



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

**DEBORAH CARVALHO FREITAS**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS GERMINAS-LIKE**  
**DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA***

**FORTALEZA**

**2017**

DEBORAH CARVALHO FREITAS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS GERMINAS-LIKE  
DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

---

F936i Freitas, Deborah Carvalho.  
Identificação e caracterização de duas germinas-like do látex de *Calotropis procera* / Deborah Carvalho Freitas. – 2017.  
119 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas.

1. Germinas. 2. Látex. 3. Oxalato oxidase. I. Título.

CDD 572

---

DEBORAH CARVALHO FREITAS

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DUAS GERMINAS-LIKE  
DO LÁTEX DE *CALOTROPIS PROCERA*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Monteiro Moreira  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Diego Demarco

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas, por ter aceitado me orientar e por toda dedicação que teve comigo desde então. Pela sua grande paciência durante essa jornada frente as minhas limitações, foi sempre um orientador presente, acompanhando de perto o trabalho e propondo ideias, inovações e disposto a esclarecer dúvidas e contribuir. Sou muito grata a todas as críticas construtivas, ensinamentos e ao convívio durante este período que me fizeram crescer.

Ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, por ter me recebido em seu laboratório e no grupo de pesquisa. Por toda sua atenção e paciência em ajudar até mesmo na bancada. Por todo o aprendizado proporcionado e por ser uma referência como profissional.

Aos professores Enéas Gomes, Ilka Vasconcelos, Francisco Campos, Ana Lúcia e Dirce Vasconcelos por todos os ensinamentos durante as disciplinas do mestrado. Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira, por quem tenho grande admiração por ter sido um grande exemplo de professor, sempre gentil e prestativo em ajudar.

Aos professores Dr. Diego Demarco e Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora.

À professora Dra. Marina Lobo, por todas as contribuições com as análises de espectrometria de massas e por ter aceitado o convite como suplente na banca de avaliação.

A todos os amigos do Laboratório de Plantas Laticíferas, que se tornaram minha segunda família.

A Daniel de Brito, que foi o primeiro a me receber no laboratório e se tornou meu amigo com quem compartilho os melhores passeios e risadas.

Aos meninos da hora do café, Mauro, Wallace, Eilton, Júnior, João Pedro, obrigada pelos momentos de descontração e todo apoio.

A Wallace, que contribuiu muito na construção desse trabalho, obrigada por todos os esclarecimentos, pela paciência em me ajudar e pela amizade.

A Zelândia, que na reta final dessa jornada esteve ao meu lado me dando apoio emocional e me ajudando nos experimentos. Por ser um exemplo como pessoa e como profissional. Obrigada por ser minha colega de laboratório e por ter se tornado minha amiga.

A Isabel, que eu tanto perturbei para me ajudar a preparar os meios de cultura e que é uma amiga muito querida que ganhei durante o mestrado.

A Igor, que tem me ajudado nos experimentos, que me deu uma força na escrita e tem sido um ótimo amigo e colega de laboratório.

A Carol Viana, pela amizade e que mesmo tão ocupada está sempre disponível para ajudar a todos.

E a todos os outros membros do laboratório Beatriz, Camila Tauane, Juliane, Camila Freitas, Mirele, Hugo, Rafaela, pelo convívio e experiências trocadas.

A todos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

A meu querido amigo Samuel Bernardino, por todo apoio que tem me dado diariamente, pelos conselhos e por todo afeto que sempre teve por mim.

Às minhas amigas da Agronomia Viviane, Jaqueline, Raiza e Rafaela, que mesmo distantes estiveram presentes.

Ao meu irmão David Freitas, por sempre me ajudar no que for preciso.

Aos meus amados pais, Nilda e Maurício, meus maiores exemplos e incentivadores. Obrigada pelo apoio incondicional aos meus sonhos e por não medirem esforços para torná-los realidade.

A Universidade Federal do Ceará pelo suporte oferecido através dos Laboratórios de Biotecnologia de Proteases Vegetais, coordenado pelo Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas e de Plantas Laticíferas, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos, ambos pertencentes ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM).

A Universidade de Fortaleza pelo apoio através do Laboratório de Análise Proteômica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do fornecimento de apoio financeiro.

A todos, muito obrigada!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan



## RESUMO

As condições de estresse causadas por fatores bióticos e abióticos, aos quais as plantas estão constantemente expostas, induzem mecanismos de defesa que promovem a produção de PR-proteínas. Neste estudo foram investigadas proteínas germinas e germinas-like (GLPs) pertencentes às famílias PR-15 e PR-16, respectivamente, no látex de *C. procera*. As buscas no transcriptoma desta espécie revelaram duas sequências com alta similaridade (maior que 60%) com GLPs, que foram nomeadas de GLCp1 e GLCp2. Análises *in silico* mostraram que as GLPs de *C. procera* apresentam, consecutivamente, 216 e 206 resíduos de aminoácidos, com massa molecular aparente de 22,79 e 21,79 kDa, valores esses semelhantes aos relatados para germinas-like. A modelagem por homologia gerou modelos confiáveis que ao serem submetidos a estudos de docking molecular evidenciaram um provável sítio de ligação ao oxalato, envolvendo três resíduos de histidina e um de glutamato. O látex de *C. procera* foi fracionado por métodos cromatográficos e os sete picos obtidos (P1-P7) foram sujeitos a análises proteômicas. Ensaio enzimático para detecção de atividade oxalato oxidase (OxO) apresentaram atividade na fração P4. A eletroforese dos picos mostrou que P4 possui proteínas de massa molecular entre 20-25 kDa, possivelmente monômeros de GLP. Os imunoenaios utilizando um peptídeo sintetizado a partir das sequências GLCp1 e GLCp2 foram capazes de reconhecer P4. O ensaio de ELISA também foi realizado com material vegetal sem látex contendo plântulas, raízes das plântulas, sementes não germinadas sem cascas e não germinadas com e sem embrião exposto; em nenhum destes materiais houve reconhecimento pelo anticorpo anti-GLCP-pep, o que sugere a presença de germinas-like exclusivamente no látex da planta. A grande identidade com GLPs indicam que as duas sequências de *C. procera* são germinas-like. De acordo com os ensaios enzimáticos as mesmas possuem atividade oxalato oxidase, uma atividade incomum em GLPs, sendo, portanto, o primeiro relato de germinas-like com atividade OxO em fluidos laticíferos.

**Palavras-chave:** Germinas. Látex. Oxalato oxidase.

## ABSTRACT

The constant exposure of plants to stress conditions caused by biotic and abiotic factors induces defense mechanisms that promote the production of PR-proteins. In this study, the germin and germin-like proteins (GLPs) belonging to the PR-15 and PR-16 families, respectively, were investigated in latex of *C. procera*. The transcriptome analysis of this species revealed two sequences with high similarity (greater than 60%) with GLPs, which were named GLCp1 and GLCp2. *In silico* analysis showed that the GLPs of *C. procera* consecutively presented 216 and 206 amino acid residues, with apparent molecular weight of 22.79 and 21.79 kDa, values similar to those reported for germin-like. Homology modeling generated reliable models that after undergoing molecular docking studies evidenced a probable oxalate binding site involving three histidine and one glutamate residues. The latex of *C. procera* was fractionated by chromatographic methods and the seven peaks obtained (P1-P7) were subjected to proteomic analysis. Enzymatic assays detected oxalate oxidase (OxO) activity in the P4 fraction. An electrophoresis of the peaks showed that P4 has proteins of molecular weight between 20-25 kDa, possibly monomers of GLP. Immunoassays using a peptide synthesized from the GLCp1 and GLCp2 sequences were able to recognize P4. The ELISA assay was also performed with latex-free plant material containing seedlings, seedling roots, non-germinated bark-free seeds and non-germinated seeds with and without exposed embryos, in all these latex-free materials there was no recognition by the anti-GLCp-pep antibody, suggesting that these proteins are only found in the latex. The large GLP identity indicates that the two *C. procera* sequences are germin-like proteins. According to the enzymatic assays they have oxalate oxidase activity, an unusual activity in GLPs, being, therefore, the first report of germin-like proteins with OxO activity in laticifers fluids.

**Keywords:** Germins. Latex. Oxalate oxidase.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura quaternária da proteína germina de cevada.....  | 21 |
| Figura 2 - Representação do sítio ativo das proteínas germinas.....  | 22 |
| Figura 3 - Sequência de aminoácidos específicos de várias GLPs e classificações.....   | 23 |
| Figura 4 - Aspecto geral da planta <i>Calotropis procera</i> .....   | 25 |
| Figura 5 - Sementes de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> ).....   | 36 |
| Figura 6 - Germinação das sementes de trigo.....   | 38 |
| Figura 7 - Alinhamento das sequências GLCp1 e GLCp2 (com peptídeo sinal) pela<br>plataforma ClustalO.....                            | 45 |
| Figura 8 - Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas do tipo germina e "germina-<br>like" utilizando o programa ClustalO..... | 46 |
| Figura 9 - Relações de membros das famílias GLP e germinas – Árvore Filogenética   | 48 |
| Figura 10 - Predição de sítios de N-glicosilação em GLCp1 e GLCp2.....   | 50 |
| Figura 11 - Predição de sítios de O-glicosilação em GLCp1 e GLCp2.....   | 51 |
| Figura 12 - Modelos das estruturas tridimensionais de GLCp1 obtidos por diferentes<br>plataformas.....                               | 52 |
| Figura 13 - Modelos das estruturas tridimensionais de GLCp2 obtidos por diferentes<br>plataformas.....                               | 53 |
| Figura 14 - Sobreposição dos modelos das estruturas tridimensionais obtidos para GLCp1 e<br>GLCp2 com a proteína modelo.....         | 54 |
| Figura 15 - Predição topológica das estruturas secundárias de GLCp1 a partir dos<br>modelos gerados pelo servidor SWISS MODEL.....   | 56 |
| Figura 16 - Predição topológica da estrutura secundária de GLCp1 e GLCp2 a partir dos<br>modelos gerados pelo servidor Phyre2.....   | 57 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17 - Predição topológica da estrutura secundária de GLCp1 e GLCp2 a partir dos modelos gerados pelo servidor GalaxyWeb .....            | 58 |
| Figura 18 - Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 e GLCp2 para os modelos gerados por SWISS MODEL.....       | 59 |
| Figura 19 - Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 e GLCp2 para os modelos gerados pelo servidor Phyre2 ..... | 60 |
| Figura 20 - Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 e GLCp2 dos modelos gerados pelo servidor GalaxyWeb.....   | 61 |
| Figura 21 - Modelos de GLCp1 e GLCp2 mostrando o provável sítio de atividade do tipo oxalato oxidase .....                                     | 62 |
| Figura 22 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos a partir da sequência deduzidas de GLCp1 .....                         | 63 |
| Figura 23 - Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos a partir da sequência deduzidas de GLCp2.....                          | 64 |
| Figura 24 - Docking molecular da estrutura de GLCp1 .....  | 66 |
| Figura 25 - Cromatografia do extrato total do látex e eletroforese dos picos .....   | 68 |
| Figura 26 - Ensaio enzimático para detecção de atividade OxO <i>in vitro</i> .....   | 75 |
| Figura 27 - Ensaio quantitativo para detecção de atividade OXO <i>in vitro</i> .....   | 76 |
| Figura 28 - SDS-PAGE das frações proteicas do látex e Zimograma para detecção de SOD .....   | 77 |
| Figura 29 - Ensaio SOD adaptado para micropoços de placa de ELISA .....  | 79 |
| Figura 30 - Valores das médias de triplicatas para atividade SOD .....   | 80 |
| Figura 31 - Alinhamento entre GLCp1 e GLCp2.....   | 81 |
| Figura 32 - Localização dos peptídeos nas superfícies de GLCp1 e GLCp2 .....   | 82 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 33 - Representação em superfície das estruturas destacando as sequências que foram escolhidas para avaliação.....   | 90 |
| Figura 34 - Cromatografia de Fase Reversa com o peptídeo DVAQVKKLKGV, evidenciando seu grau de pureza .....  | 91 |
| Figura 35 - Espectrometria de massa por dessorção a laser assistida por matriz do peptídeo DVAQVKKLKGV .....   | 92 |
| Figura 36 - Perfil cromatográfico do soro total do coelho .....  | 93 |
| Figura 37 - <i>Dot Blotting</i> para detecção de GLCp1 e GLCp2 usando anticorpos primários anti-peptídeo.....  | 95 |
| Figura 38 - Ensaio de ELISA para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2 nas diferentes frações proteicas do látex de <i>Calotropis procera</i> .....               | 96 |
| Figura 39 - Ensaio <i>Western Blotting</i> com o extrato proteico de <i>C. procera</i> e os picos cromatográficos para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2..... | 97 |
| Figura 40 - Ensaio de ELISA para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2 nas sementes e diferentes partes de plântulas de <i>Calotropis procera</i> .....           | 98 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Famílias das proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas).....  | 19 |
| Tabela 2 - Comparação das propriedades físico-químicas de GLCp1 e GLCp2 com outras germinas e "germin-like" proteínas .....                                    | 47 |
| Tabela 3 - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais de GLCp1 e GLCp2 construídos por diferentes plataformas .....                                    | 67 |
| Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas no látex de <i>Calotropis procera</i> por espectrometria de massa a partir dos picos da cromatografia .....        | 70 |
| Tabela 5 - Lista de proteínas identificadas no látex de <i>C. procera</i> por espectrometria de massa a partir de "spots" obtidos do gel de eletroforese ..... | 71 |
| Tabela 6 - Similaridade entre as sequências conservadas de GLCp1 e GLCp2 e alérgenos de maior identidade .....   | 85 |
| Tabela 7 - Predição de epítomos pró-inflamatórios usando o servidor Proinflam .....  | 88 |
| Tabela 8 - Predição de peptídeos antigênicos realizado pelo servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES para a sequência completa de GLCp1 .....                     | 88 |
| Tabela 9 - Predição de peptídeos antigênicos realizado pelo servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES para a sequência completa de GLCp2 .....                     | 89 |

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

|               |  |
|---------------|--|
| Anti-GLCp-pep | Anticorpo produzido contra peptídeo de <i>C. procera</i> |
| BCIP/NBT      | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/ nitroblue tetrazólio  |
| BLAST         | <i>Basic Local Alignment search Tool</i>                 |
| BSA           | Albumina Sérica Bovina                                   |
| DTT           | Ditiotreitol   |
| EDTA          | Etilenodiaminotetra-acético                              |
| ELISA         | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay                       |
| GLP           | Germina-like proteína                                    |
| GLCp          | Germin-like proteína de <i>Calotropis procera</i>        |
| GLCp-pep      | Peptídeo de proteína germina-like de <i>C. procera</i>   |
| KDa           | Kilodalton (1000 Da)                                     |
| LPCp          | Proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i>          |
| LPPr          | Proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i>              |
| NCBI          | Centro Internacional de Informação Biotecnológica        |
| OxO           | Oxalato oxidase  |
| PBS           | Tampão fosfato de sódio                                  |
| PDB           | Banco de dados de proteínas                              |
| P1-P7         | Picos obtidos após cromatografia de exclusão             |
| SDS           | Dodecil sulfato de sódio                                 |
| SOD           | Superóxido dismutase                                     |
| Triton X-100  | Detergente não carregado                                 |
| UA            | Unidade de atividade                                     |
| µgP           | Micrograma de proteína                                   |

## SUMÁRIO

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>1</b>        | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>1.1</b>      | <b>Defesa Vegetal</b> .....  | 17 |
| <b>1.2</b>      | <b>PR-Proteínas</b> .....  | 18 |
| <b>1.3</b>      | <b>PR-15 e PR-16 (Germinas e Germinas-like proteínas)</b> .....                | 20 |
| <b>1.4</b>      | <b>Látex</b> .....   | 23 |
| <b>1.5</b>      | <b><i>Calotropis procera</i> (ait.) R. Br</b> .....                            | 24 |
| <b>2</b>        | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 27 |
| <b>2.1</b>      | <b>Objetivo Geral</b> .....  | 27 |
| <b>2.2</b>      | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | 27 |
| <b>3</b>        | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 28 |
| <b>3.1</b>      | <b>Materiais</b> .....   | 28 |
| <b>3.1.1</b>    | <b><i>Reagentes</i></b> .....  | 28 |
| <b>3.2</b>      | <b>Métodos</b> .....   | 28 |
| <b>3.2.1</b>    | <b><i>Anotação Gênica</i></b> .....  | 28 |
| <b>3.2.2</b>    | <b><i>Análises das sequências</i></b> .....                                    | 29 |
| <b>3.2.3</b>    | <b><i>Análises filogenéticas</i></b> .....                                     | 29 |
| <b>3.2.4</b>    | <b><i>Construção dos modelos tridimensionais</i></b> .....                     | 30 |
| <b>3.2.5</b>    | <b><i>Validação dos modelos</i></b> .....                                      | 30 |
| <b>3.2.6</b>    | <b><i>Docking Molecular</i></b> .....  | 31 |
| <b>3.2.7</b>    | <b><i>Coleta e fracionamento de látex</i></b> .....                            | 31 |
| <b>3.2.8</b>    | <b><i>Cromatografia de Exclusão Molecular</i></b> .....                        | 31 |
| <b>3.2.9</b>    | <b><i>Dosagem de proteínas solúveis</i></b> .....                              | 32 |
| <b>3.2.10</b>   | <b><i>Análise do perfil proteico por eletroforese unidimensional</i></b> ..... | 32 |
| <b>3.2.11</b>   | <b><i>Análise proteômica do látex de <i>C. procera</i></i></b> .....           | 33 |
| <b>3.2.12</b>   | <b><i>Espectrometria de massas</i></b> .....                                   | 34 |
| <b>3.2.13</b>   | <b><i>Pesquisa em bancos de dados</i></b> .....                                | 35 |
| <b>3.2.14</b>   | <b><i>Ensaio Enzimáticos</i></b> .....   | 35 |
| <b>3.2.14.1</b> | <b><i>Preparo de Meio MS com 2 % de sacarose</i></b> .....                     | 35 |
| <b>3.2.14.2</b> | <b><i>Desinfecção de sementes para germinação</i></b> .....                    | 36 |
| <b>3.2.14.3</b> | <b><i>Atividade Oxalato Oxidase</i></b> .....                                  | 37 |



|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 3.2.14.4 | <i>Atividade Superóxido Dismutase</i> .....                                    | 39  |
| 3.2.15   | <i>Predição de peptídeos antigênicos nas germinas de C. procera</i> .....      | 40  |
| 3.2.16   | <i>Síntese do peptídeo</i> .....   | 40  |
| 3.2.17   | <i>Produção de anticorpos anti-CpGermin</i> .....                              | 41  |
| 3.2.18   | <i>Purificação dos anticorpos GLCp-pep</i> .....                               | 41  |
| 3.2.19   | <i>Dot Blotting</i> .....  | 42  |
| 3.2.20   | <i>Western Blotting</i> .....  | 42  |
| 3.2.21   | <i>Ensaio de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i> .....               | 43  |
| 4        | <b>RESULTADOS</b> .....  | 44  |
| 4.1      | <b>Caracterização <i>in silico</i> de GLCP1 e GLCP2</b> .....                  | 44  |
| 4.2      | <b>Análises Proteômicas</b> .....  | 68  |
| 4.3      | <b>Ensaio Enzimáticos</b> .....  | 75  |
| 4.4      | <b>Predição de peptídeos antigênicos</b> .....                                 | 80  |
| 4.5      | <b>Caracterização do peptídeo</b> .....  | 91  |
| 4.6      | <b>Identificação das proteínas GLCP1 E GLCP2 através de imunoensaios</b> ..... | 93  |
| 5        | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | 99  |
| 6        | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | 108 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 109 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Defesa Vegetal

Plantas são organismos sésseis que não podem se locomover para escapar de ataques de patógenos, insetos ou mamíferos ou ainda de ambientes desfavoráveis, além de não possuírem os mecanismos de proteção dos animais (NEILSON, 2013; AGRAWAL, 2014). Logo, as plantas necessitam desenvolver estratégias para sua defesa contra diversos tipos de estresses ambientais, sejam de origens bióticas ou abióticas, compreendendo mecanismos de defesa muito rápidos, localizados e/ou sistêmicos para estabelecer resistência e sua consequente sobrevivência (LEHMANN *et al.*, 2015; SAVATIN, 2014).

Os meios de defesa de plantas podem ser classificados como constitutivos e/ou induzíveis, incluem barreiras físicas e produção de compostos tóxicos. As defesas vegetais podem ser consideradas induzíveis ou constitutivas dependendo se necessitam ou não de estímulos ambientais para ativação (MITHÖFER, BOLAND, 2012). Exemplos típicos de defesa constitutiva incluem características morfológicas como espinhos, altos níveis de lignificação e tricomas, que funcionam como barreiras mecânicas, estando essas, presentes mesmo antes da atuação do agente agressor. Defesas induzíveis são respostas ativadas após um estímulo, que devem ser percebidas e sinalizadas rapidamente (WU, SHAN, HE, 2014; ZHOU, 2015).

O rápido reconhecimento de um potencial invasor/agressor pela planta é um pré-requisito para iniciar uma resposta de defesa eficiente (VAN LOON, 2006). Entre eles, um dos mais eficientes é a reação de hipersensibilidade, onde há a indução da produção de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas e de várias proteínas de defesa (LEHMANN *et al.*, 2015; MORENO,CAMEJO, 2016). Proteínas induzíveis relacionadas à defesa têm sido descritas em muitas espécies de plantas após infecção por oomicetos, fungos, bactérias ou vírus ou ataque de insetos (VAN LOON, 2006) e elas incluem: a) proteínas estruturais - quando incorporadas à parede celular tem por função o confinamento do patógeno; b) enzimas do metabolismo secundário, como as envolvidas na biossíntese de fitoalexinas; c) proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas e qualitativas nos teores de proteínas durante as respostas de defesa (ROJAS *et al.*, 2014).

Durante o processo de defesa, algumas PR-proteínas podem ser expressas em tecidos não infectados em resposta a uma primeira infecção. Este tipo de defesa é conhecida como resistência sistêmica adquirida (STAHL *et al.*, 2016). Outras respostas de defesa podem incluir alterações estruturais e produção de uma gama de moléculas, tais como proteínas antimicrobianas, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações na composição e reforço da parede celular (BANERJEE *et al.*, 2010; NAWROT *et al.*, 2014; MORENO, CAMEJO, 2016)

## 1.2 PR-Proteínas

Como citado anteriormente, as plantas podem se defender contra diversos tipos de agressores a partir da indução de proteínas de defesa, em que as mais intensamente estudadas têm sido as proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas) (VAN LOON, 1994; EBRAHIM, USHA, SINGH, 2011). Inicialmente, essas proteínas foram classificadas em famílias de acordo com suas características bioquímicas e biológicas, como massa molecular, ponto isoelétrico, localização celular, assim como pelo fato destas serem induzidas após o ataque de organismos, tais como insetos, fungos, bactérias ou vírus. Posteriormente, algumas proteínas induzidas por condições abióticas foram consideradas nessa classificação (FOLGADO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Desde a descoberta das primeiras PR-proteínas em tabaco, muitas outras proteínas semelhantes começaram a ser isoladas de outras espécies de plantas, incluindo dicotiledôneas e monocotiledôneas e atualmente são classificadas em 17 famílias (Tabela 1) de proteínas relacionadas à patogênese (EBRAHIM, USHA, SINGH, 2011; VAN LOON, 2006; FISTER *et al.*, 2016). As propriedades físico-químicas características das PR-proteínas permitem que as mesmas resistam a pH ácido e clivagem proteolítica. Desta maneira, é possível que se mantenham nas condições adversas onde costumam ocorrer, como no compartimento vacuolar, parede celular ou espaços intercelulares (SINHA *et al.*, 2014).

**Tabela 1.** Famílias das proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas).

| <b>Família</b> | <b>Representantes</b>                          | <b>Tamanho<br/>Típico (kDa)</b> | <b>Propriedades</b>                     | <b>Alvo do<br/>patógeno</b> |
|----------------|--|---------------------------------|---|-----------------------------|
| <b>PR-1</b>    | Tabaco PR-1a                                   | 15                              | Antifúngico                             | Desconhecido                |
| <b>PR-2</b>    | Tabaco PR-2                                    | 20                              | $\beta$ -1,3-Glucanase                  | $\beta$ -1,3-Glucano        |
| <b>PR-3</b>    | Tabaco P Q                                     | 25-30                           | Quitinase (Classes I,<br>II, IV, V, VI) | Quitina                     |
| <b>PR-4</b>    | Tabaco “R”                                     | 15-20                           | Quitinase classes I, II                 | Quitina                     |
| <b>PR-5</b>    | Tabaco S                                       | 25                              | Taumatina-like                          | Membrana                    |
| <b>PR-6</b>    | Inibidor do tomate 1                           | 8                               | Inibidor de proteinase                  | .*                          |
| <b>PR-7</b>    | Tomate P <sub>69</sub>                         | 75                              | Endoproteinase                          | .*                          |
| <b>PR-8</b>    | Quitinase de pepino                            | 28                              | Quitinase classe III                    | Quitina                     |
| <b>PR-9</b>    | “Peroxidase formadora de<br>lignina” do tomate | 35                              | Peroxidase                              | .*                          |
| <b>PR-10</b>   | Salsinha “PR1”                                 | 17                              | “Ribonuclease-like”                     | .*                          |
| <b>PR-11</b>   | Tabaco “classe V”<br>quitinase                 | 40                              | Quitinase classe I                      | Quitina                     |
| <b>PR-12</b>   | Rabanete Rs-AFP3                               | 5                               | Defensina                               | Membrana                    |
| <b>PR-13</b>   | <i>Arabidopsis</i> THI2.1                      | 5                               | Tionina                                 | Membrana                    |
| <b>PR-14</b>   | Cevada LTP4                                    | 9                               | Proteína transferidora<br>de lipídeos   | Membrana                    |
| <b>PR-15</b>   | Cevada OxOa (germina)                          | 20                              | Oxalato oxidase                         | .*                          |
| <b>PR-16</b>   | Cevada OxOLP<br>(“germina-like”)               | 20                              | “Oxalato oxidase-like”                  | .*                          |
| <b>PR-17</b>   | Tabaco PRp27                                   | 27                              | Desconhecida                            | .*                          |

Tabela foi ajustada de: Sels, J. *et al.*, 2008.

.\*Nenhuma atividade antimicrobiana relatada *in vitro*.

A maioria das PR-proteínas é induzida através da ação dos compostos sinalizadores como ácido salicílico, ácido jasmônico ou etileno (VAN LOON, 2006). A proteína osmotina (PR-5) isolada de tabaco, por exemplo, é constitutivamente expressa em raízes e células cultivadas e não está presente naturalmente em folhas saudáveis intactas. Contudo, o tratamento com o hormônio etileno induz uma alta acumulação nesses órgãos (SATO, 1996; SHOJI, HASHIMOTO, 2015).

As PR-proteínas já foram consideradas como proteínas específicas de plantas, no entanto, proteínas com funções similares, foram descobertas sendo expressas também em

outros organismos. Esta relação pode ser observada entre as proteínas de defesa expressas em raízes de plantas e as de intestino humano (BESSIS, 2014). São proteínas muito semelhantes e na maioria das vezes compartilham mais de 35% de identidade entre suas sequências. A conservação de estrutura entre as PR-proteínas durante a evolução sugere que desempenham funções biológicas comuns para o funcionamento e sobrevivência de organismos (PARK, 2004; L.C. VAN LOON, 2006; FERNANDES *et al.*, 2013).

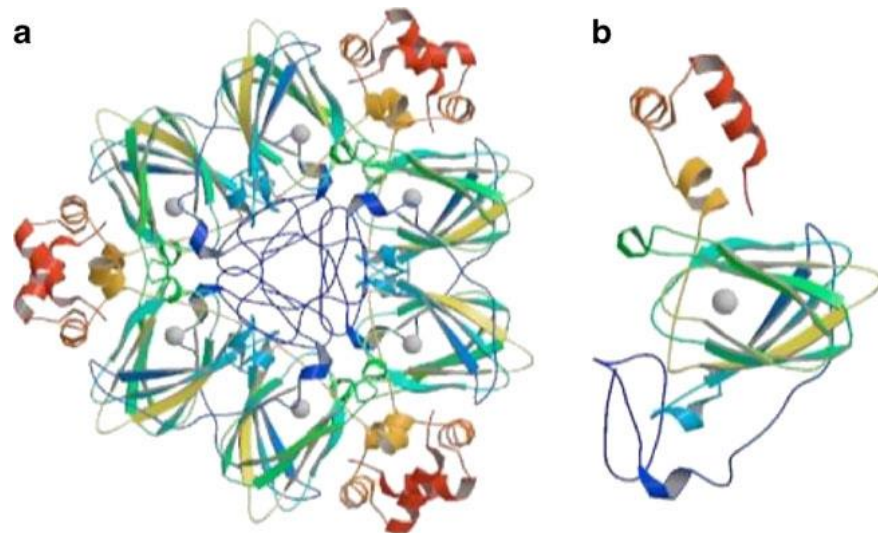
### 1.3 PR-15 e PR-16 (Germinas e Germinas-like proteínas)

A primeira proteína denominada de germina foi identificada no início do crescimento e germinação de embriões de trigo (*Triticum aestivum*), por isso seu nome. Essa proteína é uma glicoproteína homo-oligomérica com atividade oxalato oxidase (OxO) (BERNIER, BERNA, 2001; LANE, 1993). Esta enzima catalisa a clivagem oxidativa do ácido oxálico com a produção de dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio (KUMAR, BELUR, 2016). O peróxido de hidrogênio produzido pode atuar como sinalizador, induzindo a produção de várias outras proteínas de defesa, ou atuar diretamente na defesa contra patógenos (YASMIN *et al.*, 2015). Posteriormente, diferentes germinas foram detectadas em outras espécies de monocotiledôneas, tais como aveia, centeio e cevada (DUNWELL, 2008; SZUCKO, 2012). Atualmente, essas proteínas são classificadas como PR-proteínas da família PR-15 (FISTER *et al.*, 2016).

Proteínas semelhantes a germinas (GLP), sem atividade oxalato oxidase, também têm sido identificadas em plantas (BARMAN, BANERJEE, 2015). Enquanto as germinas "verdadeiras" tratam-se de um grupo muito homogêneo de proteínas com mais de 90% de identidade entre elas e com atividade oxalato oxidase, as GLP pertencem a um grupo bastante heterogêneo, com identidades variando de 30% a 70% (BARMAN, BANERJEE, 2015). As GLPs também estão relacionadas com as respostas de defesa de plantas (YASMIN *et al.*, 2015) e assim como as germinas "verdadeiras" também podem ser acumuladas durante invasões de patógenos, sendo classificadas como proteínas relacionadas à patogênese da família PR-16 (FISTER, 2016). As proteínas desta família participam de muitos processos que são importantes para o desenvolvimento e defesa da planta e hoje se sabe que podem ser encontradas em todos os órgãos e estádios de desenvolvimento, não apenas na germinação (WANG *et al.*, 2013).

Os resultados de cristalografia para a germina de cevada (*Hordeum vulgare*) mostraram que esta proteína é um homohexâmero (Figura 1) extremamente estável, em que cada monômero liga-se a outro criando um dímero e três dímeros formam uma estrutura que corresponde a um "trímero de dímeros" (WOO, 2000). O hexâmero tem aproximadamente 130 kDa. Cada monômero possui 200 aminoácidos, massa molecular de 23 kDa e um íon manganês (LANE, 2002). O monômero de germina de cevada é constituído por um domínio C-terminal em  $\alpha$ -hélice (vermelho e amarelo), uma estrutura de  $\beta$ -barril composto por várias folhas beta (verde e amarelo) e uma extensão N-terminal irregular (azul) (Figura 1).

**Figura 1.** Estrutura quaternária da proteína germina de cevada.

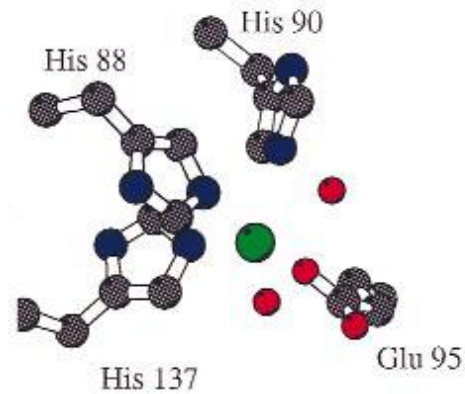


(A) Estrutura constituída por um trímero de dímeros. (B) Cada monômero se liga a um íon manganês (esferas cinzentas no centro).

Fonte: Breen, Bellgard, 2010.

O sítio ativo das germinas "verdadeiras" é composto por três histidinas e um glutamato, que se ligam ao metal manganês. A geometria octaédrica indica que o manganês está em estado de oxidação e é empregado como cofator catalítico, referente à atividade oxalato oxidase (WOO, 1998; 2000; 2006; BARMAN, BANERJEE, 2015) (Figura 2).

**Figura 2.** Representação do sítio ativo das proteínas germinas, com destaque aos quatro aminoácidos His<sub>88</sub>, His<sub>90</sub>, His<sub>137</sub> e Glu<sub>95</sub>, com o íon Mn representado em verde no centro.



Fonte: Woo, 2000.

Análises filogenéticas de vários membros da família das proteínas germinas-like (GLP) de diferentes espécies foram realizadas e foi possível classificá-las em diferentes clados/subfamílias, nomeadamente GER 1, GER 2, GER 3, GER 4, GER 5, GER 6, GER 7, GER 8 e subfamílias de briófitas 1 e 2 . As avaliações das estruturas de diferentes GLPs revelaram que os membros de cada clado compartilham alguns aminoácidos específicos e foram agrupados nas denominadas “*germin boxes*” A, B e C (Figura 3), sendo possível observar variações de aminoácidos entre as sequências de diferentes membros dentro de uma mesma subfamília (BERNIER, BERNA, 2001; KHURI *et al.* 2001; BARMAN, BARNERJEE, 2015).

