua degradação. Isto é sugerido com base em trabalhos que mostram que mecanismos adaptativos específicos de *C. maculatus* podem ocorrer, quando o inseto é submetido a determinadas dietas artificiais a base de inibidores de proteinases (ZHU-SALZMAN e REN SEN ZENG, 2008).

Uma cistatina de soja (scN), por exemplo, foi testada na concentração de 0,2% contra *C. maculatus* em ensaio de dieta artificial. Apesar de apresentar um efeito inicial sobre as larvas dos insetos, estes efeitos foram compensados por mecanismos adaptativos que culminaram com a ineficiência do inibidor (JOHNGSMA e BOLTER, 1997).

Um dos mecanismos adaptativos de larvas de *C. maculatus* ao inibidor scN envolve a expressão de uma proteinase cisteínica do tipo catepsina B, chamada CmCatB1 (“*C. maculatus* cathepsin B 1”) que é insensível ao mesmo (MOON *et al.*, 2004). Transcritos primários desta proteína só foram encontrados no intestino das larvas de *C. maculatus* alimentadas com sementes artificiais contendo o inibidor scN, mas não nas sementes controles e a expressão da proteína só foi detectada no terceiro e quarto instars larvais. Ou seja, nas primeiras etapas de desenvolvimento, onde o inibidor deve ter exercido seus maiores efeitos, os genes que codificam para a CmCatB1 ainda não estavam sendo expressos. Juntos, esses achados indicam dois fatos importantes: 1) CmCatB1 só é expressa na presença do inibidor e 2) sua expressão ocorre após um determinado tempo de exposição (KOO *et al.*, 2008).

Quando a proteinase CmCatB1 foi expressa em *Pichia pastoris* e purificada, ela mostrou-se sensível ao inibidor “universal” de proteinases cisteínicas E-64 e ao inibidor

específico de catepsinas B, (CA-074). Entretanto, a cistatina da soja, scN, não foi capaz de inibir sua atividade (KOO *et al.*, 2008). Ou seja, esta é uma proteinase cisteínica insensível à presença da cistatina.

Estes dados corroboram com a proposição de que a exposição crônica de larvas de *C. maculatus* a VuCys1 e VuCys2 pode ter provocado nestas larvas um rearranjo no seu conteúdo de enzimas digestivas culminando com a produção de proteinases cisteínicas insensíveis aos inibidores.

Aqui, de modo semelhante aos ensaios de citotoxicidade, a fraca atividade inibitória de VuCys1 e VuCys2 contra a proteinase cisteínica catepsina B, parece, pelo menos em parte, ajudar no entendimento dos resultados obtidos.

A conclusão desta discussão é que há a possibilidade de que, semelhante ao observado por Moon *et al.*, (2004) e Koo *et al.*, (2008), durante o bioensaio larvas de *C. maculatus* possam ter realizado a síntese *de novo* de uma proteinase cisteínica do tipo catepsina B, insensível aos inibidores em um nível semelhante ou mesmo superior ao encontrado para a catepsina B comercial e esta enzima pode ter anulado qualquer possibilidade de ação das cistatinas recombinantes.

Caracterização estrutural

Estudos cristalográficos e de difração de raios-X foram realizados com os propósitos de que cristais refratáveis de ambos os inibidores fossem obtidos e suas estruturas moleculares tridimensionais resolvidas

6.8 Cristalização e resolução da estrutura do inibidor VuCys1

6.8.1 A estrutura tridimensional do inibidor VuCys1 de feijão-caupi

Experimentos preliminares de cristalização utilizando o método da “gota sentada” foram realizados nos quais 576 diferentes condições de cristalização foram avaliadas. Destas, três levaram à formação e crescimento de cristais difratáveis da cistatina de *Vigna unguiculata*, VuCys1, entretanto, nenhuma das condições avaliadas ocasionou a formação de cristais da cistatina VuCys2. Os cristais de VuCys1 foram caracterizados por pertencerem ao grupo espacial ortorrômbico, seguindo o padrão (19), $P2_12_12_1$ e as células unitárias apresentaram as dimensões $a = 41,84$, $b = 64,68$ e $c = 87,91$ Å, com os ângulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

Os cristais foram incididos com feixes de raios-X produzidos por um difratômetro MicroMax 007 (Rigaku) e a estrutura molecular tridimensional do inibidor foi resolvida a uma resolução de 1.95 Å (Figura 14), através do método de substituição molecular sendo utilizada a estrutura da cistatina de taro (CHU *et al.*, 2011), PDB 3IMA, como molde. O modelo final refinado da estrutura apresentou um fator R (R_{Factor}) de 19,90%, ($R_{Free} = 22,76\%$) para 17589 reflexões. A tabela 9 mostra de forma detalhada os dados coletados a partir da difração dos cristais e a estatística referente aos parâmetros de refinamento da estrutura. A estrutura molecular da cistatina de um domínio inibitório de feijão-caupi, VuCys1, é, ao nosso conhecimento, a primeira estrutura cristalográfica resolvida de uma fitocistatina pertencente a um membro da família Fabaceae.

Curiosamente, como pode ser observado na figura 15 e na figura 16, onde é dado ênfase ao padrão de hidrofobicidade, a estrutura tridimensional obtida para VuCys1 segue um padrão, até o momento, descrito apenas para cistatinas animais conhecido como “3D domain swapping dimmer”, aqui traduzido simplesmente como “dímero de domínios trocados”. Todas as outras fitocistatinas, cujas estruturas foram resolvidas e depositadas no “Protein Data Bank”, até o momento, apresentaram-se na forma monomérica, sendo estas: a orizacistatina-I do arroz, PDB 1EQK, que foi solucionada por ressonância magnética nuclear – RMN, por Nagata *et al.*, (2000), a cistatina de batata, na verdade um dos oito domínios inibitórios (domínio 2) que compõem a multicistatina de batata, PDB 2W9Q, resolvida por difração de raios-X a uma resolução de 2,5 Å, por Nissen *et al.*, 2009, a cistatina de taro complexada à papaína, PDB 3IMA, resolvida por difração de raios-X a uma resolução de 2,03 Å, por Chu *et al.*, (2011) e a cistatina de abacaxi, PDB 2L4v (depositado em 2011), cuja estrutura foi depositada, mas os dados não foram publicados até o momento (Figura 17).

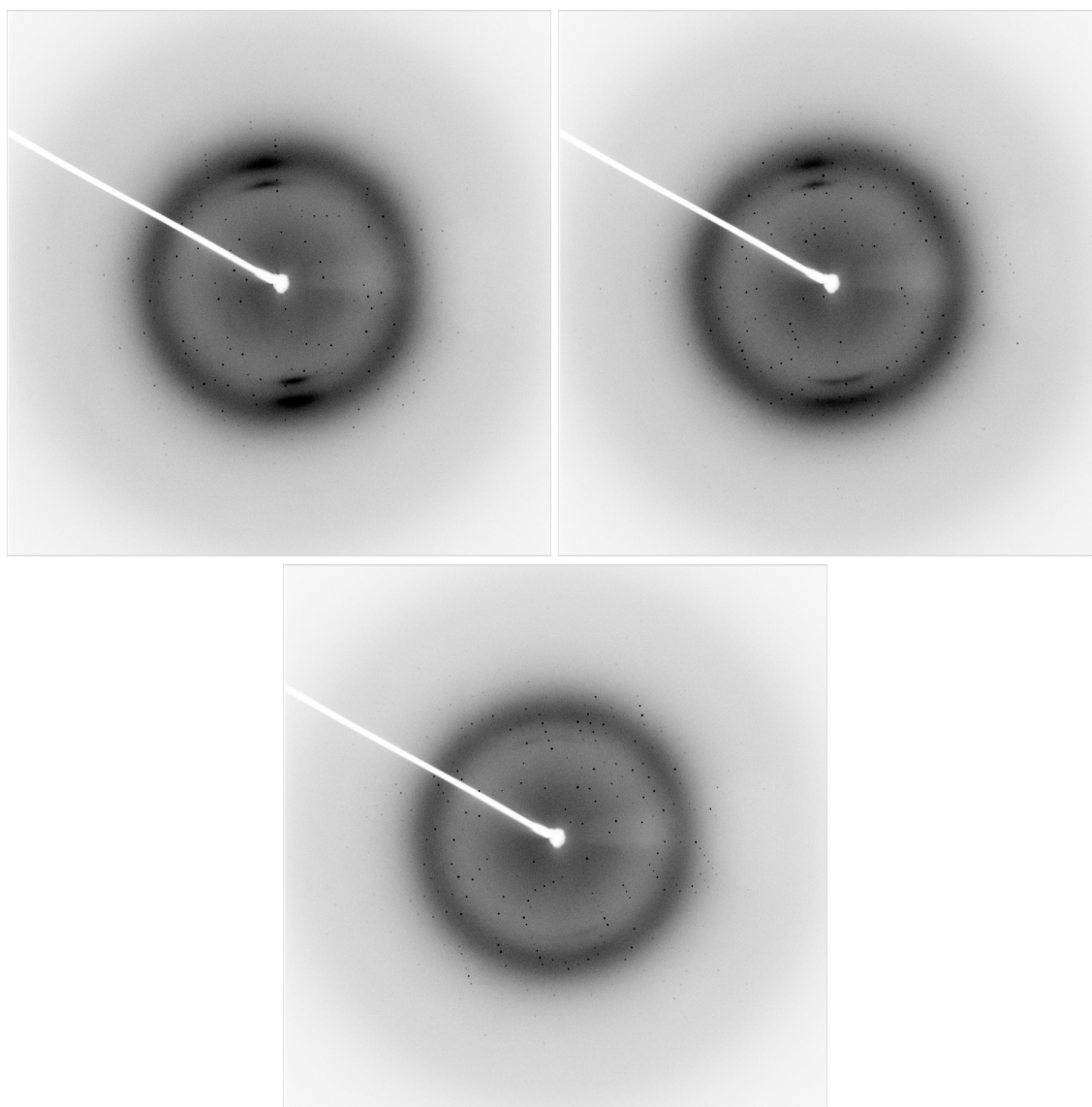


Figura 14. Diferentes imagens representativas do padrão de difração de cristais de *VuCys1*, submetidos a feixe produzido por um difratômetro MicroMax 007 (Rigaku) no comprimento de onda de 1,54 Å.

