

**SUPEREXPRESSÃO DE UMA DEFENSINA CLONADA DE  
SEMENTE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L. Walp.) E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUA ATIVIDADE SOBRE *Leishmania*  
*amazonensis***

**GÉSSIKA SILVA SOUZA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO/2014

**SUPEREXPRESSÃO DE UMA DEFENSINA CLONADA DE  
SEMENTE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L. Walp.) E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUA ATIVIDADE SOBRE *Leishmania  
amazonensis***

**GÉSSIKA SILVA SOUZA**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. André de Oliveira Carvalho

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos – LFBM, no Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB.

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ**

**FEVEREIRO/2014**

**SUPEREXPRESSÃO DE UMA DEFENSINA CLONADA DE  
SEMENTE DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata* L. Walp.) E  
CARACTERIZAÇÃO DE SUA ATIVIDADE SOBRE *Leishmania  
amazonensis***

**GÉSSIKA SILVA SOUZA**

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.

Comissão examinadora:

---

Prof. Dr. Edésio José Tenório de Melo (Doutor em Ciências Biológicas) – UENF

---

Prof. Victor Martin Quintana Flores (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

---

Prof. Dr. Marco Antonio Lopes Cruz (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

---

Prof. Dr. André de Oliveira Carvalho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Orientador

## **Agradecimentos**

À Deus por todas as bênçãos recebidas.

Ao professor André de Oliveira Carvalho pela orientação e por todos os conselhos.

Ao professor Victor Martin Quintana Flores e ao professor Marco Antonio Lopes Cruz por ter aceitado participar da banca.

Ao professor Edésio José Tenório de Melo por ter aceitado participar da banca e principalmente pela colaboração para a realização dos testes com protozoários.

À Dr<sup>a</sup> Suzanna de Fátima Ferreira Ribeiro por ser revisora da minha dissertação e por toda a ajuda durante esses anos de trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Viviane Veiga do Nascimento e a Laís Pessanha de Carvalho pela colaboração na realização dos testes com protozoários.

Aos colegas do grupo da Val por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos Luís, Noil e Valéria por toda a ajuda e pela manutenção do laboratório.

A todos os alunos, professores e funcionários do LFBM.

Às amigas Flávia Camila, Maria, Julia Fardin, Larinne, Érica, Daniela e Anna pela amizade, por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelos momentos de descontração, pelos conselhos e por todo incentivo! Obrigada meninas!

À Jaíne, Camila, Fernanda e Aline por toda a amizade ao longo desses anos de UENF. Obrigada meninas!

À amiga de república Marina pelos momentos de descontração e por toda ajuda.

Aos meus pais, Bernadete e José Antônio, por sempre confiarem e acreditarem em mim e nos meus sonhos. Por me incentivarem e por todo ensinamento de vida. Amo vocês!

Ao meu irmão, João Otávio por sempre está ao meu lado me dando força. Obrigado irmão! Te amo!

**Índice**

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Agradecimentos.....</b>                     | <b>I</b>    |
| <b>Índice.....</b>                             | <b>III</b>  |
| <b>Lista de figuras.....</b>                   | <b>VI</b>   |
| <b>Lista de quadros.....</b>                   | <b>VIII</b> |
| <b>Resumo.....</b>                             | <b>IX</b>   |
| <b>Abstract.....</b>                           | <b>XI</b>   |
| <br>   |             |
| <b>1. Introdução.....</b>                      | <b>1</b>    |
| 1.1. Peptídeos antimicrobianos.....            | 1           |
| 1.2. Defensina de plantas.....                 | 3           |
| 1.2.1. Aspectos estruturais.....               | 3           |
| 1.2.2. Atividade biológica das defensinas..... | 4           |
| 1.2.3. Mecanismo de ação das defensinas.....   | 6           |
| 1.3. Leishmaniose.....                         | 9           |
| <br>   |             |
| <b>2. Objetivo.....</b>                        | <b>11</b>   |
| 2.1. Objetivo geral.....                       | 11          |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2. Objetivos específicos.....  | 11        |
| <b>3. Material e métodos.....</b>  | <b>12</b> |
| 3.1. Material biológico e manutenção.....  | 12        |
| 3.1.1. Cepa de <i>Escherichia coli</i> .....   | 12        |
| 3.1.2. Cepa de <i>Leishmania amazonensis</i> .....   | 13        |
| 3.1.3. Defensina natural de <i>Vigna unguiculata</i> .....   | 14        |
| 3.2. Indução, extração e purificação da Vu-Defr.....   | 14        |
| 3.2.1. Cultivo de bactérias para a indução.....  | 14        |
| 3.2.2. Pré-inóculo.....  | 14        |
| 3.2.3. Indução da Vu-Defr.....   | 14        |
| 3.2.4. Extração da Vu-Defr.....  | 14        |
| 3.2.5. Purificação da Vu-Defr em coluna de afinidade a metal – Ni <sup>+</sup> -NTA agarose.....   | 15        |
| 3.2.5.1. Análise dos picos cromatográficos por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)..... | 16        |
| 3.2.5.1.1. Preparo das amostras e condições de corrida .....   | 16        |
| 3.2.5.1.2. Coloração e descoloração do gel.....  | 17        |
| 3.2.6. Corte da cauda de histidina da Vu-Defr pela Enteroquinase.....  | 17        |
| 3.2.7. Eletroforese em gel de Tricina na presença de SDS.....  | 17        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.7.1. Preparo das amostras e condições de corrida.....  | 17        |
| 3.2.7.2. Coloração e descoloração do gel.....  | 18        |
| 3.2.8. Purificação final em cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência.....   | 18        |
| 3.3. Análise da <i>Vu-Defr</i> através de dicroísmo circular.....  | 19        |
| 3.4. Análise da atividade biológica da <i>Vu-Defr</i> contra <i>Leishmania amazonensis</i> .....   | 19        |
| 3.4.1. Ensaio de inibição do crescimento do protozoário.....   | 19        |
| 3.4.2. Permeabilização da membrana plasmática de <i>Leishmania amazonensis</i> pela <i>Vu-Defr</i> .....   | 20        |
| 3.4.3. Análise da funcionalidade da mitocôndria de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com a <i>Vu-Defr</i> através do corante rodamina 123.....                    | 20        |
| 3.4.4. Efeito da <i>Vu-Defr</i> sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) em <i>Leishmania amazonensis</i> ..... | 21        |
| <b>4. Resultados.....</b>  | <b>22</b> |
| 4.1. Indução da <i>Vu-Defr</i> .....   | 22        |
| 4.2. Purificação da <i>Vu-Defr</i> .....   | 22        |
| 4.3. Análise da <i>Vu-Defr</i> através de dicroísmo circular.....  | 28        |
| 4.4. Análise da atividade biológica da <i>Vu-Defr</i> contra <i>Leishmania amazonensis</i> .....   | 28        |
| 4.4.1. Ensaio de inibição do crescimento de <i>Leishmania amazonensis</i> .....  | 28        |
| 4.4.2. Ensaio de inibição do crescimento de <i>Leishmania amazonensis</i> ao longo do tempo.....   | 29        |
| 4.4.3. Análise da permeabilização de membrana de <i>L. amazonensis</i> através do marcador   |           |