**Figura 3.** Sequência de aminoácidos específicos de várias GLPs e suas classificações.

| Subfamily       | Germin Boxes |                        |                   | Subfamily         | Germin Boxes          |                        |                   |
|-----------------|--------------|------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| GER 1           | Box A        | Box B                  | Box C             | Bryophyte         | Box A                 | Box B                  | Box C             |
| HvGER1a         | PLDQFCVAD    | AFGGTFRHHPGATEIGMVMKG  | ADETFVIRPGLMHPQFN | Subfamily 1 and 2 | PLDQFCVAD             | DVGGINVRHHPGATEIFLVMKG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| TapSBGer1       | PLDQFCVAD    | AFGGTFRHHPGATEIGMVMKG  | ADETFVIRPGLMHPQFN | PpGLP6            | GLDQFCVRD             | AMGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGEAFVFPKGLIHFQIN |
| TapSBGer3       | PLDQFCVAD    | AFGGTFRHHPGATEIGMVMKG  | ADETFVIRPGLMHPQFN | BuGLP             | PLDQFCVAD             | AMGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| OsGER7          | PLDQFCVAV    | AFGGVFRHHPGATEIGMVMKG  | ADETFVIRPGLMHPQFN | PpGLP3a           | PLDQFCVAD             | AMGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| AtGLP4          | PLDQFCVGD    | AFGGVFRHHPGATEIGMVMKG  | ADETFVIRPGLMHPQFN | PpGLP3b           | PLDQFCVAD             | AMGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| GER 2           |              |                        |                   | PpGLP5            | LTDFFPAM              | LEGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| AtGLP1          | SVLDFCVAN    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | PpGLP7            | LTDFFPVS              | LEGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| AtGLP2          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | PpGLP4            | LTDFFVNS              | LEGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| AtGLP3b         | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | PpGL2             | LTDFFVAP              | LEGGINVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| AhGLP1          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | Isolated member   |                       |                        |                   |
| AhGLP5          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | AlGLP             | QLDQFCGV              | APFGVNRHHPGATEILLIKLG  | KGDIVVFPQGLIHFQAN |
| BnGLP           | SVLDFCVAN    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | GER 5 and GER 6   |                       |                        |                   |
| ChGLP           | AVDQFCVGD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | HvGER5a           | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | VGDVVFPPGGLIHFQIN |
| GmGLP8          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | OsGER4            | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| GmGLP9          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | CaGLP             | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| GmGLP10         | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | NaGER             | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| GhGLP           | NADQFCVGD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | AtGLP5            | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| HvGLP1          | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | GmGLP16           | TLQDLCVAL             | KAGGLNVRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| HvGER2a         | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | HvGER6a           | YLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PhGLP           | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | AtGL22            | ALDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| Nt24GLP         | AVLDFCVAN    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | NaNEC1            | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| OsGLP1          | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | RmGL2             | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| OsGER5          | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | VvGER2            | MLDQFCVAD             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| OsGLP110        | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | GER 7             |                       |                        |                   |
| PvGLP1          | AVHDFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | AtGLP9            | PLDQFCVGV             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | VGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PvGLP3          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | VvGER3            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PpABP19         | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | VvGER4            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PpABP20         | AVDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | VvGER5            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PpABP2          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | VvGER1            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| PpABP3          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | AtGLP2a           | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| SoGLP1          | SVLDFCVAD    | AKGVIIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | GER 8             |                       |                        |                   |
| VvGER6          | AVDQFCVGD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | GmGLP6            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
| ZmGLP1          | LTDQFCVAD    | AVGGVIRHHPGASEVLLVLTG  | PGQVMVFPQGLLHFQIN | PLDQFCVAL         | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN      |                   |
|                 |              |                        |                   | GmGLP12           | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | AhGLP3            | PLDQFCVAL             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | GmGLP2            | PLDQFCVAA             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | GmGLP3            | PLDQFCVAA             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | GmGLP13           | PLDQFCVAA             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | GmGLP14           | PLDQFCVAA             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   | GmGLP20           | PLDQFCVAA             | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |
|                 |              |                        |                   |                   |                       |                        |                   |
| GER 3 and GER 4 |              |                        |                   |                   |                       |                        |                   |
| HvGER3a         | PLDQFCIAD    | GFLGVNFRHHPGATEILLIKLG | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| ZmGLP1-17       | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsGER1          | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsGER2          | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| HvGER4c         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| HvGER4d         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsGER6          | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsRGLF1         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsRGLP2         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| OsGLP16         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| TaGLP2a         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| TaGLP2b         | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |
| TmGLP4          | PLDQFCVAD    | AFGGQNRHHPGATEILLIKLG  | KGDVVFPPGGLIHFQIN |                   |                       |                        |                   |

Aminoácidos conservados/consenso dentro de uma subfamília específica são destacados por vários matizes de cores. Os motivos KGD ou KGE nas caixas são sublinhados. O resíduo de lisina (K) conservado em GER 8 é mostrado em vermelho.

Fonte: Barman, Banerjee, 2015.

## 1.4 Látex

Látex é um fluido de aspecto leitoso encontrado em muitas plantas (KONNO, 2011). Nele foram identificadas uma variedade de proteínas e metabólitos secundários tais como alcalóides, glicosídeos, terpenóides, canabinóides, taninos e borracha. Este último constituído de poliisopreno que se destaca por ser encontrado em maior proporção (HAGEL, 2008). Ao sofrer alguma injúria mecânica, ataque de patógenos ou insetos a planta libera látex, que se encontra sob pressão. Embora a maioria apresente aspecto leitoso, alguns fluidos laticíferos podem apresentar coloração amarela, laranja, avermelhada, esverdeada ou mesmo transparente (PICKARD, 2008).



Laticíferos são células especializadas que produzem e armazenam látex. Estas células ocorrem em mais de 40 famílias de angiospermas não relacionadas e é a partir delas que o látex é liberado (HAGEL, 2008; KAJII, 2014). Laticíferos são divididos em não-articulados e articulados. Os não-articulados são células multinucleadas que derivaram de uma única célula que se estende durante o desenvolvimento da planta, enquanto os laticíferos articulados consistem de diversas células frequentemente alongadas que podem ser simples ou ramificadas (KEKWICK, 2001).

As proteases cisteínicas, quitinases, enzimas anti-oxidantes e  $\beta$ -1,3-glucanases são as proteínas mais encontradas nos fluidos laticíferos e têm sido relacionadas a papéis importantes na defesa das plantas contra insetos e microrganismos (KONNO, 2011; FREITAS *et al.*, 2007; RAMOS, 2015).

### **1.5 *Calotropis procera* (ait.) R. Br.**

*Calotropis procera* é um arbusto da família Apocynaceae que cresce principalmente em regiões tropicais e subtropicais, possuindo uma habilidade excepcional para se adaptar e crescer em condições severas como a falta de água e solos salinos (Figura 4). No Brasil, ela é encontrada principalmente no Nordeste (FIGUEIREDO, 2014; BARBOSA *et al.*, 2014). Esta planta é conhecida popularmente como leiteiro, ciúme ou flôr-de-seda. As espécies geralmente têm caules cilíndricos, folhas largas e são muito ramificados. Esta planta se destaca pela grande quantidade de látex liberado pelas folhas ou caule após alguma injúria mecânica (RAHMAN, WILCOCK, 1991).

**Figura 4.** Aspecto geral da planta *Calotropis procera*.



Fonte: Brito, 2015.

Látex de *C. procera* tem sido amplamente estudado, principalmente no aspecto da identificação e caracterização de metabólitos secundários e proteínas (MOHAMED *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2015). Isso se justifica pela grande quantidade de atividades farmacológicas identificadas em seu látex, tais como atividade anti-inflamatória (FIGUEIREDO, 2014), analgésica (PARIHAR, BALEKAR, 2016), efeito anti-helmíntico e protetivo a outras doenças infecciosas (IQBAL, 2005; OLIVEIRA NASCIMENTO *et al.*, 2016), hepatoprotetora (SETTY, 2007) e cicatrizante (RAMOS *et al.*, 2016).

Látex de *C. procera* é constituído por várias substâncias incluindo proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, alcalóides, resinas e taninos (RAMOS *et al.*, 2013; RAVIKUMAR, 2015; CAVALCANTE *et al.*, 2016). Entre as proteínas, as proteases ganham destaque. Já foram purificadas e caracterizadas cinco proteases cisteínicas e mais vinte outros RNAm codificantes para proteases foram caracterizados (KUMAR DUBEY, JAGANNADHAM, 2003; KWON *et al.*, 2015). Além de proteases, quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo que têm sido identificadas (FREITAS *et al.*, 2007, 2016). Uma proteína semelhante às proteínas osmotinas, que pertencem ao grupo PR-5 de proteínas relacionadas à patogênese, foi purificada do látex de *C. procera*, sugerindo um papel defensivo para este fluido (FREITAS *et al.*, 2011).

Recentemente uma proteína do tipo germina-like, até então não encontrada em fluidos laticíferos, foi descrita por nosso grupo de pesquisa (FREITAS *et al.* 2016). Esta proteína, purificada do látex de *Thevetia peruviana*, denominada peruvianina, foi a primeira germina-like descrita na literatura com atividade proteolítica. Essa proteína apresentou-se como um hexâmero de 120 kDa, constituído de homomonômeros de 20 kDa. Além destas características estruturais, ela apresentou sequência N-terminal muito semelhante a das proteínas "germinas-like" (FREITAS *et al.*, 2016). No entanto, esta proteína não apresentou atividade oxalato oxidase, atividade característica das germinas "verdadeiras". Assim, peruvianina foi classificada como uma "germina-like" com atividade proteolítica.

Embora muitos relatos tenham sido feitos para germinas e germinas-like ocorrendo em vários tecidos de plantas de diversas espécies (BRUNO *et al.*, 2014; SASSAKI *et al.*, 2015), não há nenhum registro da presença destas proteínas em *C. procera*. Esta espécie se encontra em abundância na região Nordeste (FIGUEIREDO, 2014), tem sido amplamente estudada, apresentando um látex rico em proteínas (FREITAS *et al.*, 2011) e recentemente foi publicada a biblioteca de cDNA para esta espécie (KWON *et al.*, 2015). O interesse em investigar proteínas germina e germina-like no látex de *C. procera* é também justificado pelo potencial biotecnológico que elas apresentam, portanto, este trabalho teve como objetivo identificar essas proteínas no látex através de abordagens de bioinformática, proteômicas, bioquímicas e imunológicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar a presença de proteínas germinas ou germinas-like no látex de *Calotropis procera* caracterizando-as através de análises *in silico*, proteômicas e ensaios enzimáticos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar proteínas germinas e germinas-like a partir do transcriptoma de *Calotropis procera*;
- Realizar caracterização físico-química das proteínas germinas e/ou germinas-like a partir de análises *in silico*;
- Obter estruturas tridimensionais através de modelagem por homologia das proteínas em estudo;
- Avaliar possíveis sítios de atividade das proteínas em estudo por docking molecular;
- Purificar parcialmente do látex de *C. procera* diferentes frações proteicas;
- Identificar as proteínas presentes nas frações proteicas;
- Avaliar atividades oxalato oxidase e/ou superóxido dismutase nas frações proteicas purificadas de *C. procera*.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes

Acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, N,N,N,N tetrametiletilenodiamino (TEMED), marcadores de peso molecular foram obtidos da GE Healthcare (São Paulo, Brasil), *coomassie Brilliant blue* R-250, Sephacryl S-100. Iodoacetamida, 1,4-Dithiothreitol (DTT), tripsina (Promega grau sequenciamento), TFA (ácido trifluoroacético). N, N dimetilnilina, 3-metil-2-benzotiazolinona, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), peroxidase *horse radish*, riboflavina, NBT (nitroazul tetrazólio), L-metionina. Adjuvante completo e incompleto de Freund, IgG de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfato dissódico, Sepharose 4B, 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitroazul tetrazólio (BCIP/NBT), membrana de PVDF (Polivinilpirrolidona), membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham life Science) e de diálise “*cut off*” 8.000 foram obtidos de Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Tween 20 e Albumina Sérica Bovina (BSA) foram obtidas de INLAB, Brasil. Demais reagentes foram de grau analítico.

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Anotação Gênica

Foi realizado alinhamento com diversas proteínas germina-like para busca de regiões conservadas. Uma região conservada de *Nicotiana tabacum* (Acesso: BAH15357.1), contendo 20 resíduos de aminoácidos foi escolhida como isca. A sequência escolhida foi submetida à tBLASTn mediante uma busca no banco de sequências do transcriptoma da folha de *C. procer*a (SRX601829 da Database SRA). Todas as sequências resultantes da busca foram baixadas em formato FASTA e utilizou-se a ferramenta CAP3 (<http://biosrv.cab.unina.it/webcap3/>) da Mobyly Pasteur para obter os contigs. Os 30 primeiros nucleotídeos de cada uma das duas extremidades dos contigs foram submetidos à

tBLASTn, novamente na Database SRA (SRX601829). Todas as sequências resultantes foram selecionadas e o CAP3 foi usado para ampliar os contigs. O processo foi repetido até a obtenção de sequências que incluíssem a metionina inicial e o códon de parada. As sequências foram traduzidas com o auxílio do ExPASy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) para obtenção das sequências de aminoácidos que foram denominadas de germin-like proteína de *Calotropis procera* 1 e 2, GLCp1 e GLCp2, respectivamente.

### 3.2.2 Análises das sequências

As sequências de aminoácidos obtidas de *C. procera* foram comparadas com outras proteínas já depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank) utilizando o programa BLASTp, que realiza um alinhamento local entre as sequências deduzidas e as proteínas já catalogadas. Em seguida, foram selecionadas as proteínas que apresentaram maior identidade com as sequências de aminoácidos de GLCp1 e GLCp2 para ser realizado o alinhamento múltiplo das sequências através da plataforma ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os peptídeos sinais de GLCp1 e GLCp2 foram preditos pelo servidor SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), as massas moleculares e os pontos isoelétricos teóricos foram calculados por meio da ferramenta Compute pI/MW ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) (GASTEIGER *et al.*, 2005). O número de resíduos de cisteínas e as pontes dissulfeto preditas foram obtidos a partir do servidor Cys\_Rec (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) (GEOURJON, DELÉAGE, 1995). A predição dos sítios de N-glicosilação foi realizada utilizando o programa NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (EMANUELSSON *et al.*, 2000) e para os sítios de O-glicosilação foi utilizado o servidor YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) (GUPTA, BRUNAK, 2001).

### 3.2.3 Análises filogenéticas

Análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA 7 para verificar a homologia entre as sequências GLCp1 e GLCp2 e as proteínas germina e germin-like de maior identidade (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2016). As sequências de aminoácidos das proteínas foram alinhadas pelo programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (THOMPSON *et al.*, 1994). Foi utilizada a

matriz BLOSUM, selecionando com penalidades de gap padrão para alinhamento de pares de base (*gap open*: 10; *gap extension*: 0.1) e múltiplo (*gap open*: 10; *gap extension*: 0.2) e 30% de atraso de cortes divergentes. Uma árvore filogenética foi construída usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987) com distância-p para substituições de aminoácidos e opção de deleção completa para tratamento de *gaps*. Os clados gerados tiveram a estabilidade avaliada usando o método bootstrap com 1000 repetições.

### **3.2.4 Construção dos modelos tridimensionais**

A fim de comparar as estruturas de GLCp1 e GLCp2 com as de proteínas germina e germin-like, foram construídos modelos tridimensionais a partir de diferentes plataformas: Phyre2, SWISS MODEL e GalaxyWeb (KELLEY, STERNBERG, 2009; BORDOLI *et al.*, 2009; KO, PARK, SEOK, 2012). A estrutura tridimensional de *Hordeum vulgare* (PDB: 2ET7) (WOO *et al.*, 1998; WOO *et al.*, 2000) foi escolhida como molde por possuir estrutura resolvida por cristalografia e difração de raios-X e por ter apresentado alto grau de identidade (maior que 60%) com as proteínas GLCp1 e GLCp2. O programa Pymol foi utilizado para visualizar os modelos obtidos por modelagem, assim como para visualizar o possível sítio de atividade enzimática característico das germinas (DELANO, 2002).

### **3.2.5 Validação dos modelos**

Para avaliar a qualidade dos modelos tridimensionais de GLCp1 e GLCp2, construídos por diferentes plataformas, foram utilizados os programas ProSA, ERRAT2 e MolProbity (RAMACHANDRAN *et al.*, 1963; COLOVOS; YEATES, 1993; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007; CHEN *et al.*, 2010). O servidor 3DSS (SUMATHI *et al.*, 2006) foi utilizado para sobrepor as estruturas geradas por modelagem comparativa com a estrutura da proteína usada como molde e a sobreposição foi visualizada pela ferramenta RASMOL, que está interconectada com o servidor.

### **3.2.6 Docking Molecular**

O estudo de “docking” de proteínas, no qual se testa a afinidade de um “ligante” a um determinado substrato ou sítio de ligação, também foi realizado para verificar se o ligante oxalato pode se unir à GLCP. O programa utilizado foi o AutoDock Vina (TROT, OLSON, 2010).

### **3.2.7 Coleta e fracionamento do látex de *C. procera***

O látex de *C. procera* foi coletado a partir de plantas sadias localizadas em Fortaleza. O látex foi coletado a partir da quebra do ápice caulinar em tubos do tipo falcon contendo água destilada em uma proporção de 1:1 (v:v). O efeito natural de coagulação do látex foi parcialmente impedido por agitação suave durante a coleta.

O material foi centrifugado a 5000 x g, temperatura de 4 °C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, dialisado contra água destilada, em membranas capazes de reter moléculas com mais de 8000 Da, durante três dias, sendo realizadas três trocas diárias. O material retido nas membranas foi novamente submetido à centrifugação, sob as mesmas condições já citadas, e posteriormente liofilizado, obtendo-se um material proteico livre de borracha que foi armazenado até sua utilização (FREITAS *et al.*, 2007).

### **3.2.8 Cromatografia de Exclusão Molecular**

As proteínas do látex de *C. procera* foram submetidas à cromatografia de filtração em gel, utilizando matriz Sephacryl S-100 (GE Healthcare, 60 cm × 16 mm). A coluna foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,9. Aplicou-se 30 mg de LPCp dissolvida em 3 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna e no qual as proteínas foram eluídas. Foi empregado um fluxo de 0,3 mL/min sendo coletadas frações de 2 mL, as quais tiveram suas absorbâncias medidas a 280 nm. Após a separação dos picos, o material foi liofilizado e armazenado para uso em ensaios posteriores.



### 3.2.9 Dosagem de proteínas solúveis

Para avaliar a concentração de proteínas solúveis das amostras, assim como mensurar a quantidade de proteínas a ser empregada em cada ensaio subsequente, foi utilizado o método de Bradford (1976). A aplicação do método consistiu em utilizar 2,5 mL do reagente de Bradford e adicionar alíquotas de 10  $\mu$ L (1 mg/250  $\mu$ L) das amostras de interesse. Após 10 minutos, as absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm. A curva de calibração foi construída utilizando albumina sérica bovina como proteína padrão.

### 3.2.10 Análise do perfil proteico por eletroforese unidimensional

O processo de separação das proteínas do látex, através de cromatografia de exclusão molecular, foi avaliado inicialmente por eletroforese unidimensional. Os géis foram preparados de acordo com o método de Laemmli (1970), adaptado para uso em placas. Utilizou-se gel de separação a 12,5% em condições desnaturantes, enquanto o gel para aplicação da amostra continha 5% de poliacrilamida.

Os picos obtidos da cromatografia e LPCp (proteínas do látex de *Calotropis procera*) foram inicialmente dissolvidos em água destilada e de cada amostra foi retirada uma alíquota correspondente à 10  $\mu$ g de proteínas solúveis, que foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, glicerol 10% e na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, as amostras foram então aplicadas nos poços do gel.

Para que as proteínas tivessem a massa molecular estimada, em um dos poços do gel foi utilizada uma mistura de proteínas com massas conhecidas (marcadores de massa molecular): fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e alfa-lactalbumina (14,4 kDa). As condições em que a corrida foi realizada foram ajustadas para 15 mA por placa a 120 V, com duração média de 3 horas, a 25 °C. O tampão de corrida utilizado foi a solução de Tris 0,025 M (pH 8,3) contendo glicina 0,192 M e 0,1% de SDS. Para a visualização das bandas proteicas, os géis foram corados com o corante *Coomassie Brilhante* 0,1 % em solução com água destilada, ácido acético e metanol (6:1:3 v/v/v), sob agitação constante. Em seguida, o gel foi descorado com a mesma solução na ausência do corante.

### 3.2.11 Análise proteômica do látex de *C. procera*

As amostras liofilizadas, referentes aos sete picos obtidos por cromatografia de exclusão molecular, foram diluídas em água Milli-Q, resultando em uma concentração de 1 mg/mL. De cada amostra foi retirada uma alíquota de 50  $\mu$ L, as quais foram adicionados 10  $\mu$ L de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 50 mM e 2,5  $\mu$ L de ditioneína (DTT) 100 mM, seguido por agitação com o auxílio de um agitador de tubos. Os tubos foram então aquecidos a 60 °C em banho seco durante 30 minutos e em seguida foram removidos, deixados para resfriar a temperatura ambiente e centrifugados a 14000 x g, por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 2,5  $\mu$ L de iodoacetamida 300 mM e novamente agitados. As amostras foram colocadas no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos para que ocorresse a reação. Alíquotas de 10  $\mu$ L de uma solução de tripsina (Promega grau sequenciamento), diluída em bicarbonato de amônio 50 mM, foram adicionadas aos tubos e mantidos em estufa a 37 °C durante a noite para que ocorresse a digestão. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14000 x g, à 6 °C por 30 minutos e os sobrenadantes foram armazenados para análise posterior por espectrometria de massas.

Outra abordagem utilizada foi a separação das proteínas de cada pico cromatográfico através de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida da retirada de cada banda e digestão com tripsina, como descrito por Hellman e colaboradores (1995). Todas as bandas de interesse foram excisadas do gel com auxílio de um bisturi, transferidas para um microtubo, e descoradas em uma solução de Acetonitrila 50 % em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8. Posteriormente, foram feitas duas lavagens com 200  $\mu$ L desta solução, sob agitação no vortex antes e depois de cada lavagem, e deixada "overnight" para que a descoloração fosse efetiva.

No dia seguinte procedeu-se outra lavagem segundo as mesmas condições descritas. Os *spots* foram descorados e desidratados com 200  $\mu$ L de Acetonitrila 100 %, este passo foi repetido mais uma vez e as bandas do gel ficaram com aparência opaca. A acetonitrila foi removida em centrífuga a vácuo. Os pedaços de géis provenientes foram reidratados com 100  $\mu$ L de DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM e foram colocados em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos. A solução foi então removida e os *spots* foram alquilados com 100  $\mu$ L de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, permanecendo no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos. Seguiu-se com a remoção da solução e lavagem dos pedaços de géis com 200  $\mu$ L de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos, novamente a solução foi removida, os géis foram desidratados com acetonitrila 100%, esta solução

permaneceu em contato com os géis por 5 minutos e em seguida foi descartada. Procedeu-se com a repetição deste passo. Foi adicionada mais uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila 100%, que foi removida após 5 minutos.

Os pedaços de géis foram secados em concentrador de amostras e reidratados em banho de gelo, por 1 hora, com 20 $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de amônio 100 mM, contendo 0,2  $\mu\text{g}$  de tripsina. A digestão procedeu-se a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, os tubos foram sonicados no ultrassom por 10 minutos, e toda solução foi transferida para outro tubo. Ao gel restante adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, permanecendo 15 minutos em repouso em temperatura ambiente e depois 2 minutos em ultrassom. Toda a solução com os peptídeos foi transferida para o mesmo tubo já contendo solução de cada *spot*. Este passo foi repetido e em seguida os tubos foram submetidos à centrifugação por 30 segundos a 14000 x *g*. Os peptídeos foram concentrados em concentrador de amostras e armazenados em freezer para posterior análise por espectrometria de massas.

### 3.2.12 Espectrometria de massas

A mistura de peptídeos provenientes dos peptídeos, oriundos da digestão das proteínas dos *spots*, foi dissolvida em 2  $\mu\text{L}$  de TFA 0,5%. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 C18 (75  $\mu\text{m}$  x 200 mm) utilizando um gradiente de acetonitrila de 7% a 40%, contendo 0,1% de ácido fórmico, a partir de um fluxo de 500 nL/minuto (PANIS *et al.*, 2013).

Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema NanoUPLC-ESI. As análises foram feitas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) a partir da fonte NanoLockSpray. O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 segundos para passagem do íon de referência. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução de GFP (320 fmol/mL) injetado através do spray de referência da fonte NanoLockSpray. Os íons duplamente carregados ( $[M + 2H]^2+$ ) foram usados para a calibração de um ponto inicial (Lteff) e a fragmentação iônica de GFP em MS/MS foi usada para obtenção da calibração final do instrumento.

### 3.2.13 Pesquisa em bancos de dados

Para o processamento dos dados obtidos pelo ESI-QUAD-TOF, tanto para amostra complexa como para os *spots*, foi utilizado o software ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters). Os procedimentos compreenderam de correção automática dos valores de m/z dos espectros MS e MS/MS segundo a massa do íon de referência do *lockspray*. Os dados de MS e MS/MS foram submetidos simultaneamente ao programa de busca MASCOT (Matrix Science Ltd. –www.matrixscience.com). As análises foram realizadas utilizando banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) restringido para Viridiplantae (Green Plants). Os critérios adotados para as buscas consideraram a carbamidometilação de cisteínas como modificações fixas e oxidação das metioninas e desamidação como modificações variáveis. Na hidrólise por tripsina, foi considerada a possível perda de até um sítio de clivagem e a tolerância das massas dos peptídeos e dos fragmentos foi de  $\pm 0,05$  Da.

### 3.2.14 Ensaio Enzimáticos

#### 3.2.14.1 Preparo de Meio MS com 2 % de sacarose

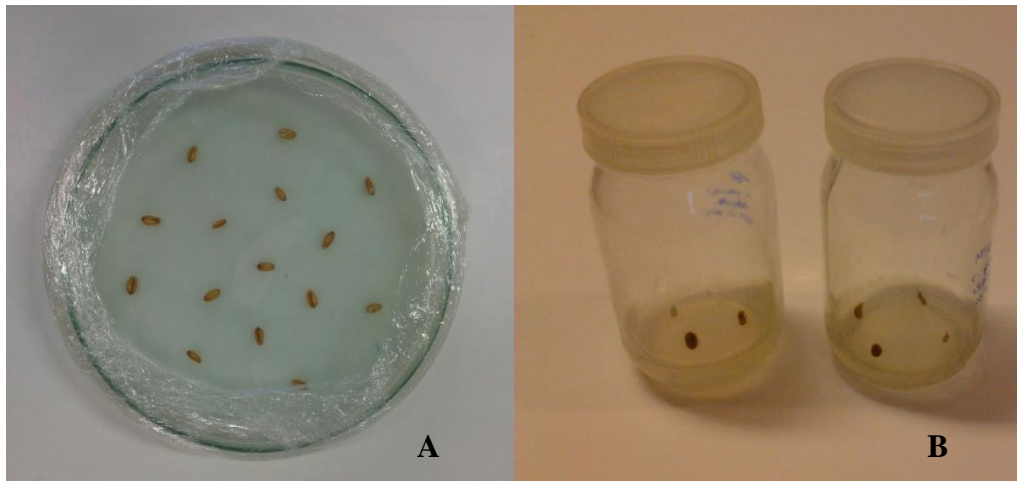
Sementes de *C. procera* foram postas para germinar em meio MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) a 2% de sacarose. Soluções previamente preparadas de macronutrientes ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e EDTA férrico); micronutrientes ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ); vitaminas (glicina, ácido nicotínico, Pirodoxina-HCL e Tiamnina-HCL);  $\text{CaCl}_2$  e iodeto de potássio (KI) foram adicionadas em água destilada e logo em seguida sacarose foi adicionada e o pH ajustado para 5,8. O ágar foi adicionado em sequência, com o meio sendo agitado constantemente para facilitar a completa dissolução. Posteriormente, o meio foi aquecido até apresentar aspecto gelatinoso e distribuído em frascos de vidro (20 mL) que foram previamente autoclavados.

#### 3.2.14.2 Desinfecção de sementes para germinação

Sementes de *C. procera* e trigo (*Triticum aestivum* - controle positivo para a presença de germinas) foram inicialmente imersas em 50 mL de água destilada contendo três gotas de

detergente e posteriormente submetidas a cinco lavagens sucessivas com água destilada. Em seguida o material foi levado à câmara de fluxo laminar e imerso em 100 mL de álcool etílico 70% por 10 minutos e, após lavagens subsequentes com água esterilizada, foi imerso em 100 mL de hipoclorito 33% por 20 minutos, novamente o material foi lavado exaustivamente com água estéril. As sementes de trigo foram então depositadas em placas sobre papel de filtro umedecido, que haviam sido previamente autoclavados (Figura 5). Sementes de *C. procera* foram depositadas nos frascos contendo meio MS e mantidas em ambiente com controle de luz (12 horas de claro e 12 horas de escuro, a 23 °C).

**Figura 5.** Sementes de trigo (*Triticum aestivum*) e de *Calotropis procera*.



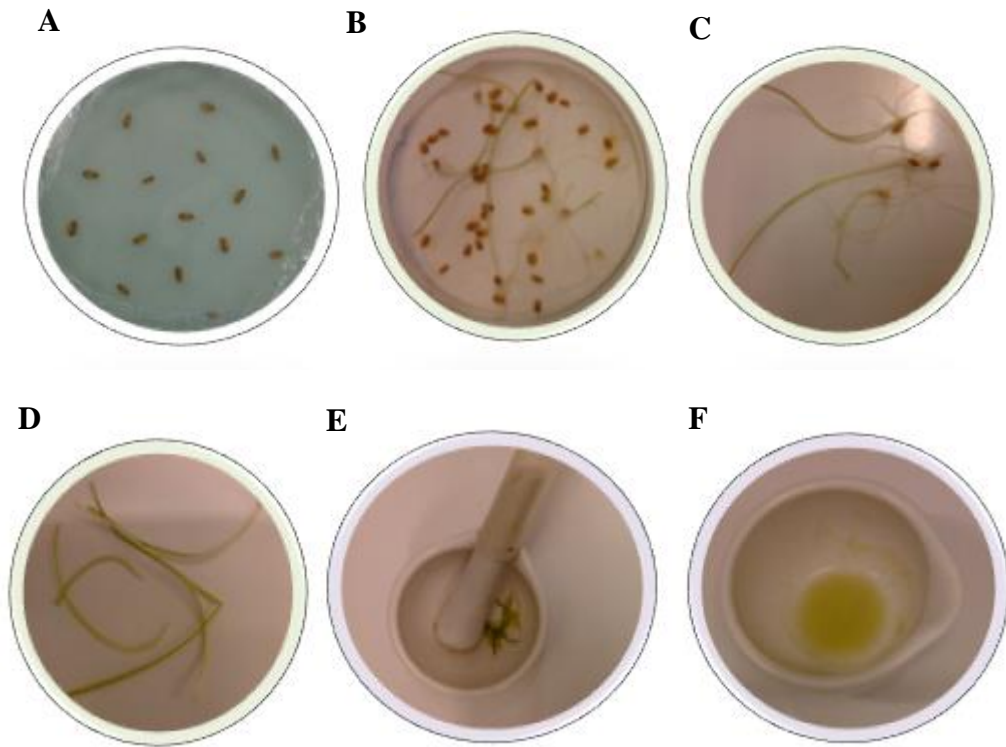
(A) Sementes de trigo (*Triticum aestivum*) mantidas em placas de petri (B) Sementes de *C. procera* em meio MS.

Fonte: elaborado pelo próprio autor

#### 4.2.14.3 Atividade Oxalato Oxidase

Germinas apresentam atividade enzimática do tipo oxalato oxidase presente no trigo (*Triticum aestivum*), por isso foi usado como controle positivo na avaliação da atividade nas frações cromatográficas e nas sementes de *C. procera*. Os procedimentos para obtenção do extrato proteico de coleótilos de trigo germinado foram realizados como descrito pelo método de Sugiura *et al.*(1979). As placas com as sementes de trigo foram envolvidas com papel alumínio para simular o ambiente escuro, e após três dias, quando as sementes começaram a germinar, as placas foram expostas a ambiente com luz (12 horas de claro e escuro), 23 °C, onde permaneceram por mais cinco dias para alongamento dos coleótilos. Os segmentos de coleótilos foram excisados e macerados com tampão succinato 0,1 M, pH 3,5 (Figura 6). O material foi centrifugado a 10000 x g, 10 °C, por 10 minutos e os sobrenadantes foram usados para quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

**Figura 6.** Germinação das sementes de trigo



(A) Sementes de trigo depositadas em placas de petri - 1º dia. (B) Aparecimento e alongamento dos coleóptilos - 9º dia. (C) e (D) Seleção e separação dos coleóptilos – Dia 11. (E) e (F) Maceração do material – 11º dia.

A atividade de oxalato oxidase *in vitro* foi realizada com o extrato de coleóptilos de trigo (220  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), com a fração proteica total do látex de *C. procera*, LPCp (4 mg/mL) e com os picos cromatográficos (1 mg/mL). As amostras (190  $\mu\text{L}$ ) foram incubadas com 2,5 mL do reagente A (40 mM de tampão succinato, 0,79 mM N,N-dimetilanilina e 0,11 mM de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona, pH 4,0), 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mM, 200  $\mu\text{L}$  de ácido oxálico 200 mM e 10  $\mu\text{L}$  de peroxidase horse radish (1 mg/mL), por 10 minutos, a 25 °C. O material obtido do trigo foi utilizado como controle positivo. Todas as reações foram monitoradas a partir da medição da absorbância a 600 nm como descrito por CHEN *et al.*, 2011.