Tabela 9. Coleta de dados e estatística de refinamento da estrutura do dímero de domínios trocados da cistatina de feijão-caupi, *VuCys1*

Coleta e refinamento	Cistatina (Dímero de domínios trocados)
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensões da célula unitária (Å) <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> .	41,84; 64,68; 87,91
Detector	Rigaku RaxisIV++
Fonte de raios-X	Rigaku MicroMax 007
Comprimento de onda (Å)	1,54
Faixa de resolução	30,0-1,95 (2,07-1,95)
Redundância	3,8 (3,48)
R_{meas} (%)	6,4 (39,7)
Completeza (%)	98,5 (97,0)
Número de reflexões totais	67098 (9567)
Reflexões únicas	17608 (2749)
$I / \sigma(I)$	16,99 (3,49)
Parâmetros de refinamento	
Reflexões usadas no refinamento	17589
R_{factor} (%)	19,90
R_{free} (%)	22,76
Número de átomos de proteína	1327
Número de átomos de ligantes	9
Diagrama de Ramachandran	
Regiões mais favoráveis (%)	98,11
Resíduos em região não permitida	0
RMSd da geometria ideal	
R.m.s. do comprimento de ligação (Å)	0,016
R.m.s. do ângulo de ligação (°)	0,995

Os dados de difração dos cristais foram coletados no Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Laboratório de Cristalografia de Proteínas da Universidade de São Paulo (USP), com um feixe de raios X na linha Rigaku MicroMax 007, a $\lambda = 1,54$ Å.

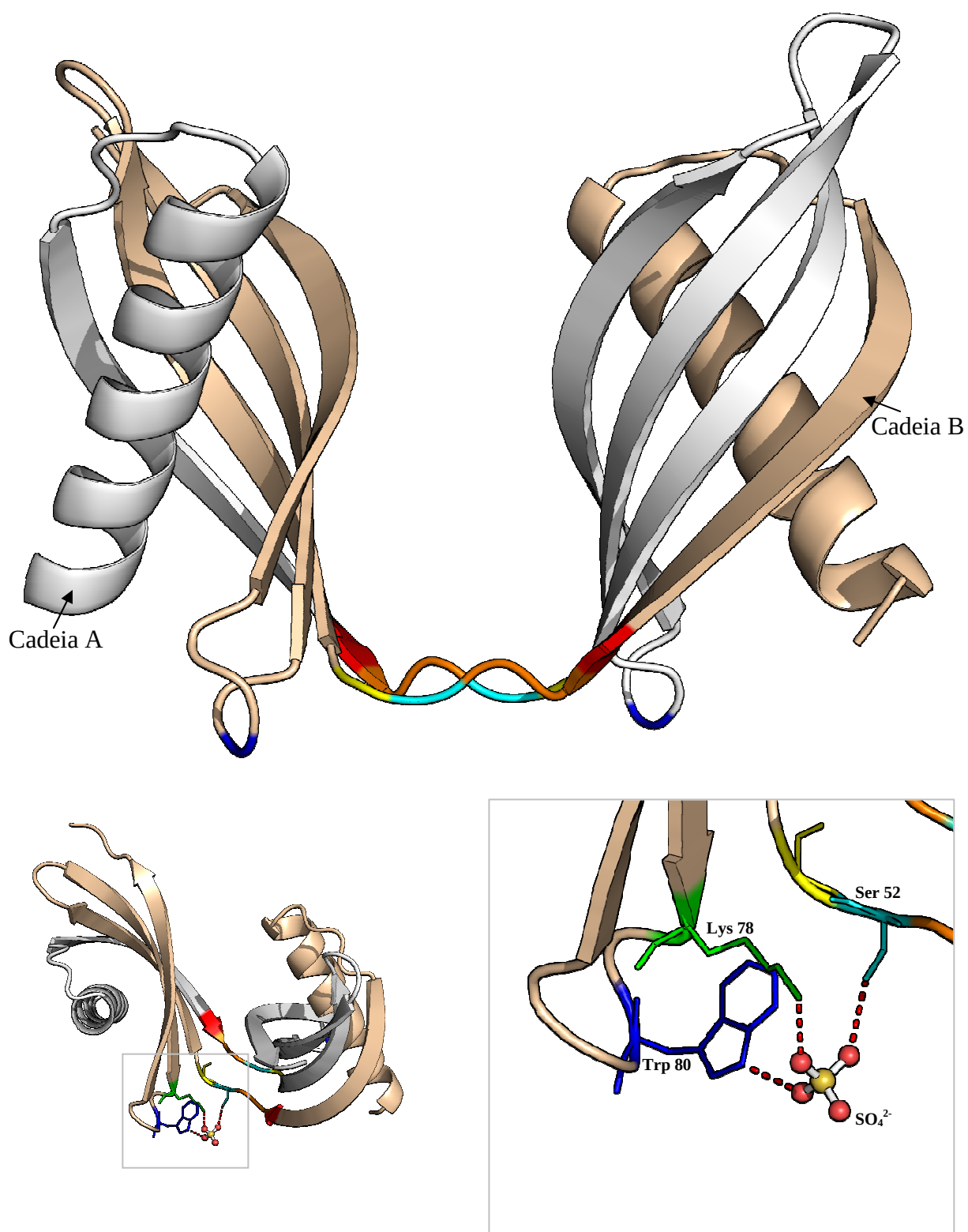


Figura 15. Estrutura cristalográfica do dímero de domínios trocados da cistatina de feijão-caupi resolvida a uma resolução de 1,95 Å. O dímero é formado por duas moléculas de inibidor, onde a molécula A (cadeia A) está representada em branco e a molécula B (cadeia B) em marrom. Na ilustração inferior é mostrado ainda o detalhe da interação dos aminoácidos Trp 80 (azul), Lys 78 e Ser 52 com uma molécula de sulfato (SO_4^{2-}).

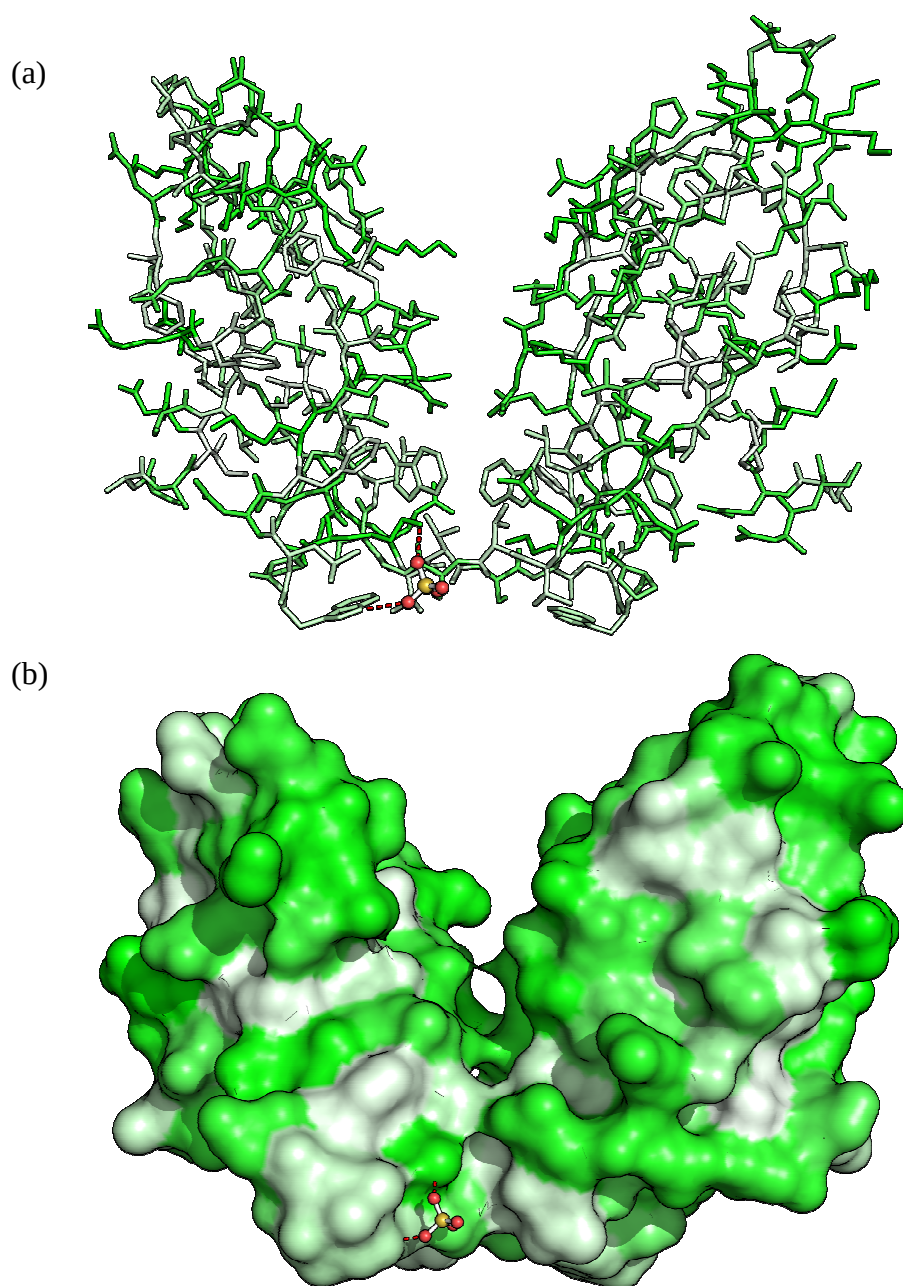


Figura 16. Estrutura molecular do dímero de domínios trocados do inibidor recombinante *VuCys1* de feijão-caupi representado no modo “line” ilustração (a) e no modo “superfície”, ilustração (b). Ambas as ilustrações evidenciam o padrão de hidrofobicidade do inibidor recombinante. Quanto maior o grau de hidrofobicidade mais verde a estrutura da proteína será. Na região inferior de ambos os modelos é mostrado o detalhe da interação entre uma molécula de sulfato (SO₄²⁻) com os resíduos Lys78 e Trp79.