|  |           |
|--|-----------|
| Sytox Green .....  | 30        |
| 4.4.4. Análise da funcionalidade da mitocôndria de <i>L. amazonensis</i> através do corante rodamina 123.....                              | 31        |
| 4.4.5. Efeito da <i>Vu-Defr</i> sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em <i>L. amazonensis</i> ..... | 33        |
| 4.4.6. Efeito da <i>Vu-Defr</i> sobre a indução da produção endógena de óxido nítrico (NO) em <i>L. amazonensis</i> .....                  | 35        |
| <b>5. Discussão.....</b>   | <b>36</b> |
| 5.1. Expressão e purificação da <i>Vu-Defr</i> .....   | 36        |
| 5.2. Atividade biológica da <i>Vu-Defr</i> .....   | 38        |
| <b>6. Conclusão.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>7. Bibliografia.....</b>  | <b>43</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   |   |
|---|---|
| <b>Figura 1.</b> Comparação dos esquemas estruturais dos quatro grupos de AMPs classificados de acordo com a estrutura..... | 2 |
| <b>Figura 2.</b> Estruturas das defensinas <i>VrD1</i> e <i>PhD1</i> .....  | 4 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática do modo de ação de defensinas de plantas em fungos .....  | 8  |
| <b>Figura 4.</b> Mapa e região de policlonagem do vetor pET-32 Ek/LIC.....   | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Visualização eletroforética dos extratos brutos bacterianos não induzido (NI) e induzido (I) com IPTG, em meio TB, em gel de Laemmli 12%.....   | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Cromatograma do extrato solúvel de <i>Escherichia coli</i> expressando a <i>Vu</i> -Defr feito em meio TB contendo Triton-X 100 após cromatografia em coluna de Ni <sup>+</sup> -NTA agarose .....  | 23 |
| <b>Figura 7.</b> Visualização eletroforética em gel de Laemmli (12%) dos picos obtidos após cromatografia em coluna de Ni <sup>+</sup> -NTA agarose do extrato protéico solúvel contendo a <i>Vu</i> -Defr induzida em meio TB e extraída em tampão contendo Triton-X 100..... | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Visualização eletroforética da clivagem do P2 com enteroquinase em gel de tricina.....  | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Cromatograma do P2 após clivagem com a enzima enteroquinase em coluna de fase reversa C18.....  | 26 |
| <b>Figura 10.</b> Visualização eletroforética do pico denominado <i>Vu</i> -Defr obtido em coluna de fase reversa C18.....   | 27 |
| <b>Figura 11.</b> Sobreposição dos espectros do dicroísmo circular da <i>Vu</i> -Def e <i>Vu</i> -Defr.....  | 28 |
| <b>Figura 12.</b> Ensaio de eliminação de <i>L. amazonensis</i> na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL <sup>-1</sup> de defensina recombinante ( <i>Vu</i> -Defr) e natural ( <i>Vu</i> -Def).....  | 29 |
| <b>Figura 13.</b> Ensaio de eliminação de <i>L. amazonensis</i> na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL <sup>-1</sup> de <i>Vu</i> -Defr ao longo do tempo.....  | 30 |
| <b>Figura 14.</b> Fotomicrografia da permeabilização de membrana de células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com <i>Vu</i> -Defr.....   | 31 |
| <b>Figura 15.</b> Fotomicrografia da funcionalidade mitocondrial de células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com <i>Vu</i> -Defr.....   | 32 |
| <b>Figura 16.</b> Fotomicrografia da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com <i>Vu</i> -Defr.....  | 34 |

## LISTA DE QUADROS

|   |   |
|---|---|
| <b>Quadro 1.</b> Atividades biológicas das defensinas de plantas com a indicação das espécies de onde as defensinas foram isoladas..... | 5 |
|---|---|

## RESUMO

Todos os organismos enfrentam problemas frequentes em relação a se defender de invasores ou organismos competidores e para superar esses problemas, estratégias de sobrevivência foram selecionadas e deram origem a sistemas de defesas complexos como a imunidade inata. Dentre a imunidade inata, a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) tem papel preponderante na defesa. Dentre eles estão as defensinas de plantas. Vários estudos já foram feitos mostrando diversas atividades inibitórias sobre microrganismos das defensinas de planta *in vitro*, mas pouco se sabe sobre a sua atuação em protozoários. Este trabalho teve como objetivo obter a defensina recombinante de *Vigna unguiculata* L. Walp. (feijão-de-corda), *Vu-Defr*, e estudar o efeito do peptídeo purificado sobre *Leishmania amazonensis*. Para isso foi realizada a superexpressão da *Vu-Defr* clonada no vetor pET-32 EK/LIC. Após a superexpressão, a *Vu-Defr* foi purificada utilizando uma coluna Ni<sup>+</sup>-NTA agarose. Após a purificação, *Vu-Defr* foi clivada utilizando a enzima enteroquinase. Após a clivagem a amostra foi purificada utilizando a coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC. Com a *Vu-Defr* purificada inicialmente foi feita avaliação de sua atividade biológica. Para esta análise foram feitos ensaios comparando a *Vu-Defr* com a defensina natural purificada de sementes de feijão-de-corda, *Vu-Def*. Primeiramente foi feita a análise do enovelamento *Vu-Defr* e *Vu-Def* através da comparação de seus espectros de dicroísmo circular, mostrando que havia uma sobreposição dos espectros indicando que ambas as defensinas apresentavam o mesmo padrão de enovelamento. Adicionalmente também foi feita a comparação da atividade biológica de *Vu-Defr* e *Vu-Def* contra células de *L. amazonensis*, indicando que a inibição de células de *L. amazonensis*, na mesma concentração e condições de incubação, não apresentaram diferenças significativas. Com esses resultados foi possível concluir que a superexpressão da *Vu-Defr* biologicamente ativa ocorreu com sucesso. Com 100 µg.mL<sup>-1</sup> da *Vu-Defr* foi feito um novo ensaio de inibição sendo que o crescimento da cultura de *L. amazonensis* foi acompanhada nos tempos de 0, 8, 16, 24, 32 e 48 h. E nesse ensaio foi observada, que em comparação com o tempo de 0 h, *Vu-Defr* foi capaz de eliminar 30,1 % dos protozoários e a partir do tempo de 24 h os protozoários que remanesceram voltaram a proliferar. Foram realizados também ensaios de permeabilização de membrana, funcionalidade mitocondrial, indução da produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em *L. amazonensis* para o tempo de 24 h com o uso de

indicadores fluorescentes. Nesses ensaios foi possível observar que *Vu-Defr* é capaz de permeabilizar membrana plasmática, diminuir a funcionalidade da mitocôndria e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em células de *L. amazonensis*. Porém não é capaz de induzir a produção de óxido nítrico nas condições testadas. Este trabalho mostra a expressão funcional da *Vu-Defr* e sua atividade sobre *L. amazonensis*, em cujo mecanismo de inibição estão envolvidos permeabilização de membrana, perda da funcionalidade mitocondrial e indução de espécies reativas de oxigênio em células de *L. amazonensis*.