#### 3.2.14.4 Atividade Superóxido Dismutase

Como algumas germinas ou germinas-like apresentam também atividade superóxido dismutase, esta atividade foi avaliada nas mesmas amostras usadas na atividade oxalato oxidase. A atividade superóxido dismutase foi avaliada por zimograma e por ensaios *in vitro* em microplacas. Para os zimogramas, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 12,5 % sob condição desnaturante (SDS-PAGE) de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971). Alíquotas dos extratos proteicos foram misturadas com tampão de aplicação e submetidas à eletroforese. Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes com triton 2,5 %, por 20 minutos cada lavagem, para retirada do SDS e em seguida foi imerso em 50 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 por 15 min. O tampão foi retirado e o gel foi imerso em 50 mL de solução contendo riboflavina 0,1 mg/mL e NBT 0,25 mg/mL e expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats ( $30 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), para indução da reação fotoquímica. Após 40 minutos, as bandas acromáticas foram visualizadas e a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água destilada.

Para os ensaios de microplaca foi usado o protocolo de Peskin *et al.* (2000), adaptado para placas de ELISA, sendo realizados à temperatura ambiente (25 ° C). Os reagentes foram adicionados na microplaca em triplicata, na seguinte ordem: 10  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 7,8; 20  $\mu\text{L}$  de EDTA 1 mM; 10  $\mu\text{L}$  de triton X-100 0,25%; 20  $\mu\text{L}$  de L-metionina 130 mM; 100  $\mu\text{L}$  da amostra em 100  $\mu\text{L}$  de água deionizada (controle negativo); 20  $\mu\text{L}$  de NBT (Nitro azul de tetrazólito) 750  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{L}$  de riboflavina 100 mM. As adições de NBT e riboflavina foram feitas em ambiente com baixa luminosidade e logo após a adição de riboflavina a microplaca foi coberta com papel alumínio e mantida em repouso por 5 minutos, posteriormente seguiu-se as leituras de absorvância a 630 nm, em leitora de ELISA, sendo as primeiras leituras realizadas no escuro relativas à mistura reacional e não à reação propriamente dita. Após a etapa no escuro, a microplaca foi transferida para uma câmara com luz fluorescente e a intervalos de um minuto foram realizadas leituras a 630 nm, depois de cada leitura de absorvância a placa voltou imediatamente para a câmara luminosa, até completar o tempo de 5 minutos de reação. Os poços que continham água deionizada e extrato proteico de *Plumeria rubra* que apresenta atividade Superóxido Dismutase (FREITAS *et al.*, 2010) consistiram no controle negativo e controle positivo, respectivamente.



### 3.2.15 Predição de peptídeos antigênicos nas germinas de *C. procera*

Uma busca por peptídeos antigênicos foi realizada com o objetivo de encontrar uma sequência para ser sintetizada e utilizada em ensaios imunológicos para o reconhecimento de proteínas germina ou germina-like no látex e em sementes de *C. procera*. As sequências GLCp1 e GLCp2 foram alinhadas utilizando a plataforma ClustalO (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para que fossem realizadas buscas por regiões conservadas entre ambas. A fim de avaliar o potencial alergênico dos peptídeos que se encontravam em regiões conservadas, os mesmos foram submetidos aos servidores SDAP - AllAllergens (<https://fermi.utmb.edu/>) e AllerTOP 1.0 (<http://www.pharmfac.net/allertop/>). As sequências GLCp1 e GLCp2 foram analisadas pelos servidores AllergenOnline (<http://www.allergenonline.org/>) que realiza buscas por peptídeos alérgenos. GLCp1 e GLCp2 foram ainda analisadas pelo programa Proinflam (<http://metabiosys.iiserb.ac.in/proinflam/>), que realiza predição de epítomos pró-inflamatórios, e ao servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>), para predição de peptídeos antigênicos. As sequências selecionadas foram visualizadas nas estruturas tridimensionais das duas proteínas através do programa Pymol. Assim, foi selecionado um peptídeo com potencial antigênico e que estava localizado na superfície das duas germinas de *C. procera*. O peptídeo foi denominado de GLCp-Pep.

### 3.2.16 Síntese do peptídeo

A síntese do peptídeo foi realizada pela empresa GenoneBiotechnologies. Foi utilizada cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC) em coluna PLRP-S 100A, 4.6×250 mm para purificação do peptídeo. O eluente A (solvente A) consistiu em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em acetonitrila 100% e o eluente B correspondeu à água acidulada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Foram aplicados 5 µL da amostra e a taxa de fluxo foi de 1 mL/min. Para a detecção do peptídeo utilizou-se o comprimento de onda de 220 nm. A pureza do peptídeo foi avaliada por Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS; ionização via dessorção por laser).

### **3.2.17 Produção de anticorpos anti-CpGermin**

Anticorpos policlonais anti-GLCp-pep foram produzidos em coelho macho da raça Nova Zelândia, de 4 meses de idade, obtido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (Ramos *et al.*, 2006). Para a indução de sensibilização uma dose inicial (dia 0) de GLCp-pep (0,5 mg em 0,5 mL de salina estéril) com adjuvante completo de Freud (0,5 mL) foi administrada por via intramuscular na pata traseira do animal. No mesmo dia foi realizada incisão na extremidade da orelha do animal para coleta de sangue antes da primeira sensibilização, que foi usado como controle. Doses reforços de 0,5 mg de GLCp-pep em 0,5 mL de solução salina com o adjuvante incompleto foram aplicadas via subcutânea no dorso do animal nos dias 21, 35 e 42. Aproximadamente 20 a 35 mL de sangue foram coletados nas incisões que foram realizadas nos dias em que eram administradas as doses reforços (dias 21, 35 e 42). O sangue coletado foi deixado em repouso em estufa a 37 °C por 5 horas para retração do coágulo e obtenção do soro. Em seguida, o soro foi submetido à centrifugação a 2000 x g por 5 minutos a 25°C. O soro total resultante foi utilizado para purificação dos anticorpos GLCp-pep, que posteriormente foram utilizados em ensaios de *Dot Blotting*, *Western Blotting* e ELISA.

### **3.2.18 Purificação dos anticorpos GLCp-pep**

Os soros totais obtidos a partir da imunização com GLCp-pep foram aplicados em coluna de proteína A imobilizada em Sepharose 4B, previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,15 M, pH 6,0. As proteínas não retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio e as proteínas retidas na coluna foram eluídas com tampão glicina-HCl 50 mM, pH 2,8, fluxo de 1,5 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e as leituras das absorbâncias foram registradas a 280 nm em espectrofotômetro. As frações correspondentes aos picos de absorbância foram dialisadas contra água destilada por três dias a 4°C e liofilizadas. O material liofilizado referente às proteínas do pico retido foi considerado como anticorpo GLCp-pep purificado.

#### **4.2.19 Dot Blotting**

Nos ensaios de *Dot Blotting* foram adicionados 10 µL das amostras, correspondentes a LPCp, aos sete picos cromatográficos e GLCp-pep (usado como controle positivo), na membrana de nitrocelulose (0,45 mm) (Hybond-P, Amersham Life Science), em seguida, foram deixadas para secar por 10 minutos a 25°C e incubadas em solução bloqueadora PBS (NaCl 0,13 M KCl 2,6 mM, NaHPO<sub>4</sub> 5,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas a 25 °C. Após esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana lavada três vezes consecutivas com PBS. Os anticorpos policlonais anti-GLCp-pep foram adicionados na diluição 1: 5000 v/v na solução bloqueadora contendo 5% de leite desnatado e a incubação feita à temperatura ambiente, sob agitação por 2 horas. Depois de três lavagens com tampão PBS, cada uma por 2 minutos e sob agitação, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo na diluição 1: 10000 (v:v, anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra, conjugado com fosfatase alcalina), por 2 horas, à 25°C. Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphatase/ nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), que consiste de uma solução de Tris-HCl 20 mM, pH 9,0; NaCl 0,1 M; MgCl 2,5 mM; NBT 10 mg/mL. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato até o aparecimento de círculos arroxeados.

#### **4.2.20 Western Blotting**

Para o ensaio de *Western Blotting* (TOWBIN *et al.*, 1979) foram realizadas duas eletroforeses, uma para a eletrotransferência e outra para coramento com Coomassie Brillante Blue R-350. Os poços do gel de eletroforese foram preenchidos com LPCp e as sete frações cromatográficas do látex de *C. procera*. BSA foi utilizada como controle negativo. As proteínas foram transferidas por 2 horas a 100 mA para uma membrana de PVDF, que foi previamente ativada com metanol e incubada por 10 minutos com tampão de corrida contendo 20% de metanol, usando uma unidade de transferência no Semi-dry (GE HealthCare). Os passos seguintes da reação foram realizados conforme já descritos no ensaio de *Dot Blotting*. Após a adição do substrato esperou-se a formação de bandas arroxeadas e a reação foi parada lavando a membrana com água destilada.

### **3.2.21 Ensaio de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

As amostras (LPCp e os picos cromatográficos) foram dissolvidas em tampão ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,6) na concentração de 1 mg/mL. Foi utilizada placa de ELISA de polietileno de fundo chato, estéril, contendo 96 poços. Em cada um dos poços foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  das amostras e deixadas em repouso durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (PBS; pH 7,4 contendo 0,005% de Tween 20) e deixadas para secar. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de BSA (10 mg/mL em PBS), seguido de repouso por 1 hora a 37 °C. Após esse período as placas foram lavadas e esperou-se que secassem para adição de 150  $\mu\text{L}$  do anticorpo primário (diluição de 1: 5000 de anti- GLCP-pep) em cada poço, dissolvido em tampão PBS com 0,025% de Tween 20, deixada em repouso por 2 horas a 37°C. Novamente as placas foram lavadas e após secas, 150  $\mu\text{L}$  do substrato (p-nitrofenil fosfato dissódico preparado em água) na concentração de 1 mg/mL foi adicionado e deixado por 30 minutos, protegido da luz. A reação foi parada com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio (4 N) e em seguida a leitura de absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Elx800 Absorbance Microplate Reader) a 405 nm.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização *in silico* de GLCP1 e GLCP2

Utilizando uma germina de *Nicotiana tabacum* (BAH15357.1) e após a anotação gênica de sequências oriundas de uma biblioteca de cDNA de planta de *C. procera*, foram obtidas duas sequências completas de nucleotídeos que foram posteriormente traduzidas em proteínas. Desta forma, as duas proteínas foram nomeadas "Germina-Like proteínas de *Calotropis procera*" (GLCp1 e GLCp2) e foram alinhadas a partir da plataforma ClustalO, apresentando 59, 51 % de identidade entre si (Figura 7). O alinhamento local (BLASTp) contra o banco de dados de proteínas do NCBI mostrou que estas duas sequências possuem identidade maior que 60% com proteínas do tipo "Germina-like" de outras plantas. As proteínas germina-like que apresentaram maior similaridade com GLCp1 e GLCp2, assim como proteínas do tipo germina, foram selecionadas para realizar um alinhamento múltiplo através da plataforma ClustalO (Figura 8). As sequências de GLCp1 e GLCp2 apresentaram maior identidade com as proteínas germina-like de *Camellia sinensis* (69,67%) e *Chimonanthus praecox* (64,08%), respectivamente. Por outro lado, GLCp1 e GLCp2 apresentaram menor similaridade com as germinas de *Triticum aestivum* e *Hordeum vulgare*, com identidade de 34,42 e 38,86%, respectivamente (Tabela 2). A "germina-like" de *Nicotiana tabacum*, usada como isca, apresentou 64,25% de similaridade com GLCp1 e 62,14% com GLCp2.

Algumas características físico-químicas de GLCp1 e GLCp2 podem ser visualizadas na Tabela 2. GLCp1 apresenta 216 resíduos de aminoácidos (com peptídeo sinal), pI teórico de 6,81 e massa molecular de 22791.55 Da. A sequência de GLCp2 possui 206 resíduos de aminoácidos, pI teórico de 6,49 e massa molecular de 21795.10 Da (com peptídeo sinal). A predição realizada por meio do servidor Cys\_Rec mostrou que as duas sequências não formam pontes dissulfeto, embora GLCp1 apresente 2 resíduos de cisteínas e GLCp2 possua 3 resíduos (Tabela 2).

**Figura 7.** Alinhamento das sequências GLCp1 e GLCp2 (com peptídeo sinal) pela plataforma ClustalO.

```

GLCp1      MFLIQAFFLFSILSITNIIISSTQATVLDFCVADPSLPVGPAGYSCKKVASVTEKDFVFS
GLCp2      --MLHLFLLFSLLL-----TSDASDFCIIGDLTAPETPSGYHCKNPANVTAEDFAFS
           ::: *:*:*:*:* :           : . *:*:*:* : * *:*:* *:* : *.*.* :*:*.*

GLCp1      -LGTAGNTSNIKAAVTPAFAPTFPGVNLGVSIARLDLAVDGVVPMHHPGSSEILVVV
GLCp2      GLGASGNTTNLIKAAVTPAFDAQFPGLNGLGISMARLDLAPGGVPMHHPGANELLVVV
           **:*:*:*:*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:* :.*:*:*:*

GLCp1      EGQLCAGFISSLENIVYFKTLFKGDVMVFPQGLLHFQFNSGKAAAVAYASFGSSYPGLQI
GLCp2      QGSVATGFISS-NQFYKVLKRGDIMVYPKGLLHFQINARGKNAIAFVSFSSSNPGLQI
           :* :.*:*:*:* * .:*:* * *:*:*:*:*:*:*:*:*:* :.*:*:* * * *

GLCp1      TDFALFKNDLPTEIVVKTFLDVAQVKLKGVLGGKN
GLCp2      LDFALFGNNIPTSLQKSTFLDAAQIKMLKGVGGTN
           ***** *:*:*:* :.*:* *:*:* *:*:* *:*:* *

```

\* Representam resíduos de aminoácidos conservados entre as sequências.

**Figura 8.** Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas do tipo germina e "germina-like" utilizando o programa ClustalO.

```

Germin T.aestivum      MGYSKNIASGMFAMLLLASAVLSSNPFLQDFCVADLDGKAVSVNGHMCKPMSEA-GDDF
Germin H.vulgare      -----SDPDPDLDGKAVSVNGHTCKPMSEA-GDDF
Germin-like P.vulgaris -----MIYILFLFSLLAFTSNAAVNDFCVADLKGPDSP-SGYQCKPTKEVTVDDF
Germin-like C.procera 2 -----MLHLFLLFSLLLV--TSDASDFCIGDLTAPETP-SGYHCKNPANVTAEDF
Germin-like O.sativa  ----MAKAVMMLPVLLSFLLLPFSSMALTQDFCVADLTCSDTP-AGYPCKA--SVGAGDF
Germin-like Z.mays    ----MAKMVLLCVLVSFLLMPLASLALTQDFCVADLTCSDTP-AGYPCKS--SVTANDF
Germin-like P.sativum -----MKMILTISFFIFSLLSLSHASVVDVFCVADYNAPNGP-AGYSCKTPKKVTVDDF
Germin-like A.thaliana -----MKMIIQIFFIISLISLISFASVQDFCVADPKGQSP-SGYSCKNPDQVTENDF
Germin-like C.procera 1 --MFLIQAFFLFSILSITNIIISSTQATVLDVFCVADPSLPVGP-AGYSCKKVASVTEKDF
Germin-like N.tabacum -----MFKLLFLLAIFILGSNAAVQDFCVADLKGPEP-AGYSCKSVANVTVDDF
Germin-like C.sinensis -----MEMYLP--LFVVSLLFSYSHGSVLDVFCVADFSLPDGP-AGYSCKKPAKVTVNDF
Germin-like C.praecox -----MEMMPTIFFFFLQLLFFSSSNAAVQDFCVADLTGPEGP-AGYSCKKPAIVTVDDF
                                     ***:.*          *: **      .   **

Germin T.aestivum      LFSSKLAKAGNTSTPNGSAVIDLNVAEWPGTNTLGVSMNRVDFAPGGTNPPIHPRATEI
Germin H.vulgare      LFSSKLTKAGNTSTPNGSAVTELDVAEWPGTNTLGVSMARVDFAPGGTNPPIHPRATEI
Germin-like P.vulgaris -----VF-SGLV-AGNTTNTFNAALTSFVTFDFPGVNLGVSAARLDIAKGGSIIPMHTHPAATEL
Germin-like C.procera 2 AF-SGLGASGNTTNLKAAVTPAFDAQFPGLNGLGISMARLDLAPGGVVPMTHTPEANEL
Germin-like O.sativa  AY-HGLAAAGNTSNLIKAAVTPAFVQFPFGVNLGISAARLDIAVGGVVPPLHTHPAASEL
Germin-like Z.mays    YF-HGLAGQGKINPLIKAAVTPAFVQFPFGVNLGISAARLDIEVGGVVPPLHTHPAGSEL
Germin-like P.sativum VF-HGLATGGNTNIIKAAVTPAFDAQFPFGVNLGISIARLDLAPGGVVPPLHTHPGASEV
Germin-like A.thaliana AF-TGLGKAGNTSNIKAAVTPAFAPAYAGINGLVSLARLDLAPGGVVPPLHTHPGASEV
Germin-like C.procera 1 VF-S-LGTAGNTSNIKAAVTPAFAPTFFPGVNLGVSIARLDLAVDGVVPMHTHPGSSEI
Germin-like N.tabacum VF-SGLSAAAGNTASIIKAAVTPAFAAQFPGLNGLLSAARLDLAPGGVVPPLHTHPGASEV
Germin-like C.sinensis VY-SALGIAGDNTNLKAKVTPAFAAQFPFGVNLGLSMARLDLAVDGVVVPHTHPGGSEI
Germin-like C.praecox VF-SGLGKAGNTSNIIRAAPTAFSAQFPGLNGLLSIARLDLAVEGVVPPLHTHPGGSSEL
:  *  * .      : :*      : * * * * * * : : * * * * * . * :

Germin T.aestivum      GIVMKGELLVGLGSLDSGNKLYSRVVRAGETFLIPRGLMHFQFNVGKTEASMVVFNFSQ
Germin H.vulgare      GMVMKGELLVGLGSLDSGNKLYSRVVRAGETFVIIPRGLMHFQFNVGKTEAYMVVFNFSQ
Germin-like P.vulgaris -----LIMVEGKITAGFMT----PFAVYTKTLKPGDIMVFPQGLHFQVNSGKKGATAFLAFSSA
Germin-like C.procera 2 LLVVQGSVATGFIS---SSNQFYKVKLRKGDIMVYKGLLHFQINARGKNAIAFVFSFSS
Germin-like O.sativa  LFVTQGTVAAGFITS--SSNTVYTRTYAGDIMVFPQGLLHYQYNAGQSAVALVAFSGP
Germin-like Z.mays    LFVTQGTVAAGFISS--GSNTVYTKTYAGDIMVFPQGLLHYQYNAGTGAVALVAFSSP
Germin-like P.sativum LVVVIQGTILAGFVS---SANVVYLKTLNKGDMVFPQGLLHFQINSGRNSALAFVFSFSSA
Germin-like A.thaliana LVVVIQGTICAGFIS---SANKVYLKTLNRGDSMVFPQGLLHFQVNSGKGPALAFVAFGSS
Germin-like C.procera 1 LVVVEGQLCAGFISS---LENIVYFKTLFKGDMVFPQGLLHFQVNSGKAAAVAYAFGSS
Germin-like N.tabacum LLVVQGSITAGFVS---SANAVYLKTLKKGDLMIFPQGLLHFQVSDAGYTSVGFVFSFSSS
Germin-like C.sinensis LFVVEGTICAGFISS---SANTVYFKTLYKGDVFPQGLLHFQVNSGNRPALAIVFSFSSP
Germin-like C.praecox LVVVQGTICAGFISS---SANTVYFKTLKKGDMVFPQGLLHFQINGGGIPAFVFSFSSP
.: :* : .*: :      . * : : * : : * : * : * . :

Germin T.aestivum      SPSVVFVPLTLFGSNPPIPKPVLTKALRVEAGVVELLKSKFAGGS
Germin H.vulgare      NPGIVFVPLTLFGSDPPIPTPVLTKALRVEAGVVELLKSKFAGGS
Germin-like P.vulgaris -----NPGAQLLDLLFGNSIPS--ELIAQTFFLDVDQVKKVRRRFGGGR
Germin-like C.procera 2 NPGIQILD FALFGNNIPT--SLLQKSTFLDAAQIKMLKGVVGGTN
Germin-like O.sativa  NPGIQITD YALFANNLPS--AIVEKVTFLDDAQVKKL KSVLGGSG
Germin-like Z.mays    NPGIQITD FALFANNLPS--AVVEKVTFLDDAQVKKL KSVLGGSG
Germin-like P.sativum NPGIQILD FALFKSDFPT--ELI TATTF LDAGLVKKL KGVVGGSG
Germin-like A.thaliana SPGLQILP FALFANDLPS--ELVEATTF LSDAEVKKL KGVVGGTN
Germin-like C.procera 1 YPGIQITD FALFKNDLPT--EIVVKTFFLDVAQVKKL KGVVGGKN
Germin-like N.tabacum SPGLQITD FALFANDLPT--KLVEATTF LDEATIKKL KGVVGGTN
Germin-like C.sinensis SPGLQITD FALFANNLPS--ALVEKVTFLDDAQVKKL KAVLGGTG
Germin-like C.praecox SPGLQITA FALFANNLPS--ELVEKTF LDDAQVKKL KAVLGGTG
* . : ** .. * : : . : : * : *

```

\* Representam resíduos de aminoácidos conservados entre as sequências.

**Tabela 2.** Comparação das propriedades físico-químicas de GLCp1 e GLCp2 com outras germinas e "germinas-like" proteínas.

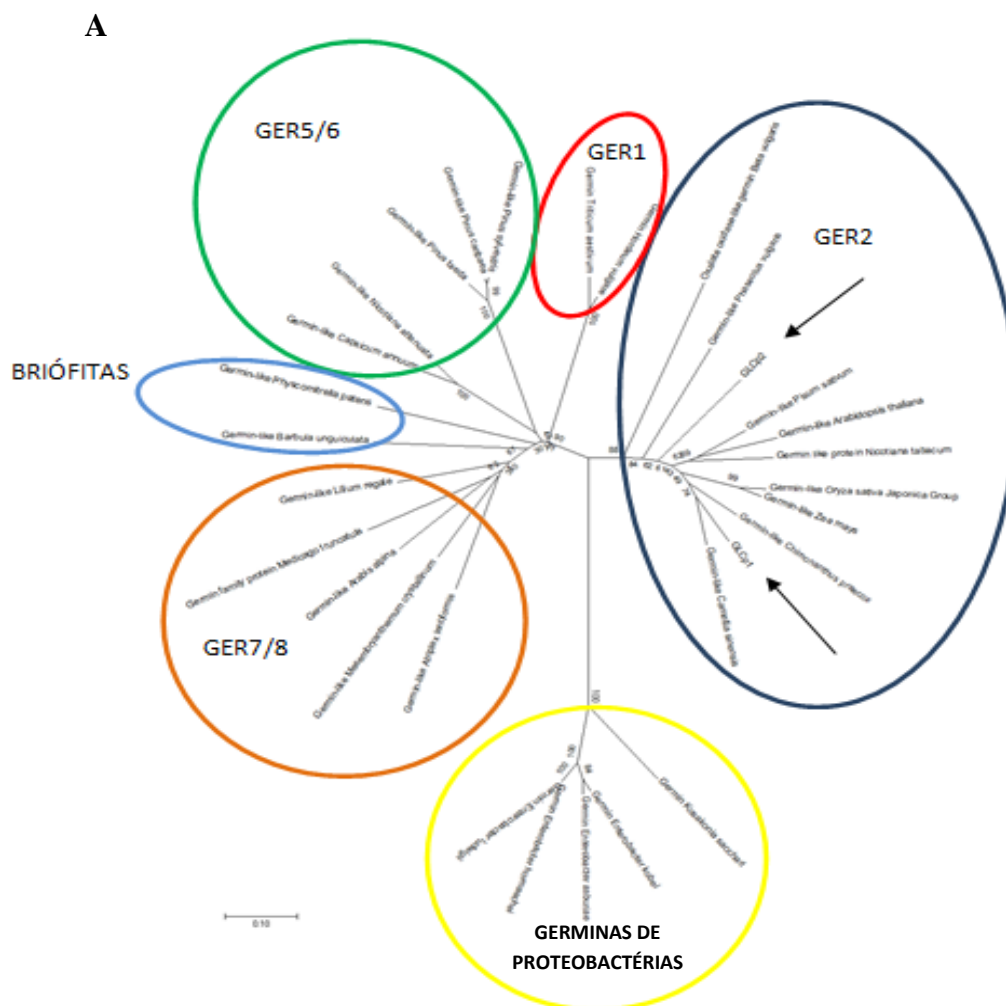
\* Comprimento das sequências com peptídeo sinal.

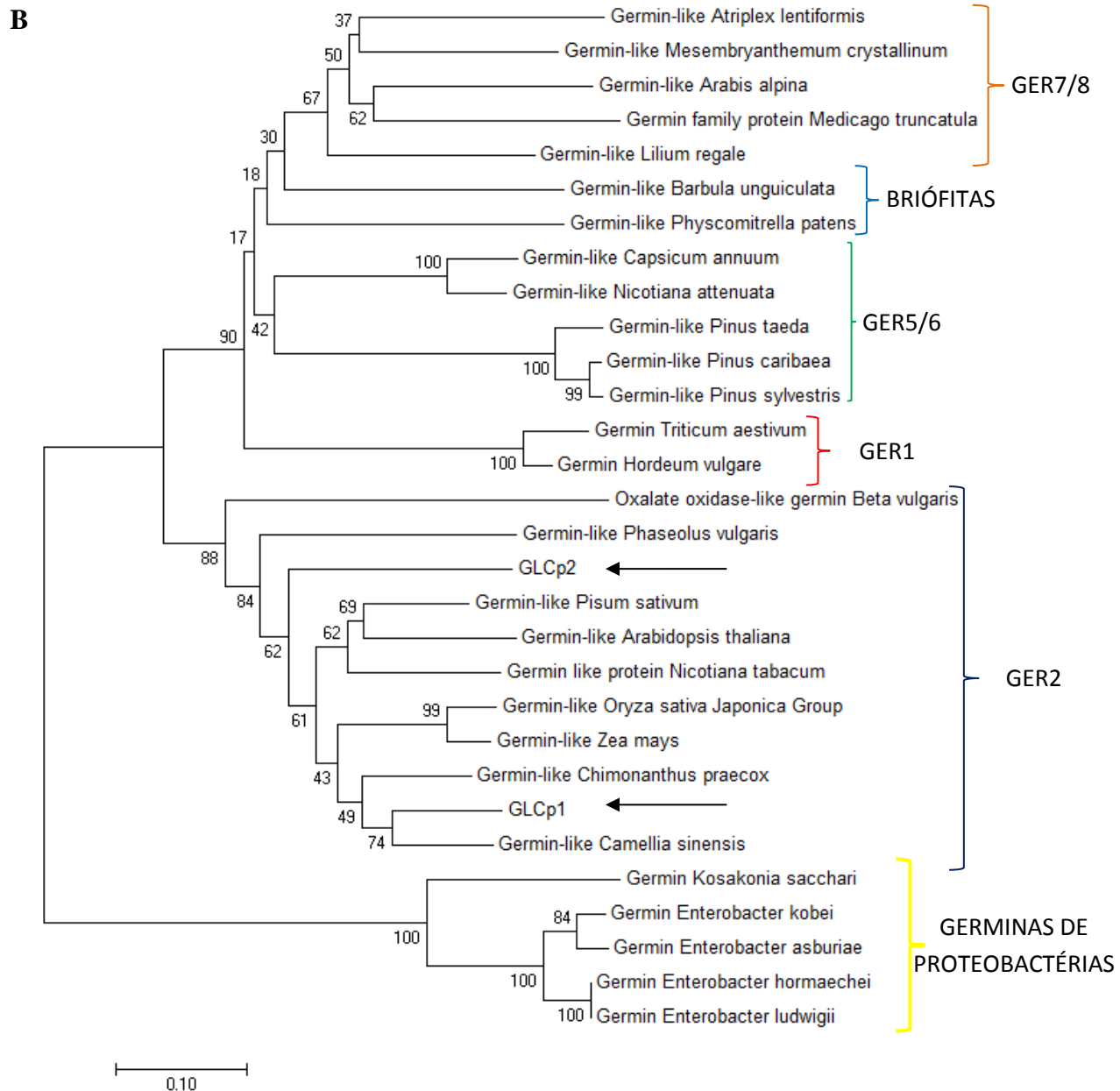
| Espécie                      | Proteína             | Comprimento da sequência* | Massa Molecular (Da) | pI teórico | Pontes dissulfeto preditas | Nº Resíduos de cisteína | Acesso (NCBI)  | % Identidade |       |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|------------|----------------------------|-------------------------|----------------|--------------|-------|
|                              |                      |                           |                      |            |                            |                         |                | Cp1          | Cp2   |
| <i>Calotropis procera</i>    | Germina-like (GLCp1) | 216                       | 22791.55             | 6,81       | 0                          | 3                       | _____          | 100          | 56.59 |
| <i>Calotropis procera</i>    | Germina-like (GLCp2) | 206                       | 21795,10             | 6,49       | 0                          | 2                       | _____          | 56.59        | 100   |
| <i>Hordeum vulgare</i>       | Germina              | 201                       | 21217.22             | 5,52       | 1                          | 2                       | 2ET7_A         | 38.66        | 38.86 |
| <i>Triticum aestivum</i>     | Germina              | 224                       | 23562.24             | 8,57       | 1                          | 2                       | AAA34271.1     | 34.42        | 37.07 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>  | Germina-like         | 211                       | 21603.88             | 6,26       | 0                          | 3                       | AAB51666.1     | 65.71        | 57.77 |
| <i>Pisum sativum</i>         | Germina-like         | 211                       | 21615.06             | 6,95       | 1                          | 2                       | CAC34417.1     | 63.81        | 62.14 |
| <i>Camellia sinensis</i>     | Germina-like         | 212                       | 21421.78             | 6,45       | 1                          | 3                       | AEN02469.1     | 69.67        | 60.29 |
| <i>Chimonanthus Praecox</i>  | Germina-like         | 214                       | 19749.77             | 6,31       | 0                          | 3                       | ABV03161.1     | 66.20        | 64.08 |
| <i>Zea mays</i>              | Germina-like         | 212                       | 21887.34             | 6,01       | 2                          | 4                       | NP_001140857.1 | 57.35        | 58.82 |
| <i>Oryza sativa Japonica</i> | Germina-like         | 213                       | 21861.22             | 6.01       | 1                          | 3                       | AAC05682.1     | 58.49        | 61.76 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Germina-like         | 206                       | 21833.19             | 7,77       | 0                          | 2                       | CAB77393.1     | 54.15        | 52.94 |
| <i>Nicotiana tabacum</i>     | Germina-like         | 208                       | 21421.72             | 5,84       | 0                          | 2                       | BAH15357.1     | 63.77        | 62.14 |



As proteínas germina-like podem ser classificadas em clados/subfamílias e nomeadas de GER 1, GER 2, GER 3, GER 4, GER 5, GER 6, GER 7, GER 8 ou subfamílias das briófitas 1 e 2 (BARMAN, BANERJEE, 2015). Cada clado é composto por proteínas com aminoácidos específicos e/ou conservados que foram separados em "germin boxes" A, B e C (BERNIER, BERNA, 2001; KHURI *et al.* 2001). Assim, uma árvore filogenética foi construída para verificar a relação e a proximidade evolutiva entre as sequências GLCp1 e GLCp2 e outras proteínas germinas e germinas-like (Figuras 9A e 9B). GLCp1 e GLCp2 foram agrupadas no clado GER 2. A isca usada para a obtenção das sequências, a proteína germina-like de *Nicotiana tabaco*, também ficou incluída no clado GER 2 como pode ser observada na árvore filogenética (Figura 9).

**Figura 9.** Relações de membros das famílias GLP e germinas de 25 plantas de diferentes espécies e cinco germinas de proteobactérias.