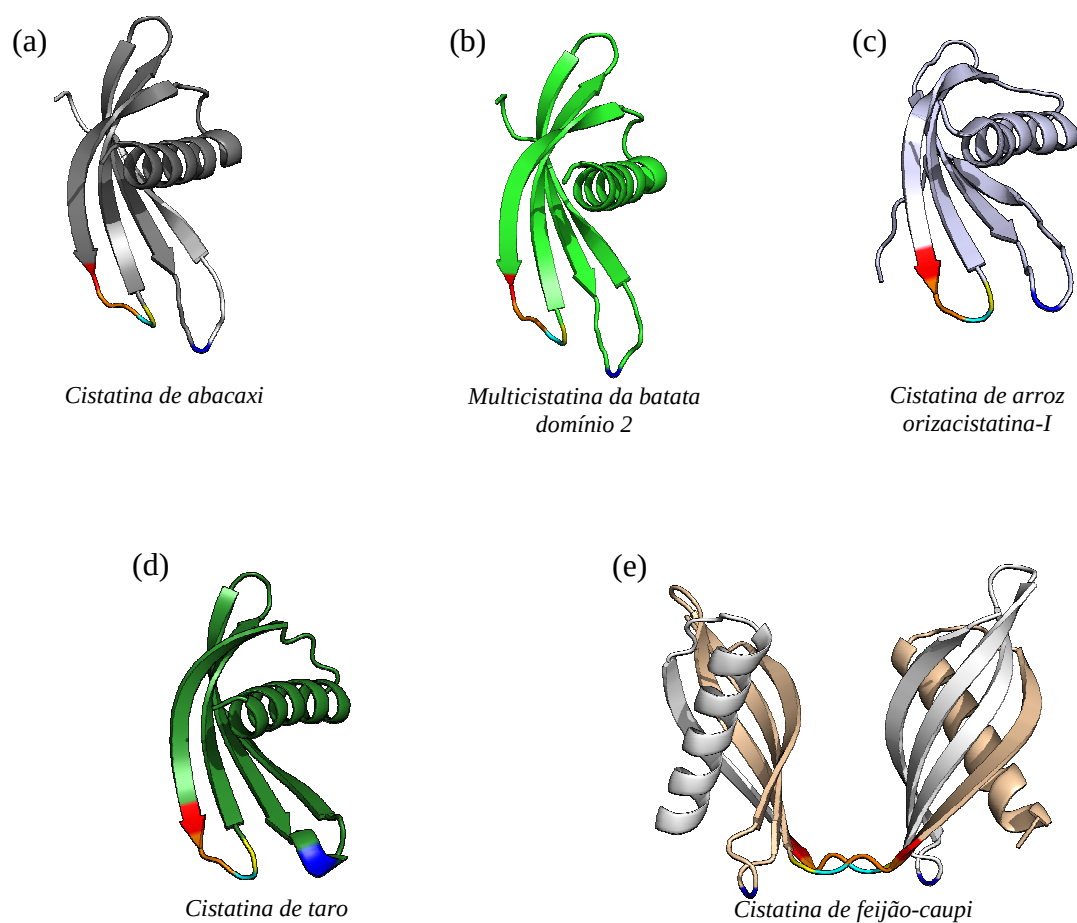


Figura 17. Comparação entre as estruturas tridimensionais de cistatinas de plantas resolvidas até o momento, com a estrutura da cistatina de feijão-caupi resolvida no presente trabalho. (a) - estrutura cristalográfica da cistatina de abacaxi, PDB 2L4v, (b) - estrutura cristalográfica do domínio 2 da multicistatina da batata, PDB 2W9Q, (c) estrutura tridimensional da cistatina do arroz resolvida por ressonância magnética nuclear, PDB 1EQK, (d) estrutura cristalográfica da cistatina de taro, PDB 3IMA e (e) estrutura cristalográfica da cistatina de único domínio de feijão-caupi (ainda não deposita no *protein data bank*). As ilustrações foram preparadas utilizando o software PyMol e em todos os casos, os resíduos de aminoácidos localizados na região N-terminal dos inibidores foram removidos para facilitar a comparação das diferentes estruturas. Os aminoácidos que participam do primeiro loop inibitório (Loop L1) estão destacados em vermelho (Gln), laranja (Val), azul ciano (Ser/Ala) e amarelo (Gly). O triptofano conservado do segundo “loop” inibitório (Loop L2) está destacado em azul.

6.8.2 O dímero de domínios trocados

Dímeros de domínios trocados já são bem descritos na literatura para diversos grupos de proteínas (BENNETT *et al.*, 1995) e foram inicialmente definidos em estudos estruturais relativos à toxina da difteria no trabalho de Bennet *et al.*, (1994). No caso particular de cistatinas, um dos casos mais bem estudados deste tipo de interação é o da cistatina C humana (KOZAK *et al.*, 1999; JANOWSKI *et al.*, 2001; JANOWSKI *et al.*, 2004; SANDERS *et al.*, 2004; ORLIKOWSKA *et al.*, 2011).

A formação dos dímeros de domínios trocados na cistatina C humana pode ocorrer por associação de duas ou mais moléculas mutantes do inibidor, dando origem a agregados protéicos insolúveis. A deposição destes agregados pode causar um tipo de amiloidose, chamada angiopatia amiloidal cerebral, um processo patológico onde os agregados protéicos insolúveis de cistatina C depositam-se em vários tecidos, incluindo o sistema vascular cerebral, onde causam hemorragia cerebral e podem levar à morte (ÁSGEIRSSON *et al.*, 1998; OLAFSSON e GRUBB, 2000; LEVY *et al.*, 2006).

Os mecanismos bioquímicos pelos quais estes dímeros são formados ainda não são muito claros (JANOWSKI *et al.*, 2005), o que dificulta que seja predita a capacidade que uma determinada proteína terá de formar tais dímeros. Contudo, as alterações conformacionais que precedem a formação de dímeros de domínios trocados estão, em muitos casos, centradas em alguns resíduos de aminoácidos que compõem “loops” flexíveis. Estas estruturas “flexibilizadas” por tais aminoácidos podem ser desestabilizadas de modo que “loops” e “voltas” (estruturas fechadas) podem ser abertos e assim ficarem passíveis de sofrer o fenômeno de troca de domínios. Tal fenômeno de desestabilização de “loops” e “voltas” é observado na família das cistatinas (SZYMAŃSKA *et al.*, 2009).

6.8.2.1 Na forma dimérica o inibidor é quimicamente inativo

Como já mencionado na fundamentação teórica e em outros locais deste trabalho, cistatinas apresentam em sua estrutura molecular três regiões “canônicas” de contato e interação com o sítio ativo de proteinases cisteínicas. Sendo estas, um resíduo de Gly e o “loop” (L1) ambos localizados na região N-terminal do inibidor e o “loop” (L2) formado por um resíduo de Pro seguido de um resíduo aromático, normalmente Trp, localizado na porção C-terminal da molécula (BODE *et al.*, 1988., HONG *et al.*, 2007; SHAH e BANO, 2009).

Quando duas cistatinas interagem entre si formando dímeros de domínios trocados o “loop” L1 sofre uma alteração conformacional passando a existir como estrutura em fita estendida, o que impossibilita estericamente que haja interação entre os resíduos de aminoácidos desta região e aqueles presentes no sítio ativo da proteinase. Como consequência, no caso particular das cistatinas a formação do dímero de domínios trocados leva à inativação do inibidor (EKIEL e ABRAHAMSON, 1996). A figura 18 ilustra o mecanismo de abertura do “loop” L1 de *VuCys1*, tomando como referência de forma monomérica a cistatina de taro (CHU *et al.*, 2011). A figura 19 ilustra de modo comparativo detalhes estruturais do “loop” L1 na sua forma aberta na estrutura dimérica de *VuCys1* e da cistatina C humana.

6.8.3 Significado fisiológico

Como já relatado, os dímeros de cistatina C estão envolvidos em condições patológicas já bem estudadas. A ausência de trabalhos relatando a formação de dímeros de domínios trocados em cistatinas de plantas, contudo, limita bastante a discussão sobre os possíveis significados fisiológicos deste mecanismo molecular de interação para a cistatina de feijão-caupi, *VuCys1*. Contudo, algumas hipóteses são aqui levantadas a fim de explicar a razão bioquímica/fisiológica para a existência dos dímeros de domínios trocados na cistatina *VuCys1*. É importante, porém, deixar claro que toda a discussão a seguir é feita tendo como pressuposto a possibilidade de que a organização de *VuCys1* em dímeros de domínios trocados seja algo que possa ocorrer no vegetal e não apenas nas condições de cristalização utilizadas.

6.8.3.1 Defesa contra estresses abióticos

Uma hipótese que pode ser levantada com base na estrutura obtida é a de que a formação do dímero talvez ocorra em condições bem específicas e em uma fração de moléculas de inibidor, não necessariamente todas. Em situações de elevada temperatura, como as utilizadas nos ensaios de desnaturação térmica, talvez haja a formação dos dímeros e esse arranjo poderia proteger as moléculas dos inibidores envolvidas na interação, da desnaturação térmica. Com o abaixamento da temperatura os dímeros seriam desfeitos e as proteínas assumiriam suas formas monoméricas e ativas. Suportando esta hipótese, estudo

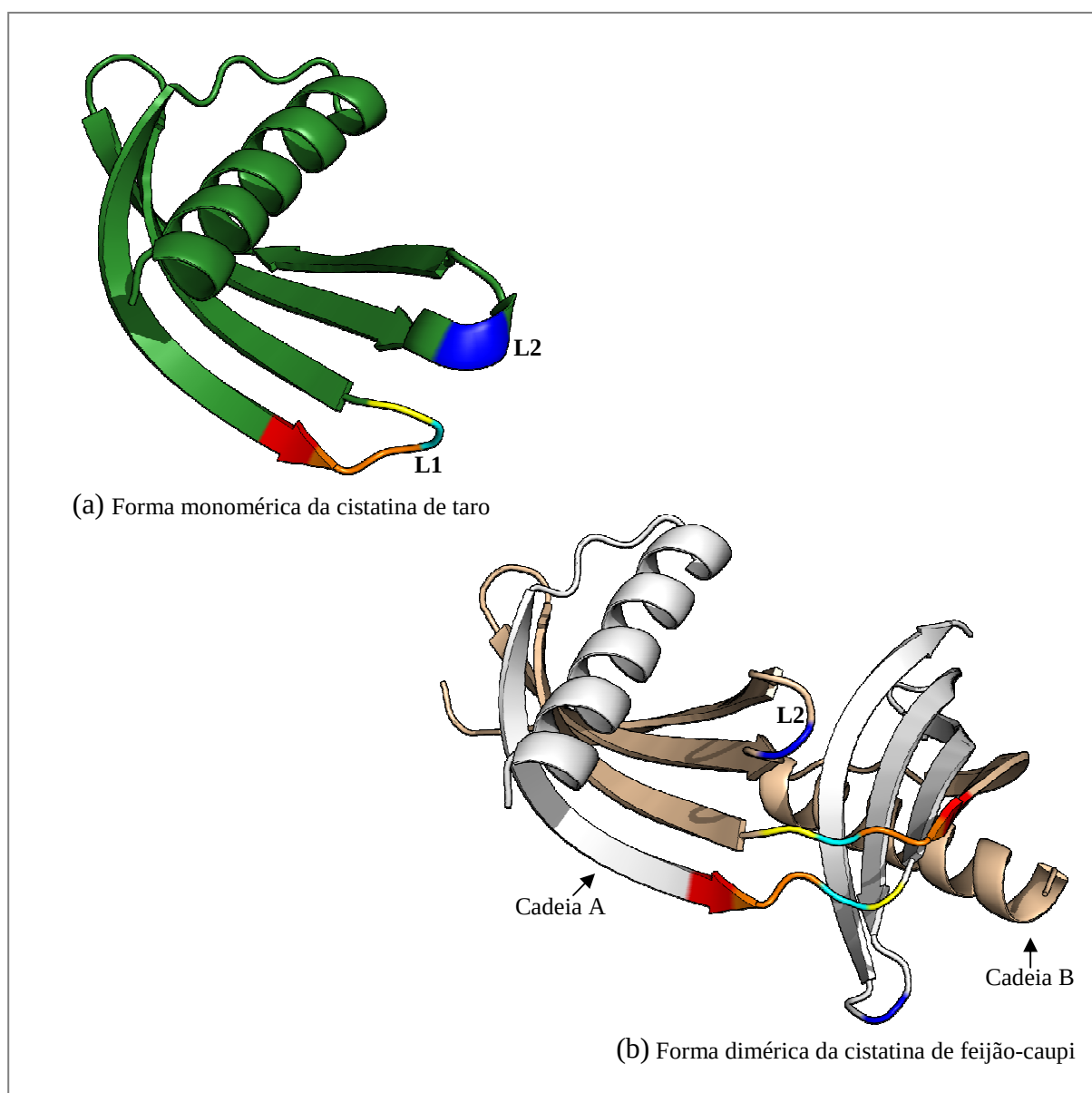


Figura 18. Alteração na conformação do loop inibitório (L1) durante a formação do dímero de domínios trocados. Em sua conformação ativa uma cistatina apresenta dois loops que compõem os domínios inibitórios, chamados loop (L1) e loop (L2). Em (a), estes loops são evidenciados na cistatina de taro. Quando há a formação do dímero de domínios trocados, cada molécula de inibidor (cadeia A e cadeia B) se distende de modo que L1 de ambas as cadeias assume uma conformação de fita estendida, como ocorre com a cistatina de feijão-caupi, figura (b). As cadeias A e B são evidenciadas em branco e marrom, respectivamente.