**ABSTRACT**

All organisms face frequent problems in relation to fend off invading organisms or competitors and to overcome these problems, survival strategies were selected given rise to complex defenses systems such as the innate immunity. Among innate immunity, the production of antimicrobial peptides (AMPs) plays a major role in defense. Among the plant AMPs are the plant defensins. Several studies have been done showing these diverse biological activities of plant defensins *in vitro*, but little is known about its activity against protozoa. This work had the aim to obtain the recombinant defensin from *Vigna unguiculata* L. (cowpea), *Vu-Defr*, and study the effect of the purified peptide on *Leishmania amazonensis*. For that the overexpression of *Vu-Defr* cloned into the pET-32 EK/LIC vector was done. After expression, *Vu-Defr* was purified using a Ni<sup>+</sup>-NTA agarose column. After purification, *Vu-Defr* was cleaved with the enzyme enterokinase. After cleavage, the sample was purified using reversed-phase C18 column on the HPLC system. With *Vu-Defr* purified, initially was done analysis to verify if it had biological activity. For this analysis were done tests comparing the *Vu-Defr* with the natural defensin purified from *V. unguiculata* seeds, *Vu-Def*. Firstly analysis was made of the folding of *Vu-Defr* and *Vu-Def* by comparing their circular dichroism spectrum. This result indicated that there was an overlap of the two spectra indicating that both defensins showed the same folding pattern. Additionally it was also done the comparison of the biological activity of *Vu-Defr* and *Vu-Def* against cells of *L. amazonensis*, indicated that inhibition of *L. amazonensis* cells, in the same concentration and incubation conditions, did not show significant difference. With these results it was concluded that overexpression of biologically active *Vu-Defr* was successful. At 100 µg.mL<sup>-1</sup> of *Vu-Defr* a new inhibition assay was done with the culture growth of *L. amazonensis* accompanied at the times of 0, 8, 16, 24, 32 and 48 h. In this assay it was observed that, in comparison with the 0 h time point, *Vu-Defr* was able to eliminate 30.1% of protozoa and from the time of 24 h on, the protozoa which remained return to proliferate. Membrane permeabilization, mitochondrial function, induction of the production of reactive oxygen species and nitric oxide assays was also done in *L. amazonensis* at the time of 24 h using fluorescent indicators. In these tests it was observed that *Vu-Defr* is able to permeabilize the plasma membrane, decreasing the functionality of mitochondria and induce the production of reactive oxygen species in *L. amazonensis* cells. However it is not capable of inducing nitric oxide production

in the tested conditions. This work shows the functional expression of *Vu-Defr* and its activity on *L. amazonensis*, in whose mechanism of action is involved in membrane permeabilization, loss of mitochondrial function and induction of reactive oxygen species in the cells of *L. amazonensis*.

## 1. Introdução

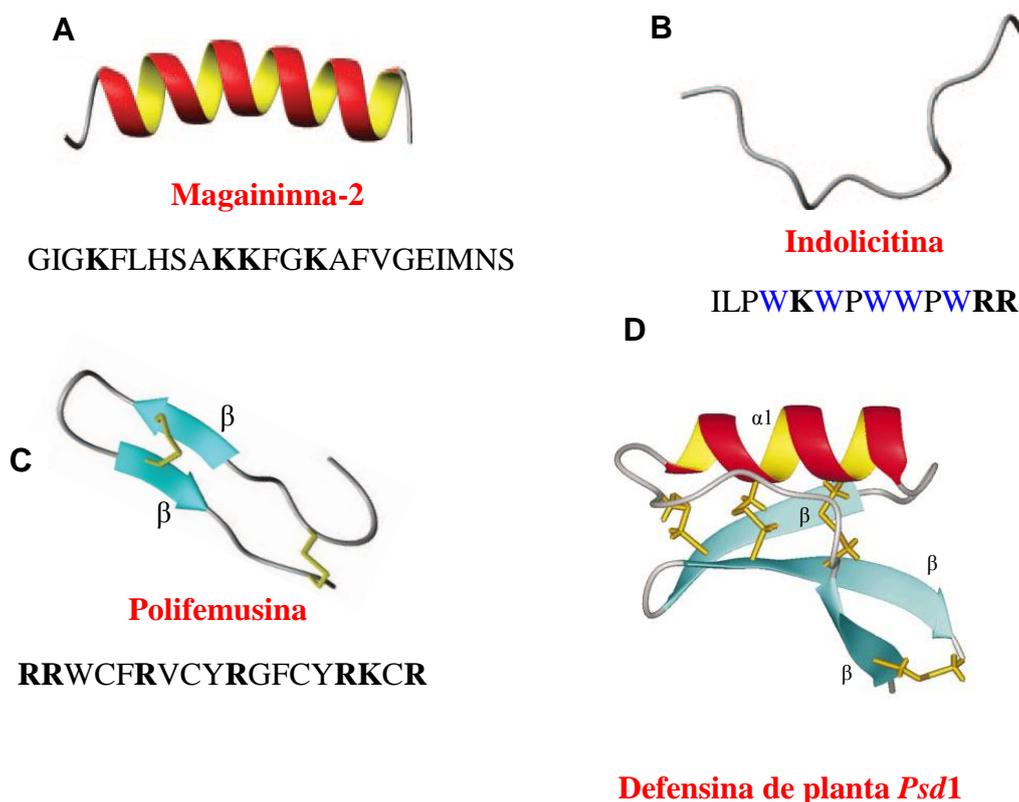
### 1.1. Peptídeos Antimicrobianos

Todos os organismos vivos enfrentam problemas frequentes em relação a se defender de invasores ou organismos competidores (Reddy *et al.*, 2004; Carvalho e Gomes, 2011) e para superar esses problemas, mecanismos de ataque e defesa, e estratégias de sobrevivência foram desenvolvidos (Carvalho e Gomes, 2011). Em plantas e animais, as barreiras da superfície são o primeiro obstáculo para a penetração dos patógenos. Em animais, tecidos cutâneos, membranas mucosas e o fluido de revestimento do trato respiratório representam a primeira proteção não-específica contra infecções (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Semelhantemente, as barreiras externas naturais das plantas, incluem camadas epicuticulares, suberizadas, cutinizadas e tecidos epidérmicos lignificados. As plantas são conhecidas por apresentarem ambos os mecanismos de resistência, constitutivo e induzido, contra o ataque de patógenos. As armas de defesa que as plantas utilizam para prejudicar a invasão dos patógenos incluem: barreiras morfológicas, metabólitos secundários e proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*). Após o contato com patógenos, e se estes forem reconhecidos, ocorre a ativação de um sistema específico de defesa e com isso uma série de respostas secundárias é iniciada, e entre elas, está a síntese de fatores relacionados a defesa chamados de proteínas de defesa relacionadas a patogênese (PR, do inglês *pathogenesis related*) (Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Os AMPs também estão incluídos entre os peptídeos PR existentes (Silverstein *et al.*, 2007).

Os AMPs são componentes importantes do sistema de defesa das plantas e animais (Thevissen *et al.*, 2003a; Mihajlovic e Lazaridis, 2010). São encontrados na maioria dos organismos, e estão distribuídos em praticamente todos os reinos, abrangendo de bactérias a seres humanos (Giuliani *et al.*, 2007; Ulm *et al.*, 2012). Os AMPs são definidos como peptídeos, geralmente com menos de 100 resíduos de aminoácidos (geralmente inferiores a 10 kDa), possuem uma carga líquida positiva em pH fisiológico em parte pela presença de múltiplos resíduos de lisina e arginina, são anfipáticos e apresentam ação contra vírus, bactérias, fungos e até células tumorais *in vitro* (Giuliani *et al.*, 2007; Guaní-Guerra *et al.*, 2010).