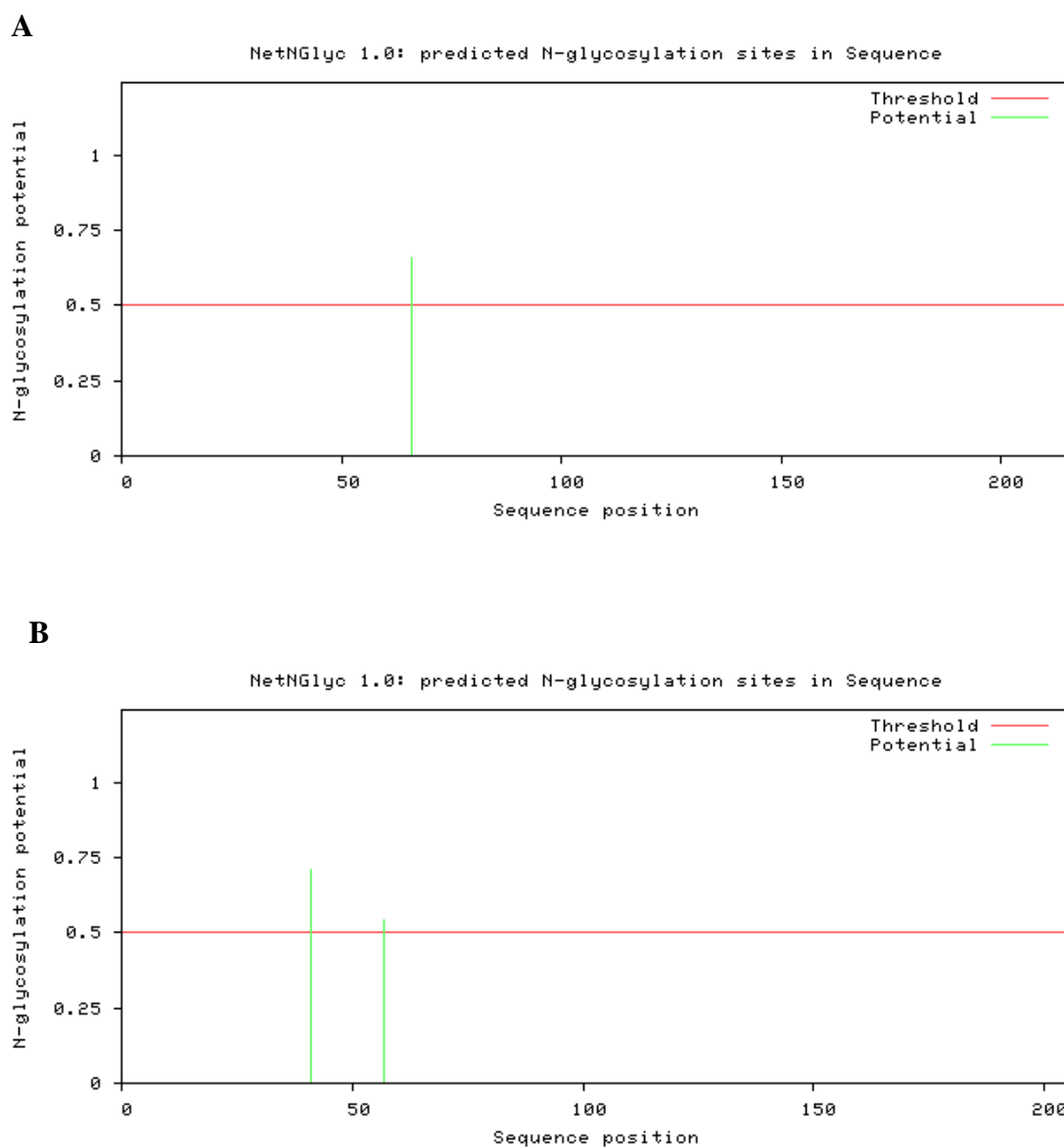




A árvore filogenética é baseada em seqüências de aminoácidos das estruturas primárias de diferentes proteínas germina e "germina-like" construída utilizando o método de Neighbor-Joining no programa Mega 7 utilizando um *bootstrap* com 1000 replicações. A análise envolveu 30 seqüências de aminoácidos, em que 25 foram agrupados em cinco diferentes clados e outras 5 foram agrupadas como germinas de proteobactérias. (A) Representações radiada e (B) tradicional.

Várias germinas e germina-like proteínas são N-glicosiladas (JAIKARAN *et al.*, 1990). Assim, foi investigado se GLCp1 e GLCp2 apresentavam possíveis sítios de N-glicosilação. As buscas revelaram que há um único potencial sítio de N-glicosilação para GLCp1 (Asparagina na posição 66) (Figura 10A) e dois sítios em GLCp2 (Asparagina nas posições 41 e 57) (Figura 10B).

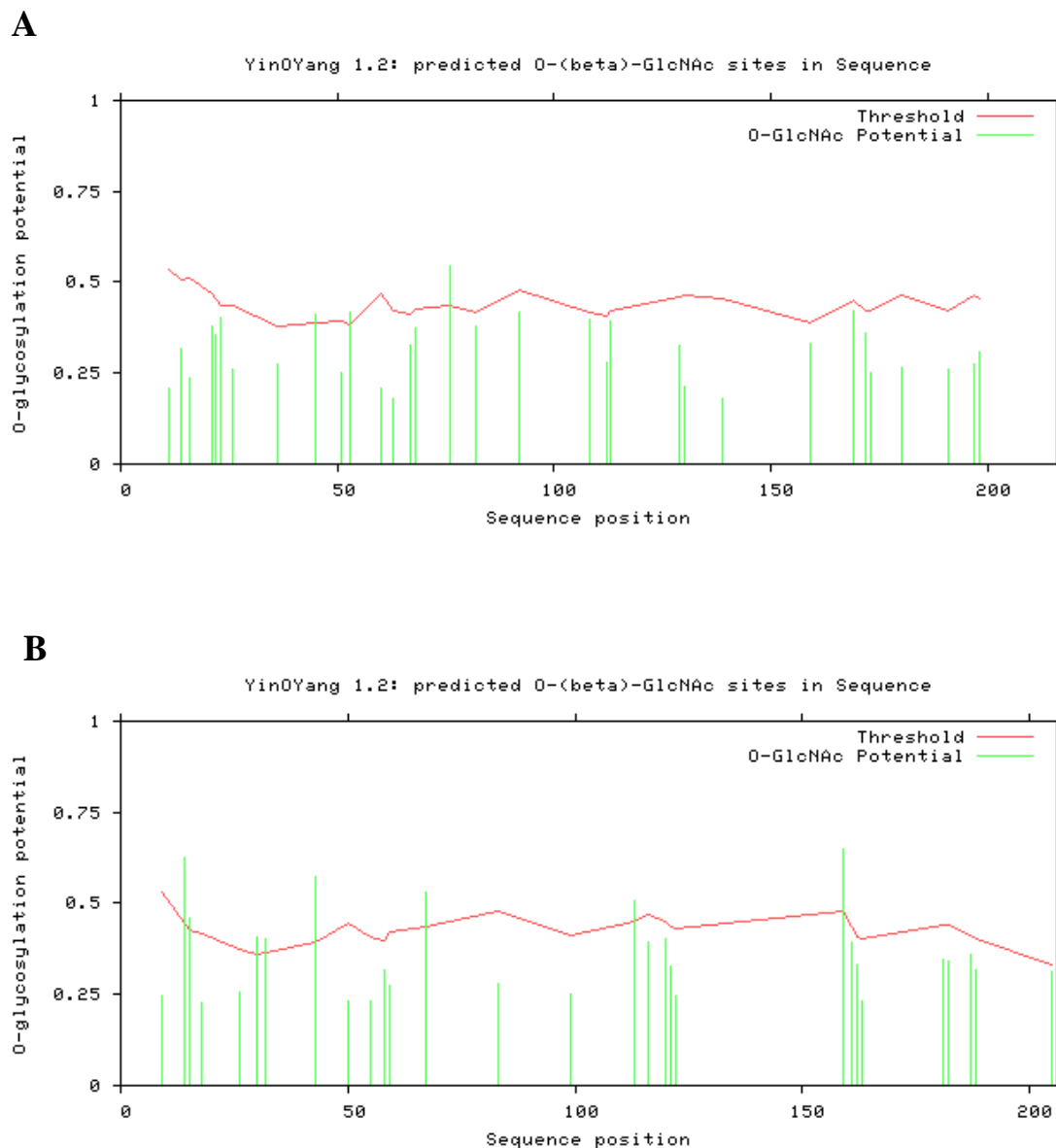
**Figura 10.** Predição de sítios de N-glicosilação em GLCp1 (A) e GLCp2 (B).



O programa utilizado foi NetNGlyc. Linhas acima do limiar (vermelho) indicam potenciais sítios para N-glicosilação.

A busca por sítios de O-glicosilação (Figuras 11A e 11B) revelou que GLCP1 possui 3 potenciais sítios de glicosilação do tipo O-GlcNac, mas apenas um apresentando potencial acima do limiar-2 localizado no resíduo Thr<sub>76</sub>. Com relação a GLCP2, a predição mostrou 8 potenciais sítios do tipo O-GlcNac, com 3 deles apresentando potencial acima do limiar-2, localizados nos resíduos Thr<sub>14</sub>, Thr<sub>46</sub> e Ser<sub>159</sub>.

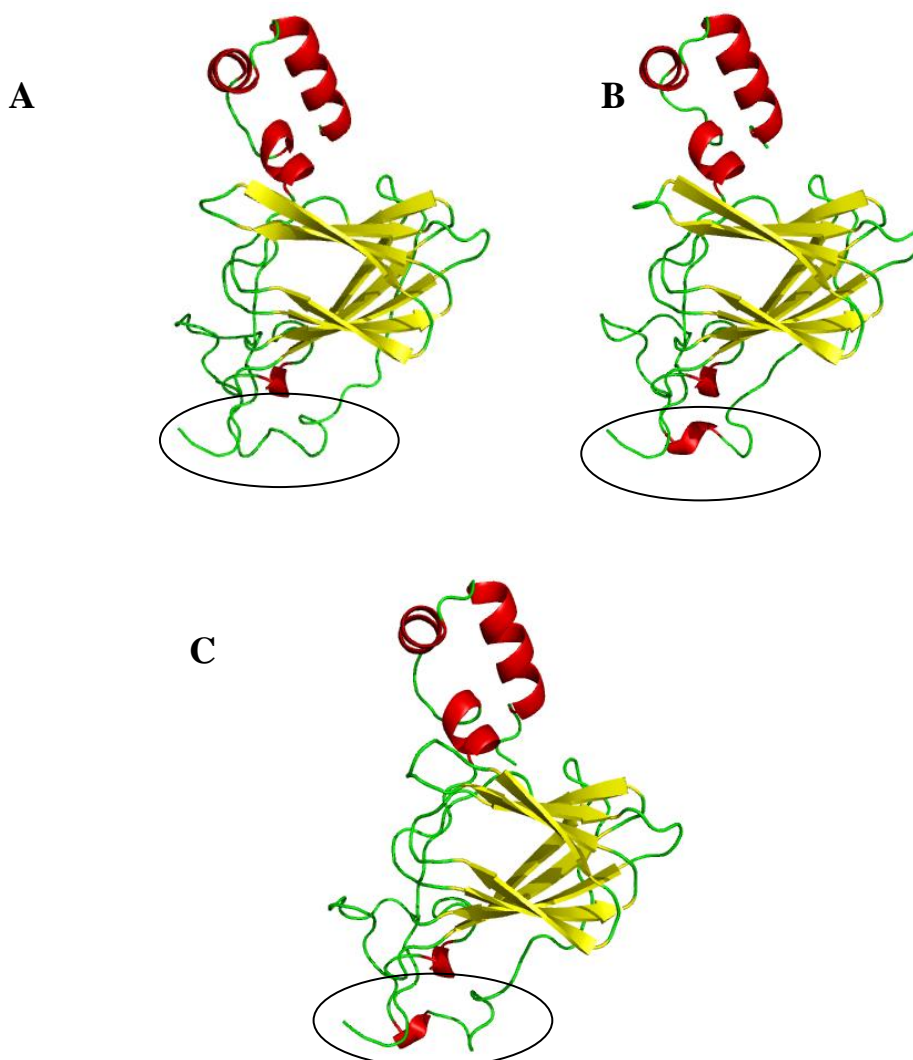
**Figura 11.** Predição de sítios de O-glicosilação em GLCP1 (A) e GLCP2 (B).



A análise foi feita através do servidor YinOYang 1.2. Linhas acima do limiar (vermelho) indicam possíveis sítios para O-glicosilação.

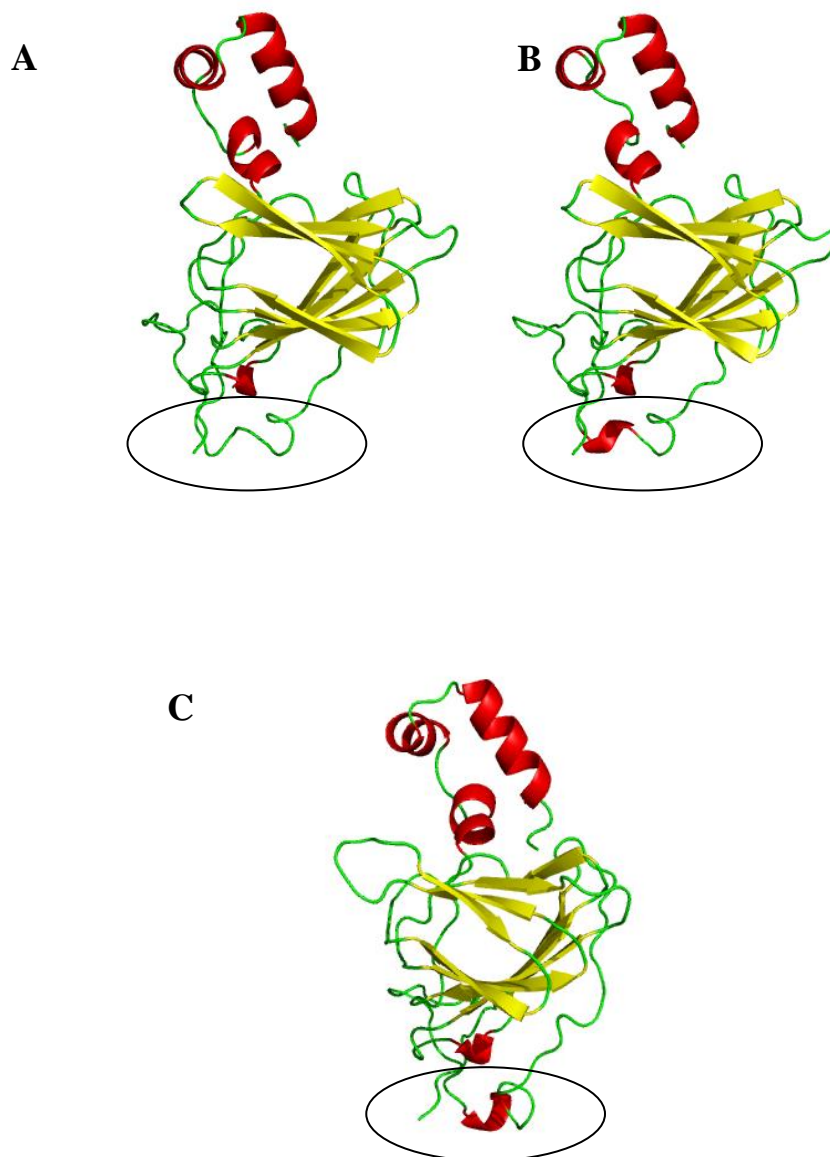
Foram construídos modelos tridimensionais de GLCp1 e GLCp2 por meio dos servidores: Phyre2, SWISS MODEL e GalaxyWeb (Figuras 12 e 13). Para isso foi selecionada a proteína do tipo germina de *Hordeum vulgare* (PDB:2ET7) como molde, pois embora esta proteína não apresente identidade tão elevada com relação às duas proteínas em estudo (38,66% com GLCp1 e 38,86% com GLCp2), a mesma possui estrutura resolvida, necessária para a construção dos modelos tridimensionais. As estruturas foram visualizadas no programa Pymol.

**Figura 12.** Modelos das estruturas tridimensionais de GLCp1 obtidos por diferentes plataformas.



Representação em “cartoon” dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: SWISS MODEL (A); Phyre2 (B) e GalaxyWeb (C). Estrutura secundária representada em diferentes cores:  $\alpha$ -hélice (vermelho), fita- $\beta$  (amarelo), alças (verde).

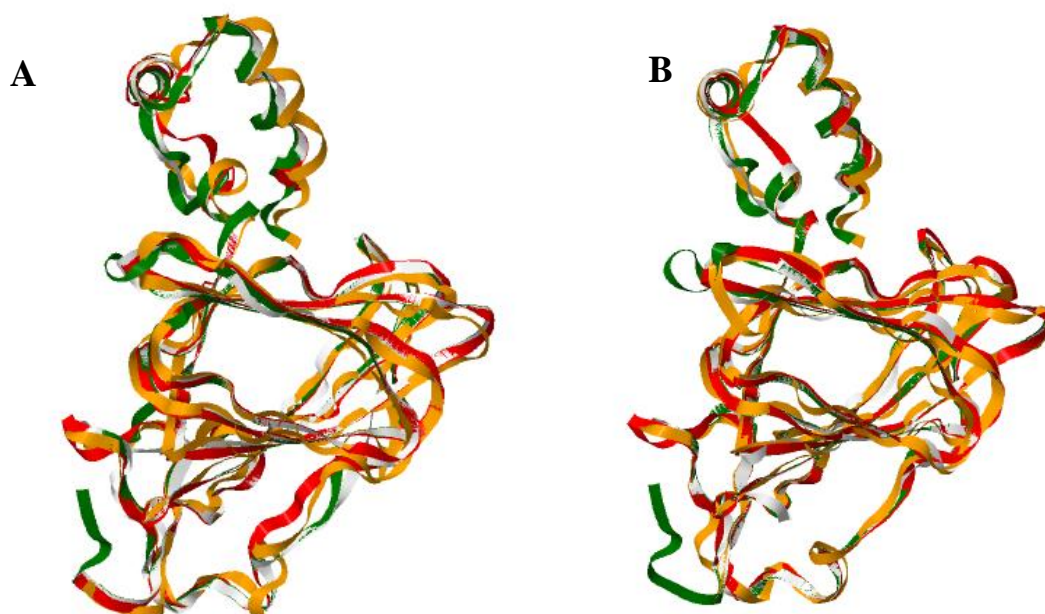
**Figura 13.** Modelos das estruturas tridimensionais de GLCp2 obtidos por diferentes plataformas.



Representação em “*cartoon*” dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: SWISS MODEL (A); Phyre2 (B) e GalaxyWeb (C). Estrutura secundária representada em diferentes cores:  $\alpha$ -hélice (vermelho), fita- $\beta$  (amarelo), alças (verde).

As estruturas obtidas por modelagem, pelas diferentes plataformas, foram sobrepostas com o molde padrão utilizando o programa 3DSS (Figura 14). Com o mesmo programa foi possível obter o RMDS (raiz quadrada do desvio médio), que corresponde à medida da distância média entre os átomos de proteínas sobrepostas. Quanto maior o valor do RMDS, maior é a diferença entre as proteínas comparadas. Os valores de RMSD para GLCp1 foram de 0,629; 0,774 e 1,218 Å para os modelos gerados pelos servidores SWISS MODEL, Phyre2 e GalaxyWeb, respectivamente. Para GLCp2 os valores de RMSD foram de 0,421; 0,456 e 1,019 Å para os modelos gerados pelos servidores SWISS MODEL, Phyre2 e GalaxyWeb. Os modelos obtidos pelo SWISS MODEL foram os mais promissores, visto que ele gerou os menores valores de RMSD, enquanto os modelos gerados pelo GalaxyWeb obtiveram os maiores valores, mostrando-se menos viáveis.

**Figura 14.** Sobreposição dos modelos das estruturas tridimensionais obtidos para GLCp1.



A sobreposição das representações em “*ribbon*” das estruturas de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) foi realizada pelo programa 3DSS. Modelos construídos por cada servidor e o molde padrão (2ET7) estão representados em cores distintas: Molde padrão (verde); SWISS MODEL (branco); Phyre2 (vermelho); GalaxyWeb (laranja).

A predição das estruturas secundárias realizada através do servidor PDBsum (<https://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) mostrou que foi comum a todos os modelos a organização das estruturas em  $\alpha$ -hélices, fitas- $\beta$  e alças (Figuras 15, 16 e 17). As estruturas apresentaram 5  $\alpha$ -hélices e 10 fitas- $\beta$  (5 paralelas e 5 antiparalelas). Nos diagramas das figuras 18, 19 e 20 é possível observar como os elementos estão dispostos nas estruturas.

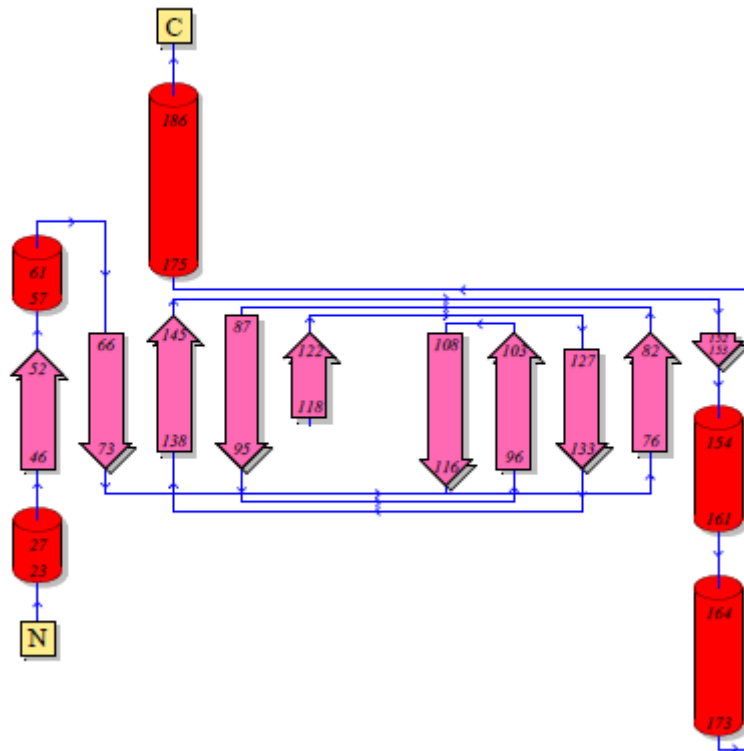
Os modelos gerados pela plataforma SWISS MODEL quando submetidos ao PDBsum geraram diagramas de interações entre quatro resíduos de aminoácidos (3 histinas e um glutamato; His<sub>107</sub>, His<sub>109</sub>, His<sub>154</sub> e Glu<sub>114</sub>) e um íon manganês, mostrando a possibilidade de um sítio de atividade oxalato oxidase, que é comum em germinas e em algumas germina-like proteínas (Figura 21). Os modelos foram visualizados pelo Pymol e comparados com o molde usado como padrão (germina de *Hordeum vulgare*) (PDB:2ET7).

O diagrama das estruturas secundárias preditas para GLCp1 e GLCp2 revelou a presença de ponte dissulfeto para ambos os modelos gerados pelo Phyre2, para os outros modelos não foram geradas pontes (Figura 19 A e B). No entanto, a predição realizada anteriormente com relação às pontes dissulfetos, mostrou que não haveria formação das mesmas tanto em GLCp1 como em GLCp2.

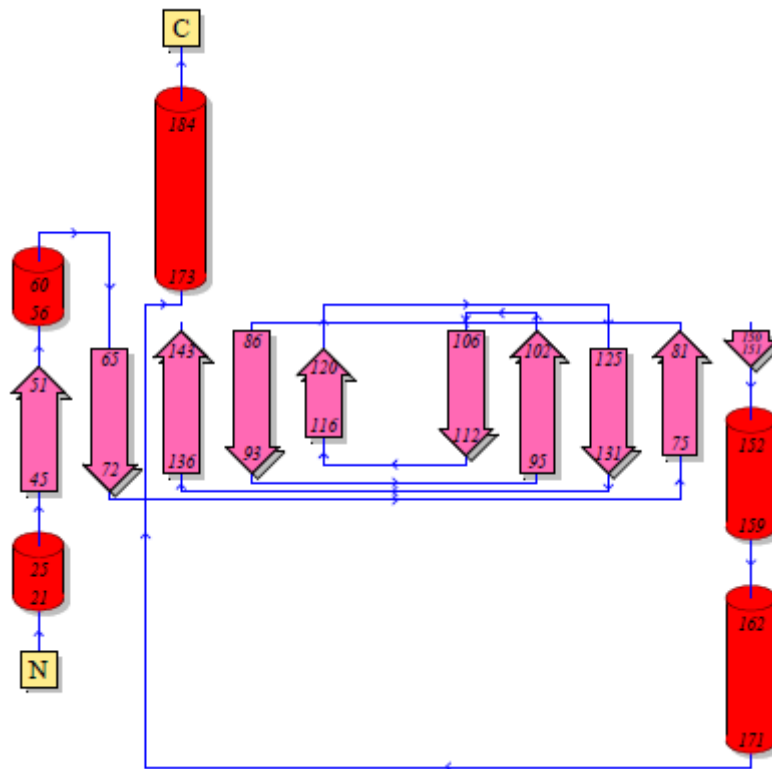


**Figura 15.** Predição topológica das estruturas secundárias de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) a partir dos modelos gerados pelo servidor SWISS MODEL.

A

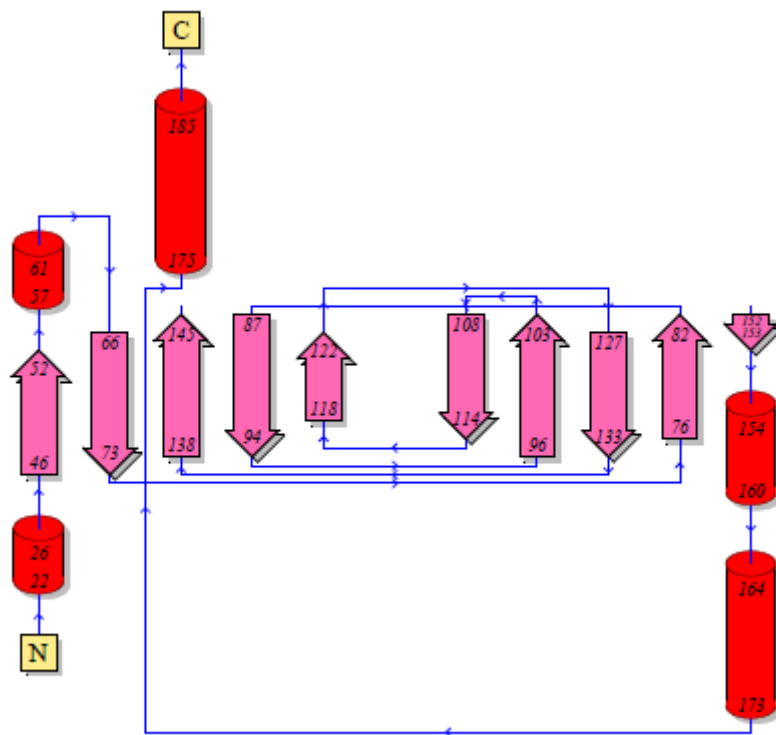


B

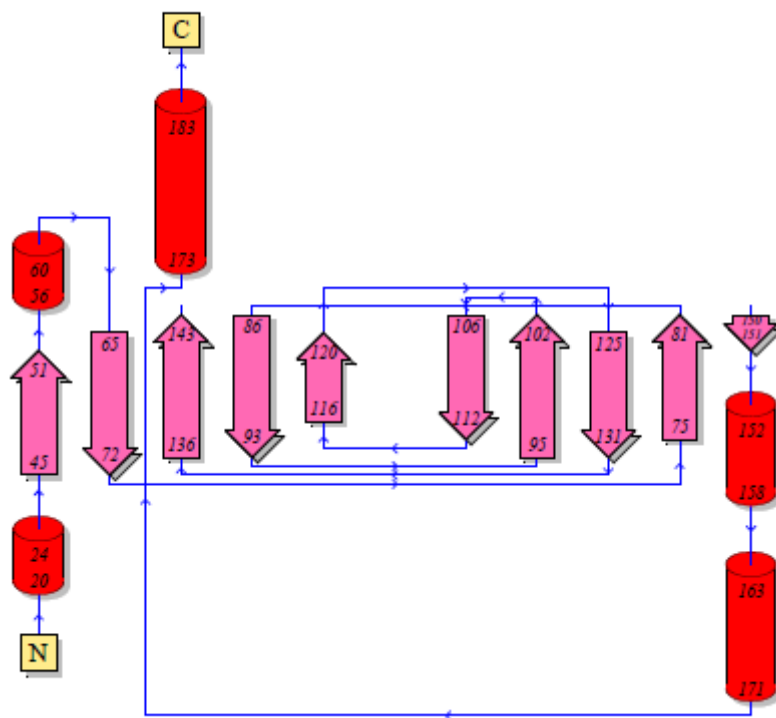


**Figura 16.** Predição tológica da estrutura secundária de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) a partir dos modelos gerados pelo servidor Phyre2.