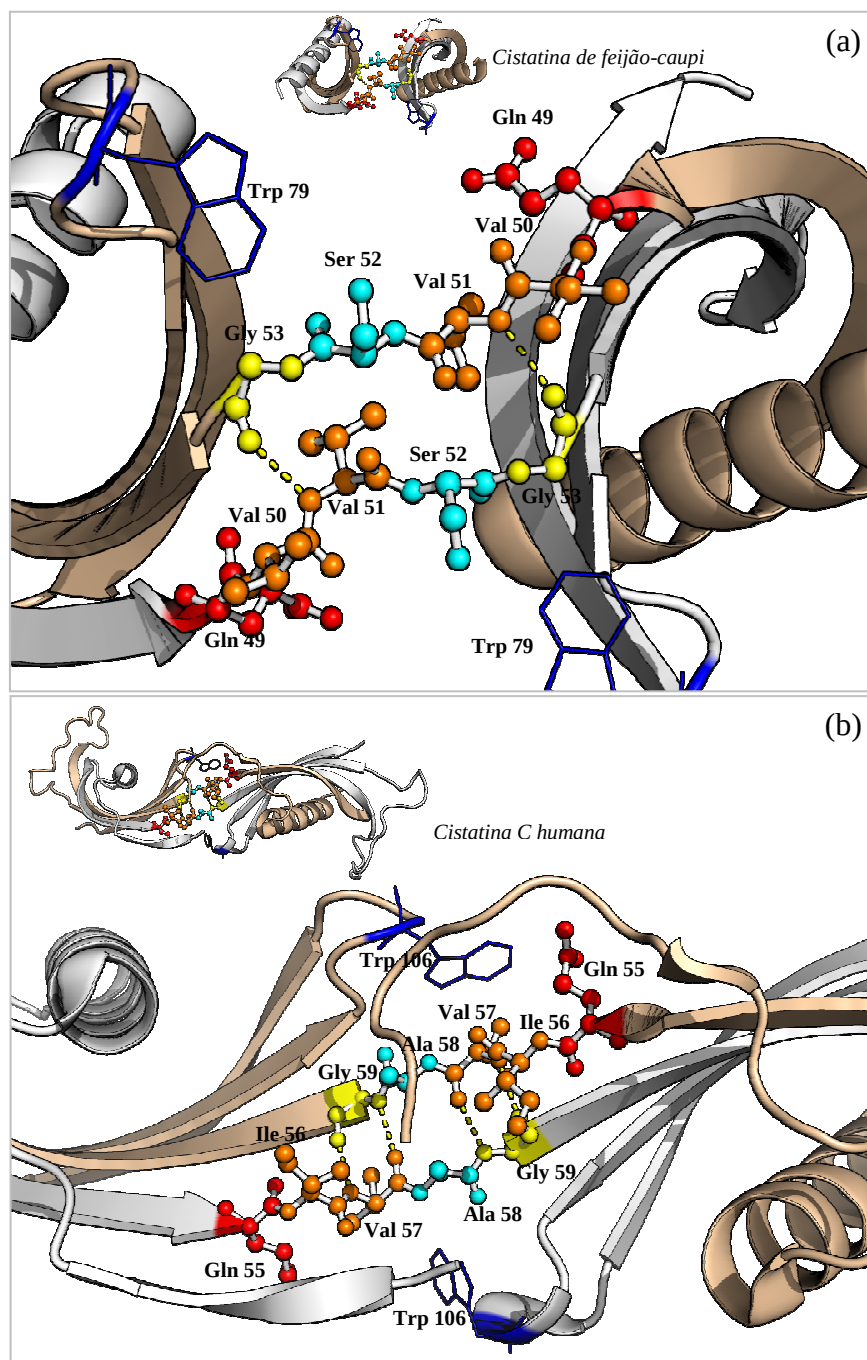


Figura 19. Detalhe da alteração conformacional sofrida no loop L1 de duas cistatinas que se associam formando dímeros de domínios trocados. (a) Estrutura cristalográfica da cistatina de feijão-caupi (resolvida no presente trabalho), (b) estrutura cristalográfica da cistatina C humana, PDB 1TIJ (JANOWSKI *et al.*, 2005). O resíduo de Trp conservado no loop L2 de cada inibidor (o qual não é afetado pela formação do dímero) está destacado em azul.

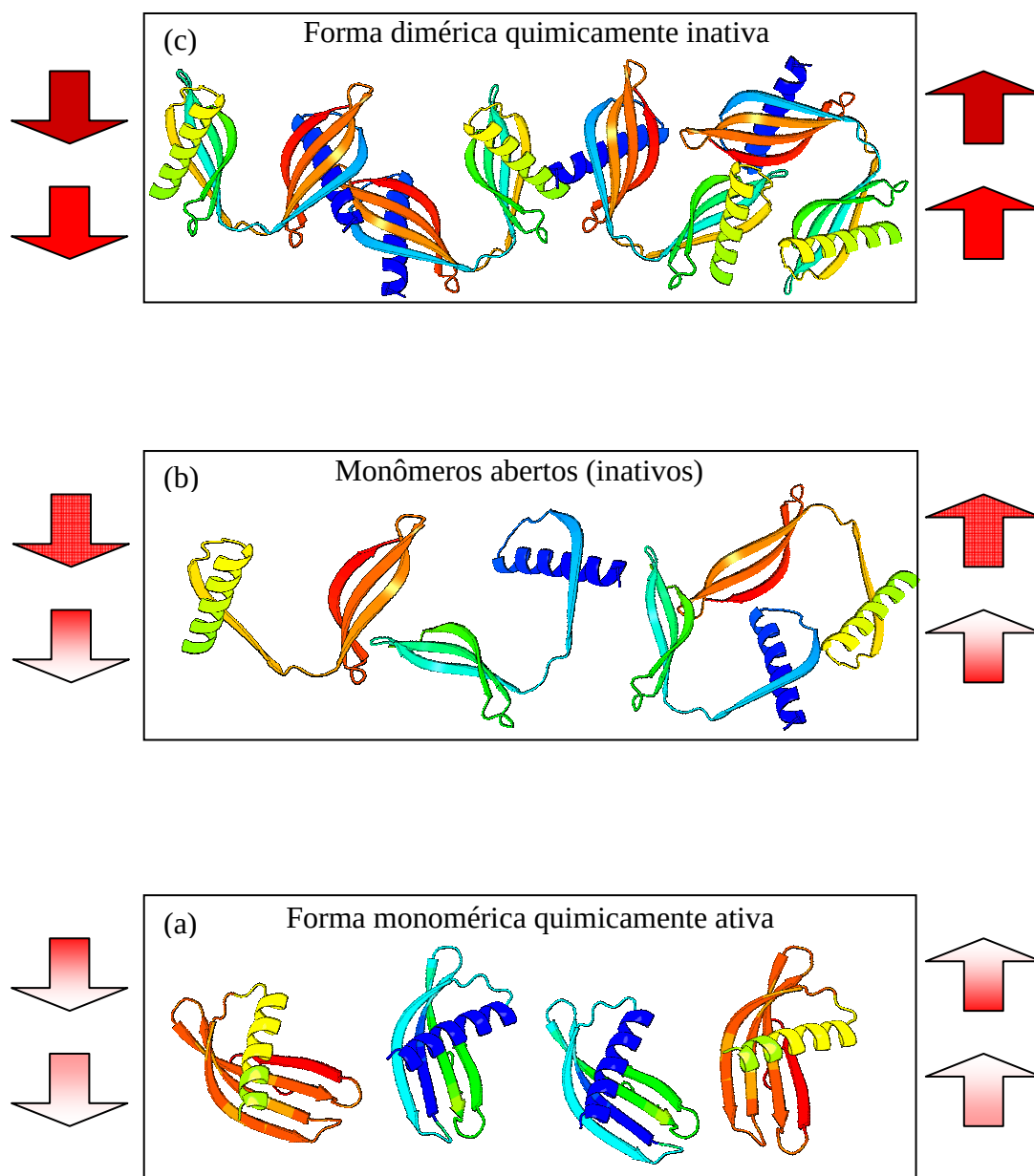
pioneiro sobre o mecanismo de formação de dímeros de domínios trocados na cistatina C humana, (EKIEL e ABRAHAMSON, 1996) mostrou que alguns dos fatores que propiciam a dimerização do inibidor são baixos valores de pH e elevadas temperaturas. Além disso, uma ideia que inclusive já foi apresentada na discussão dos resultados de estabilidade verificados por CD é a de que a formação de pontes de hidrogênio poderia ser um dos grandes fatores para explicar a estabilidade dos inibidores, com base nos dados obtidos nos trabalhos de Vogt *et al.*, (1997) e Kumar *et al.*, (2000). De posse desta informação, o padrão de pontes de hidrogênio intra e inter cadeia do dímero de domínios trocados foi verificado (Figura 20). Como pode ser observado na figura 20 há uma extensa rede de pontes de hidrogênio entre os dois monômeros que formam o dímero, o que pode dar suporte à sugestão de que pontes de hidrogênio podem atuar como forças estabilizadoras da proteína em condições extremas de pH e, principalmente, temperatura.