Uma característica comum entre os AMPs é a sua capacidade de se enovelar em conformações anfipáticas, muitas vezes, induzidas pela interação com a membrana ou pela interação com uma imitação de membrana (Giuliani *et al.*, 2007). Os AMPs descobertos até agora foram divididos em quatro grupos, classificados de acordo com a sua estrutura

secundária, composição de aminoácidos e número de pontes dissulfeto (Figura 1). O primeiro grupo são os peptídeos lineares helicoidais, estes não possuem resíduos de cisteína, um exemplo são as LL-37 produzidos por células imunes tais como: monócitos, macrófagos e neutrófilos de humanos e a magainina-2 extraída da pele do sapo; no segundo grupo encontramos peptídeos com uma estrutura estendida, livre também de cisteína, estendendo aos peptídeos helicoidais com uma predominância de um ou dois aminoácidos, tais como PR-39, extraído do intestino de porco, que é rico em prolina, e indolicitina, extraída de neutrófilos de bovinos, que é rico em triptofano. O terceiro grupo são peptídeos que formam “voltas”, normalmente entre as duas pontes dissulfeto formado pelas cisteínas. As polifemusina, extraídas do emócitos do caranguejo-ferradura, e as bactenecinas, extraídas de bovinos, são representantes desse grupo. O último grupo são os peptídeos contendo folhas  $\beta$  estabilizadas por duas a quatro pontes dissulfetos intramoleculares e as defensinas extraídas principalmente de sementes de plantas são representantes desse grupo (Figura 1) (Wilmes *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Comparação dos esquemas estruturais dos quatro grupos de AMPs classificados de acordo com a estrutura. (A) Estrutura da magainina-2 (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006); (B) Estrutura da indolicitina (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006); (C) Estrutura de polifemusina (Adaptado de Jenssen *et al.*, 2006); (D) - Estrutura da defensina *Psd1* de *Pisum sativum* (Adaptado de Almeida *et al.*, 2002). Abaixo da estrutura foi colocada a sequência de aminoácidos, com exceção da defensina de planta, com destaque para os aminoácidos carregados (K – Lisina, R – Arginina) (mostrados em negrito) ou predominância de aminoácidos regulares (W – Triptofano) (azul). ( $\alpha$ )  $\alpha$ -hélice; ( $\beta$ ) folha  $\beta$ .

Muitos AMPs têm sido isolados de plantas, principalmente de sementes, local em que podemos encontrar um nível elevado de peptídeos quando comparado a outros órgãos da planta. Os AMPs de plantas, além de compartilharem as características comuns dos AMPs como: geralmente serem inferiores a 10 kDa e possuírem carga líquida positiva, eles são peptídeos ricos em resíduos de cisteínas. Esses resíduos estabilizam a proteína através de formações de pontes dissulfeto. De acordo com o arranjo dessas moléculas e com a sua organização tridimensional estes são classificados em algumas famílias, sendo as principais: tioninas, ciclotídeos, esnaquinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTP, do inglês *lipid transfer protein*) e defensinas de plantas (Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

## 1.2. Defensinas de plantas

As defensinas de plantas são encontradas em tecidos como: sementes, caule, raízes, folhas e órgãos florais (De Coninck *et al.*, 2010). Sua estrutura primária possui de 45 a 54 resíduos de aminoácidos, com uma baixa massa molecular, de aproximadamente 6 kDa, e possui alguns aminoácidos básicos, o que faz com que a molécula fique com carga líquida positiva em pH neutro (Carvalho e Gomes, 2011). As defensinas de plantas são peptídeos ricos em cisteínas (oito resíduos) que juntas formam quatro pontes dissulfeto, o que confere uma alta estabilidade físico-química a esta molécula. Possuem ação antifúngica e/ou antimicrobiana em concentrações micromolares (Thevissen *et al.*, 2003a; Aerts *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009).

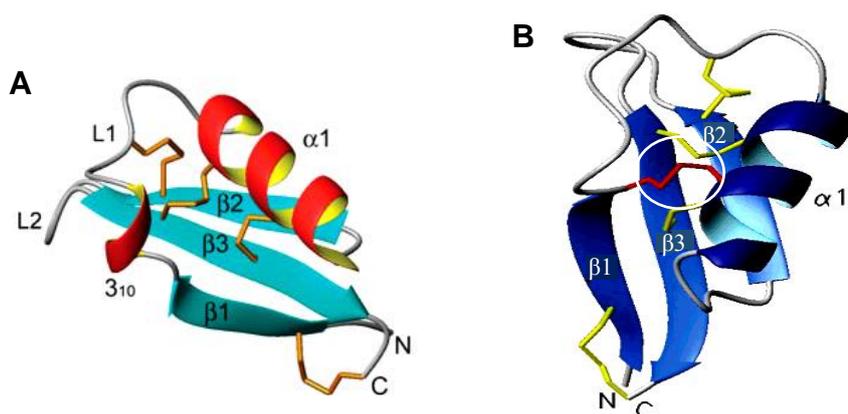
Defensinas de plantas foram isoladas originalmente do endosperma de cevada (*Hordeum vulgare*) (Mendez *et al.*, 1990) e de trigo (*Triticum turgidum*) (Colilla *et al.*, 1990). Primeiramente elas foram caracterizadas como um novo membro da família das tioninas, as  $\gamma$ -tioninas, baseadas na sua similaridade, na sua massa molecular, na sequência de aminoácidos e no seu número de resíduos de cisteína (Carvalho e Gomes, 2011). Mas sua conformação estrutural disposta em três folhas  $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice estabilizada por quatro pontes dissulfeto, as diferenciavam estruturalmente das tioninas (Thevissen *et al.*, 2004), assim como o pareamento dos resíduos de cisteínas. Alguns anos depois, devido a sua similaridade estrutural com defensinas de insetos e mamíferos,  $\gamma$ -tioninas foram renomeadas como defensinas de plantas (Terras *et al.*, 1995; Carvalho e Gomes, 2009).

### 1.2.1. Aspectos estruturais

As defensinas encontradas em diferentes espécies de plantas são caracterizadas por possuírem quatro pontes dissulfeto e por compartilharem os mesmos padrões de pares de

cisteínas (C1-C8, C2-C5, C3-C6, C4-C7) (Wilmes *et al.*, 2011). Estas pontes ajudam a estabilização da estrutura tridimensional e duas destas pontes, que ligam a  $\alpha$ -hélice à última folha  $\beta$ , formam um “motif” estrutural chamado “motif”  $\alpha\beta$  estabilizado por cisteínas (CS $\alpha\beta$ ). Este CS $\alpha\beta$  está presente em alguns peptídeos que tem atividade antimicrobiana (Terras *et al.*, 1995; Carvalho e Gomes, 2009; Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Como esses peptídeos contêm um “motif” que se assemelham, a estrutura deles, de um modo geral, é composta por três folhas  $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice, sendo estes elementos da estrutura secundária, conectados através de três alças (Slavokhotova *et al.*, 2011).

Apesar de todas as similaridades entre as estruturas das defensinas de plantas, já foram descritas algumas estruturas diferenciadas como: *PhD1* (isolada de *Petunia hybrida*) que contém cinco pontes dissulfeto e *VrD1* (isolada de *Vigna radiata*) que possui em sua estrutura uma hélice extra, a hélice  $3_{10}$  (Carvalho e Gomes, 2011) (Figura 2). Mesmo com estas diferenças estruturais, estas defensinas também possuem o “motif” CS $\alpha\beta$ .



**Figura 2.** Estruturas das defensinas *VrD1* e *PhD1*. A - Estrutura da defensina *VrD1* de *Vigna radiata* (Adaptado de Liu *et al.*, 2006); B - Estrutura da defensina *PhD1* de *Petunia hybrida* (Adaptado de Janssen *et al.*, 2003). (N) Região N-terminal; (C) região C-terminal; ( $\alpha 1$ )  $\alpha$ -hélice; ( $\beta 1$ ) folha  $\beta$  1; ( $\beta 2$ ) folha  $\beta$  2; ( $\beta 3$ ) folha  $\beta$  3; ( $3_{10}$ )  $\alpha$ -hélice  $3_{10}$ ; (L1) “volta” 1; (L2) “volta” 2. A quinta ponte dissulfeto de *PhD1* é mostrada no círculo branco. A  $\alpha$ -hélice  $3_{10}$  de *PhD1* é mostrada no círculo preto.

### 1.2.2. Atividade biológica das defensinas

Defensinas de plantas exibem atividade contra uma grande variedade de microrganismos entre eles bactérias e fungos. Também exibem outras atividades biológicas como pode ser observada no Quadro 1.