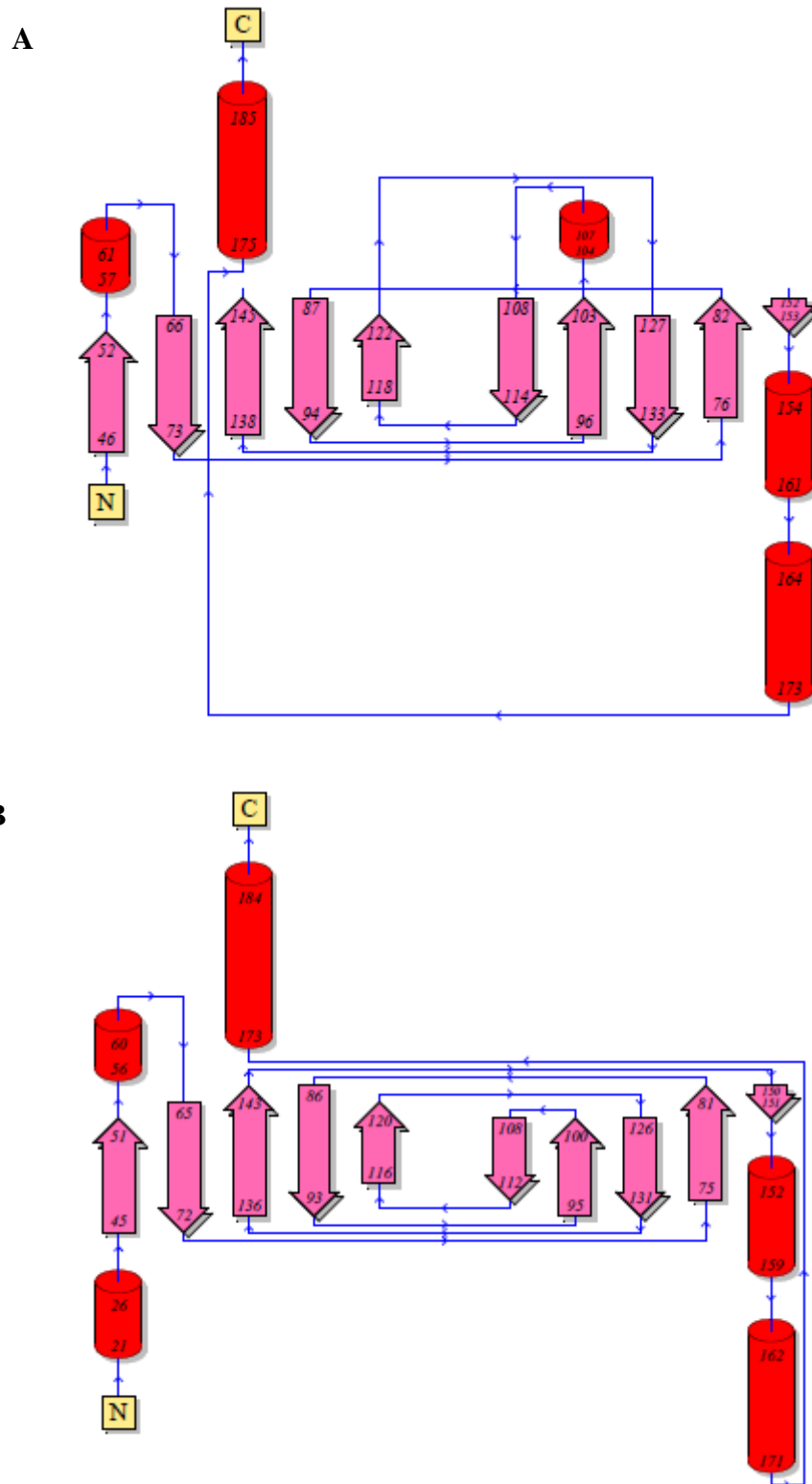
A



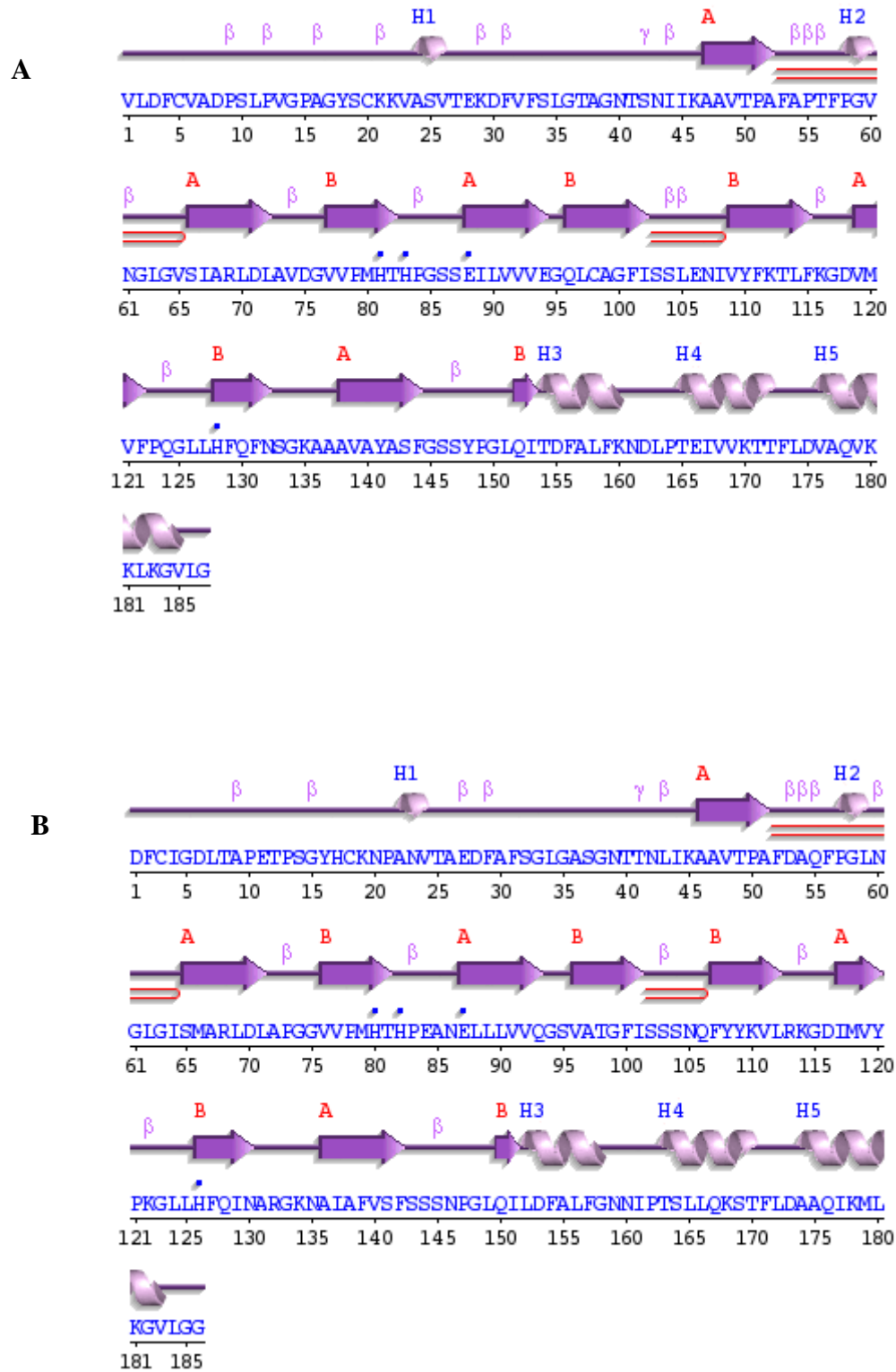
B



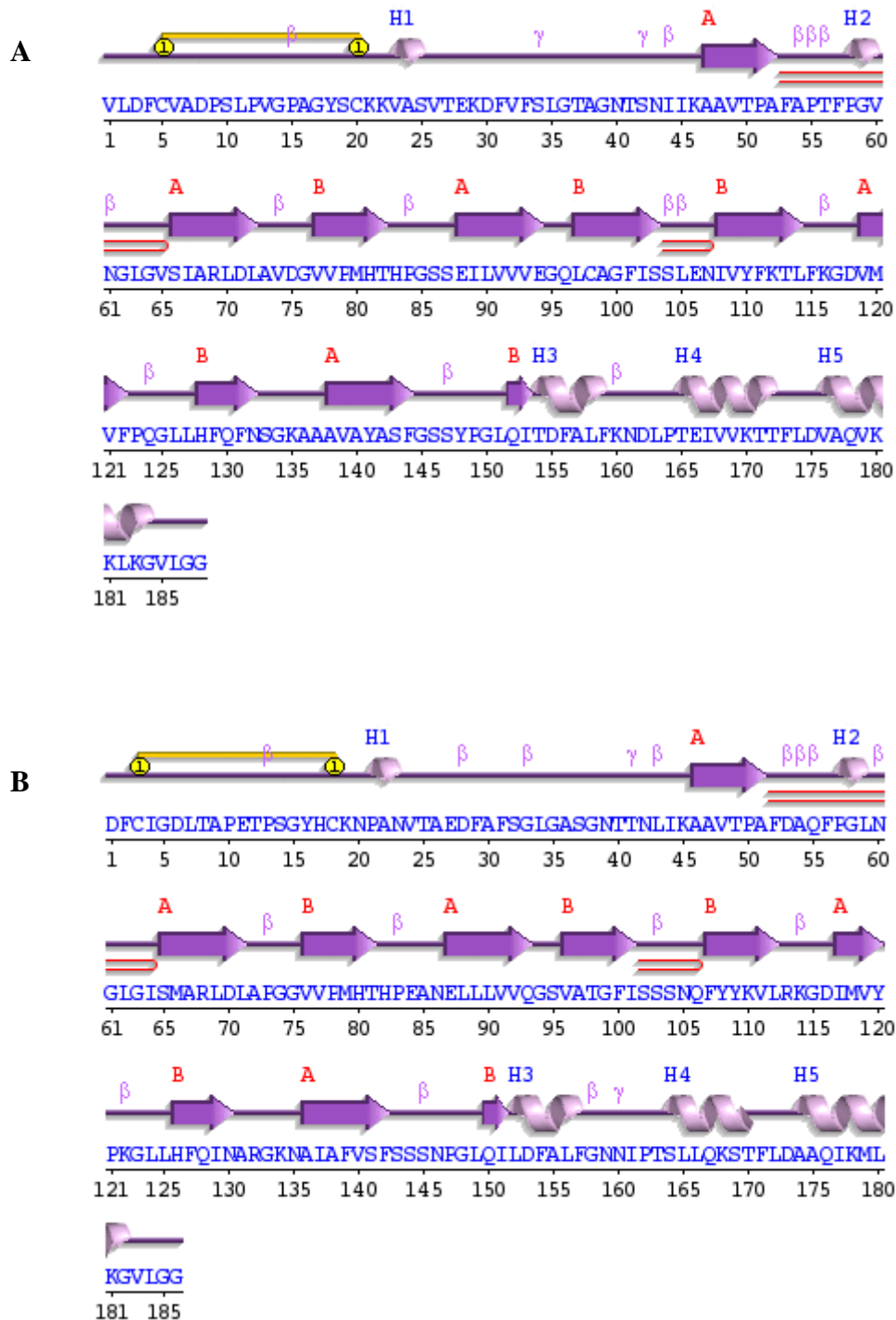
**Figura 17.** Predição topológica da estrutura secundária de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) a partir dos modelos gerados pelo servidor GalaxyWeb.



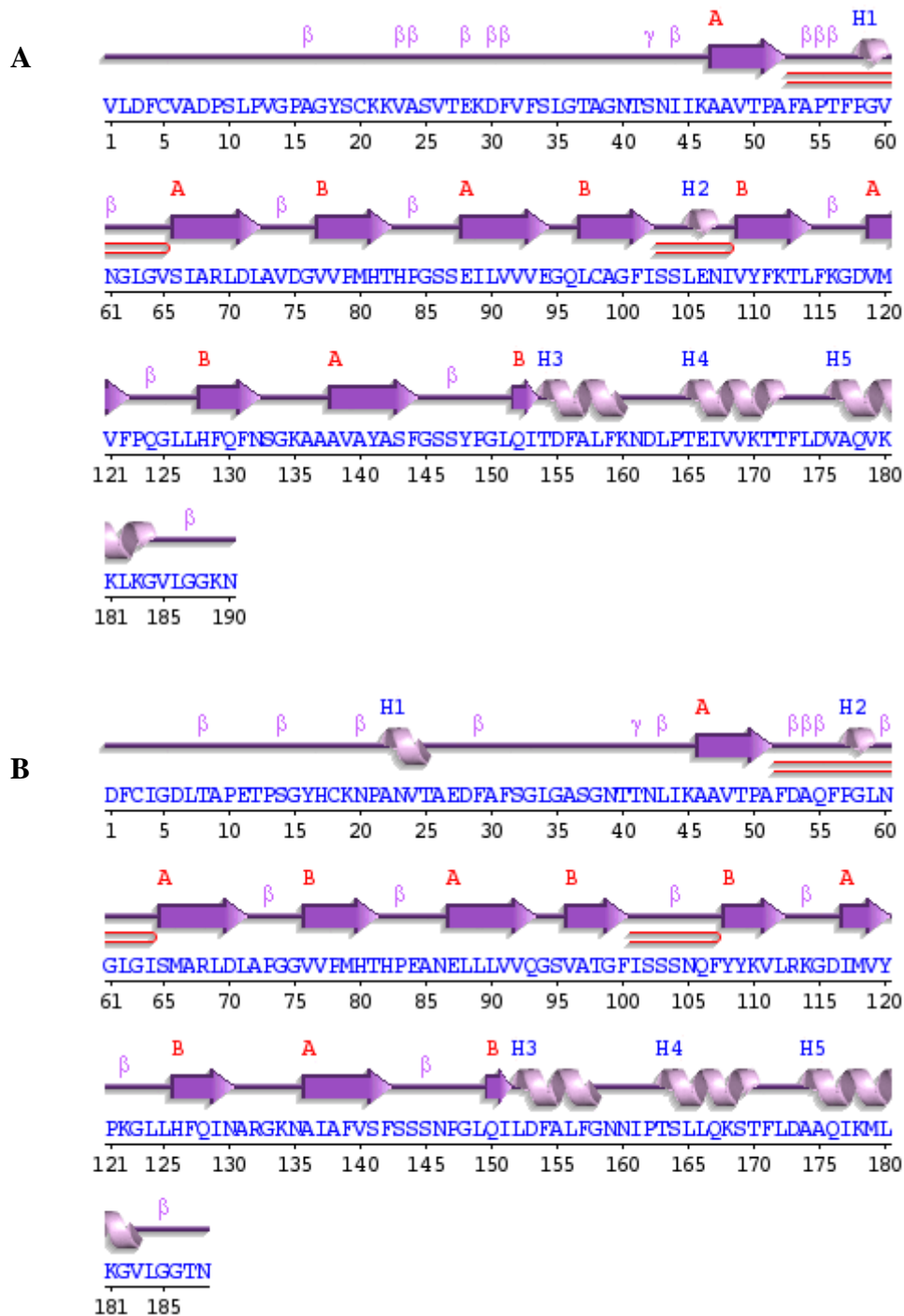
**Figura 18.** Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) para os modelos gerados pelo servidor SWISS MODEL.



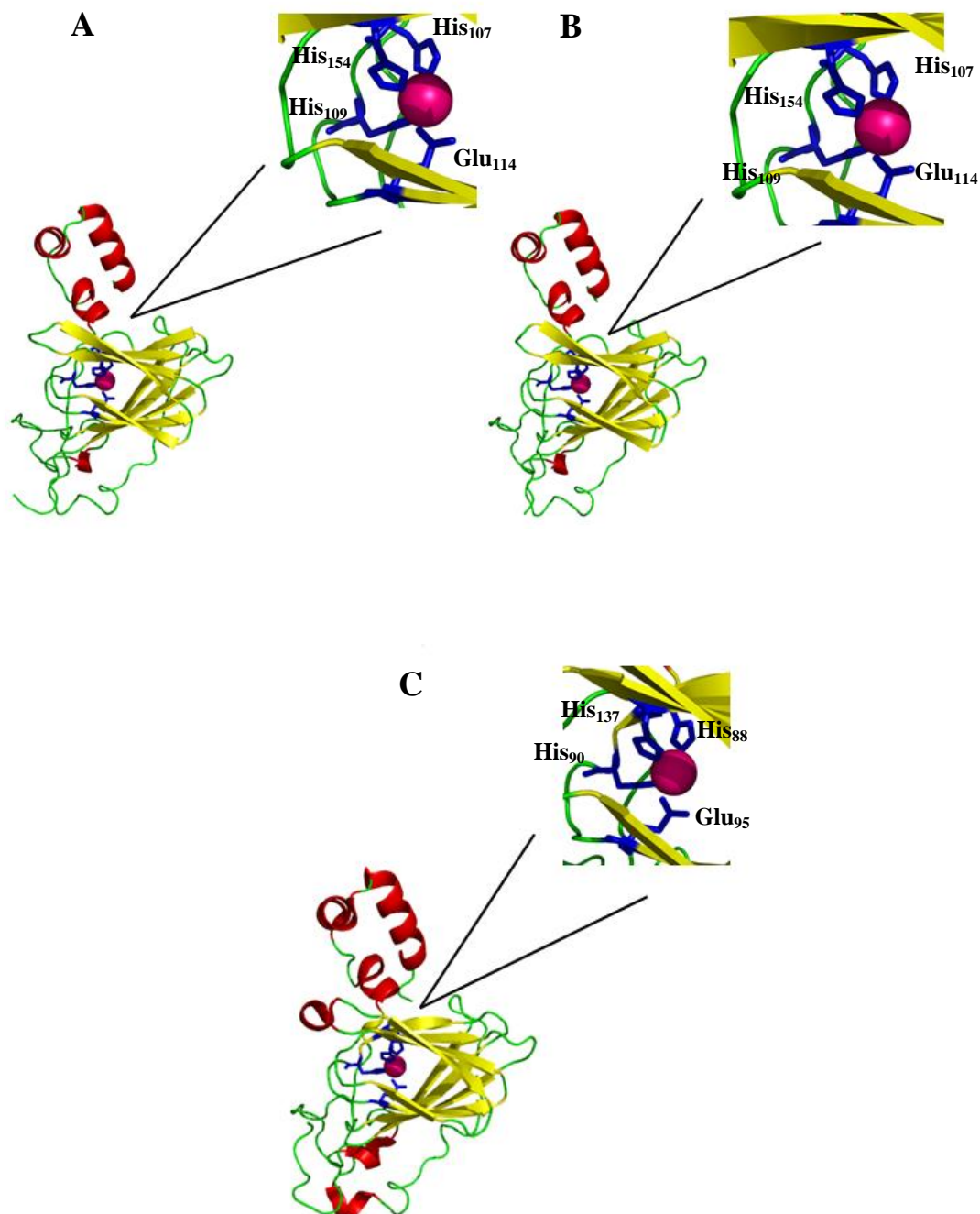
**Figura 19.** Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) para os modelos gerados pelo servidor Phyre2.



**Figura 20.** Diagrama representando a disposição das estruturas secundárias de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) para os modelos gerados pelo servidor GalaxyWeb.



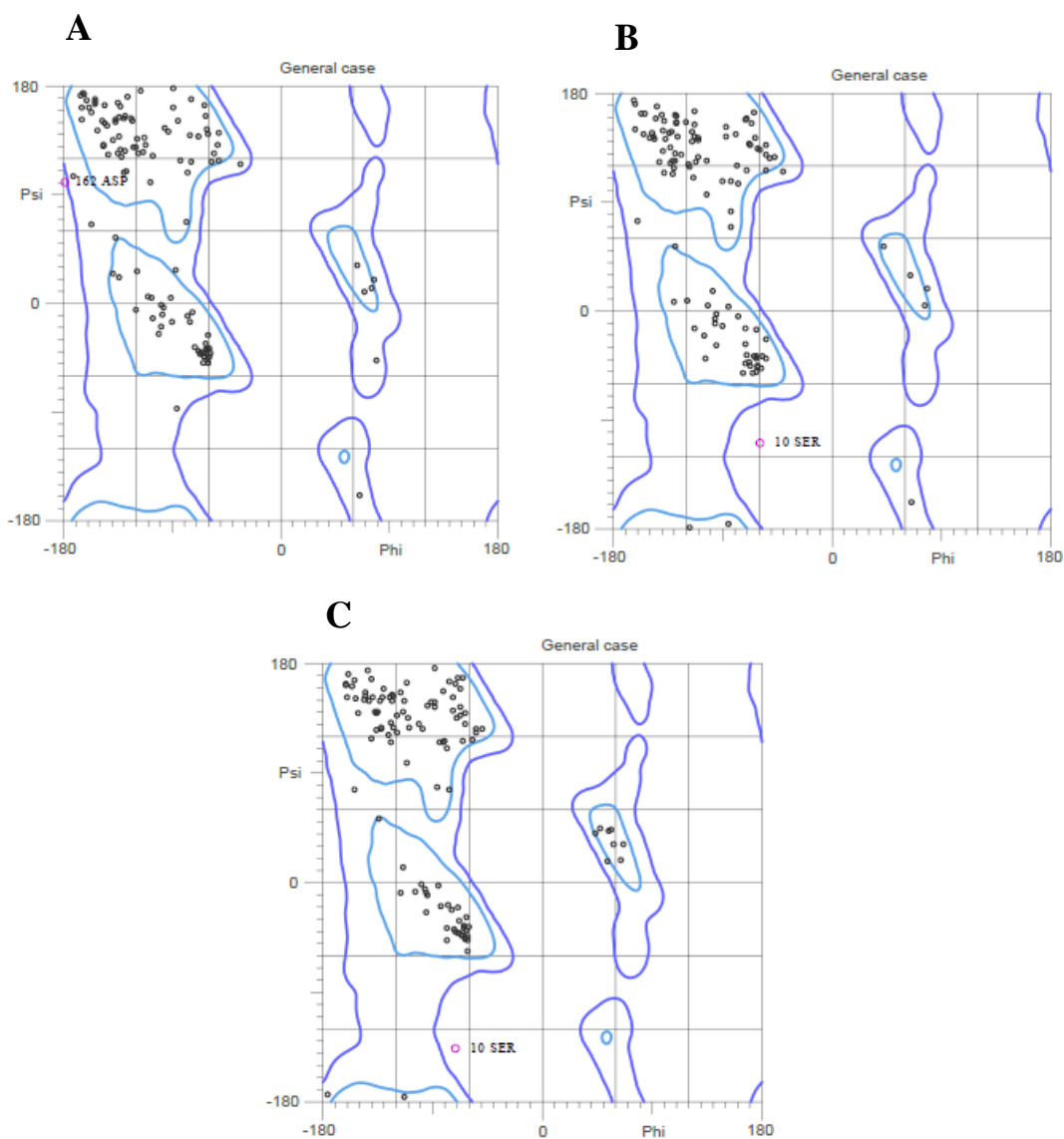
**Figura 21.** Modelos de GLCp1 (A) e GLCp2 (B) mostrando o provável sítio de atividade.



O provável sítio de atividade do tipo oxalato oxidase com o íon manganês no centro e os resíduos de aminoácidos envolvidos em destaque (His<sub>107</sub>, His<sub>109</sub>, Glu<sub>114</sub> e His<sub>154</sub>), comparados com o molde padrão (C).

Os modelos tridimensionais construídos para GLCp1 e GLCp2 foram avaliados utilizando os *softwares* Molprobit, que gerou gráficos de Ramachandran (Figuras 22 e 23), assim como pelos programas ProSA, ERRAT2 e Verify 3D (Tabela 3).

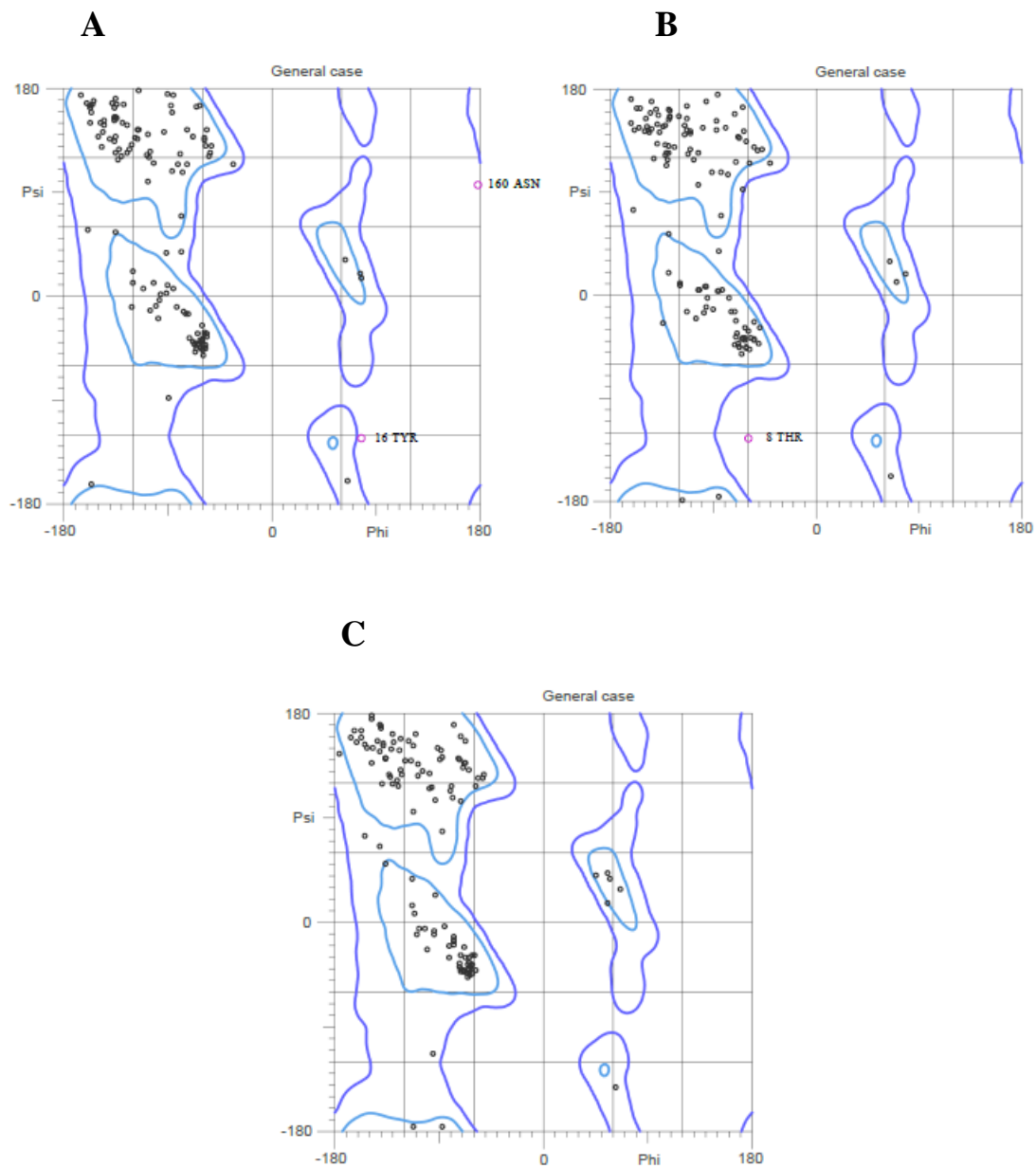
**Figura 22.** Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos a partir da sequência deduzidas de GLCp1.



Os gráficos foram gerados pelo servidor MolProbit a partir dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: SWISS MODEL (A), Phyre2 (B) e GalaxyWeb (C).



**Figura 23.** Gráfico de Ramachandran dos modelos tridimensionais obtidos a partir da sequência deduzidas de GLCp2.



Os gráficos foram gerados pelo servidor MolProbity a partir dos modelos tridimensionais construídos pelos servidores: SWISS MODEL (A), Phyre2 (B) e GalaxyWeb (C).

O servidor Molprobitry realiza análises geométricas para a validação de modelos gerando o gráfico de Ramachandran (Figuras 16 e 17). A partir da análise dos gráficos se observa que, entre os modelos, se destacaram convenientemente aqueles gerados pela plataforma GalaxyWeb. O modelo gerado para GLCp1 apresentou apenas 1 resíduo de aminoácido (SER<sub>10</sub>) em região desfavorável, enquanto que para GLCp2 todos os resíduos de aminoácidos se encontraram em regiões fisicamente permitidas.

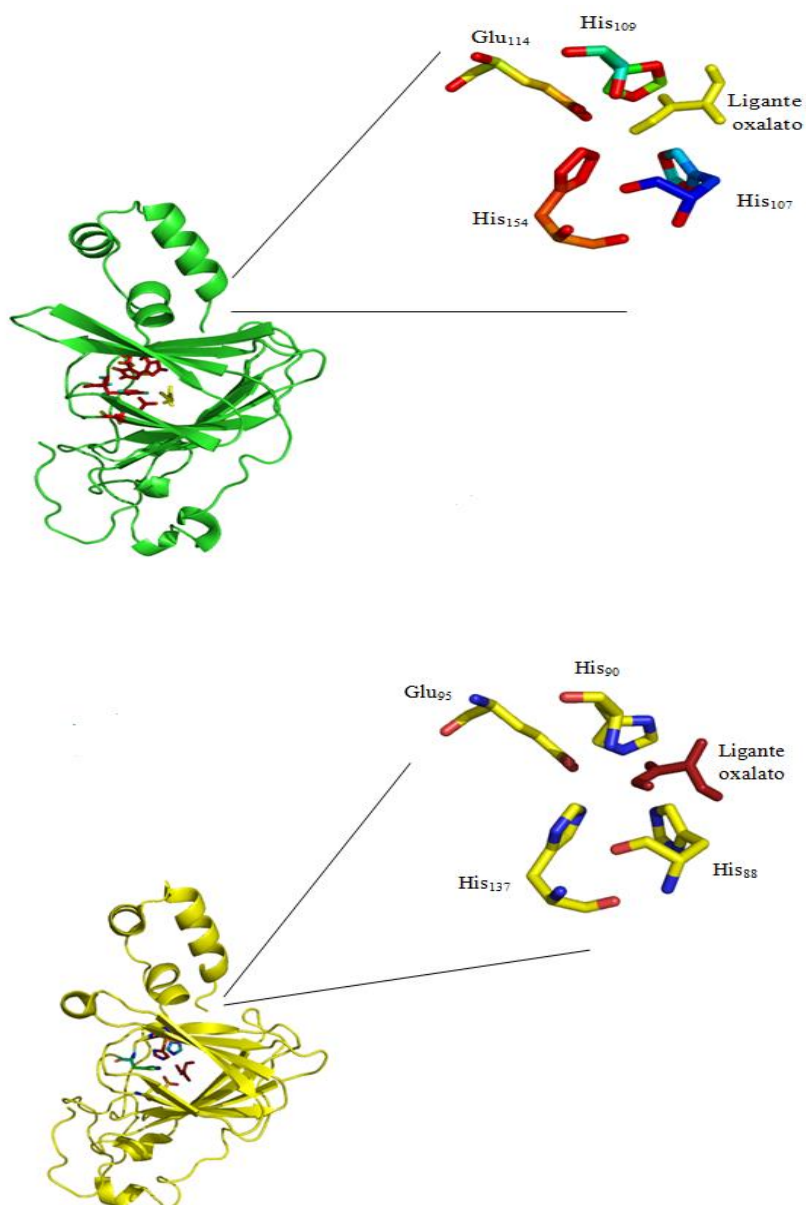
Os valores de qualidade locais (para cada aminoácido) foram calculados por meio do servidor ProSA, que gerou valores de z-score que variaram de -3,11 a -4,66, que são satisfatórios, pois é esperado z-score negativo para um bom modelo, além de serem valores bem próximos ao do z-score da proteína usada como molde (-3,97). Análises de qualidade global realizadas utilizando o servidor ERRAT2 mostraram que os modelos mais favoráveis foram aqueles gerados pela plataforma GalaxyWeb, pois apresentam os maiores fatores de qualidade.

Para avaliar erros estruturais e promover a confiabilidade do modelo tridimensional utilizou-se o Verify 3D. Os melhores modelos foram aqueles gerados pela plataforma GalaxyWeb, todavia, apenas o modelo gerado para GLCp2 apresentou fator de qualidade satisfatório (84,04%), todos os outros modelos apresentaram menos de 80% dos aminoácidos com uma média 3D-1D acima de 0,2, resultado insatisfatório para considerar o modelo como qualificado. Considerando que os modelos construídos por meio da plataforma GalaxyWeb foram os que obtiveram os resultados mais promissores, eles foram escolhidos para realizar estudos posteriores.

Foram feitos estudos de “docking” para avaliar se o ligante oxalato (substrato para atividade oxalato oxidase) poderia se unir às "germinas-like" de *C. procera* e estimar a geometria do complexo e a energia de ligação. As análises foram feitas pelo programa AutoDock Vina (TROTT, OLSON, 2010) utilizando o modelo gerado pelo servidor GalaxyWeb com a sequência de GLCp1, por ter sido a que apresentou melhor qualidade estereoquímica. Os arquivos gerados foram visualizados pelo Pymol. Uma inspeção criteriosa da bolsa de ligação do modelo GLCp1 indicou que o ligante oxalato adaptou-se em uma posição numa gaiola rodeada por His<sub>107</sub>, His<sub>109</sub>, Glu<sub>114</sub> e His<sub>154</sub> na germina-like de *C. procera* (Figura 18 A). A distância do oxalato a partir do átomo de N do anel aromático de His<sub>105</sub> e His<sub>107</sub> foi de 4,2 e 3,1, respectivamente. Na figura 18 B pode-se observar a estrutura molde padrão (PDB: 2ET7) com o sítio de atividade com

os aminoácidos envolvidos e o ligante oxalato em destaque (His<sub>88</sub>, His<sub>90</sub>, Glu<sub>95</sub> e His<sub>137</sub>) a fim de comparação com o complexo gerado pelo “docking” de GLCp2.

**Figura 24.** Docking molecular da estrutura de GLCp1.



Modelo gerado pelo servidor GalaxyWeb (A) e molde padrão (B) com os aminoácidos e o ligante oxalato envolvidos no sítio de ligação em destaque.

**Tabela 3** - Avaliação da qualidade dos modelos tridimensionais de GLCp1 e GLCp2 construídos por diferentes plataformas.

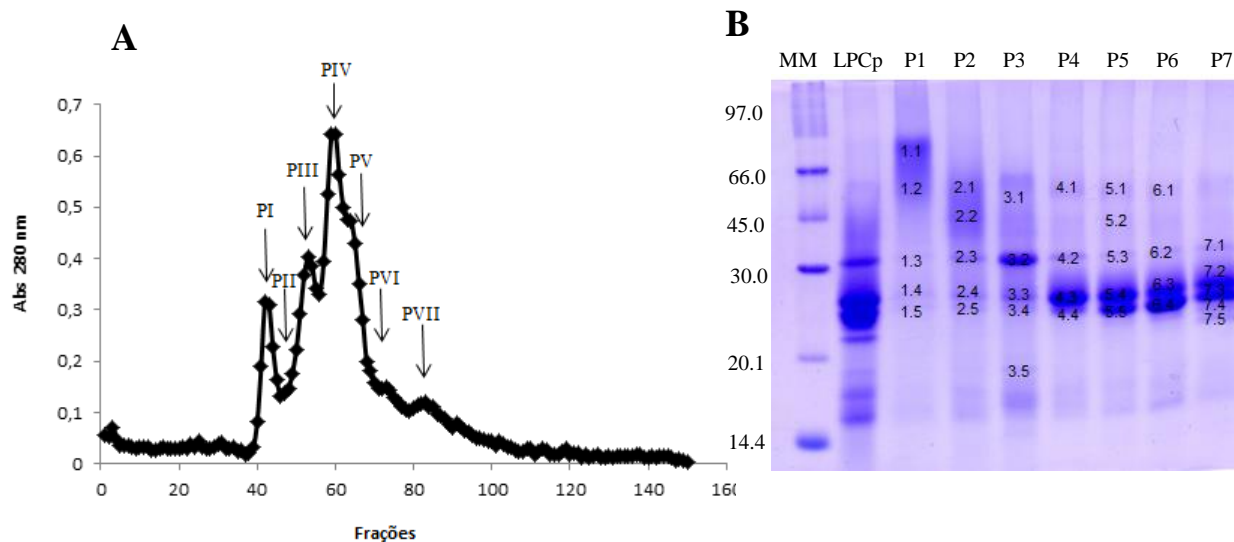
| <b>SEQUÊNCIA</b> | <b>Plataforma</b> | <b>ProSA<br/>(z-score)</b> | <b>ERRAT2<br/>(Fator de qualidade<br/>global)</b> | <b>Verify 3D<br/>(%)</b> | <b>Gráfico de Ramachandran<br/>(Molprobit)*</b>                 |
|------------------|-------------------|----------------------------|---|--------------------------|---|
| <b>GLCp1</b>     | SWISS-MODEL       | -3,1                       | 78,916  | 58,82                    | 3 (PRO <sub>15</sub> ; VAL <sub>23</sub> ; ASP <sub>162</sub> ) |
|                  | Phyre 2           | -3,34                      | 55,952  | 56,38                    | 3 (SER <sub>10</sub> ; LEU <sub>11</sub> ; PRO <sub>12</sub> )  |
|                  | GalaxyWeb         | -3,19                      | 89,535  | 67,89                    | 1 (SER <sub>10</sub> )  |
| <b>GLCp2</b>     | SWISS-MODEL       | -4,11                      | 82,840  | 78,49                    | 2 (TYR <sub>16</sub> ; ASN <sub>160</sub> )                     |
|                  | Phyre 2           | -4,29                      | 60,465  | 75,81                    | 2 (THR <sub>8</sub> ; ILE <sub>161</sub> )                      |
|                  | GalaxyWeb         | -4,66                      | 93,125  | 84,04                    | 0   |

\*Resíduos em regiões não permitidas.

## 4.2 Análises Proteômicas

Proteínas do extrato total do látex de *Calotropis procera* foram submetidas à cromatografia em coluna de filtração em gel, Sephacryl S-100, e eluídas com tampão bicarbonato de amônio 25 mM (pH 7,9). As frações coletadas foram separadas em sete picos distintos (Figura 25A). Com os picos obtidos foi realizada eletroforese unidimensional a fim de analisar o perfil proteico e massa molecular aparente das proteínas (Figura 25B). O pico 1 apresentou, predominantemente, proteínas com massas moleculares próxima a 60-90 kDa. As outras frações se mostraram ricas em proteínas com massas moleculares entre 20-30 kDa.

**Figura 25.** Cromatografia do extrato total do látex e eletroforese dos picos.



(A) Cromatografia de filtração em gel em coluna de Sephacryl S - 100. Proteínas laticíferas (10 mg/ mL) foram eluídas com tampão de bicarbonato de amônio 25 mM pH 7,9 . Fluxo: 0,3 ml/min. Frações: 2,0 ml. As setas indicam os intervalos de frações utilizadas para separar os picos. (B) SDS-PAGE dos picos cromatográficos analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. MM: Marcador de massa molecular (2,5 µL); LPCp: Proteínas totais do látex de *Calotropis procera* (4,0 mg/mL; 20 µL); P1: Pico I (2,5 mg/mL; 50 µL); P2: Pico II (2,5 mg/mL; 20 µL); P3: Pico III (2,5 mg/mL; 10 µL); P4: Pico IV (2,5 mg/mL; 10 µL); P5: Pico V (2,5 mg/mL; 10 µL); P6: Pico VI (2,5 mg/mL; 20 µL) ; P7: Pico VII (2,5 mg/mL; 50 µL).