É importante lembrar que os estudos de dicroísmo circular realizados com VuCys1 mostraram, particularmente nas medidas realizadas em condições de elevada temperatura, que o inibidor não desnaturou quando aquecido a 80 e 90 °C, contudo, nestas mesmas temperaturas, foi observada uma alteração no espectro de CD (Gráfico 5 *a*). A incubação do inibidor em diferentes valores de pH também não causou alteração tão pronunciada no seu padrão e conteúdo de estruturas secundárias, contudo a pH 2 foi possível observar uma queda no sinal dos espectros (Gráfico 5 *b*). Estes dois dados são interessantes, pois podem não só indicar, ou melhor, sugerir que naquelas condições (elevadas temperaturas e baixos valores de pH) VuCys1 encontrava-se na sua forma nativa, como também, com base no trabalho de Ekiel e Abrahamson, (1996), podem ser um indicativo da presença da estrutura dimérica, o que ocasionaria as alterações observadas nos espectros. Em adição, como mencionado, a formação do dímero poderia funcionar como um mecanismo de auto-associação e proteção do inibidor em condições extremas, como as testadas, particularmente devido à intensa rede de pontes de hidrogênio (Figura 20). A figura 21 ilustra a possível relação aqui levantada, com base nos dados experimentais de CD e nos estudos cristalográficos, bem como no trabalho de Ekiel e Abrahamson, (1996), entre a temperatura e a formação dos dímeros de domínios trocados de VuCys1.

Se os dímeros de domínios trocados ocorrem em *Vigna unguiculata* é possível, do ponto de vista da planta, que a formação destas estruturas possa resultar no ajuste e adaptação do vegetal, particularmente, para situações de estresse abiótico, como escassez de água e extremos de temperatura. Nestas condições uma das ações “extremas” que os vegetais podem realizar consiste na morte celular e queda de folhas, a fim de evitar desidratação excessiva por

Elevadas temperaturas

Elevadas temperaturas



Baixas temperaturas

Baixas temperaturas

Figura 21. Mecanismo hipotético proposto com base na estrutura cristalográfica do inibidor VuCys1 para tentar explicar a estabilidade térmica da proteína. Em condições de baixas temperaturas, ou mesmo temperatura ambiente, o inibidor VuCys1 encontra-se na forma monomérica e quimicamente ativa (a). À medida que há elevação da temperatura do meio, de acordo com este modelo, os monômeros assumem uma conformação parcialmente aberta (b). Em temperaturas mais extremas, *i.e.*, acima de 80 °C, os monômeros abertos associam-se em dímeros de domínios trocados, que por sua vez são quimicamente inativos (c). Com o abaixamento da temperatura o processo é revertido, originando as formas monoméricas corretamente enoveladas e quimicamente ativas das cistatinas. Este mecanismo foi proposto tendo como base os dados de dicroísmo circular e os estudos cristalográficos realizados com VuCys1.

estes órgãos. Tendo em vista que proteinases cisteínicas vegetais semelhantes às caspases humanas parecem estar envolvidas no processo de morte celular programada, bem como da resposta hipersensitiva de plantas (POZO e LAM, 1998; SOLOMON, 1999), parece razoável especular que o “empacotamento” e inativação das cistatinas na forma de dímeros, possam consistir em mecanismos de ajustes do vegetal à condição do estresse.

Belenghi *et al.*, (2003) demonstraram que a super expressão da cistatina de *Arabidopsis thaliana*, AtCYS1 (*Arabidopsis thaliana* cystatin 1), tanto em cultura de células de *A. thaliana*, como em plantas transgênicas de fumo suprimiu a morte celular induzida por patógenos avirulentos, bem como por óxido nítrico. Dentro da linha de discussão referente ao estresse hídrico, Zagdanska e Wisniewski (1996) mostraram que plantas de trigo submetidas a este estresse apresentaram um aumento significativo (1306 vezes) nos níveis de proteinases cisteínicas em folhas de plantas estressadas com relação às plantas controle (não estressadas). A questão que os autores levantaram, contudo, é se os níveis aumentados destas enzimas estariam relacionados à reorganização das proteínas celulares da planta sob estresse ou à desintegração completa da célula vegetal.

Estes dados podem reforçar a hipótese de que durante a formação dos dímeros de domínios trocados os inibidores, quimicamente inativos e incapazes de interagir com proteinases cisteínicas (EKIEL e ABRAHAMSON, 1996), sejam assim bloqueados, de modo que as proteinases livres possam atuar sobre as proteínas estruturais, de armazenamento e enzimáticas dispersas no citosol, levando à morte celular e, em última instância, a uma possível queda foliar.

Contudo, seguindo outra linha de raciocínio, não se pode deixar de atentar para o fato de que muitas fitocistatinas têm sido relatadas como tendo seus níveis de transcritos primários e protéicos aumentados em situações de seca (MASSONNEAU *et al.*, 2005 e HUANG *et al.*, 2007). Entretanto, estes mesmos trabalhos não refutaram a possibilidade de que nas condições de seca e elevadas temperaturas essas cistatinas induzidas (todas ou algumas moléculas) estivessem interagindo entre si como dímeros de domínios trocados. Por conseguinte, a hipótese a ser levantada é a de que o balanço entre o número de moléculas de inibidor presentes na forma monomérica e o número de moléculas presentes na forma dimérica, seria um dos fatores que determinaria o grau de ajuste e adaptação do vegetal em condições de estresses abióticos.

A conclusão desta discussão, entretanto, é a de que não se pode resumir todo o mecanismo de ajuste bioquímico e fisiológico que um vegetal sofre, sob qualquer que seja a condição de estresse, ao balanço de uma ou duas proteínas. Na verdade, este é um processo

bem mais complexo que envolve, além do equilíbrio entre os níveis de enzimas proteolíticas e seus inibidores, a ativação de diversas cascatas de reações, transdução de sinais, ativação de sistemas anti-oxidativos enzimáticos e não enzimáticos, dentre outros ajustes bioquímicos e fisiológicos.

6.8.3.2 Defesa contra estresses bióticos

Outra possível explicação para a formação *in planta* dos dímeros de domínios trocados é que este seria um mecanismo modulador da atividade do inibidor quando a planta estivesse em condição de estresse biótico. Em condições normais, o vegetal produziria parte das moléculas do inibidor em uma forma inativa (dímero de domínios trocados) e estas permaneceriam armazenadas. No momento em que as condições físico-químicas do ambiente celular, particularmente força iônica e pH fossem alteradas pela ação predatória de um inseto, ou mesmo um fitonematóide intracelular, por exemplo, os dímeros seriam desfeitos originando formas monoméricas ativas dos inibidores prontas para contra atacar as enzimas proteolíticas do predador.

De fato, Walsh e Strickland (1993) postularam que a formação de cristais nativos da multicistatina da batata, os quais não são funcionais em termos de atividade inibitória, poderia ser um mecanismo de defesa do vegetal. Em soluções de baixo pH, como o suco gástrico moderadamente ácido do intestino de insetos, os cristais seriam dissolvidos originando as formas monoméricas ativas do inibidor que seriam capazes de suprimir a atividade das enzimas digestivas dos insetos. Entretanto, é importante lembrar que, diferentemente da explicação proposta para os cristais da multicistatina de batata, baixos valores de pH, segundo Ekiel e Abrahamson, (1996), podem levar à formação dos dímeros e domínios trocados e não sua desestabilização. Assim, para que a hipótese do estresse biótico aqui levantada possa fazer sentido, à luz do proposto por Ekiel e Abrahamson, (1996) é preciso que seja considerado um cenário onde o ambiente celular esteja com pH tendendo mais à neutralidade do que à acidez, ou ainda, que as secreções liberadas por insetos fitófagos, ou mesmo fitonematóides tenham a mesma característica de pH.

É importante ressaltar que o exposto nesta discussão ainda é muito especulativo, mas, como já citado, a formação de dímeros de domínios trocados, pelo menos ao momento, era um fato ainda não descrito para fitocistatinas, o que torna a exposição e discussão de ideias um pouco limitada à elaboração de conjecturas.

Nenhuma destas possibilidades, contudo, poderiam ser levantadas se não estivessem disponíveis as informações relativas à estrutura molecular do inibidor, reafirmando mais uma vez a importância e necessidade do conhecimento da estrutura de uma molécula para compreensão de seu comportamento químico e suas funções biológicas.

Agora, diante dos dados estruturais, é necessário que experimentos adicionais sejam realizados a fim de se determinar com maior precisão qual ou quais condições bioquímicas e se possível, fisiológicas, podem levar à formação dos dímeros de domínios trocados na cistatina *VuCys1* de feijão-caupi.

7 CONCLUSÕES

Dois inibidores de proteinases cisteínicas de *Vigna unguiculata*, aqui denominados VuCys1 e VuCys2 foram expressos de forma solúvel em células de *Escherichia coli*. As proteínas recombinantes foram purificadas por homogeneidade e caracterizadas como sendo capazes de tolerar condições extremas de temperatura e pH. Ambas as cistatinas inibiram diferencialmente proteinases cisteínicas, mas não apresentaram efeitos sobre a proteinase serínica tripsina.

Do ponto de vista da caracterização biológica nenhuma das proteínas foi ativa contra os fungos fitopatogênicos, microrganismos patogênicos e as linhagens de células tumorais testadas no presente trabalho. Entretanto, é importante destacar que modelos biológicos adicionais de fungos, microrganismos e células cancerosas podem ser testados a fim de que se possa ampliar a exploração do potencial biotecnológico das proteínas recombinantes. Ambos os inibidores mostraram elevada ação inibitória sobre as enzimas digestivas de larvas de *Callosobruchus maculatus* sendo, porém, apenas fracamente ativos contra as enzimas digestivas isoladas de larvas de *Zabrotes subfasciatus*. Contudo, os efeitos da administração de dieta contendo os inibidores recombinantes em bioensaio realizado contra *C. maculatus* não diferiram daqueles obtidos para a dieta controle. A aparente discrepância entre os dados de inibição *in vitro* e aqueles obtidos dos bioensaios pode sugerir que nos testes *in vivo* as larvas de *C. maculatus* tenham a capacidade de desenvolver mecanismos adaptativos à presença dos inibidores, compensando seus efeitos deletérios.

A estrutura tridimensional do inibidor VuCys1 foi resolvida por difração de raios-X, a uma resolução de 1,95 Å. A estrutura refinada do inibidor apresenta o aspecto de um dímero de domínios trocados, um arranjo molecular já bem relatado para cistatinas animais, porém pouco usual para cistatinas de plantas. Trabalhos adicionais precisam ser realizados a fim de que seja verificado se estes dímeros podem ocorrer *in vivo*, ou seja, nos tecidos do vegetal e, caso ocorram, qual seu significado fisiológico.

Os resultados deste trabalho complementam aqueles já obtidos, não só em relação às cistatinas de feijão-caupi, mas em relação a todas as cistatinas já caracterizadas e abrem possibilidades para que novos estudos possam ser realizados, particularmente com relação aos experimentos de cristalização e aos bioensaios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M., ABE, K., KURODA, M., ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.

ABE, M., ABE, K., IWABUCHI, K., DOMOTO, C., ARAI, S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. **J Biochem.**, v. 116, p. 488 – 492, 1994.