**Quadro 1.** Atividades biológicas das defensinas de plantas com a indicação das espécies de onde as defensinas foram isoladas.

| Atividade Biológica                                 | Nome da defensina e espécies de planta de origem  | Referências   |
|---|---|---|
| Atividade inibitória da tradução proteica           | RBAFP ( <i>Adzuckia angularia</i> ); $\gamma$ -hordotionina e $\omega$ -hordotionina ( <i>Hordeum vulgare</i> ); PBAFP e WCBAFP ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )   | Ye e Ng, 2001; Mendez <i>et al.</i> , 1990; Mendez <i>et al.</i> , 1996; Wong <i>et al.</i> , 2006  |
| Efeito inibitório para transcriptase reversa do HIV | RBAFP ( <i>Adzuckia angularia</i> ); gymnima ( <i>Gymnocladus chinensis</i> ); PBAFP e WCBAFP ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )   | Ye e Ng, 2001; Wong <i>et al.</i> , 2003; Wong <i>et al.</i> , 2006   |
| Atividade mitogênica                                | RBAFP ( <i>Adzuckia angularia</i> ); PBAFP e WCBAFP ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )   | Ye e Ng, 2001; Wong <i>et al.</i> , 2006  |
| Antibacteriana                                      | Ah-AMPI ( <i>Aesculus hippocastanum</i> ); Br-AMP <sub>2</sub> ( <i>Brassica rapa</i> ); Ct-AMP <sub>1</sub> ( <i>Clitoria ternatae</i> ); Dm-AMP <sub>1</sub> ( <i>Dhalia merckii</i> ); SPD <sub>1</sub> ( <i>Ipomoea batatas</i> )   | Osborn <i>et al.</i> , 2011; Terras <i>et al.</i> , 1993; Huang <i>et al.</i> , 2008  |
| Tolerância a metal pesado                           | Ah-PDF1.1 ( <i>Arabidopsis halleri</i> )  | Mirouze <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et al.</i> , 2009  |
| Antifúngica   | RBAFP ( <i>Adzuckia angularia</i> ); Ah-AMP <sub>1</sub> ( <i>Aesculus hippocastanum</i> ); Ah-PDF1.1 ( <i>Arabidopsis halleri</i> ); PDF 1.1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ); AX <sub>1</sub> e AX <sub>2</sub> ( <i>Beta vulgaris</i> ); BSD1 ( <i>Brassica campestris</i> ); Bn-AMP <sub>1</sub> e Bn-AMP <sub>2</sub> ( <i>Brassica napus</i> ); Br-AMP <sub>1</sub> e Br-AMP <sub>2</sub> ( <i>Brassica rapa</i> ); CADEF <sub>1</sub> e J1 ( <i>Capsicum annuum</i> ); $\gamma$ -tionina ( <i>Capsicum chinense</i> ); Ct-AMP <sub>1</sub> ( <i>Clitoria ternatae</i> ); Dm-AMP <sub>1</sub> e Dm-AMP <sub>2</sub> ( <i>Dhalia merckii</i> ); Ec-AMP-D <sub>1</sub> e Ec-AMP-D <sub>2</sub> ( <i>Echinocloa crusgalli</i> ); gymnima ( <i>Gymnocladus chinensis</i> ); Hs-AMP <sub>1</sub> ( <i>Heuchera sanguinea</i> ); SPD <sub>1</sub> ( <i>Ipomoea batatas</i> ); MsDEF <sub>1</sub> ( <i>Medicago sativa</i> ); NaD <sub>1</sub> ( <i>Nicotiana alata</i> ); PhD <sub>1</sub> e PhD <sub>2</sub> ( <i>Petunia hybrida</i> ); PvD <sub>1</sub> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ); PsD <sub>1</sub> e PsD <sub>2</sub> ( <i>Pisum sativum</i> ); Rs-AFP <sub>1</sub> e Rs-AFP <sub>2</sub> ( <i>Raphanus sativus</i> ); Vu-Def ( <i>Vigna unguiculata</i> ) | Ye e Ng, 2001; Osborn <i>et al.</i> , 2011; Wong <i>et al.</i> , 2003; Terras <i>et al.</i> , 1993; Huang <i>et al.</i> , 2008; Mirouze <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et al.</i> , 2009; Penninckx <i>et al.</i> , 1996; Park <i>et al.</i> , 2006; Kragh <i>et al.</i> , 1995; Osborn <i>et al.</i> , 2011; Anaya-López <i>et al.</i> , 2006; Odintsova <i>et al.</i> , 2008; Do <i>et al.</i> , 2004; Li e Li, 2009; Meyer <i>et al.</i> , 1996; Gao <i>et al.</i> , 2000; Spelbrink <i>et al.</i> , 2004; Allen <i>et al.</i> , 2008; Lay <i>et al.</i> , 2003; Almeida <i>et al.</i> , 2000; Games <i>et al.</i> , 2008; Mello <i>et al.</i> , 2011; Terras <i>et al.</i> , 1992; Carvalho <i>et al.</i> , 2006; Santos <i>et al.</i> , 2011 |
| Auto incompatibilidade                              | PCP-A <sub>1</sub> ( <i>Brassica oleracea</i> )   | Doughty <i>et al.</i> , 2008  |
| Atividade inibitória a tripsina                     | 5459 ( <i>Cassia fistula</i> ); SPD <sub>1</sub> ( <i>Ipomoea batatas</i> )   | Wijaya <i>et al.</i> , 2000; Huang <i>et al.</i> , 2008   |

|   |   |   |
|---|---|---|
| Atividade inibitória para células cancerígenas                | <i>Ct-AMP<sub>1</sub></i> ( <i>Capsicum chinense</i> ); <i>gymnima</i> ( <i>Gymnocladus chinensis</i> )     | Anaya-López <i>et al.</i> , 2006; Wong <i>et al.</i> , 2003                           |
| Atividade inibitória a $\alpha$ -amilase                      | $\gamma$ -hordotionina ( <i>Hordeum vulgare</i> ); <i>Vu-Def</i> ( <i>Vigna unguiculata</i> )               | Mendez <i>et al.</i> , 1990; Mendez <i>et al.</i> , 1996; Santos <i>et al.</i> , 2011 |
| Atividade redutase dehidro-e monodehidroascorbato             | <i>SPD<sub>1</sub></i> ( <i>Ipomoea batatas</i> )   | Huang <i>et al.</i> , 2008  |
| Atividade inibitória a oomiceto                               | <i>Lm-def</i> ( <i>Lepidium meyenii</i> )   | Solis <i>et al.</i> , 2007  |
| Bloqueio de canais de cálcio tipo-L de mamíferos              | <i>MsDEF<sub>1</sub></i> ( <i>Medicago sativa</i> )   | Gao <i>et al.</i> , 2000; Spelbrink <i>et al.</i> , 2004; Allen <i>et al.</i> , 2008  |
| Atividade inibitória ao crescimento de raiz de planta         | <i>MsDEF<sub>1</sub></i> ( <i>Medicago sativa</i> )   | Gao <i>et al.</i> , 2000; Spelbrink <i>et al.</i> , 2004; Allen <i>et al.</i> , 2008  |
| Atividade contra <i>Leishmania</i>                            | <i>PTH<sub>1</sub></i> ( <i>Solanum tuberosum</i> )   | Berrocal-Lobo <i>et al.</i> , 2009  |
| Bloqueio do canal de sódio                                    | $\gamma_1$ -zeationina e $\gamma_2$ -zeationina ( <i>Zea mays</i> )   | Kushmerick <i>et al.</i> , 1998; Kant <i>et al.</i> , 2009                            |
| Aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio | <i>PvD<sub>1</sub></i> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ); <i>Rs-AFP<sub>1</sub></i> ( <i>Raphanus sativus</i> ) | Mello <i>et al.</i> , 2011; Aerts <i>et al.</i> , 2007                                |

(Adaptado de Carvalho e Gomes, 2011)

### 1.2.3. Mecanismo de ação das defensinas

Diferentes estudos têm sido feitos no sentido de se desvendar o mecanismo de ação das defensinas de plantas, porém este ainda não foi totalmente elucidado (Aerts *et al.*, 2008; Slavokhotova *et al.*, 2011). As primeiras características do seu mecanismo de ação foram mostradas em *Dm-AMP<sub>1</sub>* e *Rs-AFP<sub>2</sub>* isoladas de *Dahlia merckii* e de *Raphanus sativus*, respectivamente, que são capazes de induzir uma variedade de rápidas respostas na membrana fúngica (Lobo *et al.*, 2007), incluindo por exemplo, o aumento do efluxo de  $K^+$ , do influxo de  $Ca^{2+}$ , a alcalinização do meio e a mudança no potencial de membrana (Aerts *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009).