Com o intuito de identificar as proteínas presentes nas frações cromatográficas obtidas, todas as proteínas dos picos P1-P7 foram submetidas à digestão trípica e analisadas por espectrometria de massas (ESI QUAD-TOF). Os dados foram avaliados pelo servidor MASCOT (Matrix Science Ltd. - [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), utilizando o NCBI (National Center for Biotechnology Information) como banco de dados, restringido para Viridiplantae (*Green Plants*). Diferentes proteínas foram identificadas (Tabela 4), com destaque para proteases cisteínicas e quitinases, que foram recorrente na maioria dos picos. No entanto, não foi identificada nenhuma proteína germina ou germina-like. Com o intuito de otimizar as identificações, foram selecionados 33 *spots* (Figura 24B), que foram excisados do gel, submetidos à digestão trípica e analisados por espectrometria de massas. Dos 33 *spots* analisados, em apenas 20 foram identificadas proteínas com valores de escores satisfatórios (Tabela 5). Novamente, as proteases e quitinases foram predominantes e não houve reconhecimento de germinas ou germina-like em nenhum dos *spots* analisados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Lista de proteínas identificadas no látex de *Calotropis procera* por espectrometria de massa a partir dos picos obtidos por cromatografia. 70

| Amostra complexa N° | Massa Molecular (Da) | pI   | Protein Score | Íon Parental | Sequência de todos os peptídeos identificados | ID (NCBI)     | Descrição e espécies   |
|---------------------|----------------------|------|---------------|--------------|---|---------------|--|
| P1                  | 34857                | 8,66 | 113           | 1946.9598    | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388  | Quitinase Classe I (Pyrus x bretschneideri x <i>Pyruspyrifolia</i> )         |
|                     | 40217                | 6,60 | 55            | 1198.6132    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
| P2                  | 40217                | 6,60 | 78            | 1198.5230    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
|                     | 24187                | 9,19 | 74            | 985.5004     | LPNSVDWR                                      | gi 475638275  | Procerain B, parcial ( <i>Calotropisprocera</i> )                            |
| P3                  | 35045                | 7,36 | 68            | 1946.0096    | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 1002167066 | Endoquitinase ( <i>Droserarotundifolia</i> )                                 |
| P4                  | 40217                | 6,60 | 76            | 1198.5360    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
| P5                  | 40217                | 6,60 | 67            | 1197.2946    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
|                     | 40586                | 5,96 | 61            | 1240.6310    | VVSVPPSVDWR                                   | gi 544129     | Precursor de protease cisteínica; Endopeptidase de feijão ( <i>Vignain</i> ) |
| P6                  | 40217                | 6,60 | 62            | 1198.5718    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
| P7                  | 40217                | 6,60 | 101           | 1197.3644    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                      |
|                     | 24187                | 9,19 | 59            | 985.5000     | LPNSVDWR                                      | gi 475638275  | Procerain B, parcial ( <i>Calotropisprocera</i> )                            |

**Tabela 5.** Lista de proteínas identificadas no látex de *Calotropis procera* por espectrometria de massa a partir de *spots* obtidos do gel de eletroforese (Figura 25B).

| N° Spot | Molecular massa (Da) | pI   | Protein Score | Íon Parental | Sequência de todos os peptídeos identificados | ID (NCBI)     | Descrição e espécie   |
|---------|----------------------|------|---------------|--------------|---|---------------|---|
| P 1.1   | 35045                | 7.36 | 225           | 1945.9736    | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 1002167066 | Endoquitinase ( <i>Drosera rotundifolia</i> )                                 |
|         | 21829                | 6.08 | 111           | 1946.9602    | VPGYGVLTNIIDGGVECGK                           | gi 224712040  | Endoquitinase ( <i>Avena sativa</i> )   |
| P 1.2   | 34857                | 8.66 | 92            | 1946.0060    | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388  | Quitinase Classe I ( <i>Pyrus x bretschneideri</i> x <i>Pyrus pyrifolia</i> ) |
|         | 21829                | 6.08 | 92            | 1946.0060    | VPGYGVLTNIIDGGVECGK                           | gi 224712040  | Endoquitinase ( <i>Avena sativa</i> )   |
|         | 40217                | 6.60 | 63            | 1198.6168    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                       |
| P 1.3   | 34857                | 8.66 | 82            | 1946.0058    | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388  | Quitinase Classe I ( <i>Pyrus x bretschneideri</i> x <i>Pyrus pyrifolia</i> ) |
|         | 40217                | 6.60 | 59            | 1198.6148    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                       |
| P 1.4   | 40217                | 6.60 | 61            | 1198.6104    | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )                       |
| P 1.5   | 24187                | 9.19 | 74            | 985.4960     | LPNSVDWR                                      | gi 475638275  | Procerain B, parcial ( <i>Calotropis procera</i> )                            |



| N° Spot      | Molecular massa (Da) | pI   | Protein Score | Íon Parental           | Sequência de todos os peptídeos identificados | ID (NCBI)    | Descrição e espécie  |
|--------------|----------------------|------|---------------|------------------------|---|--------------|--|
| <b>P 2.1</b> | 34857                | 8.66 | 66            | 1946.0072              | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388 | Quitinase Classe I (Pyrus x bretschneideri x <i>Pyruspyrifolia</i> ) |
|              | 21829                | 6.08 | 66            | 1946.0072              | VPGYGVLTIIDGGVECGK                            | gi 224712040 | Endoquitinase ( <i>Avena sativa</i> )                                |
| <b>P 2.2</b> | 34857                | 8.66 | 99            | 1946.0044              | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388 | Quitinase Classe I (Pyrus x bretschneideri x <i>Pyruspyrifolia</i> ) |
| <b>P 2.3</b> | 34857                | 8.66 | 77            | 1946.0050              | VPGYGVITNIINGGVECGK                           | gi 222139388 | Quitinase Classe I (Pyrus x bretschneideri x <i>Pyruspyrifolia</i> ) |
|              | 34376                | 8.40 | 68            | 1946.0050              | LPGFGVITNIINGGVECGK                           | gi 1705813   | Endochitinase Básica ( <i>Vitisvinifera</i> )                        |
|              | 40217                | 6.60 | 60            | 1198.6162              | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339 | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )              |
| <b>P 3.1</b> | 40217                | 6.60 | 61            | 1198.6160              | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339 | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )              |
| <b>P 4.1</b> | 40217                | 6.60 | 81            | 1198.6168<br>1677.7978 | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339 | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )              |
| <b>P 4.3</b> | 40217                | 6.60 | 93            | 1198.5408              | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339 | Precursor de protease cisteínica ( <i>Glycine Max</i> )              |

| N° Spot | Molecular massa (Kda) | pI   | Protein Score | Íon Parental                       | Sequência de todos os peptídeos identificados | ID (NCBI)     | Descrição e espécie  |
|---------|-----------------------|------|---------------|------------------------------------|---|---------------|--|
| P 4.4   | 40217                 | 6.60 | 135           | 1198.5514<br>1677.7975             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 5.3   | 40217                 | 6.60 | 112           | 1196.5962<br>1198.5372             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 5.4   | 40217                 | 6.60 | 115           | 1198.5372                          | VGSVPPSVDWR                                   | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 6.3   | 40217                 | 6.60 | 129           | 1198.4800<br>1677.7975             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 6.4   | 38739                 | 6.67 | 102           | 2403.1978                          | VDHAVNIVGYGSEGGVNYWIVR                        | gi 1017032779 | Procerain ( <i>Calotropis procera</i> )                    |
|         | 40217                 | 6.60 | 94            | 1198.4776<br>1677.7966             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 7.2   | 40217                 | 6.60 | 109           | 1198.5150<br>1677.8011             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
| P 7.3   | 40217                 | 6.60 | 125           | 1198.6110<br>1677.7969             | VGSVPPSVDWR<br>NSWGPEWGEQGYIR                 | gi 351726339  | Precursor de protease cisteínica<br>( <i>Glycine Max</i> ) |
|         | 24187                 | 9.19 | 83            | 985.4944<br>1705.8100<br>1687.6758 | LPNSVDWR<br>MIALSEQELDCER<br>NSWGTNWGENGYMR   | gi 475638275  | Procerain ( <i>Calotropis procera</i> )                    |

| N° Spot      | Molecular massa (Kda) | pI   | Protein Score | Íon Parental                                     | Sequência de todos os peptídeos identificados                                    | ID (NCBI)     | Descrição e espécie  |
|--------------|-----------------------|------|---------------|--|--|---------------|--|
|              | 24187                 | 9.19 | 276           | 985.4942<br>1101.6174<br>1667.9887<br>1539.9078  | LPNSVDWR<br>EKDVVFPIR<br>KLQSVVAQQVVSVGVK<br>LQSVVAQQVVSVGVK                     | gi 475638275  | Procerain B, parcial ( <i>Calotropis procera</i> )                         |
| <b>P 7.4</b> | 23257                 | 8.23 | 159           | 1802.8612<br>912.9870<br>824.3698                | NNCPYTIWAAAVPGGGR<br>LNSGQWTINVAPGTAGAR<br>CTADINGQCPNELR                        | gi 645985721  | Cadeia A, osmotina ( <i>Calotropis procera</i> )                           |
|              | 38739                 | 6.67 | 127           | 1667.9887<br>2403.1993                           | QLQSVVAQQVVSVGVK<br>VDHAVNIVGYGSEGGVNYWIVR                                       | gi 1017032779 | Procerain ( <i>Calotropis procera</i> )                                    |
|              | 23257                 | 8.23 | 353           | 1802.8606<br>2069.0740<br>1912.9668<br>1646.7230 | NNCPYTIWAAAVPGGGR<br>RLNSGQWTINVAPGTAGAR<br>LNSGQWTINVAPGTAGAR<br>CTADINGQCPNELR | gi 645985721  | Cadeia A, osmotina ( <i>Calotropis procera</i> )                           |
| <b>P 7.5</b> | 22948                 | 7.92 | 311           | 2069.0740<br>1912.9668<br>1646.7230<br>1420.6268 | RLNSGQWTINVAPGTAGAR<br>LNSGQWTINVAPGTAGAR<br>CTADINGQCPNELR<br>APGGCNPCTVFK      | gi 922074392  | Proteína Thaumatin-like, parcial ( <i>Cryptostegia grandiflora</i> )       |
|              | 20060                 | 6.29 | 121           | 1646.7230<br>1420.6268                           | CTADINGQCPNQLR<br>APGGCNPCTVFK   | gi 158668024  | Proteína thaumatin-like relacionada a patogênese ( <i>Coffea arabica</i> ) |
|              | 25110                 | 8.45 | 95            | 1646.7230<br>2842.1668                           | CTADINGQCPNQLR<br>CPDAYSYPKDDATSTFTCPGGTNYR                                      | gi 976907913  | Taumatina ( <i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i> )               |

### 4.3 Ensaio Enzimáticos

Com o objetivo de detectar atividades enzimáticas relacionadas com germinas e germina-like proteínas, foram realizados ensaios enzimáticos para oxalato-oxidase e superóxido dismutase, utilizando a fração proteica total do látex de *Calotropis procera*, assim como as sete frações cromatográficas.

A coloração azul nos tubos foi um indicativo de resultado positivo para a enzima oxalato oxidase, como pode ser observado na amostra contendo o extrato de *Triticum aestivum* (usado como controle) (Figura 26). Uma leve coloração positiva foi também encontrada na fração P4, indicando uma possível presença de germinas ou germina-like proteínas nesta fração. Esse resultado colabora em parte com a eletroforese e com os resultados de bioinformática, pois a eletroforese mostrou que a fração P4 é rica em proteínas com massas moleculares aparentes de 20-25 kDa, valores próximos daqueles estimados para as germinas de *C. procera* GLCp1 e GLCp2 por bioinformática (Tabela 2).

**Figura 26.** Ensaio enzimático para detecção de atividade oxalato-oxidase *in vitro*.

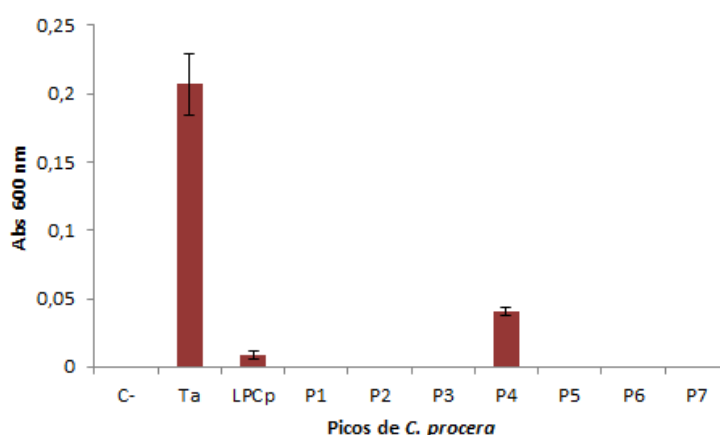
C -    *Ta*    LPCp    P1    P2    P3    P4    P5    P6    P7



C -: controle negativo (água); *Ta*: extrato proteico de hipocótilos de *Triticum aestivum* (220 µg/µL), controle positivo; LPCp: Proteínas totais do látex de *Calotropis procera* (4 mg/mL); P1-P7: Picos obtidos após cromatografia de exclusão molecular da fração LPCp (2,5 mg/mL). Foto tirada após 48 h de ensaio a 25 °C.

As amostras da figura 26 foram lidas a 600 nm para quantificação da atividade enzimática, após 48 horas de ensaio (Figura 27). Os resultados obtidos corroboraram com as análises qualitativas. Contudo, foi identificada uma leve atividade oxalato oxidase na fração de LPCp, que não havia sido identificada visivelmente (Figura 27). Todas as outras amostras, correspondentes aos picos e ao controle negativo, apresentaram leitura nula. Os resultados mostraram um forte indicativo de germinas ou germina-like proteínas no látex de *C. procera* e as mesmas foram detectadas apenas no pico 4 da cromatografia de exclusão molecular.

**Figura 27.** Ensaio quantitativo para detecção de atividade oxalato-oxidase *in vitro*.



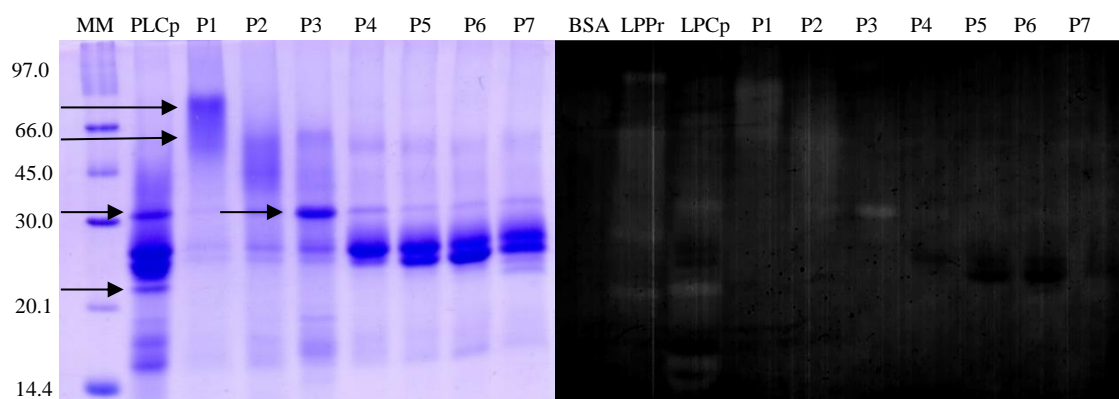
C -: controle negativo (água); Ta: extrato proteico de hipocótilos de *Triticum aestivum* (220 µg/µL), controle positivo; LPCp: Proteínas totais do látex de *Calotropis procera* (4 mg/mL); P1-P7: Picos obtidos após cromatografia de exclusão molecular da fração LPCp (2,5 mg/mL). As reações foram monitoradas depois de 48 horas a 600 nm.

As proteínas germinas e "germinas-like" têm sido associadas também à enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio. Assim, ensaios *in vitro* e zimogramas para a detecção desta atividade foram realizados com as amostras LPCp e picos cromatográficos.

O zimograma para SOD consistiu em um ensaio qualitativo em que a atividade pôde ser revelada a partir da visualização de bandas esbranquiçadas no gel. Foi possível notar a presença de atividade SOD nos picos 1, 2 e 3, assim como no extrato proteico

total de *C. procera* e no controle positivo (Látex de *Plumeria rubra*) (Figura 28). As bandas com atividade SOD no látex de *C. procera* e nos picos corresponderam a massas aparentes de 20, 45, 66 e 90 kDa (representadas em setas, Figura 28A). As proteínas do Pico 4 não apresentaram nenhuma atividade do tipo SOD, mostrando que a(s) possível(ies) germina(s) ou germinas-like presente(s) nesta fração apresenta(m) apenas atividade do tipo oxalato oxidase. Desta forma, as proteínas de *C. procera* GLCp1 e GLCp2 poderiam ser classificadas como germina-like proteínas com atividade oxalato oxidase.

**Figura 28.** SDS-PAGE das frações proteicas do látex e Zimograma para detecção de SOD.



(A) SDS-PAGE das frações proteicas do látex de *Calotropis procera* analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. (B) Zimograma para detecção de atividade superóxido dismutase (SOD). BSA: controle negativo; LPPr: Controle positivo, proteínas do látex de *Plumeria rubra* (2 mg/mL). LPCp: Proteínas do látex de *Calotropis procera* (4 mg/mL); P1-P7: picos 1 a 7, correspondentes às frações cromatográficas (2,5mg/mL).

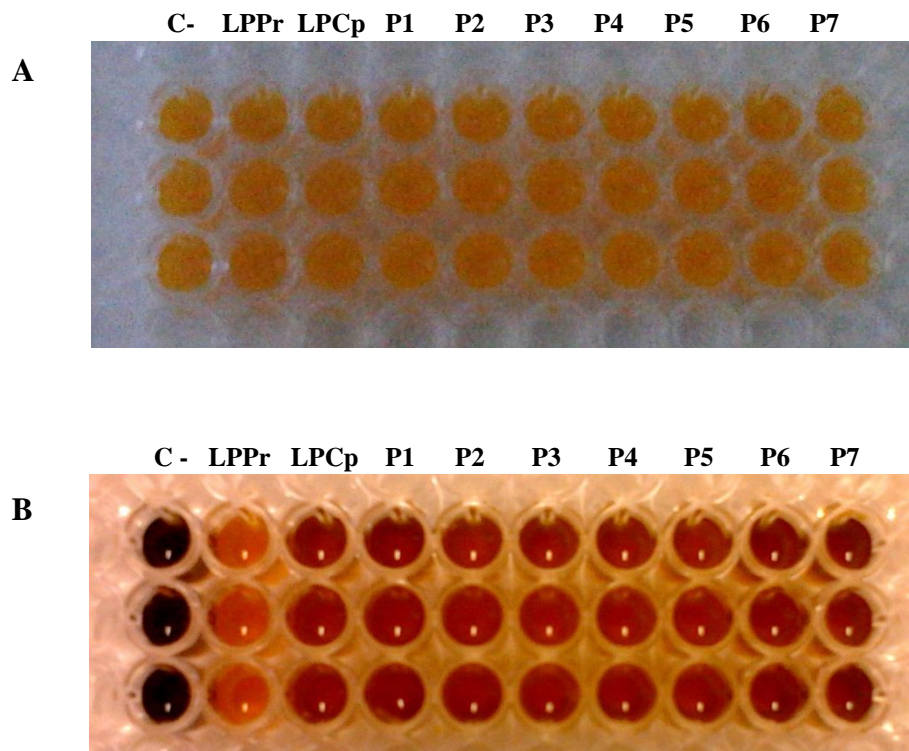
Ensaio para detecção de atividade SOD também foram realizados em microplaca. Esse ensaio envolve a excitação fotoquímica da riboflavina, que por sua vez, é reduzida para o radical superóxido. O superóxido formado converte o nitro azul de tetrazólio (NBT) para formazana azul. A enzima superóxido dismutase (SOD) degrada o superóxido, inibindo a produção de formazana azul (PIACHAM *et al.*, 2003). Logo, quanto maior o percentual de inibição, mais claras serão as colorações percebidas nos micropoços da placa, quando comparado com a coloração escura do controle sem a enzima superóxido dismutase. Antes de serem expostas à luz, todas as amostras nos poços apresentavam a mesma coloração amarelada (Figura 29A). Após a excitação

fotoquímica por 5 minutos pôde se notar que o controle negativo (sem SOD) apresentou coloração bastante escura, enquanto o controle positivo (LPPr) apresentou cor clara e amarelada. As amostras correspondentes ao extrato do látex de *C. procera* (LPCp) e aos picos exibiram coloração mais clara que o controle negativo, mostrando que foram capazes de inibir a formação de formazana azul, embora não de forma tão eficiente quanto LPPr (controle positivo) (Figura 29B).

A quantificação de SODs foi feita a partir de leituras de absorbância das amostras a 630 nm. O cálculo da unidade de atividade (UA), que corresponde à quantidade de amostra necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT à formazana azul, mostrou que os picos 1 e 2 foram os que apresentaram os maiores valores de UA, reforçando os resultados obtidos no zimograma (Figura 30).

Os resultados contradizem em parte aqueles obtidos para o zimograma, onde apenas os picos 1, 2 e 3 apresentaram atividade enzimática do tipo SOD (Figura 28B). A baixa atividade encontrada nos outros picos pode ser explicada, por uma possível contaminação das outras frações proteicas (Figura 30).

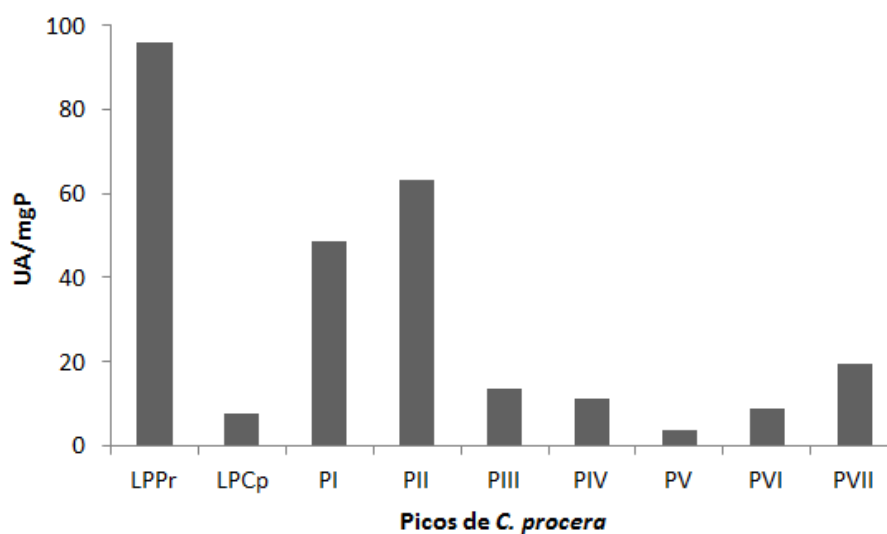
**Figura 29.** Ensaio SOD adaptado para micropoços de placa de ELISA.



Placa antes (A) e após 5 minutos (B) de exposição à luz. LPPr: Controle positivo: Proteínas do látex de *Plumeria rubra* (2mg/mL); LPCp: Proteínas do látex de *Calotropis procera* (4 mg/mL); Picos cromatográficos P1-P7 (2,5 mg/mL).



**Figura 30.** Valores das médias de triplicatas para atividade SOD.



Amostras do extrato proteico de *Plumeria rubra* (controle positivo), do extrato total e dos picos de *C. procera*, oriundos da figura 22. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de amostra necessária para inibir 50% da fotorredução.

#### 4.4 Predição de peptídeos antigênicos

O alinhamento entre GLCp1 e GLCp2 mostrou que estas sequências possuem regiões com aminoácidos conservados (Figura 31). As sequências dos 7 peptídeos foram visualizadas pelo programa Pymol para observar como eles estão expostos na superfície das proteínas (Figura 32).

**Figura 31.** Alinhamento entre GLCp1 e GLCp2.

```

GLCp1      VLDFCVADPSLPVGPAGYSCKKVASVTEKDFVFS-LGTAGNTSNIIKAAVTPAFAPTFFPG
GLCp2      --DFCIGDLTAPETPSGYHCKNPANVTAEDFAFSGLGASGNTTNLIKAAVTPAFDAQFFPG
           ***:.* : * *.** **: *.** :**.* ***:***:*.***** **

GLCp1      VNGLGVSIARLDLAVDGVVPMHTHFGSSSEILVVVEGQLCAGFISSLENI VYFKTLFKGDV
GLCp2      LNGLGISMARLDLAPGVVPMHTHFEANELLVQGSVATGFISSS-NQFYKVLKGDV
           :****:*.***** ***** :.*:***:*.:.:***** * .*:.* ***:

GLCp1      MVFPQGLLHFQFNSGKAAAVAYASFGSSYPGLQITDFALFKNDLPTEI VVKTTFLDVAQV
GLCp2      MVYPKGLLHFQINARGKNAIAFVSFSSSNPGLQILDFALFGNNIPTSL LQKSTFLDAAQI
           **:*:*****:*: *:*:.*.* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
           **:*:*****:*: *:*:.*.* ** ** ** ** ^

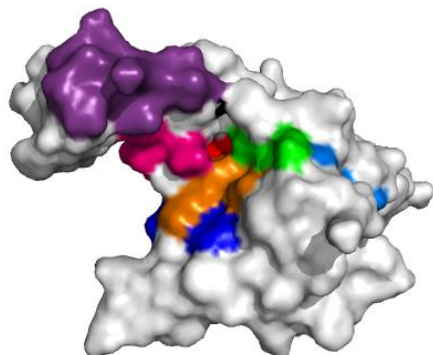
GLCp1      KKLKGVLGGKN
GLCp2      KMLKGVLGGTN
           * *****_*

```

As sequências conservadas entre GLCp1 e GLCp2 estão destacadas em cores diferentes.

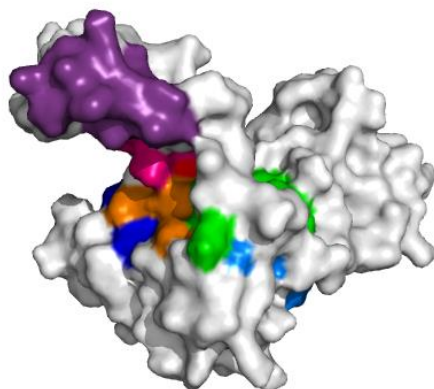
**Figura 32.** Localização dos diferentes peptídeos nas superfícies de GLCp1 (A) e GLCp2 (B).

(A)



**IKAAVTPAF**  
**ARLDLA**  
**GVVPMHTHP**  
**GLLHFQ**  
**PGLQI**  
**DFALF**  
**DVAQVKKLKGV**

(B)



**IKAAVTPAF**  
**ARLDLA**  
**GVVPMHTHP**  
**GLLHFQ**  
**PGLQI**  
**DFALF**  
**DAAQIKMLKGV**

Os sete peptídeos que apresentaram alta identidade entre as duas proteínas foram selecionados para avaliar a probabilidade de serem alérgenos e desta forma capazes de induzir a produção de anticorpos, para os posteriores ensaios de ELISA e *Western Blotting*. O servidor SDAP-All Allergens utiliza um índice denominado de PD (propriedade da distância fisicoquímica) que mede a similaridade entre duas sequências, e peptídeos com sequências idênticas possuem valor de PD zero, enquanto que aqueles que exibem substituições em alguns aminoácidos ficam no intervalo de 0-3. Os valores para PD comumente são inferiores a 10 para sequências que apresentam semelhanças nas propriedades fisicoquímicas com proteínas depositadas no banco de dados (IVANCIUC *et al.*, 2009). Ao serem submetidos ao servidor SDAP, os sete peptídeos apresentaram índices de similaridade variados, com as sequências PGLQI e DFALV exibindo os menores valores de PD. No entanto, tratam-se de sequências curtas, com menos de 6 aminoácidos, o que pode representar um falso positivo de alergenicidade. Por outro lado, quanto maior a sequência menor será a chance de alinhamento com alta identidade com outras proteínas alergênicas. Isso foi observado nas sequências com maior número de aminoácidos que apresentaram os maiores valores de PD, mas se mantiveram abaixo do valor permitido ( $PD \leq 10$ ), apresentando similaridade com vários alérgenos conhecidos (Tabela 6).

O servidor AllerTOP 1.0 mostrou que os peptídeos avaliados apresentaram probabilidade de 33,0 a 99,9% de ser toxina, veneno ou alérgeno salivar, alimentar e inalante, havendo ainda aqueles categorizados como prováveis não alérgenos. Dentre os peptídeos avaliados por este servidor o mais propício foi o de sequência DVAQVKKLLKGV, que apresentou 99,9% de ser toxina, veneno ou alérgeno salivar. Com relação à predição de epítomos pró-inflamatórios, estes não foram reconhecidos quando as sequências foram analisadas pelo servidor Proinflam (Tabela 7).

A busca por peptídeos antigênicos nas sequências completas das proteínas GLCp1 GLCp2, realizada pelo programa PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES, revelou três sequências promissoras (IKAAVTPAF, DVAQVKKLLKGV e PGLQITDFALF) que foram selecionadas para avaliação, pois as mesmas apresentaram sequências com resíduos conservados entre GLCp1 e GLCp2 e possuem mais de nove aminoácidos, o que é importante para que não ocorra o falso positivo já mencionado (Tabelas 8 e 9). As sequências foram então visualizadas pelo Pymol para analisar como

ficavam dispostas nas germinas-like de GLCp (Figura 33), pois quanto mais expostos na superfície da estrutura, maior será a facilidade de serem reconhecidas por anticorpos.

Após todas as avaliações, o peptídeo DVAQVKKLKGV, pertencente à sequência de GLCp1, foi escolhido para ser sintetizado, pois, embora três resíduos de aminoácidos não estejam alinhados com os da sequência de GLCp2, o reconhecimento poderá ser pouco afetado, sendo este peptídeo o que apresentou 99,9% de probabilidade de ser toxina, veneno ou alérgeno salivar, foi predito como peptídeo antigênico, possui onze resíduos de aminoácidos e fica disposto na proteína de forma que favorece o reconhecimento por anticorpos.

**Tabela 6.** Similaridade entre as sequências conservadas de GLCp1 e GLCp2 e alérgenos de maior identidade. Os dados foram gerados através do servidor SDAP - AllAllergens.

| Sequência conservada | Nº de resíduos da sequência conservada | Alérgeno       | Fonte do alérgeno (Espécie)           | Tipo do alérgeno | Índice de similaridade | Região de combinação |
|----------------------|--|----------------|---------------------------------------|------------------|------------------------|----------------------|
| IKAAVTPAF            | 9                                      | Asp f 16       | <i>Aspergillus fumigatus</i>          | Fungo            | 4.80                   | IKGSVTPAL            |
|                      |  | Poa p 5.0101   | <i>Poa pratensis</i>                  | Gramina          | 5.07                   | FKAALTKAI            |
|                      |  | Clas c 9.0101  | <i>Cladosporium cladosporioides</i>   | Fungo            | 5.97                   | YKAAVRPTM            |
|                      |  | Eur m 14       | <i>Euroglyphus maynei</i>             | Ácaro            | 6.24                   | VKTAICPAH            |
| ARLDLA               | 6                                      | Dac g 5.01     | <i>Dactylis glomerata</i>             | Gramina          | 3.55                   | AKLDAA               |
|                      |  | Lep d 5.0102   | <i>Lepidoglyphus destructor</i>       | Ácaro            | 3.60                   | ADLNLA               |
|                      |  | Tri a glutenin | <i>Triticum aestivum</i>              | Trigo            | 3.60                   | ARLKVA               |
|                      |  | Mala s 10      | <i>Malassezia sympodialis</i>         | Fungo            | 3.66                   | ARLNLH               |
|                      |  | Cor a 13.0101  | <i>Corylus avellana</i>               | Avelã            | 4.02                   | ARMKLA               |
| GVVPMHTHP            | 9                                      | Jun v 1.0102   | <i>Juniperus virginiana</i>           | Árvore           | 5.61                   | GVVPVHAQD            |
|                      |  | Cha o 1        | <i>Chamaecyparis obtusa</i>           | Árvore           | 5.61                   | GVVPVHAQD            |
|                      |  | Sal s 3.0101   | <i>Salmo salar</i>                    | Salmão           | 7.58                   | GVVPLAGTN            |
| GLLHFQ               | 6                                      | Der p 21.0101  | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> | Ácaro            | 3.63                   | GLLHLS               |
|                      |  | Ves v 2.0201   | <i>Vespula vulgaris</i>               | Inseto           | 3.97                   | GVIHFH               |
|                      |  | Lep d 7        | <i>Lepidoglyphus destructor</i>       | Ácaro            | 3.97                   | GLIHIK               |
|                      |  | Act d 2        | <i>Actinidia deliciosa</i>            | Kiwi             | 3.99                   | GLLQCQ               |

|                    |    |                      |   |          |      |             |
|--------------------|----|----------------------|---|----------|------|-------------|
| <b>PGLQI</b>       | 5  | Ory s 1              | <i>Oryza sativa</i>   | Arroz    | 1.72 | PGLKI       |
|                    |    | Asp f 18             | <i>Aspergillus fumigatus</i>                                    | Fungo    | 1.74 | PGLNI       |
|                    |    | Rho m 2              | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>                                 | Fungo    | 1.74 | PGLNI       |
|                    |    | Cla h 9              | <i>Cladosporium herbarum</i>                                    | Fungo    | 1.74 | PGLNI       |
|                    |    | Pen ch 18            | <i>Penicillium chrysogenum</i><br>(formerly <i>P. notatum</i> ) | Fungo    | 1.74 | PGLNI       |
| <b>DFALF</b>       | 5  | Jug r 2              | <i>Juglans regia</i>  | Noz      | 1.90 | DFAFF       |
|                    |    | Gly m<br>conglycinin | <i>Glycine max</i>  | Soja     | 2.82 | DFLLF       |
|                    |    | Der p 3              | <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>                           | Ácaro    | 3.01 | DIALI       |
|                    |    | Blo t 3              | <i>Blomia tropicalis</i>  | Ácaro    | 3.01 | DIALI       |
|                    |    | Eur m 3              | <i>Euroglyphus maynei</i>                                       | Ácaro    | 3.01 | DIALI       |
| <b>PGLQITDFALF</b> | 11 | Tab y 2.0101         | <i>Tabanus yao</i>  | Inseto   | 7.17 | SGLAVIDFELW |
|                    |    | Ole e 1.0101         | <i>Olea europea</i>   | Árvore   | 7.25 | PSLAIADIARI |
|                    |    | Api m 7              | <i>Apis mellifera</i>   | Animal   | 7.30 | DDWQINDIALL |
|                    |    | Der p 9.0102         | <i>Dermatophagoide spteronysinus</i>                            | Ácaro    | 7.32 | PGDAVYQIALF |
|                    |    | Jug r 2              | <i>Juglans regia</i>  | Alimento | 7.40 | PLASILDFAFF |

|                    |    |               |                                 |         |      |             |
|--------------------|----|---------------|---------------------------------|---------|------|-------------|
| <b>DVAQVKKLKGV</b> | 11 | Dic v a       | <i>Dictyocaulus viviparus</i>   | Animal  | 6.95 | QQAQVKKIYGT |
|                    |    | Ses i 7.0101  | <i>Sesamum indicum</i>          | Sésamo  | 7.15 | DVQTARRLKGQ |
|                    |    | Api m 7       | <i>Apis mellifera</i>           | Abelha  | 7.41 | NVVLVKKVKIV |
|                    |    | Artfr 5.0101  | <i>Artemia franciscana</i>      | Camarão | 7.50 | TLAQIEKLGGT |
|                    |    | Pis v 5.0101  | <i>Pistacia vera</i>            | Árvore  | 8.00 | NFAVVKRARGQ |
|                    |    | Der f 13.0101 | <i>Dermatophagoides farinae</i> | Ácaro   | 8.12 | DRADGKRVKTV |



**Tabela 7.** Predição de epítomos pró-inflamatórios usando o servidor Proinflam.

| Sequência conservada | Predição |
|----------------------|----------|
| <b>IKAAVTPAF</b>     | Negativa |
| <b>ARLDLA</b>        | Negativa |
| <b>GVVPMHThP</b>     | Negativa |
| <b>GLLHFQ</b>        | Negativa |
| <b>PGLQI</b>         | Negativa |
| <b>DFALF</b>         | Negativa |
| <b>LKGVGG</b>        | Negativa |
| <b>KKLKGVLGGKN</b>   | Negativa |
| <b>KTFLDVAQVK</b>    | Negativa |

**Tabela 8.** Predição de peptídeos antigênicos realizado pelo servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES com relação à sequência completa de GLCp1.

| n | Posição Inicial | Sequências                             | Posição Final |
|---|-----------------|--|---------------|
| 1 | 4               | FCVADPSLPVGPAGYSCKKVASVTEKDFVFSL       | 35            |
| 2 | 44              | <b>IKAAVTPAF</b> APTF                  | 57            |
| 3 | 59              | GVNGLGVS <b>ARLDLA</b> VD <b>GVVPM</b> | 80            |
| 4 | 85              | GSSEILVVEGQLCAGFISSLENI VYFKT          | 113           |
| 5 | 115             | FKGDVMVFPQ <b>GLLHF</b>                | 129           |
| 6 | 135             | KAAAVAYASFGSSY <b>PGLQITDFALFK</b>     | 160           |
| 7 | 164             | PTEIVKTTFL <b>DVAQVKLKG</b> V          | 185           |

As sequências em destaque representam as que foram escolhidas para avaliação.