ABE, K., ARAI, S. Purification of a cysteine proteinase inhibitor from rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, p. 3349-3350, 1985.

ABE K., KONDO, H., ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agric. Boil. Chem.**, v. 51, p. 2763-2768, 1987.

ABE, K., KONDO, H., WATANABE, H., EMORI, Y., ARAI, S. Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds. **Biomed. Biochim. Acta**, v. 50, p. 637-641, 1991.

ABRAHAMSON, M., RITONJA, A., BROWN, M.A., GRUBB, A., MACHLEIDT, W., BARRET, A.J. Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 2621, p. 9688-9694, 1987.

ADAMS, P.D., AFONINE, P.V., BUNKÓCZI, G., CHEN, V.B., DAVIS, I.W., ECHOLS, N., HEADD, J.J., HUNG, L.-W., KAPRAL, G.J., GROSSE-KUSTLEVE, R.W., MCCOY, A.J., MORIARTY, N.W., OEFFNER, R., READ, R.J., RICHARDSON, D.C., RICHARDSON, J.S., TERWILLIGER, T.C., ZWART, P.H. Phenix: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta crystallographica, Section D**, v. 66, p. 213-221, 2010.

AGUIAR, J., FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., BLOCH-JUNIOR, C., MONTEIRO, A.C.S., FLORES, V.M.Q., JACINTO, T., XAVIER-FILHO, J., OLIVEIRA, A.E.A.,

GROSSI-DE-SÁ, M.F., FERNANDES, K.V.S. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**. v. 63, p. 662-670, 2006.

ALMAGRO, L., GÓMEZ-ROS, L.V., BELCHI-NAVARRO, S., BRU, R., BARCELÓ, A.R., PEDREÑO, M.A. Class III peroxidases in plant defense reactions. **Journal of Experimental Botany (JXB)**, v. 60, p. 377-390, 2009.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANASTASI, A., BROWN, M.A., KEMBHAVI, A.A., NICKLIN, M.J.H., SAYERS, C.A., SUNTER, D.C., BARRET, A.J. Cystatin a protein inhibitor of cysteine proteinases. **Biochemical Journal**. v. 211, p. 129-138, 1983.

ARAI, S., MATSUMOTO, I., EMORI, Y., ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6612-6617, 2002.

ARAÚJO-FILHO, J.H., VASCONCELOS, I.M., MARTINS-MIRANDA, A.S., GONDIM, D.M.F., OLIVEIRA, J.T.A. A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. Has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4090-4096, 2010.

ÁSGEIRSSON, B., HAEBEL, S., THORSTEINSSON, L., HELGASON, E., GUDMUNDSSON, K.O., GUDMUNDSSON, G., ROEPSTORFF, P. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the Leu-68 - Gln cystatin C variant in cerebrospinal fluids and monocyte cultures by MS. **Biochem. J.**, v. 329, p. 497-503, 1998.

BARRET A.J. The cystatins – a new class of peptidase inhibitors. **Trends Biochem. Sci.**, v. 12, p. 193-196, 1987.

BARRET, A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol.**, v. 244, 1994, p. 765.

BARRET, A.J., FRITZ, H., GRUBB, A., ISEMURA, S., JÄRVINEN, M., KATUNUMA, N., MACHLEIDT, W., MÜLLER-ESTERL, W., SASAKI, M., TURK, V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochemical Journal**, v. 236, p. 312, 1986.

BARRET, A.J., McDONALD, J.K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v. 237, p. 935, 1986.

BARRET, A.J., TOLLE, D.P., RAWLINGS, N.D. Managing peptidases in the genomic era. **Biol. Chem.**, v. 384, p. 873-882, 2003.

BANGRAK, P., CHOTIGEAT, W. Molecular cloning and characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 244-250, 2011.

BELENGHI, B., ACCONCIA, F., TROVATO, M., PERAZZOLLI, M., BOCEDI, A., POLITICELLI, F., ASCENZI, P., DELLEDONNE, M. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 2593-2604, 2003.

BENCHABANE, M., SCHLÜTER, U., VORSTER, J., GOULET, M.C., MICHAUD, D. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, p. 1657-1666, 2010.

BENNET, M.J., CHOE, S., EISENBERG, D. Domain swapping: Entagling alliances between proteins (diphtheria toxin/evolution of oligomers). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 3127-3131, 1994.

BENNETT, M.J., SCHLUNEGGET, M.P., EISENBERG, D. 3D Domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. **Protein Science**, v. 4, p. 2455-2468, 1995.

BLANKENVOORDE, M.F., HENSKENS, Y.M., VAN'T-HOF, W., VEERMAN, E.C., AMERONGEN, N. Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity of *Porphyromonas gingivalis* by human salivary cystatin S and chicken cystatin. **Biol. Chem.**, v. 377, p. 847-850, 1996.

BODE, W. Crystallization of chicken egg white cystatin, a low molecular weight protein inhibitor of cysteine proteinases, and preliminary X-ray diffraction data. **J. Mol. Biol.**, v. 181, p. 331-332, 1985.

BODE, W., ENGH, R., MUSIL, D., THIELE, U., HUBER, R., KARSHIKOV, A. BRZIN, J., KOS, J. e TURK, V. A X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **EMBO Journal**. v.7, p. 2593-2599, 1988.

BOLTER CJ. Methyl Jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1347-1353, 1993.

BOTELLA, M.A., XU, Y., PRABHA, T.N., ZHAO, Y., NARASIMHAN, M.L., WILSON, K.A., NIELSEN, S.S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P. M. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to Wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**. v. 112, p. 1201-1210, 1996.

BOUTTÉ. A.M., FRIEDMAN, D.B., BOGYO, M., MIN, Y., YANG, L. LIN, P.C. Identification of a myeloid-derived suppressor cell cystatin-like protein that inhibits metastasis. **The FEBS Journal**, v. 25, p. 2626-2637, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A.; VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 61-66, 1990.

CARRILO, L., MARTINEZ, M., ALVAREZ-ALFAGEME, F., CASTANERO, P., SMAGGHE, G., DIAZ, I., ORTEGO, F. A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. **Transgenic Resource**, v. 20, p. 305-319, 2011.

CHEN, G.H., TANG, S.J., CHEN, C.S., JIANG, S.T. Overexpression of the soluble form of chicken cystatin in *Escherichia coli* and its purification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 48, p. 2602-2607, 2000.

CHI, Y.H., SALZMAN, R.A., BALFE, S., AHN, J.E., SUN, W., MOON, J., YUN, D.J., LEE, S.Y., HIGGINS, T.J.V., PITTHENDRIGH, B., MURDOCK, L.L., SALZMAN, K.Z. Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin – costs and benefits of counter-defense. **Insect Molecular Biology**. v. 18, p. 97-100, 2009.

CHU, M.H., LIU, K.L., WU, H.Y., YEH, K.W., CHENG, Y.S. Crystal structure of tarocystatin-papain complex: implications for the inhibition property of group-2 phytocystatins. **Planta**, v. 234, pp. 243-254, 2011.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7. Wayne, Pennsylvania, USA.

COLLINS, A.R., GRUBB, A. Cystatin D, a natural salivary cysteine protease inhibitor, inhibits coronavirus replication at its physiologic concentration. **Oral Microbial. Immunol.**, v. 13, p. 59-61, 1998.

DADSON, R.B., HASHEM, I.J., ALLEN, A.L., DEVINE, T.E. Effect of water stress on yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Delmarva region of the United States. In: MUCHERO, W., EHLERS, J.D., ROBERTS, P.A. Seedling stage drought-induced phenotypes and drought-responsive genes in diverse cowpea genotypes. **Crop Science**, v. 48, p. 541-552, 2008.

DENAULT, J.B., SALVESEN, G.S. Caspases: Keys in the ignition of cell death. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4489-4499, 2002.

DIOP, N.N., KIDRIC, M., REPELLIN, A., GAREIL, M., ARCY-LAMETA, A. D., THI, A.T.P., FODIL, Y. Z. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS letters**, v. 577, p. 545-550, 2004.

DUFFY, M.J. Do proteinases play a role in cancer invasion and metastasis? **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 23, p. 583-589, 1987.

EKIEL, I., ABRAHAMSON, M. Folding-related dimerization of human cystatin C. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 1314-1321, 1996.

EHLERS, J.D., HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204, 1997.

EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W.G., COWTAN, K. Features and development of coot. **Acta Crystallographica, Section D**, v. 66, p. 486-501, 2010.

ESPOSITO, V., GUGLIELMI, F., MARTIM, S.R., PAUWELS, K., PASTORE, A., PICCOLI, R., TEMUSSI, P.A. Aggregation mechanism of cystatins: A comparative study of monellin and oryzacystatin. **Biochemistry**, v. 49, p. 2805-2810, 2010.

EWING, B., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research.**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL. M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research.**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERNANDES, K.V.S., SABELLI, P.A., BARRATT, D.H.P., RICHARDSON, M., XAVIER-FILHO, J., SHEWRY, P.R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase-inhibitors. **Plant Mol. Biol.**, v. 23, p. 215–219, 1993.

FERNÁNDEZ, G., VERA, A., VILLAYERDE, A., MARTÍNEZ, Á. Analysis of recombinant protein toxicity in *E. coli* through a phage λ -based genetic screening system. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1381-1386, 2007.

FERREIRA, D.F. SISVAR: Sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavaras: UFLA, 2000. (Sisvar 4.1 pacote computacional).

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEIN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 677-700, 2007.

FOSSUM, K., WHITAKER, J.R. Ficin and papain inhibitor from chicken egg white. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, p. 367-375, 1968.

GADDOUR, K., VICENTE-CARBAJOSA, J., LARA, P., ISABEL-LAMONEDA, I., DIAZ, I., CARBONERO, P. A constitutive cystatin encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. **Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 599-608, 2001.

GIANINAZZI, S., MARTIN, C., VALLÉE, J.C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **CR Academy of Science of Paris**, v. 270, serie D, p. 2383-2386, 1970.

GIANOTTI, A., RIOS, W.M., SOARES-COSTA, A., NOGAROTO, V., CARMONA, A.K., OLIVA, M.L.V., ANDRADE, S.S., HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 483-489, 2006.

GIRARD, C., RIVARD, D., KIGGUNDU, K., KUNERT, K., GLEDDIE, S.C., CLOUTIER, C., MICHAUD, D. A multicomponent elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*. **New Phytologist**, v. 173, p. 841-851, 2007.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRUDKOWSKA, M., ZAGDANSKA, B. Multifunctional roles of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p. 602-629, 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HABIB, H., FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, p. 68-85, 2007.

HEI, M., TON, J. Long-distance signaling in plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 264-272, 2008.

HINES, M.E., OSUALA, C.I., NIELSEN, S.S. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, p. 1515-1520, 1991.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. California Agric. Exper. Sta. Cir. 347. 1938.

HOCMAN, G. Chemoprevention of cancer: Proteinase inhibitors. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 1365-1375, 1992.