A existência de sítios de ligação com alta afinidade para *Dm-AMP<sub>1</sub>* em fungos foi demonstrado através do uso da *Dm-AMP<sub>1</sub>* marcada com enxofre radioativo e do uso de fungos modificados geneticamente. Com esses estudos, foi identificado que o sítio de ligação

para *Dm-AMP*<sub>1</sub> é o esfingolípídeo manosildiinositolfosforilceramida (M(IP)<sub>2</sub>C) e observou-se a importância desse alvo, quando testada a inibição do crescimento de uma cepa mutante da levedura, deficiente na síntese de M(IP)<sub>2</sub>C. Viu-se que essa levedura, quando incubada com a defensina, apresentou resistência, diferentemente da cepa selvagem (Thevissen *et al.*, 2004). Estudos semelhantes foram realizados utilizando a defensina *Rs-AFP*<sub>2</sub> e foi visto que o sítio de ligação desta defensina era outra classe de esfingolípídeos, a glicosilceramida (GlcCer), presente na membrana dos fungos (Thevissen *et al.*, 2003b; Thevissen *et al.*, 2004). A membrana plasmática dos fungos apresenta fosfoglicerolípídeos principalmente no seu lado interno e esteróis e esfingolípídeos no lado externo. Tem sido mostrado que os esfingolípídeos e os esteróis são enriquecidos em domínios específicos, os chamados “rafts lipídicos”. A interação de *Dm-AMP*<sub>1</sub> com esfingolípídeos destes “rafts” resultam na ação dessa defensina, ligada a estes componentes de membrana (Thevissen *et al.*, 2003b; Thevissen *et al.*, 2004).

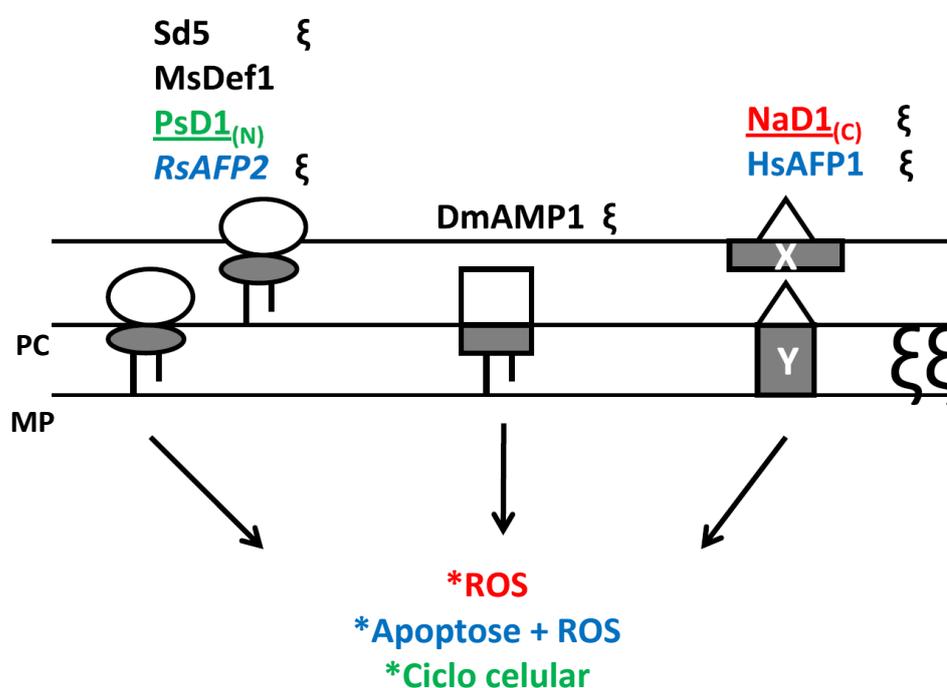
De um modo geral as defensinas de plantas não são capazes de se ligar às glicosilceramidas presentes nas células de humanos e soja. Segundo Thevissen *et al.* (2003a) isto acontece devido ao fato de os esfingolípídeos encontrados nestas células serem estruturalmente diferentes. Além da estrutura dos lipídeos que constituem a membrana, a composição lipídica da mesma, parece determinar a susceptibilidade e/ou resistência às defensinas de plantas (Thevissen *et al.*, 2003b). Esses dados segundo Jha e Chattoo (2010) dão indícios que as defensinas de plantas podem atuar de maneira específica sobre os microrganismos. Ainda dentro deste processo de interação com componentes de membrana, já foi demonstrado que as defensinas podem causar permeabilização na membrana de fungos (Thevissen *et al.*, 1999; van der Weerden *et al.*, 2010).

Além dos resultados sobre o mecanismo de ação já mostrados, é também conhecido que as defensinas *PvD1* (obtida de *Phaseolus vulgaris*) e *Rs-AFP*<sub>2</sub> induzem a produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de fungos. Para *Rs-AFP*<sub>2</sub> foi adicionalmente mostrado que tanto a produção de ROS quanto a atividade antifúngica desaparece na presença do antioxidante ácido ascórbico, o que sugere uma ligação causal entre a atividade antifúngica de *Rs-AFP*<sub>2</sub> e a produção de ROS por ela mediada (Aerts *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2011). Porém, ainda não está claro se estas defensinas são internalizadas pelas células dos fungos através da sua interação com os esfingolípídeos da membrana, ou se elas se mantêm fora da célula e sinalizam processos que levam a morte da célula (Aerts *et al.*, 2009).

Com o intuito de investigar o possível mecanismo de ação intracelular das defensinas, estudos foram feitos utilizando a defensina *Psd1* (obtida de *Pisum sativum*). Um sistema duplo híbrido foi usado para identificar interações proteína-proteína entre o peptídeo *Psd1* e

as proteínas fúngicas. Proteínas alvo foram analisadas dentro de uma biblioteca de cDNA do fungo *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007). Um clone apresentou sequência similar à da ciclina F, que é uma proteína que está envolvida no ciclo celular. Análises por microscopia de fluorescência de *Psd1* conjugado com FITC e da coloração do fungo com DAPI, mostraram a colocalização, *in vitro*, de *Psd1* no núcleo. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da defensiva de planta *Psd1* pode envolver também alvos nucleares (Lobo *et al.*, 2007).