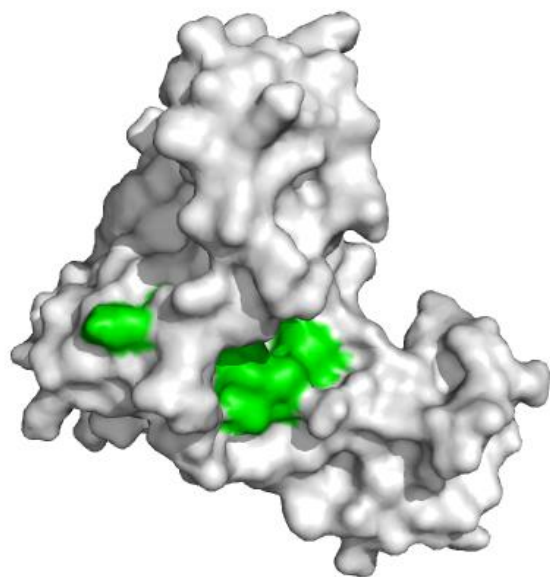
**Tabela 9.** Predição de peptídeos antigênicos realizado pelo servidor PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES com relação à sequência completa de GLCp2.

| n | Posição Inicial | Sequência        | Posição Final |
|---|-----------------|------------------|---------------|
| 1 | 14              | SGYHCKN          | 20            |
| 2 | 43              | LIKAAVTPAFDAQF   | 56            |
| 3 | 63              | GISMARLDLAPGGVVP | 79            |
| 4 | 85              | ANELLVVQGSVATGF  | 100           |
| 5 | 102             | SSSNQFYKVL       | 113           |
| 6 | 116             | DIMVYPKGLLHFQ    | 128           |
| 7 | 136             | AIAFVSF          | 142           |
| 8 | 146             | NPGLQILDFA       | 155           |
| 9 | 162             | PTSLQKSTFLDA     | 174           |

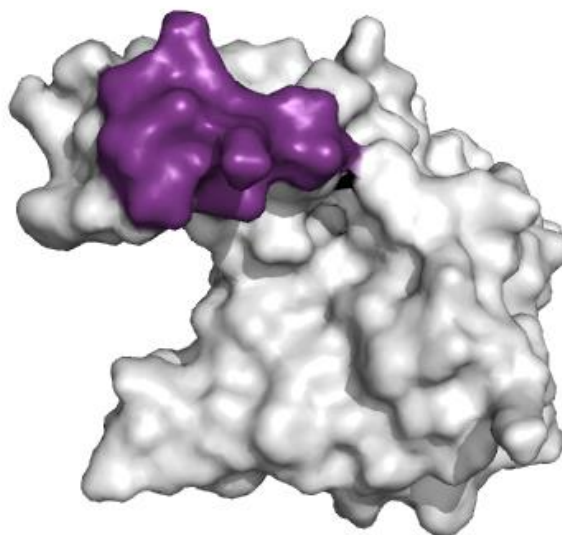
As seqüências em destaque representam as que foram escolhidas para avaliação.

**Figura 33.** Representação em superfície das estruturas destacando as seqüências que foram escolhidas para avaliação.

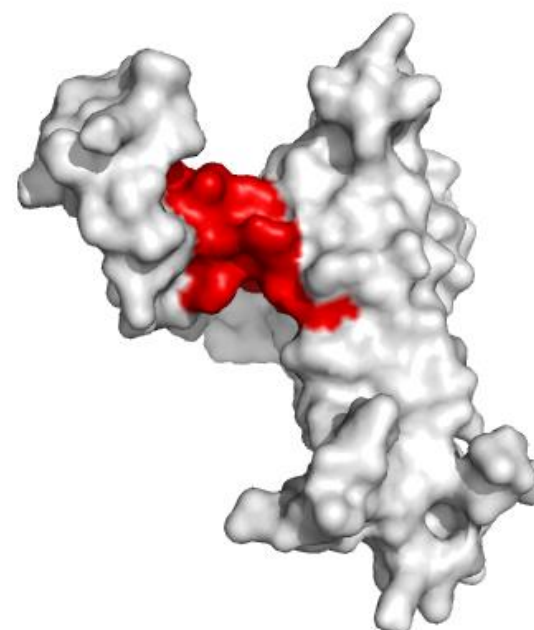
**IKAAVTPAF**



**DVAQVKKLKGV**



**PGLQITDFALF**

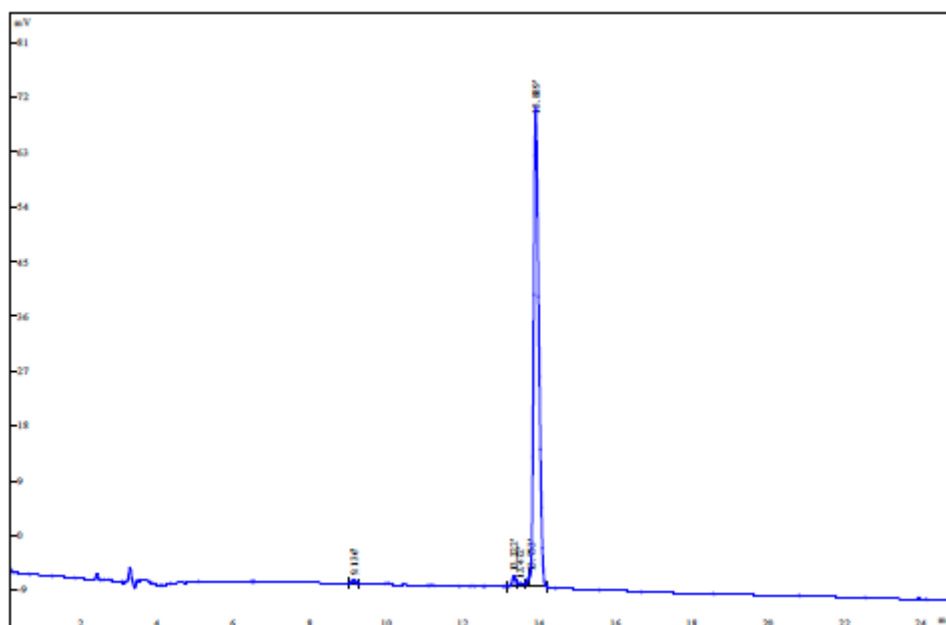


\*As estruturas foram geradas a partir da seqüência de GLCp1.

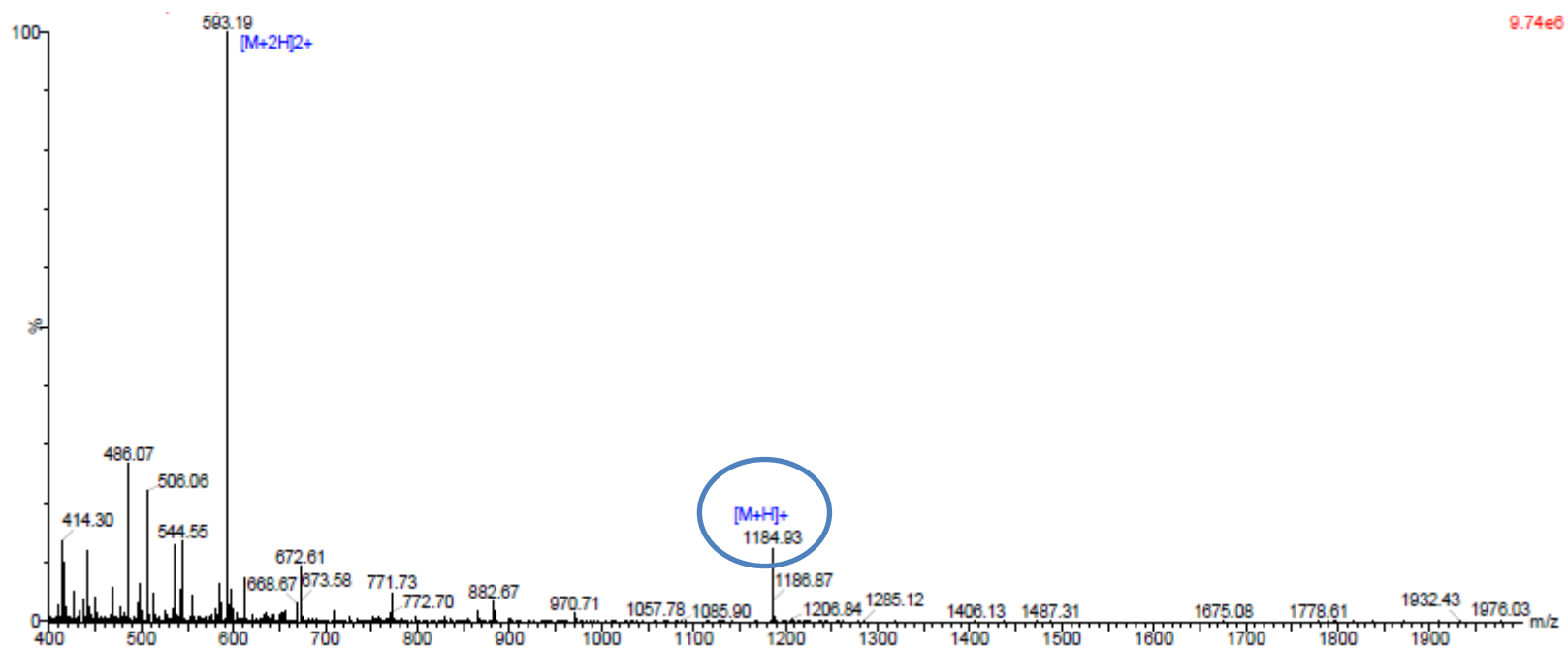
#### 4.5 Caracterização do peptídeo

O peptídeo sintetizado DVAQVKKLKGV consistiu em uma sequência de 11 aminoácidos, que foi submetida à cromatografia em sistema HPLC para análise de pureza. O cromatograma (Figura 34) demonstrou que houve um grau de pureza bastante satisfatório (>95%), visto que houve a predominância de um único pico. A pureza do peptídeo foi também analisada por Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS), obtendo massa molecular 1184,46 (Figura 35), condizente com a massa predita pela ferramenta ExPASy-Compute PI/Mw tool, que foi de 1184,44 Da, confirmando novamente o alto grau de pureza do peptídeo.

**Figura 34.** Cromatografia de Fase Reversa com o peptídeo DVAQVKKLKGV, evidenciando seu grau de pureza.



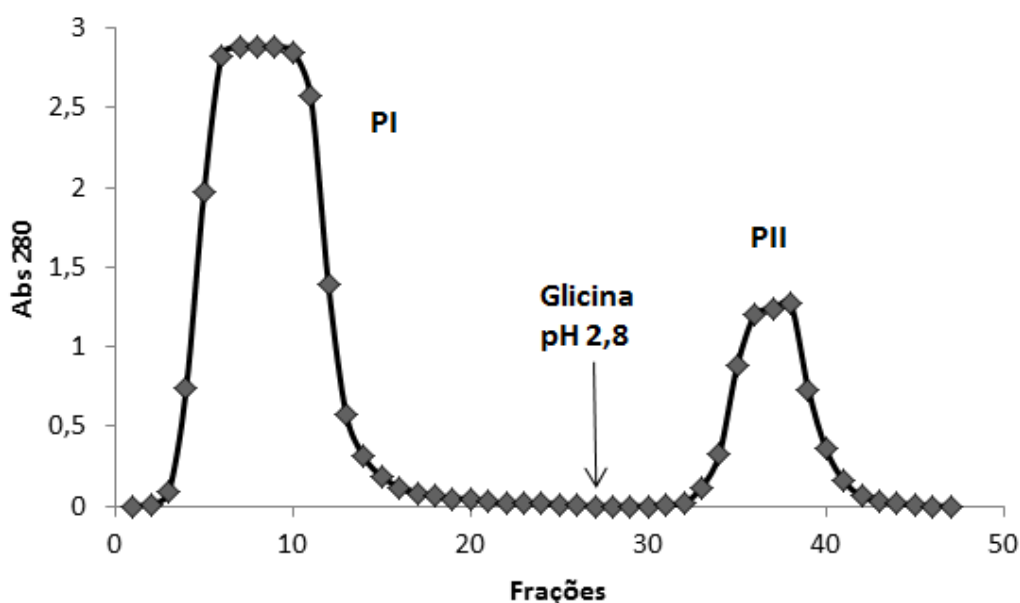
**Figura 35.** Espectrometria de massa por dessorção a laser assistida por matriz do peptídeo DVAQVKKLKGV.



#### 4.6 Identificação das proteínas GLCP1 e GLCP2 através de imunoenaios

Com o intuito de identificar especificamente as proteínas GLCP1 e GLCP2 nas frações proteicas estudadas, anticorpos policlonais foram produzidos contra o peptídeo DVAQVKKLKGV. Os anticorpos (IgG totais) foram purificados do soro, coletado após 21 dias, através de cromatografia de afinidade em coluna de Proteína-A imobilizada em Sepharose 4B, equilibrada em tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,15 M, pH 7,0. A figura 36 mostra a presença de dois picos cromatográficos, um não retido e outro retido, que foram eluídos com tampão de equilíbrio e com tampão glicina-HCl 50 mM (pH 2,8), fluxo de 1,5 mL/min, respectivamente. Frações de 1 mL foram coletadas e as leituras das absorbâncias foram registradas a 280 nm em espectrofotômetro.

**Figura 36.** Perfil cromatográfico de soro total de coelho.

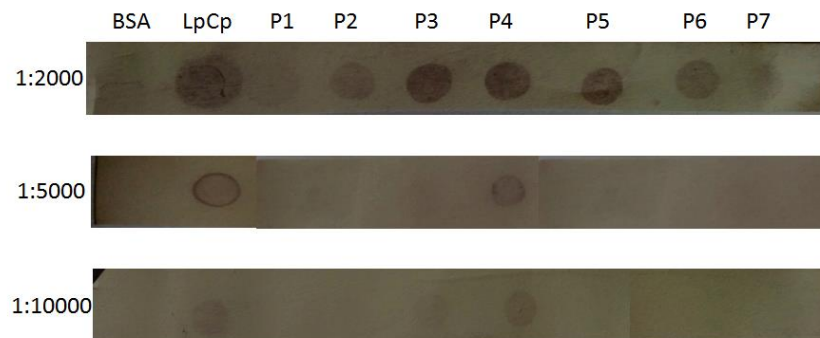


Soro coletado 21 dias após a aplicação do peptídeo DVAQVKKLKGV (1 mg/mL) em coluna de proteína A imobilizada em Sepharose 4B. Frações: 1 mL. Fluxo: 1,5 ml/min.

O pico retido, rico em IgGs, foi dialisado contra água destilada e liofilizado. Diferentes diluições desta fração (5 mg/mL) foram usadas em ensaios de *Dot Blotting* para a determinação da melhor diluição a ser utilizada. Foram utilizadas as diluições 1: 2000, 1: 5000 e 1: 10000 (Figura 37). A diluição 1: 2000 mostrou reconhecimento por todas as amostras, não sendo confiável sua utilização, já a diluição de 1:5000 foi capaz de reconhecer proteínas do extrato total do látex de *C. procera* e do pico P4. Na diluição de 1:10000 os reconhecimentos foram mais fracos que 1:5000, mas repetiram os mesmos resultados. A diluição 1: 5000 foi então escolhida para ensaios posteriores. Esses resultados confirmam os resultados de ensaio enzimático para a detecção de atividade oxalato oxidase, em que apenas o pico P4 apresentou atividade do tipo germina. Ensaios de ELISA também foram realizados para a identificação das proteínas GLCp1 e GLCp2 (Figura 38). O ensaio mostrou que o anticorpo foi capaz de reconhecer proteínas no extrato total de látex de *C. procera* e no pico P4, o que corrobora com os resultados obtidos anteriormente. Para a identificação de possíveis bandas referentes às proteínas germinas (GLCp1 ou GLCP2), foi realizado um ensaio de *Western Blotting* (Figura 39). No ensaio houve reconhecimento de uma banda na faixa de 20 kDa no extrato proteico de *C. procera* e no pico 4 (Figura 39).

Por último, como várias germinas foram identificadas em sementes durante a germinação (por isso o nome germinas), sementes de *C. procera* foram postas para germinar com o intuito de identificar estas proteínas durante a germinação. O material vegetal de *C. procera* correspondente a plântulas, sementes não germinadas, sementes não germinadas com embrião exposto, raiz e sementes sem casca foram utilizados em ensaio de ELISA (Figura 40). Os resultados mostram que não houve reconhecimento de proteínas nestes materiais estudados. Assim, sugere-se que as proteínas GLCp1 e GLCp2 estão presentes no látex de *C. procera* e não nas sementes ou plântulas.

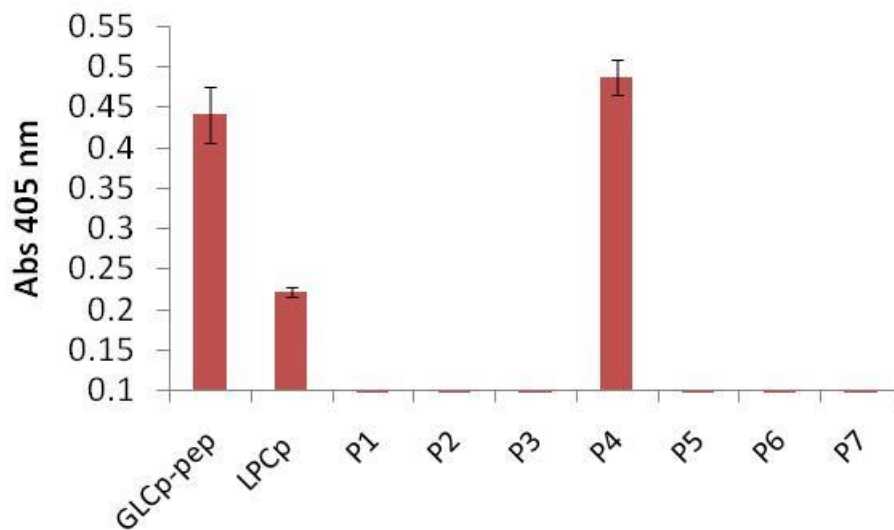
**Figura 37.** *Dot Blotting* para detecção de GLCp1 e GLCp2 usando anticorpos primários anti-peptídeo DVAQVKKLKGV com o extrato proteico e os picos de *C. procera* para detecção de proteínas semelhantes à GLCp-pep.



Concentrações do anticorpo primário: 1: 2000; 1: 5000 e 1:10000. Anticorpo secundário em concentração 1: 10000, marcado com fosfatase alcalina. BSA: controle negativo (1 mg/mL); PLCp: proteínas do látex de *C. procera* (5 mg/mL); P1-P7: picos 1 a 7 (2 mg/mL). Foram aplicados 10  $\mu$ L em cada poço.

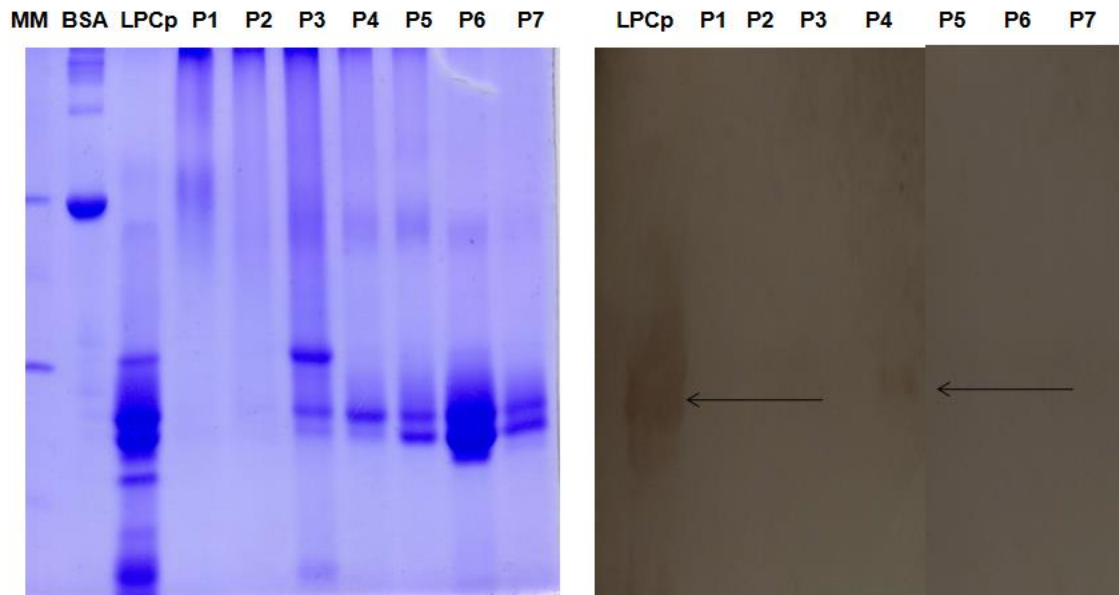


**Figura 38.** Ensaio de ELISA para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2 nas diferentes frações proteicas de látex de *Calotropis procera*.



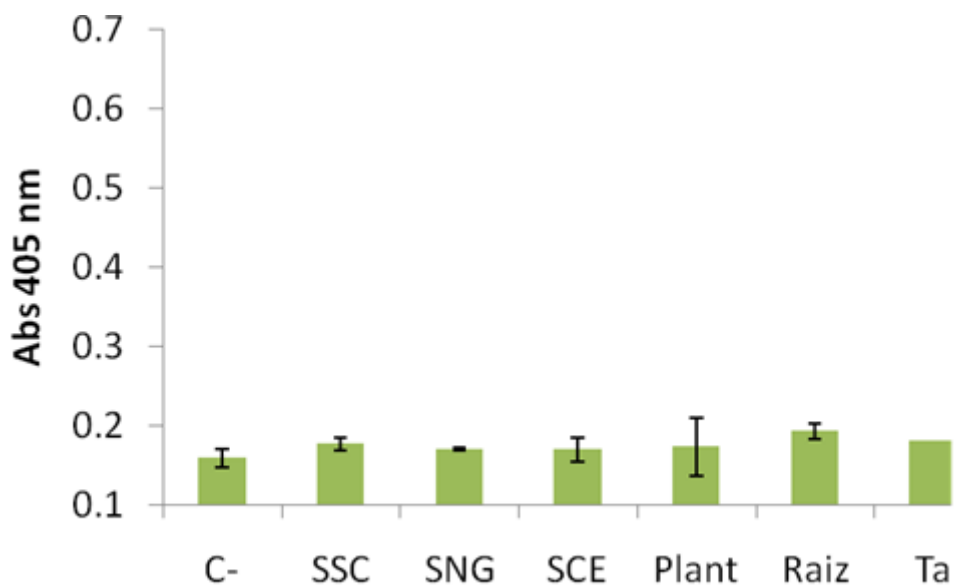
Ensaio de ELISA com o extrato proteico de *C. procera* e dos sete picos cromatográficos. GLCp-pep: peptídeo de GLCp; LPCp: extrato de *C. procera* (60  $\mu$ g); P1-P7: picos 1 a 7 (30  $\mu$ g). Anticorpo primário 1: 5000 e anticorpo secundário 1: 10000 conjugado com fosfatase alcalina.

**Figura 39.** Ensaio *Western Blotting* com o extrato proteico de *C. procera* e os picos cromatográficos para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2.



(Esquerda) SDS-PAGE 12,5%. MM: marcador molecular (2,5  $\mu$ L); BSA: albumina do soro bovino; LPCp: proteínas do látex de *C. procera*. P1-P7: picos cromatográficos. (B) *Western Blotting*, concentração do anticorpo primário: 1: 5000; concentração do anticorpo secundário: 1: 10000.

**Figura 40.** Ensaio de ELISA para detecção das proteínas GLCp1 e GLCp2 nas sementes e diferentes partes de plântulas de *Calotropis procera*.



Ensaio de ELISA com o material vegetal de *C. procera* e trigo. SSC: sementes sem cascas; SNG: sementes não germinadas (20 µg); SCE: sementes que não germinaram, mas com embrião proeminente (20 µg); Plant: plântulas com 40 dias (20 µg). Raiz: raiz extraída das plântulas (20 µg); Ta: *Triticum aestivum*, trigo (20 µg). Anticorpo primário 1: 5000 e anticorpo secundário 1: 10000 conjugado com fosfatase alcalina.

## 5 DISCUSSÃO

As proteínas germinas têm sido identificadas em diversas gramíneas de importância econômica como arroz, trigo, milho e cevada (YASMIN *et al.*, 2015) e, subsequentemente, proteínas germinas-like (GLPs) foram encontradas em outras monocotiledôneas, várias dicotiledôneas, angiospermas e gimnospermas (LU *et al.*, 2010), mostrando que são amplamente distribuídas. Essas proteínas têm despertado o interesse em várias pesquisas, visto que há vários relatos sobre estas desempenharem papel na defesa de plantas (CHEN, 2010).

Devido ao seu papel na defesa, pesquisadores têm realizado trabalhos com a expressão heteróloga de GLPs. Banerjee *et al.* (2010) avaliaram plantas de tabaco transgênico transformadas com um gene de GLP de arroz (*Oryza sativa*) e constataram a tolerância a estresses abióticos intensificados pelo acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e resistência por infecção por patógeno fúngico (*Fusarium solani*). A expressão de uma GLP de girassol em plantas de *Arabidopsis* conferiu tolerância a *Sclerotinia sclerotiorum* nos primeiros estádios da doença e interferiu com a infecção por *Rhizoctonia solani*, além de ter elevado os níveis endógenos de ROS (BERACOCHEA *et al.*, 2015). A superexpressão de uma GLP de arroz mediada por *Agrobacterium* apresentou resistência foliar quando exposta a *Fusarium oxysporum* f.sp. (MAJEED, 2016).

As aplicações destas proteínas contra estresses bióticos e abióticos, principalmente contra patógenos, levou ao desenvolvimento de plantas transgênicas comercialmente e agronomicamente importantes, mostrando-se uma ferramenta biotecnológica valiosa com um repertório de genes cada vez mais extenso para ser explorado para uso comercial (BERACOCHEA *et al.*, 2015; ILYAS, RASHEED, 2016).

Apesar dos vários estudos com germinas ou GLPs, o primeiro registro destas proteínas em fluidos laticíferos foi descrito por nosso grupo de pesquisa em 2016 (FREITAS *et al.*, 2016). Nesse trabalho foi purificada a primeira GLP com atividade proteolítica no látex de *Thevetia peruviana*. Visto o grande potencial biotecnológico mostrado pelas germinas ou GLPs, este trabalho se propôs a investigar a presença destas proteínas na planta laticífera *Calotropis procera*. Esta planta foi escolhida por vários motivos, entre eles: é uma planta facilmente encontrada em nossa região; o nosso grupo de pesquisa já trabalha com ela há mais de 15 anos; a planta produz uma larga quantidade de látex; seu látex é rico em proteínas com diversas atividades biológicas relacionadas com a defesa da planta, como atividade inseticida e antifúngica.

Recentemente uma biblioteca de cDNA de *C. procera* foi publicada, havendo assim uma fonte riquíssima de informações a serem acessadas através de ferramentas de bioinformática (KWON *et al.*, 2015).

Atualmente, os avanços na área genômica aliados com as ferramentas de bioinformática possibilitam a pesquisa de qualquer sequência gênica por homologia em qualquer genoma disponível nos bancos de dados. Sendo assim, essa etapa tornou-se imprescindível para muitas estratégias de pesquisa (JANA, 2015). Baseado nisso, o nosso trabalho visou identificar germinas ou GLPs em *C. procera* usando a biblioteca de cDNA desta planta e como isca uma sequência gênica de germina-like de *Nicotiana tabacum* (BAH15357.1). Duas sequências completas foram obtidas e nomeadas GLCP1 e GLCP2 (Figura 7). As análises *in silico* mostraram que as duas sequências obtidas de *C. procera* apresentaram mais que 60% de similaridade com algumas sequências de outras germinas-like (GLP) (Tabela 2). Enquanto o alinhamento com germinas revelou que estas duas proteínas compartilham baixa similaridade entre suas sequências, abaixo de 40%, como foi também constatado com as GLPs obtidas de *Brassica napus*, em que a identidade de aminoácidos variou entre 30 a 48% com a germina de cevada (RIETZET *et al.*, 2012). Logo, as duas proteínas GLCP1 e GLCP2 foram consideradas como germinas-like proteínas (GLP).

A predição das características físico-químicas de GLCP1 e GLCP2 revelou que são bastante semelhantes ao que já foi encontrado para outras GLPs (Tabela 2). GLCP1 e GLCP2 apresentaram, respectivamente, comprimentos da sequência de 216 e 206 aminoácidos com peptídeo sinal, massas moleculares de 22791,55 e 21795,10 Da e pontos isoelétricos (pI) 6,81 e 6,49. Esses valores foram bastante próximos aos obtidos para uma GLP de girassol, que apresentou 220 resíduos de aminoácidos com peptídeo sinal, massa molecular de 21660 Da e pI 7,22 (BERACOCHEA, 2015). Quanto aos resíduos de cisteínas foram encontrados três para GLCp1 e dois para GLCp2, que condiz com os relatos na literatura de dois destes resíduos na região N-terminal de GLPs de plantas superiores (BARMAN, BANERJEE, 2015). Semelhantemente, Carter e Thornburg (2000) mostraram que uma GLP de nectarina teve massa molecular de 21062 Da e dois resíduos de cisteínas.

As proteínas germinas-like (GLPs) compartilham sequências de aminoácidos conservados. Estas regiões são chamadas de "germin boxes" e são classificadas em "germin boxes" A, B e C (BERNIER, BERNA, 2001). A partir destas regiões

conservadas, uma árvore filogenética pode agrupar essas proteínas a partir de suas relações evolutivas. De acordo com as sequências compartilhadas nos “germin boxes” estas proteínas foram então separadas nos clados GER 1, GER 2, GER5/6, GER7/8, briófitas e germinas de proteobactérias. Dentre os clados citados, os membros de briófitas não compartilham os dois resíduos de cisteína presentes na posição conservada da região N-terminal de GLPs de plantas superiores (BARMAN, BANERJEE, 2015), o que leva a suposição que o primeiro membro GLP ocorreu em uma planta inferior e a duplicação do resíduo deu-se durante a evolução das angiospermas (DUNWELL *et al.*, 2008). Uma busca no banco de dados do NCBI revelou proteínas germinas em proteobactérias e estas foram selecionadas para as análises de relações filogenéticas, revelando que a identidade entre estas sequências e as de GLPs de plantas é bastante baixa (DUNWELL, 2000).