HONG, J.K., HWANG, J.E., LIM, C.J., YANG, K.A., JIN, Z.L., KIM, C.M., KOO, J.C., CHUNG, W.S., LEE, K.O., LEE, S.Y., CHO, M.J., LIM, C.O. Over-expression of chinase cabbage phytolectin I retards seed germination in Arabidopsis. **Plant Science**, v. 172, p. 556-563, 2007.

HORBACH, R., NAVARRO-QUESADA, A.R., KNOGGE, W., DEISING, H.B. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 51-62, 2011.

HSIANG, L.H.T., GOOGWIN, P.H. Role of two cysteine proteinase in susceptible response of *Nicotiana glauca* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Plant Science**, v. 170, p. 1001-1009, 2006.

HUANG, Y., XIAO, B., XIONG, L. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. **Planta**, v. 226, p. 73-85, 2007.

HÜCKELHOVEN, R. FODOR, J., PREIS, C., KOGEL, K.H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 1251-1260, 1999.

ISHIMOTO, M., CHRISPEELS, M.J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 393-401, 1996.

ISHIMOTO, M., KIMATURA, K. Tolerance to the seed α -amilase inhibitor by the 2 insect pests of common bean, *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae). *In*: ISHIMOTO, M., CHRISPEELS, M.J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiol.**, v. 111, p. 393-401, 1996.

IZQUIERDO-PULIDO, M.L., HAARD, T.A., HUNG, J., HAARD, N.F. Oryzacystatin and other proteinase inhibitors in rice grain: Potential use as a fish processing aid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 616-622, 1994.

JANOWSKI, R., ABRAHAMSON, M., GRUBB, A., JASKOLSKI, M. Domain Swapping in N-truncated human cystatin C. **J. Mol. Biol.**, v. 341, p. 151-160, 2004,

JANOWSKI, R., KOZAK, M., ABRAHAMSON, M., GRUBB, A., JASKOLSKI, M. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular β -sheets. **Proteins: Structure Function Bioinformatics**, v. 61, p. 570-578, 2005.

JANOWSKI, R., KOZAK, M., JANKOWSKA, E., GRZONKA, Z., GRUBB, A., ABRAHAMSON, M., JASKOLSKI, M. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. **Nature**, v. 8, p. 316-320, 2001.

JASIR, A., KASPRZYKOWSKI, F., KASPRZYKOWSKA, R., LINDSTRÖM, V., SCHALÉN, C., GRUBB, A. New antimicrobial cystatin C-based peptide active against Gram-positive bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multiresistant coagulase-negative staphylococci. **APMIS**, v. 111, p. 1004-1040, 2003.

JERALA, R., ZEROVNIK, E., LOHNER, K., TURK, V. Structural basis for the difference in thermodynamic properties between the two cysteine proteinase inhibitors stefins A and B. *In*: MARTIN, J.R., CRAVEN, C.J., JERELA, R., KROON-ZITKO, L., ZEROVNIK, E., TURK, V., WALTHO, J.P. The tree-dimensional solution structure of human stefin A. **J. Mol. Biol.**, v. 246, p. 331-343, 1995.

JIA, Z., HASNAIN, S., HIRAMA, T., LEE, X., MORT, J.S., TO, R., HUBBER, C.P. Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 5527-5533, 1995.

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

KOBLINSKI, J.E., AHRAM, M., SLOANE, B.F. Unraveling the role of proteases in cancer. **Clin. Chim. Acta**, v. 291, p. 113-135, 2000.

KOLACZKOWSKA, A., KOLACZKOWSKI, M., SOKOLOWSKA, A., MIECZNIKOWSKA, H., KUBIAK, A., ROLKA, K., POLANOWSKI, A. The antifungal properties of the chicken egg cystatin against *Candida* yeast isolates showing different levels of azole resistance. **Mycoses**, v. 53, p. 314-320, 2010.

KONDO H., ABE K., NISHIMURA I., WATANABE H., EMORI Y., ARAI S. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. **Journal of Biol. Chem.**, v. 265, p. 15832-15837, 1990.

KONRAD, R., CONNOR, M., FERRY, N., GATEHOUSE, A.M.R., BABENDREIER, D. Impact of transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin-1 (OC-1) and of insecticidal proteins on longevity and digestive enzymes of the solitary bee *Osmia bicornis*. **Journal of Insect Physiology**. v. 55, p. 305-313, 2009.

KOO, Y.D., AHN, J.-E., SALZMAN, R.A., MOON, J., CHI, Y.H., YUN, D.J., LEE, S.Y., KOIWA, H., ZHU-SALZMAN, K. Functional expression of an insect cathepsin B-like counter-defense protein. **Insect Molecular Biology**, v. 17, p. 235-245, 2008.

KOORNEEF, A., PIETERSE, C.M.J. Cross Talk in Defense Signaling. **Plant Physiol.**, v. 146, p. 839-844, 2008.

KORANT, B.D., RIZZO, C.J. An E. coli expression system which detoxifies the HIV protease. **Biomed. Biochem. Acta**, v. 50, p. 643-646, 1991.

KOUZUMA, Y., INANAGA, H., DOI-KAWANO, K., YAMASAKI, N., KIMURA, M. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds. **J. Biochem.**, v. 128, p. 161-166, 2000.

KOZAK, M., JANKOWSKA, E., JANOWSKI, R., GRZONKA, Z., GRUBB, A., FERNANDEZ, M.A., ABRAHAMSON, M., JASKOLSKI, M. Expression of a selenomethionyl derivative and preliminary crystallographic studies of human cystatin C. **Acta crystallographica Section D**, v. 55, p. 1939-1942, 1999.

KUMAR, S., CHUNG-JUNG, T., NUSSINOV, R. Factors enhancing protein thermostability. **Protein Engineering**, v. 13, p. 179-191, 2000.

KUNKEL., B.N., BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 325-331, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K. R., Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.5, p. 93-109, 2002.

LAWRENCE, J.C., NIELSEN, S.S. Partial isolation and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from Lima Bean (*Phaseolus lunatus*). **J. Agric. Food. Chem.**, v. 49, p. 1020-1025, 2001.

LEITE, Y.F.M.M., Silva, L.M.C.M., AMORIM, R.C.N., FREIRE, E.A., JORGE, D.M.M., GRANGEIRO, T.B., BENEVIDES, N.M.B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effects on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-145, 2005.

LEVY, E., JASKOLSKI, M., GRUBB, A. The role of cystatin C in cerebral amyloid angiopathy and stroke: Cell biology and animal models. **Brain Pathol.**, v. 16, p. 60-70, 2006.

LILLEY, C.J., URWIN, P.E., JOHNSTON, K.A., ATKINSON, H.J. Preferential Expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, p. 3-12, 2004.

LIMA, J.P.M. Sincronia entre catalases e peroxidases do ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão-caupi expostas ao estresse hídrico e salino (Tese de Doutorado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2007.

LOSSO, N.J. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 94+118, 2008.

MACEDO, M.L.R., FILHO, E.B.S.D., FREIRE, M.G.M., OLIVA, M.L.V.O., SUMIKAWA, J.T., TOYAMA, M.H., MARAGONI, S.A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: Purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzymes. **Protein Journal**, v. 30, p. 9-19, 2011.

MARGIS, R., REIS, E.M., VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 359, p. 24–30, 1998.

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

MARTIN, J.R., CRAVEN, C.J., JERALA, R., KROON-ZITKO, L., ZEROVNIK, E., TURK, V., WALTHO, J.P. The three-dimensional solution structure of human stefin A. **J. Mol. Biol.**, v. 246, p. 331-343, 1995.

MARTÍNEZ, M., ABRAHAM, Z., GAMBARDELLA, M., ECHAIDE, M., CARBONERO, P., DÍAZ, I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **Journal of Experimental Botany (JXB)**, v. 56, p. 1821-1829, 2005.

MARTÍNEZ, M., CAMBRA, I., GONZÁLEZ-MELENDE, P., SANTAMARÍA, M.E., DÍAZ, I. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. **Physiologia Plantarum**, 2012.

MARTÍNEZ, M., DÍAZ-MENDONZA, M., CARRILO, L., DÍAZ, I. Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2914-2918, 2007.

MARTÍNEZ, M., LÓPEZ-SOLANILLA, E., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P., CARBONERO, P., DÍAZ, I. Inhibition of plant pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (Gene *Icy*) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 876-883, 2003.

MARTÍNEZ, M., RUBIO-SOMOZA, I., FUENTES, R., LARA, P., CARBONERO, P., DÍAZ, I. The barley cystatin gene (*Icy*) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 547-556, 2005.

MARTINS-MIRANDA, A.S. Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] expostas a salinidade e deficiência hídrica. (Dissertação de Mestrado em Bioquímica). **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.

MASSONNEAU, A., CONDAMINE, P., WISNIEWSKI, J.P., ZIVY, M., ROGOWSKY, P.M. Mayze cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1729, p. 186-199, 2005.

MAZID, M., KHAN, T.A., MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, v. 3, p. 232-249, 2011.

MCCOY, A.J, GROSSE-KUNSTLEVE, R.W., ADAMS, P.D., WINN, M.D., STORONI, L.C., READ, R.J. Phaser crystallographic software. **J. Appl. Cryst.**, v. 40, p. 658-674, 2007.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 467-472, 1994.

MOON, J., R.A. SALZMAN, AHN, J.-E., KOIWA, H., ZHU-SALSMAN, K. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defense protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 13, p. 283-291, 2004.

MOSOLOV, V.V., VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, p. 233-240, 2008.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J.Immunol. Methods**, v.65, p 55-63, 1983.

MURILLO-AMADOR, B., TROYO-DIÉGUEZ, E., GARCÍA-HÉRNANDEZ, J.L., LÓPEZ-AGUILAR, R., ÁLVIRO-SERRANO, N.Y., ZAMORA-SALGADO, S. RUEDA-PUENTE, E.O., KAYA, C. Effect of NaCl salinity in genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 423-431, 2006.

NAGATA, K., KUDO, N., ABE, K., ARAI, S., TANOKURA, M. Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the Rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry**, v. 39, p. 14753-14760, 2000.

NAGLER, D.K., STORER, A.C., PORTARO, F.C., CARMONA, E., JULIANO, L., MENARD, R. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. **Biochemistry**, v. 36, p. 12608-12615, 1997.

NAITO, Y., SASAKI, M., UMEMOTO, T., Bactericidal effect of rat cystatin S on an oral bacterium *Porphyromonas gingivalis*. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** v, 110, p. 71-75, 1995.

NAUDIN, C., LECAILLE, F., CHOWDHURY, S., KRUPA, J.C, PURISIMA, E., MORT, J.S., LALMANACH, G. The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. **J. Mol. Biol.**, v. 400, p. 1022-1035, 2010.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. In: PAGE, M.J., CERA, E.D. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1226, 2008.