Um resumo das atividades já descritas para as defensinas de plantas assim como a indicação de seus alvos é mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática do modo de ação de defensinas de plantas em fungos. Defensinas de plantas que interagem com vários tipos de alvos, presentes em membranas plasmática (MP) de fungos e/ou na parede celular (PC). Defensinas de plantas (círculos brancos) que interagem com GlcCer (círculos cinzas); defensinas de plantas (retângulo branco) que interagem com M(IP)2C (retângulo cinza); defensinas de plantas (triângulos brancos) que interagem com receptores ainda não conhecidos (retângulos cinzas representados por X e Y). Defensinas de plantas que podem permeabilizar membrana plasmática são indicadas com ξ. Após a interação, algumas defensinas de plantas ficam no espaço extracelular e não entram na célula fúngica (nome em itálico), porém há outras que são levadas para dentro da célula (nome sublinhado) se localizando no núcleo (N) ou citoplasma (C). Marcado em vermelho defensinas de plantas que induzem ROS e em azul defensinas de plantas que induzem apoptose e ROS; em verde defensinas de plantas que interferem no ciclo celular (De Coninck *et al.*, 2013).

### 1.3. Leshmaniose

A Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) tem reportado o impacto da leishmaniose na saúde pública em todo mundo. A leishmaniose tem sido subestimada por muitos anos e tem afetado em torno de 350 milhões de pessoas em 88 países do mundo. A forma visceral da doença tem mais de 500 mil casos anuais, quando não tratada é fatal e é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi/ infantum* na América Latina e no sul da Europa e pela *Leishmania (L.) donovani* na África e na Índia (Brenzan *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

A forma da doença cutânea não é fatal, mas é uma doença que desfigura e estigmatiza. Alguns agentes causadores que são encontrados no Novo Mundo são: as *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e no Velho Mundo são: as *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (L.) tropica* (Silva *et al.*, 2012).

O ciclo de vida da *Leishmania* contém duas formas distintas, a promastigota e a amastigota. O estágio flagelado, a forma promastigota, reside extracelularmente no vetor do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* que é passado para o macrófago de mamífero após a picada do inseto. A forma amastigota é uma fase intracelular, aflagelada que ocorre dentro do hospedeiro (Lynn *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012).

No Brasil as leishmanioses mais comuns são: a visceral e a tegumentar americana (Secretaria de Vigilância em Saúde). A maior concentração dos surtos epidêmicos ocorre na região Nordeste, seguida das regiões Norte e Sudeste (Secretaria de Vigilância em Saúde).

Por décadas, antimoniais pentavalente, como Pentostan (estibogluconato de sódio) e Glucantime (antimoniato de N-metil glucamina) tem feito parte da primeira linha de drogas para o tratamento de leishmaniose cutânea e visceral (Pérez-Cordero, *et al.*, 2011; Glossário de doenças da Fiocruz). Quando não ocorre uma resposta satisfatória com o tratamento dos antimoniais, são utilizados antibióticos como a anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina-B-lipossomal e anfotericina-B-dispersão coloidal), e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina).

Apesar da existência de tratamentos contra leishmaniose, as drogas utilizadas são tóxicas, requerem cuidados com o monitoramento de pacientes por causarem efeitos adversos, e sua ineficácia está aumentando devido à resistência dos parasitas (Brenzan *et al.*, 2012; Marr *et al.*, 2012). Além disso, a existência de parasitas resistentes tem feito com que se utilizem drogas mais tóxicas (Cobb e Denny, 2010). Com esse cenário há uma necessidade do desenvolvimento de novas drogas com menos efeitos colaterais e de baixo custo.

Os AMPs possuem atividade inibitória em vírus envelopados, fungo, bactérias Gram negativas e positivas (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Também já foi visto que AMPs de anfíbios, mamíferos, crustáceos, insetos e plantas possuem ação inibitória em protozoários (McGwire e Kulkarni). Já foi visto que para alguns AMPs o mecanismo de ação utilizado para levar a morte de protozoários como *Leishmania* consiste na ruptura da membrana plasmática, interação com alvos intracelulares depois da interação com o parasita, indução de apoptose e/ou através da imunomodulação do hospedeiro infectado (Marr *et al.*, 2012).

Apesar de se conhecer que alguns peptídeos possuem ação contra protozoários, poucos estudos foram feitos nessa área. Dentre as famílias de AMPs já descrita em plantas, por exemplo, apenas quatro foram testados e somente dois AMPs apresentaram atividade sendo eles a tionina de trigo e defensina de batata (PTH-1) (McGwire e Kulkarni; Berrocal-Lobo *et al.*, 2009). Portanto, há uma necessidade de mais estudos nessa área para que seja possível um melhor entendimento do mecanismo de ação desses peptídeos, pois não se sabe quais são os seus alvos celulares e nem todos os efeitos que o peptídeo pode causar na célula do protozoário.

Nesse trabalho estudamos o mecanismo de ação da defensina recombinante de feijão-de-corda em *L. amazonensis* com intuito de entendermos parte do mecanismo de ação utilizado por esta defensina para inibir o crescimento deste protozoário. Em um breve histórico sobre esta defensina, ela foi inicialmente purificada e caracterizada a partir de sementes de *V. unguiculata* (Carvalho *et al.*, 2001). O cDNA que codificava esta defensina foi posteriormente clonado (Carvalho *et al.*, 2006). Sua expressão funcional foi obtida mostrando atividade contra  $\alpha$ -amilases (Santos *et al.*, 2010). A partir de então a expressão desta defensina foi melhorada e foram iniciados os testes de inibição sobre *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2013). Neste trabalho demos continuidade ao estudo do efeito sobre *L. amazonensis* comparando a atividade biológica desta defensina, chamada agora de *Vu-Defr*, com a defensina natural, *Vu-Def*, e iniciamos testes iniciais sobre o mecanismo de ação que causa a inibição do crescimento do protozoário.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter a defensina recombinante de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) (*Vu-Defr*) e estudar o seu efeito sobre *Leishmania amazonensis*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter a *Vu-Defr*;
- Analisar se o processo de produção e enovelamento da *Vu-Defr* ocorreu corretamente através de difração circular;
- Comparar as atividades da *Vu-Defr* e da *Vu-Def* obtida de sementes de feijão-de-corda contra células de *L. amazonensis*;
- Analisar a funcionalidade mitocondrial de células de *L. amazonensis* tratadas com *Vu-Defr*;
- Verificar a permeabilização de membrana de células de *L. amazonensis* tratadas com *Vu-Defr*;
- Analisar a produção de espécies reativas de oxigênio nas células de *L. amazonensis* tratadas com *Vu-Defr*;
- Analisar a produção de óxido nítrico nas células de *L. amazonensis* tratadas com *Vu-Defr*.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material biológico e manutenção