As análises indicaram que GLCp1 e GLCp2 pertencem ao clado GER 2 (Figura 9), um grupo bastante heterogêneo de germinas-like que incluem GLPs como Nectarin I (CARTER E THORNBURG, 2000), proteínas AtGLP1, AtGLP2 e AtGLP3b de *Arabidopsis*, BnGLP de *Brassica sp.*, SaGLP de *Sinapis alba*, duas proteínas de ligação a auxina de *Prunus persica* (PpABP19 e PpABP20) e duas de *Prunus salicina* (PsABP2 e PsABP3). Além de cinco GLPs nomeadas de GhGLP do algodão, Nt24KGLP de tabaco, PnGLP de *Pharbitisnil*, VvGER6 da uva e ChGLP de *Capsicum chinense* apresentarem similaridade filogenética com outros membros da subfamília de GER 2 (BARMAN, BANERJEE, 2015). A proteína germina-like de *Nicotiana tabaco*, usada como isca, também ficou incluída no clado GER 2.

A glicosilação pode ter um efeito estabilizador significativo na estrutura proteica (BREITENEDER, MILLS, 2005) e já foi confirmada para várias germinas e GLPs, apresentando um ou dois sítios (BERNIER, BERNA, 2001). Os programas de predição de sítios revelaram que há um potencial sítio de N-glicosilação para GLCp1 (Asparagina na posição 66) e dois sítios em GLCp2 (Asparagina nas posições 41 e 57) (Figura 10). A glicoproteína HvOXO é uma germina purificada das sementes de cevada em que estão presentes dois motivos N-glicanos em sua sequência proteica nos resíduos Asn<sub>47</sub> e Asn<sub>52</sub> (PAN *et al.*, 2007). Esta glicosilação parece ser essencial para as interações proteína-proteína, mas não para a atividade enzimática (BERACOCHEA *et al.*, 2015). Embora não relatado para germinas e germinas-like, a predição mostrou possíveis sítios glicosilação do tipo O-GlcNAc para GLCp1 e GLCp2 (Figura 11).

As estruturas tridimensionais de GLCp1 e GLCp2 foram obtidas por modelagem por homologia, que gera um modelo 3D confiável de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos de uma proteína homóloga, que teve sua estrutura determinada experimentalmente. Isso é possível devido ao fato de que proteínas relacionadas evolutivamente compartilham uma estrutura semelhante (VYAS, 2012). A germina de *Hordeum vulgare* (PDB: 2ET7) possui 38,66 e 38,86% de similaridade com GLCp1 e GLCp2, respectivamente, e foi escolhida como molde padrão por possuir estrutura tridimensional resolvida por cristalografia e difração de raios X (WOO, 2000).

A predição de estrutura secundária para todos os modelos tridimensionais gerados pelas plataformas para GLCp1 e GLCp2 exibiram organização das estruturas em 5  $\alpha$ -hélices, 10 fitas- $\beta$  (5 paralelas e 5 antiparalelas) e alças (Figuras 15 a 20), que é equivalente a estrutura da germina de *Hordeum vulgare* (WOO, 2000). Xi Cheng e colaboradores (2014) observaram um elevado teor de estrutura  $\alpha$ -hélice e várias folhas- $\beta$  curtas em uma GLP de *Satsuma mandarine* que pode acomodar o centro catalítico.

Os modelos gerados por todas as plataformas foram sobrepostos com o molde pelo programa 3DSS, que gera um valor de RMSD (raiz quadrada do desvio médio) (SUMATHI *et al*, 2005). Esse ensaio mostrou que modelos do GalaxyWeb não foram favoráveis. No entanto, o gráfico de Ramachandran mostrou que os modelos gerados para GLCp1 e GLCp2 por essa plataforma apresentaram o maior número de resíduos em regiões fisicamente permitidas, além de apresentarem os melhores valores de qualidade global de acordo com as análises feitas pelo servidor ERRAT2. Os valores de qualidade local realizadas por meio do servidor ProSA foram negativos, como era esperado, e próximos ao valor de z-score da proteína molde. A confiabilidade do modelo foi avaliada pelo Verify 3D mostrando que os melhores modelos foram os gerados pelo GalaxyWeb. Portanto, os modelos tridimensionais gerados pelo GalaxyWeb (Figuras 12C e 13C) se destacaram em relação aos das outras plataformas, mostrando melhor qualidade (Tabela 3).

Os registros de proteínas germinas caracterizadas com mais detalhes a níveis estruturais e bioquímicos são escassos. A OxO (germina) de *Hordeum vulgare* é um exemplo clássico de germina em que houve sucesso na sua cristalização e determinação de estrutura 3D. A mesma foi caracterizada como um homohexâmero disposto como um trímero de dímeros, em que cada subunidade tem massa molecular de 22 kDa e se liga a

um glicano (WOO, 2000; HU, 2015). As GLP têm sido descritas por também formarem complexos homohexâmericos e em SDS-PAGE sua massa molecular aparente é de aproximadamente 100 kDa (ZIMMERMAN, 2006). Barman e Barnerjee (2015) estudando a sobreexpressão de uma germin-like de cevada, HvGER5a, a caracterizaram como uma SOD extracelular que migra como um complexo homohexamérico na PAGE nativa.

Cada subunidade formadora do hexâmero possui o sítio ativo envolvido com um resíduo de glutamato e um íon manganês que interagem com três histidinas (DUNWELL, 2004). Estas características foram confirmadas por Bruno *et al.* (2014) estudando uma GLP de limão, além de constatar outra característica comum entre GLPs que é a sequência de motivo do tripeptídeo KGD, que supostamente está envolvido nas interações proteína-proteína e foram observados na GLCps. Zimmerman *et al.* (2006) avaliaram a mutagênese dirigida de uma GLP de cevada (HvGER2) substituindo um dos três resíduos conservados de histidina do sítio ativo por serina e observaram que a mudança afetou a estabilidade do complexo quaternário, indicando que um centro intacto de ligação ao manganês tem impacto na estrutura tridimensional da proteína.

Por ter sido considerada a melhor estrutura, GLCp (gerada pelo GalaxyWeb) foi escolhida para avaliar a possibilidade de interação da proteína com o substrato oxalato, através de docking molecular (Figura 24). A energia de interação calculada entre o substrato oxalato e a proteína construída indicou que as distâncias entre o oxalato e o átomo N do anel aromático de His<sub>107</sub> e His<sub>109</sub> foram de 4,2 e 3,1 Å, respectivamente. Enquanto que na germina de *Hordeum vulgare* (molde) foram encontrados valores de His<sub>88</sub> e His<sub>90</sub> de 2,27 e 2,30 Å (WOO, 2000), que se encontram em posições equivalentes a His<sub>107</sub> e His<sub>109</sub> de GLCp2. Khobragade *et al.* (2011) também usando a estrutura da germina de cevada (*Hordeum vulgare*) como molde, achou valores de 2,11 e 3,29 para as His<sub>105</sub> e His<sub>103</sub>. Embora os valores obtidos para a GLCp2 de *C. procera* indiquem que a posição do oxalato no local da “bolsa de ligação” não tenha sido tão próxima dos aminoácidos quando comparado com o molde, os dados revelam que o ligante se adaptou em uma posição numa gaiola rodeada pelas três histinas e o glutamato correspondendo ao provável sítio de atividade do tipo oxalato oxidase (WOO, 2000; ALI, MAHMOOD, 2015).

Após os ensaios *in silico*, o objetivo do trabalho foi tentar identificar estas proteínas (GLCp1 e GLCp2) no látex de *C. procera*. Assim, para facilitar os ensaios



posteriores, a fração proteica total do látex foi primeiramente fracionada em uma coluna de exclusão molecular. Sete picos foram separados e submetidos à eletroforese unidimensional (figura 25B). As proteínas foram fracionadas em picos que compreenderam proteínas com massas moleculares entre 100 kDa e 20 kDa (figura 25). Com o objetivo de identificar as proteínas presentes nos picos cromatográficos, estes foram submetidos diretamente à digestão com tripsina e analisados através de espectrometria de massas. Em paralelo, todos os *spots* proteicos obtidos após eletroforese dos picos cromatográficos foram também digeridos com tripsina e submetidos à espectrometria de massas. Diversas proteínas foram identificadas, entre elas houve grande recorrência de proteases cisteínicas e quitinases (Tabela 5). Esses resultados estão de acordo com a literatura, já que foram descritas várias isoformas de proteases e quitinases no látex de *C. procera* (RAMOS *et al.*, 2012; DUBEY, JAGANNADHAM, 2003; SINGH *et al.*, 2010). No entanto, germinas ou germinas-like não foram identificadas.

O ácido oxálico é considerado um produto inerte do metabolismo e seu acúmulo é tóxico para os tecidos. Logo, enzimas que degradam o ácido oxálico têm recebido considerável atenção (ÇALISKAN, 2000). Este ácido é considerado um fator patogênico importante de algumas doenças causadas por patógenos e enzimas capazes de degradar o oxalato são importantes para a saúde de plantas (FANG *et al.*, 2015). Os processos metabólicos aeróbico das plantas geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e elas necessitam fazer uso de um complexo antioxidante para manter a homeostase. No entanto, ROS não são apenas deletérias, mas também atuam como moléculas de sinalização geradas por complexos enzimáticos como oxalatos oxidases (MARINO *et al.*, 2012). Germinas têm sido relatadas sempre relacionadas por sua atividade oxalato oxidase, uma óxido redutase que se localiza na parede celular e degrada oxalato em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este último atuando como sinalizador nas vias de transdução de sinal (SHARMA *et al.*, 2012; KARUPPANAPANDIAN *et al.*, 2011). Esta enzima tem sido foco de trabalhos que buscam a sua expressão em altos níveis, como o estudo realizado por Pan *et al.* (2007), que conseguiram expressar oxalato oxidase de trigo em culturas de fermentação de *Pichia pastoris* para aplicações biotecnológicas. Esta enzima também tem sido explorada pela indústria. A oxalato oxidase de cevada mostrou potencial para eliminar oxigênio em embalagens e aumentar a vida útil dos alimentos e bebidas, e o

dióxido de carbono produzido atua como proteção para as embalagens (WINESTRAND *et al.*, 2013).

No presente estudo os ensaios enzimáticos tiveram como objetivo verificar a presença de atividade oxalato oxidase no látex de *C. procera* e, conseqüentemente, associar essa atividade com as duas GLPs identificadas nesta planta. Dos sete picos cromatográficos, apenas o pico P4 apresentou coloração indicativa de atividade (Figura 26). De acordo com a eletroforese da figura 25, o pico P4 apresenta proteínas com massas moleculares entre 20 e 25 kDa, que são próximas às massas preditas para GLCp1 e GLCp2, que foram 19,88 e 19,79 KDa, respectivamente (massa sem peptídeo sinal). Esses resultados colaboram com os resultados para as germinas de *Hordeum vulgare* que têm peso molecular de 22 kDa (HU, 2015) e para GLPs, em que Bruno *et al.* (2014) estudando uma GLP de *Citrus limone* (CIGLP1) analisaram suas características estruturais *in silico* e observaram uma proteína de 24,38 kDa. As absorbâncias das amostras foram lidas para quantificar a atividade e vão de acordo com o ensaio qualitativo, pois constatam atividade no pico P4 (Figura 26). Tais resultados sugerem a presença de germinas ou germina-like proteínas com atividade oxalato oxidase no látex de *C. procera*. Esse resultado é o primeiro relato na literatura de atividade oxalato oxidase em fluidos laticíferos.

Atividade SOD tem sido associada a muitas GLPs, assim essa atividade também foi investigada no látex de *C. procera* através de ensaios *in vitro* e zimogramas. O zimograma revelou que a atividade SOD foi predominante nos picos P1, P2 e P3, que continham proteínas com massas aparentes entre 35 a 90 kDa (Figura 28). Esses valores são muito superiores às massas preditas para GLCp1 e GLCp2 e para outras GLPs vegetais (WOO, 2000; HU, 2015). No pico P4 não houve detecção de atividade SOD, sugerindo que nesse pico há presença de proteínas germinas ou germinas-like apenas com atividade oxalato oxidase. Os ensaios *in vitro* para detecção de atividade SOD evidenciaram que os picos P1, P2 e P3 apresentam as maiores atividades específicas (Figura 30). Os baixos valores de atividade SOD encontrados em outros picos podem ser devido à contaminação durante o processo de purificação. Essa contaminação foi observada nesse ensaio porque os ensaios *in vitro* são quantitativos e mais sensíveis, quando comparado com o zimograma.

Embora a maioria das GLPs normalmente não possuam atividade oxalato oxidase e serem amplamente relatadas como tendo atividade de superóxido dismutase (SOD) (SULTANA *et al.*, 2016, CHEN *et al.*, 2011), há registros de GLPs desempenhando diferentes atividades enzimáticas. Rodríguez-López *et al.* (2001) estudando dois oligômeros distintos de GLPs de cevada (HvGLP1) observaram que ambos possuem atividade de ADP glucose pirofosfatase/fosfodiesterase. Xi Chen *et al.* (2014) caracterizaram uma proteína germina-like de *Satsuma mandarine* com atividade do tipo polifenol oxidase. Ainda mais recentemente, uma GLP do látex de *Thevetia peruviana* foi identificada com atividade proteolítica (FREITAS *et al.*, 2016). Mesmo com a grande semelhança estrutural entre germinas e germinas-like, a atividade oxalato oxidase não é comum para GLPs (CHEN *et al.*, 2011). Sakamoto *et al.* (2015) consideraram que todas as GLPs examinadas foram submetidas a métodos que não fossem tão sensíveis para sua detecção. Eles então utilizaram em seus estudos células de tabaco transgênico e a proteína recombinante RmGLP2 de *Rhododendron mucronatum* em um método à base de etanol, avaliado como o método mais sensível até o momento para detectar e medir a atividade oxalato oxidase. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que RmGLP2 exibiu atividade específica baixa comparada com oxalato oxidase de cevada, mas conseguiu reduzir significativamente os níveis de oxalato, representando a primeira GLP relatada com atividade oxalato oxidase.

Com o objetivo de identificar GLCp1 e GLCp2 no látex de *C. procera* de maneira mais específica, uma pesquisa foi feita para se chegar a um peptídeo que estivesse na superfície de ambas as proteínas e que o mesmo apresentasse características que o fizesse capaz de induzir a produção de anticorpos policlonais em coelho. Assim, o peptídeo DVAQVKKLKGV foi sintetizado e utilizado para a produção de anticorpos. Os ensaios de *Dot Blotting* confirmaram a presença destas proteínas na fração proteica total do látex, assim como no pico P4 (Figura 37). Os ensaios de ELISA confirmaram o *Dot Blotting* (Figura 38). Dumas, em 1995, já havia constatado a presença da enzima oxalato oxidase por imunotransferência utilizando anticorpos policlonais produzidos contra uma germina de trigo. O problema da utilização de anticorpos policlonais de proteínas complexas é o reconhecimento cruzado com proteínas não relacionadas (POWE *et al.*, 2014), o que diminui bastante a confiabilidade da metodologia. Contudo, neste trabalho os anticorpos utilizados foram produzidos contra um peptídeo muito específico de apenas 11 aminoácidos, sendo assim, acredita-se que o resultado positivo

refere-se ao reconhecimento das proteínas GLCp1 e GLCp2 no látex de *C. procera* e não ao reconhecimento cruzado com outras proteínas. Outro fato importante é que este reconhecimento foi presente apenas no pico P4, o único pico que apresentou atividade oxalato oxidase. O resultado de *Western Blotting* reafirmou a hipótese da presença de GLCp1 e GLCp2 no látex de *C. procera*, desde que uma única banda com massa molecular próxima a 20 kDa foi identificada no pico P4 (Figura 39). A questão que permanece aberta é qual isoforma está sendo expressa no látex (GLCp1 ou GLCp2 ou ambas). Pois o peptídeo DVAQVKKLKGV está presente em ambas as proteínas.

Como as primeiras germinas foram identificadas em sementes de cereais durante o processo de germinação (por isso o nome germinas), ensaios foram realizadas com o intuito de identificar as proteínas GLCp1 ou GLCp2 em sementes de *C. procera* durante a germinação. Os materiais vegetais de *C. procera* correspondente a plântulas, raízes das plântulas, sementes não germinadas sem casca e não germinadas com embrião e sem embrião exposto foram testados para a possível identificação de GLCp1 ou GLCp2 em ensaios de ELISA (Figura 40). Os resultados mostraram que não houve reconhecimento destas proteínas nos materiais estudados. Desta forma, sugere-se que ambas as proteínas (GLCp1 e GLCp2) estão presentes no látex de *C. procera* e não nas sementes ou plântulas. Bruno *et al.*, (2014) notaram que CIGLP, uma germina-like de limão, era expressa diferencialmente nos vários órgãos e foi mais elevada em frutos maduros e o nível de expressão de CIGLP1 foi observado em folhas feridas por injúrias, acompanhado por elevação endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nos estudos conduzidos por Sasaki *et al.* (2015) foi explorada a expressão *in silico* de uma sequência de eucalipto que codifica uma suposta GLP prevista para ser expressa em folhas, e como constatado nos ensaios de RT-PCR, as GLPs foram detectadas apenas em folhas enquanto que nos outros órgãos a expressão era muito fraca ou não possível de ser detectada. Esses trabalhos destacam a variedade de órgãos ou tecidos de plantas onde GLPs podem ser expressas.

## 6 CONCLUSÃO

As similaridades estruturais das proteínas identificadas nesse estudo com GLPs e o reconhecimento através de ensaios utilizando anticorpo-GLCp-pep ratificam a presença de um possível monômero de 20 a 25 kDa de uma proteína germina-like em uma fração do látex de *Calotropis procera*. Os estudos do provável sítio catalítico revelaram que o ligante oxalato se estabelece em uma posição de interação com os resíduos de aminoácidos His<sub>107</sub>, His<sub>109</sub>, His<sub>154</sub> e Glu<sub>114</sub> envolvidos no sítio ativo, colaborando com os resultados enzimáticos que constataram oxalato oxidase, uma função até então pouco relatada para GLPs e correspondendo ao primeiro relato de proteínas germinas-like com esta atividade em fluidos laticíferos.

Estas proteínas, classificadas como PR-16, são constantemente associadas à defesa vegetal, logo, mais estudos e ensaios são necessários para elucidar o papel das germinas-like de *C. procera* e sua participação na defesa de plantas contra o ataque de patógenos.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Anurag A. et al. Specificity of herbivore-induced hormonal signaling and defensive traits in five closely related milkweeds (*Asclepias* spp.). **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 7, p. 717-729, 2014.

ALI, Iftikhar; MAHMOOD, Tariq. Identification and analysis of regulatory elements in the germin and germin-like proteins family promoters in rice. **Turkish Journal of Botany**, v. 39, n. 3, p. 389-400, 2015.

BANERJEE, Joydeep et al. Transgenically expressed rice germin-like protein1 in tobacco causes hyper-accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reinforcement of the cell wall components. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 402, n. 4, p. 637-643, 2010.

BARBOSA, Mariana Oliveira et al. Seed oil content and fatty acid composition from different populations of *Calotropis procera* (Aiton) WT Aiton (Apocynaceae). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 8, p. 1433-1441, 2014.

BARMAN, Ashis Roy; BANERJEE, Joydeep. Versatility of germin-like proteins in their sequences, expressions, and functions. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 5, p. 533-548, 2015.

BEAUCHAMP, Charles; FRIDOVICH, Irwin. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BERACOCHEA, V. C. et al. Sunflower germin-like protein HaGLP1 promotes ROS accumulation and enhances protection against fungal pathogens in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant cell reports**, v. 34, n. 10, p. 1717-1733, 2015.

BERNIER, François; BERNA, Anne. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly?. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 545-554, 2001.

BESSIS, Alain; SELOSSE, Marc-Andre; POZO, María J. Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 11, p. 607-613, 2014.

BORDOLI, Lorenza et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2009.

- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BREEN, James; BELLGARD, Matthew. Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. **Functional & integrative genomics**, v. 10, n. 4, p. 463-476, 2010.
- BREITENEDER, Heimo; MILLS, EN Clare. Molecular properties of food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 1, p. 14-23, 2005.
- BRUNO, Leonardo et al. Developmental stimuli and stress factors affect expression of CIGLP1, an emerging allergen-related gene in Citrus limon. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 31-40, 2014.
- ÇALIŞKAN, MAHMUT; CUMING, ANDREW C. Germin-like oxalate oxidase activity increase in auxin-treated wheat coleoptiles. **Turkish Journal of Botany**, v. 24, n. 6, p. 329-335, 2000.
- CARTER, Clay; THORNBURG, Robert W. Tobacco nectarin I purification and characterization as a germin-like, manganese superoxide dismutase implicated in the defense of floral reproductive tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36726-36733, 2000.
- CAVALCANTE, Géssica S. et al. Chemical composition and in vitro activity of Calotropis procera (Ait.) latex on Haemonchus contortus. **Veterinary Parasitology**, v. 226, p. 22-25, 2016.
- CHEN, Vincent B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.
- CHEN, Xiaoping et al. Identification and characterization of a multigene family encoding germin-like proteins in cultivated peanut (Arachis hypogaea L.). **Plant molecular biology reporter**, v. 29, n. 2, p. 389-403, 2011.
- CHENG, Xi et al. Characterization of germin-like protein with polyphenol oxidase activity from Satsuma mandarine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 449, n. 3, p. 313-318, 2014.
- COLOVOS, Chris; YEATES, Todd O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519, 1993.

- DE FIGUEIREDO, Ingrid Samantha Tavares et al. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 512-519, 2014.
- DE FREITAS, Cleverson Diniz Teixeira et al. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 10, p. 2501-2507, 2011.
- DE FREITAS, Cleverson DT et al. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 11-22, 2010.
- DE FREITAS, Cleverson DT et al. Proteomic analysis and purification of an unusual germin-like protein with proteolytic activity in the latex of *Thevetia peruviana*. **Planta**, v. 243, n. 5, p. 1115-1128, 2016.
- DE OLIVEIRA NASCIMENTO, Danielle Cristina et al. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 745-753, 2016.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific; Palo Alto, CA, USA: 2002. **There is no corresponding record for this reference.**
- DUBEY, Vikash Kumar; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1057-1071, 2003.
- DUMAS, Bernard; FREYSSINET, Georges; PALLETT, Kenneth E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1091-1096, 1995.
- DUNWELL, Jim M. et al. Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. **Critical reviews in plant sciences**, v. 27, n. 5, p. 342-375, 2008.
- DUNWELL, Jim M.; KHURI, Sawsan; GANE, Paul J. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 153-179, 2000.
- DUNWELL, Jim M.; PURVIS, Alan; KHURI, Sawsan. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily?. **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 7-17, 2004.
- EBRAHIM, Saboki; USHA, K.; SINGH, Bhupinder. Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. **Sci Against Microb Pathog**, v. 2, p. 1043-1054, 2011.



EMANUELSSON, Olof et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of molecular biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.

FANG, W. E. I. et al. Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a wheat oxalate oxidase exhibits hydrogen peroxide related defense response. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 12, p. 2565-2573, 2015.

FERNANDES, Humberto et al. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **Febs Journal**, v. 280, n. 5, p. 1169-1199, 2013.

FISTER, Andrew S. et al. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 363, 2016.

FOLGADO, Raquel et al. Differential Protein Expression in Response to Abiotic Stress in Two Potato Species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 4912-4933, 2013.

FREITAS, Cleverton Diniz T. et al. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 781-789, 2007.

FREITAS, Cleverton DT et al. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 361-371, 2016.

GASTEIGER, Elisabeth et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. Humana Press, 2005.

GEOURJON, Christophe; DELEAGE, Gilbert. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Computer applications in the biosciences: CABIOS**, v. 11, n. 6, p. 681-684, 1995.

GUPTA, Ramneek; BRUNAK, Søren. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: **Pac. Symp. Biocomput.** p. 310-322, 2001.

HAGEL, Jillian M.; YEUNG, Edward C.; FACCHINI, Peter J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in plant science**, v. 13, n. 12, p. 631-639, 2008.

- HELLMAN, U. et al. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. **Analytical Biochemistry**, p. 224, 451-455, 1995.
- HU, Yihong et al. Characteristics and heterologous expressions of oxalate degrading enzymes "oxalate oxidases" and their applications on immobilization, oxalate detection, and medical usage potential. **Journal of Biotech Research**, v. 6, p. 63, 2015.
- ILYAS, Muhammad; RASHEED, Awais; MAHMOOD, Tariq. Functional characterization of germin and germin-like protein genes in various plant species using transgenic approaches. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 9, p. 1405-1421, 2016.
- IQBAL, Zafar et al. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 256-261, 2005.
- IVANCIUC, Ovidiu et al. The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies. **Molecular immunology**, v. 46, n. 5, p. 873-883, 2009.
- JAIKARAN, A. S. et al. Covalently bonded and adventitious glycans in germin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12503-12512, 1990.
- JANA, Žiarovská et al. Bioinformatic approach in the identification of Arabidopsis gene homologous in *Amaranthus*. **Potravinárstvo**, 2015.
- KAJII, C.; MORITA, T.; KURODA, K. Laticifers of *Ficus carica* and their potential role in plant defense. **IAWA Journal**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2014.
- KARUPPANAPANDIAN, Thirupathi et al. 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 168-177, 2011.
- KEKWICK, R. G. Latex and Laticifers, **Encyclopedia of life Science**; Nature publishing group, p. 1-6, 2001.
- KELLEY, Lawrence A.; STERNBERG, Michael JE. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.
- KHOBRADE, C. N. et al. Comparative structural modeling and docking studies of oxalate oxidase: possible implication in enzyme supplementation therapy for urolithiasis. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 466-473, 2011.

- KHURI, Sawsan; BAKKER, Freek T.; DUNWELL, Jim M. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 4, p. 593-605, 2001.
- KO, Junsu; PARK, Hahnbeom; SEOK, Chaok. GalaxyTBM: template-based modeling by building a reliable core and refining unreliable local regions. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 198, 2012.
- KONNO, Kotaro. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1510-1530, 2011.
- KUMAR, Kunal; BELUR, Prasanna D. New extracellular thermostable oxalate oxidase produced from endophytic *Ochrobactrum intermedium* CL6: Purification and biochemical characterization. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 7, p. 734-739, 2016.
- KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.
- KWON, Chang Woo et al. Cysteine protease profiles of the medicinal plant *Calotropis procera* R. Br. revealed by de novo transcriptome analysis. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119328, 2015.
- LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANE, B. G. et al. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12239-12242, 1993.
- LANE, Byron G. Oxalate, Germins, and Higher-Plant Pathogens. **IUBMB life**, v. 53, n. 2, p. 67-75, 2002.
- LEHMANN, Silke et al. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.
- LI, Yongguang et al. Expression study of soybean germin-like gene family reveals a role of GLP7 gene in various abiotic stress tolerances. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 96, n. 2, p. 296-304, 2016.
- LU, Mo et al. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 620, 2010.

- MAJEED, Nadia et al. Heterologous expression of OsRGLP1 gene induces resistance against fusarium infection in transgenic potato. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 45-55, 2016.
- MARINO, Daniel et al. A burst of plant NADPH oxidases. **Trends in plant science**, v. 17, n. 1, p. 9-15, 2012.
- MITHÖFER, Axel; BOLAND, Wilhelm. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 431-450, 2012.
- MOHAMED, Nadia H. et al. Cytotoxic cardenolides from the latex of *Calotropis procera*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 20, p. 4615-4620, 2015.
- MORENO, A., CAMEJO, D. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 10-23, 2016.
- MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAWROT, Robert et al. Plant antimicrobial peptides. *Folia microbiologica*, v. 59, n. 3, p. 181-196, 2014.
- NEILSON, Elizabeth H. et al. Plant chemical defense: at what cost?. **Trends in plant science**, v. 18, n. 5, p. 250-258, 2013.
- PAN, Heng-Yen et al. Characterization of wheat germin (oxalate oxidase) expressed by *Pichia pastoris*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 356, n. 4, p. 925-929, 2007.
- PANIS, Carolina et al. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. **Cancer letters**, v. 330, n. 1, p. 57-66, 2013.
- PARIHAR, Gaurav; BALEKAR, Neelam. *Calotropis procera*: A phytochemical and pharmacological review. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, 2016.
- PARK, Chang-Jin et al. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. **Planta**, v. 219, n. 5, p. 797-806, 2004.
- PESKIN, Alexander V.; WINTERBOURN, Christine C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). **Clinica Chimica Acta**, v. 293, n. 1, p. 157-166, 2000.

- PIACHAM, Theeraphon et al. A polymer supported manganese catalyst useful as a superoxide dismutase mimic. **Chemical Communications**, n. 11, p. 1254-1255, 2003.
- PICKARD, William F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, v. 177, n. 4, p. 877-888, 2008.
- POWE, Camille E. et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D in blacks and whites. **N Engl J Med**, v. 370, n. 9, p. 880-1, 2014.
- RAHMAN, M. A.; WILCOCK, C. C. A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 11, n. 3, p. 301-308, 1991.
- RAMACHANDRAN, Gopalamudram Narayana; RAMAKRISHNAN, Chandrasekharan; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 95-99, 1963.
- RAMOS, M. V. et al. New insights into the complex mixture of latex cysteine peptidases in *Calotropis procera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 211-219, 2013.
- RAMOS, Marcio V. et al. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 119, p. 5-18, 2015.
- RAMOS, Márcio V. et al. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v. 77, n. 4, p. 251-256, 2006.
- RAMOS, Márcio V. et al. Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 5, p. 455-463, 2012.
- RAMOS, Márcio V. et al. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 7, p. 747-756, 2016.
- RAVIKUMAR, B. S. et al. *Calotropis procera* mediated combustion synthesis of ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: Cr<sup>3+</sup> nanophosphors: Structural and luminescence studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, p. 1027-1037, 2015.
- RIETZ, Steffen; BERNSDORFF, Friederike EM; CAI, Daguang. Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an

oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of experimental botany**, 2012.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Milagros et al. Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of HvGLP1, a germin-like protein. **FEBS letters**, v. 490, n. 1-2, p. 44-48, 2001.

ROJAS, Clemencia M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 17, 2014.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAMOTO, Atsushi et al. In vitro and in vivo evidence for oxalate oxidase activity of a germin-like protein from azalea. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 458, n. 3, p. 536-542, 2015.

SASSAKI, Flávio T. et al. Expression pattern and promoter analysis of a eucalyptus grandis germin-like gene. **Plant molecular biology reporter**, v. 33, n. 1, p. 12-21, 2015.

SATO, Fumihiko; KITAJIMA, Sakihito; KOYAMA, Tomotsugu. Ethylene-induced gene expression of osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC eft-sequence. **Plant and cell physiology**, v. 37, n. 3, p. 249-255, 1996.

SAVATIN, Daniel V. et al. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 470, 2014.

SELS, Jan et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.

SETTY, S. Ramachandra et al. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7, p. 451-454, 2007.

SHARMA, Pallavi et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

SHOJI, Tsubasa; HASHIMOTO, Takashi. Stress-induced expression of NICOTINE2-locus genes and their homologs encoding Ethylene Response Factor transcription factors in tobacco. **Phytochemistry**, v. 113, p. 41-49, 2015.

SINGH, Abhay Narain et al. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 399-406, 2010.

SINHA, Mau et al. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

STAHL, E., BELLWON, P., HUBER, S., SCHLAEPPI, K., BERNSDORFF, F., VALLAT-MICHEL, A., ... & Zeier, J. Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. **Molecular plant**, v. 9, n. 5, p. 662-681, 2016.

SUGIURA, MAMORU et al. Purification and Properties of Oxalate Oxidase from Barley Seedlings. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 9, p. 2003-2007, 1979.

SULTANA, Tasawar et al. Expression of a rice GLP in *Medicago truncatula* exerting pleiotropic effects on resistance against *Fusarium oxysporum* through enhancing FeSOD-like activity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, p. 255, 2016.

SUMATHI, K. et al. 3dSS: 3D structural superposition. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl 2, p. W128-W132, 2006.

SZUCKO, Izabela et al. Multifunctional germin protein and germin-like proteins in plants. **Postepy Biologii Komorki**, v. 39, n. 2, p. 289-300, 2012.

THOMPSON, Julie D.; HIGGINS, Desmond G.; GIBSON, Toby J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOWBIN, Harry; STAEBELIN, Theophil; GORDON, Julian. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

- VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994.
- VAN LOON, Leendert C.; REP, Martijn; PIETERSE, Corné MJ. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.
- VYAS, V. K. et al. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 74, n. 1, p. 1, 2012.
- WANG, Tong et al. Characterization of peanut germin-like proteins, AhGLPs in plant development and defense. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61722, 2013.
- WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl 2, p. W407-W410, 2007.
- WINESTRAND, Sandra et al. Co-immobilization of oxalate oxidase and catalase in films for scavenging of oxygen or oxalic acid. **Biochemical engineering journal**, v. 72, p. 96-101, 2013.
- WOO, Eui-Jeon et al. Barley oxalate oxidase is a hexameric protein related to seed storage proteins: evidence from X-ray crystallography. **FEBS letters**, v. 437, n. 1-2, p. 87-90, 1998.
- WOO, Eui-Jeon et al. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, n. 11, p. 1036-1040, 2000.
- WU, Shujing; SHAN, Libo; HE, Ping. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant Science**, v. 228, p. 118-126, 2014.
- YASMIN, T. et al. A germin-like protein gene of rice increased superoxide dismutase activity in transformed tobacco. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 456-462, 2015.
- ZHOU, Shaoqun et al. Alteration of plant primary metabolism in response to insect herbivory. **Plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 1488-1498, 2015.
- ZIMMERMANN, Grit et al. The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. **Plant Physiology**, v. 142, n. 1, p. 181-192, 2006.