NISSEN, M.S., KUMAR, M.G.N., YOUN, B., KNOWLES, D.B., LAM, K.S., BALLINGER, W.J., KNOWLES, N.R., KANG, C. Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins. **The Plant Cell**, v. 21, p. 861-875, 2009.

NYCANDER, M., BJORK, I. Evidence by chemical modification that tryptophan-104 of the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin is located in or near the proteinase-binding site. **Biochemical Journal**, v. 271, p. 281-284, 1990.

OLAFSSON, I., GRUBB, A. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy. **Amyloid.**, v. 7, p. 70-79, 2000.

OLIVA, M.L.V., CARMONA, A.K., ANDRADE, S.S., COTRIN, S.S., SOARES-COSTA, A., HENRIQUE-SILVA, F. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 1082-1086, 2004.

OLIVEIRA, J.T.A; ANDRADE, N.C; MARTINS-MIRANDA, A.S; SOARES, A.A; GONDIM, D.M.F; ARAÚJO-FILHO, J.H; FREIRE-FILHO, F.R; VASCONCELOS, I.M.

Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 145-152, 2012.

OLIVEIRA, A.S., LUDOVICO, M., AQUINO, R.O., RIBEIRO, J.K.C., MACEDO, L.L.P., ANDRADE, L.S.A., BEMQUERER, M.P., SANTOS, E.A., KIYOTA, S., SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-865, 2007.

OLIVEIRA, A.S., XAVIER-FILHO, J., SALES, M.P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, p. 91-104, 2003.

ORLIKOWSKA, M., JANKOWSKA, E., KOŁODZIEJCZYK, R., JASKÓLSKI, M., SZYMAŃSKA, A. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. **Journal of Structural Biology**, v. 173, p. 406-413, 2011.

PEREIRA, P.A.A., DEL PELOSO, M.J., DA COSTA, J.G.C., FERREIRA, C.M., YOKOYAMA, L.P. Beans product: Perspectives for production, consumption and genetic improvement. In: LANGYINTUO, A.S., LOWENBERG-DEBOER, J., FAYE, M., LAMBERT, D., IBRO, G., MOUSSA, B., KERGA, A., KUSHWAHA, S., MUSA, S., NTOUKAM, G. Cowpea supply and demand in West and central Africa. **Field Crops Research**. v. 82, p. 215-231, 2003.

PERNAS, M., SÁNCHEZ-MONGE, R., SALCEDO, G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. **FEBS Letters**. v. 467, p. 206-210, 2000.

PERNAS, M., LÓPEZ-SOLANILLA, E., SÁNCHEZ-MONGE, R., SALCEDO, G., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. Antifungal activity of a plant cystatin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12 (7), p. 624-627, 1999.

PERNAS, M., SANCHEZ-MONGE, R., GOMEZ, L., SALCEDO, G. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Mol. Biol.**, v. 32, p. 1235-1242, 1998.

PETTERSEN, E.F., GODDARD, T.D., HUANG, C.C., COUCH, G.S., GREENBLATT, D.M., MENG, E.C., FERRIN, T.R. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

POZO, O.D., LAM, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Current Biology**, v. 8, p. 1129-1132, 1998.

RAWLINGS, N.D., BARRET, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem. J.**, v. 290, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N.D., BARRET, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 325-331, 1999.

RAWLINGS, N.D., BARRET, A.J., BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. D227-233, 2010.

RAWLINGS, N.D., DOMINIC, P.T., BARRET, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. D160-D164, 2004.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., KOK, C.Y., KONG, J., BARRET, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D320-D325, 2008.

RENKO, M., POZGAN, U., MAJERA, D., TURK, D. Stefin A displaces the occluding loop of cathepsin B only by as much as required to bind to the active site cleft. **The FEBS Journal**, v. 277, p. 4338-4345, 2010.

ROOPRAI, H., MCCORMICK, D. Proteases and their inhibitors in human brain tumors: A review. **Anticancer Research**, v. 17, p. 4151-4162, 1997.

RYAN, S.N., McMANUS, M.T., LAING, W.A. Identification and characterization of proteinase inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). **J. Biochem.**, v. 134, p. 31-42, 2003.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. AND MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

SANDERS, A., CRAVEN, C.J., HIGGINS, L.D., CONROY, S.G.M.J., HOUNSLOW, A.M., WALTHO, J.P., STANIFORTH, R.A. Cystatin forms a tetramer through structural rearrangement of domain-swapped dimers prior to amyloidogenesis. **J. Mol. Biol.**, v. 336, p. 165-178, 2004.

SELS, J., MATHYS, J., CONINCK, B.M.A.D., CAMMUE, B.P.A., BOLLE, M.F.C.D. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 941-950, 2008.

SCHÄGGER, H., VON JAGOWO, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368-379, 1987.

SHAH, A., BANO, B. Cystatins in health and diseases. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. v. 15, p. 43-48, 2009.

SHYU, D.J.H., YOUNG, Y.M., LU, H.C., CHENG, Y.M., TZEN, J. T.C., CHOU, W.M. Cloning, functional expression and characterization of a phytocystatin gene from jelly fig (*Ficus awkeotsang Makino*) achenes. **Botanical Studies**, v. 52, p. 407-417, 2011.

SIGUQUEIRA-JÚNIOR, C.L., FERNANDES, K.V.S., MACHADO, O.L.T., CUNHA, M., GOMES, V.M., MOURA, D., JACINTO, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiol. Biochem**, v. 40, p. 247-254, 2002.

SILVA, C.P., TERRA, W.R., LIMA, R.M. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 18-28, 2001.

SOARES-COSTA, M.A., BELTRAMINI, L., THIEMAN, O., HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 296, p. 1194-1199, 2002.

SOLOMON, M., BELENGHI, B., DELLEDONNE, M., LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 431-444, 1999.

STICHER, L., MAUCHI-MANI, B., MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

SZEWIŃSKA, J., ZDUNEK-ZASTOCKA, E., POJMAJ, M., BIELAWSKI, W. Molecular cloning and expression analysis of triticale phytocystatins during development and germination of seeds. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v.-- , p. 1-11, 2012.

SZYMAŃSKA, A., RADULSKA, A., CZAPLEWSKA, P., GRUBB, A., GRZONKA, Z., RODZIEWICZ-MOTOWIDLO, S. Governing the monomer-dimer ratio of human cystatin C by single amino acid substitution in the hinge region. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 455-463, 2009.

TIAN, L., ZHANG, L., ZHANG, J., SONG, Y., GUO, Y. Differential proteomic analysis of soluble extracellular proteins reveals the cysteine protease and cystatin involved in suspension-culture cell proliferation in rice. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1794, p. 459-467, 2009.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TREWAVAS, A. Aspects of plant intelligence. **Annals of Botany**, v. 92, p. 1-20, 2003.

TURK, V., BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, p. 213-219, 1991.

URWIN, P.E., GREEN, J., ATKINSON, H.J. Expression of a plant cystatin confers partial resistance to Globodera, full resistance is achieved by pyramiding a cystatin with natural resistance. **Molecular Breeding**, v. 12, 263-269, 2003.

URWIN, P. E., LILLEY, C. J., MCPHERSON, M. J., ATKINSON, H. J. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**, v. 12, p. 455-461, 1997.

VALDÉZ-RODRIGUEZ, S., CEDRO-TANDA, A., AGUILAR-HERNANDEZ, V., CORTES-ONOFRE, E., BLANCO-LABRA, A., GUERRERO-RANGEL, A. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 469-475, 2010.

VALDÉZ-RODRIGUEZ, S., GUERRERO-RANGEL, A., VILLAGÓMEZ, C.M., CHAGOLLA-LÓPEZ, A., DELGADO-VARGAS, F., MARTÍNEZ-GALLARDO, N., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C., DÉLANO-FRIER, J. Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 790-798, 2007.

VAN DER HOORN, R.A.L. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 191-223, 2008.

VAN DER HOORN, R.A.L., JONES, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 400-407, 2004.

VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**, V. 44, p. 135–62, 2006.

VAN LOON, L.C., VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v. 40, p. 199-211, 1970.

VAN LOON, L.C. VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-I type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa. IV. **Kew Bullrtin**, v. 24: 507-569, 1970.

VOGT, G., WOELL, S., ARGOS, P. Protein thermal stability, hydrogen bonds and ion pairs. **J. Mol. Biol.**, v. 269, p. 631-643, 1997.

WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In: Foster, G. D.; Twell, D. (Eds). *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. West Sussex: John Wiley & Sons. p. 51-73, 1996.

WALKER, A.J., URWIN, P.E., ATKINSON, H.J., BRAIN, P., GLEN, D.M. SHEWRY, P.R. Transgenic Arabidopsis leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). **Transgenic Research**. v. 8, p. 95-103, 1999.

WALSH, T., STRICKLAND, J. Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1227-1234, 1993.

WEŚSIERSKA, E., SALEH, Y., TRZISZKA, T., KOPEC, W., SIEWINSKI, M., KORZEKWA, K. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. **World J. Microb. Biotech.** v, 21, p. 59–64, 2005.

WU, J., HAARD, N. Use of cysteine proteinase inhibitors from injured tomato leaves in whiting surimi. **Journal of Food Biochemistry**, v. 22, p. 383-398, 1998.

WU, J., HAARD, N. Purification and characterization of a cystatin from leaves of methyl jasmonate-treated tomato plants. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127, p. 209-220, 2000.

XAVIER-FILHO J, CAMPOS, F.A.P., ARY, M.B., SILVA, C.P., CARVALHO, M.M.M., MACEDO, M.L.R., LEMOS, F.J.A., GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143, 1989.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 4, p. 1-6, 1992.

YADAV, S.C., KUMAR, R., KUMAR, S., TATU, U., SINGH, R.K., GUPTA, A.K. Identification and characterization of cysteine proteinases of *Trypanosoma evansi*. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 559-565, 2011.

YANG, A.H., YEH, K.W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). **Planta**, v. 221, p. 493-501, 2005.

ZAGDANSKA., B., WISNIEWSKI, K. Endoproteinase activities in wheat leave upon water deficit. **Acta Biochimica Polonica**, v. 43, p. 515-520, 1996.

ZINOV'EVA, S.V., VASYUKOVA, N.I., OZERETSKOVSKAYA, O.L. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40 (2), p. 111-119, 2004.

ZEROVNIK, E., LOHNER, K., JERALA, R., LAGGNER, P., TURK, V. Calorimetric measurements of thermal denaturation of stefins A and B. **Eur. J. Biochem.**, v. 210, p. 217-221, 1992.

ZHANG, X., LIU, S., TAKANO, T. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 131-143, 2008.

ZHAO, Y., BOTELLA, M.A., SUBRAMANIAN, L., NIU, X., NIELSON, S.S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiology**, v. 111, p. 1299-1306, 1996.

ZHU-SALZMAN, K., ZENG, R.S. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a bruchid beetle. **Insect Science**, v. 15, p. 477-481, 2008.