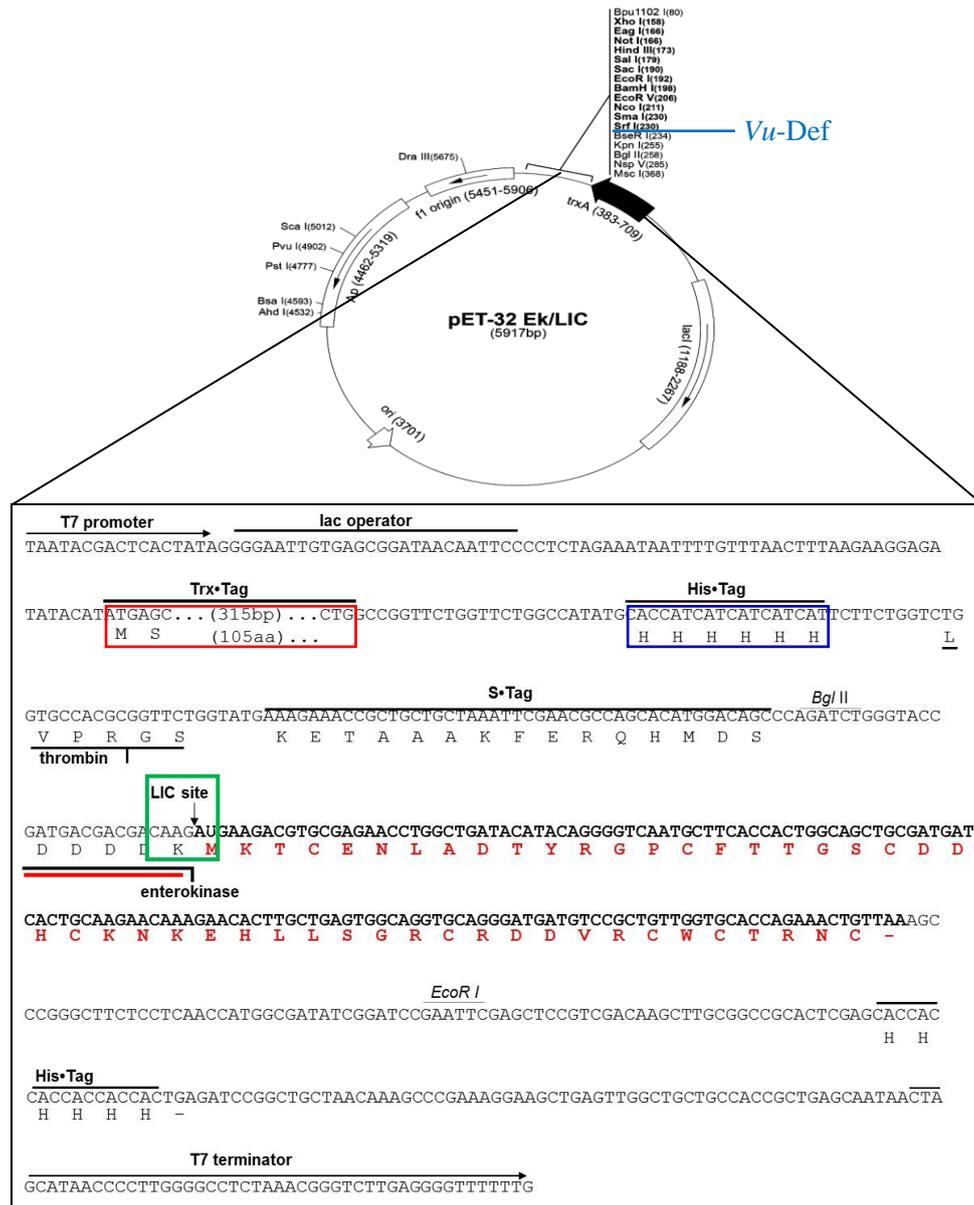
##### 3.1.1. Cepa de *Escherichia coli*

Neste trabalho foram utilizadas células de *Escherichia coli*, linhagem Rosetta-gami2 (DE<sub>3</sub>) pLysS, [genótipo:  $\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL}$  (DE3) F'[lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE2 (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)] adquiridas da Novagen, que foram transformadas com a construção pET-DEF, a qual consiste do clone da defensina de *Vigna unguiculata* do cultivar Epace-10 ligado ao plasmídeo pET-32 EK/LIC (Novagen). Este procedimento foi feito pelo Prof. André de Oliveira Carvalho.

O vetor pET-32 EK/LIC utilizado neste trabalho, para a expressão da defensina recombinante de *V. unguiculata* (Vu-Defr), fusiona à proteína recombinante uma cauda que consiste de duas regiões. Uma região é composta da proteína tioredoxina, que ajuda na solubilidade da proteína recombinante no citoplasma da *E. coli*. A segunda região é composta por seis histidinas consecutivas, que vai ser útil na purificação e na identificação da proteína recombinante. Após a purificação, esta cauda pode ser completamente eliminada pela reação de clivagem com a endoproteínase enteroquinase (EK), uma enzima altamente específica que cliva logo após quatro resíduos consecutivos de ácido aspártico e uma lisina sendo este sítio proteolítico dado pelo vetor (Figura 4).

As células de *E. coli* foram mantidas em *stabs* constituídos de meio Luria-Bertani (LB) líquido [triptona 1 g, extrato de levedura 0,5 g, NaCl 1 g e 100 mL de água destilada, pH 7,0 ajustado com NaOH e suplementado com ampicilina (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e cloranfenicol (35  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )] e glicerol 12,5% a -70 °C.

Todo o material referente à cultura de microrganismos foi manipulado usando capela de fluxo laminar (Dwyer Mark II).



**Figura 4.** Mapa e região de policlonação do vetor pET-32 Ek/LIC (retirada do manual do vetor, *User Protocol* TB163, Novagen) com a indicação da posição da inserção do clone da *Vu-Def* foi inserida (linha azul). O quadro vermelho indica a região da cauda composta pela tioredoxina; O quadro azul indica região da cauda composta pelas histidinas; Sublinhado em vermelho está o sítio de clivagem específico para enteroquinase; O quadro verde indica o sítio de clonagem independente de ligação (LIC). Destacado em vermelho está a sequência de aminoácidos do clone da *Vu-Def* que foi inserida dentro do sítio LIC.

### 3.1.2. Cepa de *Leishmania amazonensis*

A cepa LV 79 de *Leishmania amazonensis*, no estágio de promastigota, que foi utilizada nesse trabalho, foi cedida pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e o trabalho foi realizado em colaboração com o Prof. Edésio José Tenório de Melo. O protozoário foi cultivado em 5 mL de meio Warren's [90 % Brain heart broth (Fluka), contendo 10 % de soro bovino fetal inativada pelo calor], enriquecido com 0,01 % de ácido fólico e 0,4 % de hemina a 28 °C com transferência para o novo meio a cada três dias. Esse cultivo foi feito no mesmo laboratório citado acima.

### **3.1.3. Defensina natural de *Vigna unguiculata***

A defensina natural de sementes de *Vigna unguiculata* (*Vu-Def*) foi cedida pela Dr<sup>a</sup>. Viviane Veiga do Nascimento. A *Vu-Def* foi purificada de acordo com Carvalho *et al.* (2001).

## **3.2. Indução, extração e purificação da *Vu-Defr***

### **3.2.1. Cultivo de bactérias para a indução**

Para este procedimento foi necessário o preparo do meio LB sólido, com a mesma composição descrita 3.1.1., sendo necessária a adição de ágar (2%) apenas. Uma alíquota foi retirada do *stab* de *E. coli*, linhagem Rosetta-gami 2 (DE<sub>3</sub>) pLysS, contendo o clone da *Vu-Def*, e foi espalhada sobre o meio com o auxílio de uma alça de semeadura bacteriológica, e estas foram espalhadas sobre o meio em quadrantes de modo a se obter colônias isoladas. A placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica (Quimis, modelo 317.B242) por 16 h.

### **3.2.2. Pré-inóculo**

Após o período de crescimento, uma colônia bacteriana foi transferida para 20 mL de meio Terrific Broth (TB) [triptona 3 g, extrato de levedura 6 g, glicerol 1,125 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,25 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,95 g e 250 mL de água destilada suplementado com ampicilina (50 µg.mL<sup>-1</sup>) e cloranfenicol (35 µg.mL<sup>-1</sup>)], esta pré-cultura foi incubada a 37 °C por 16 h e a 250 rpm no incubador orbital (Novatecnica, modelo NT712).

### **3.2.3. Indução da *Vu-Defr***

Do pré-inóculo foi retirado uma alíquota de 20 mL que foi transferida para 400 mL de meio TB (inóculo). O inóculo foi, então, incubado a 37 °C por aproximadamente 3 h sob agitação constante de 250 rpm até a densidade celular atingir valores de absorvância entre 0,5 e 1 medida em espectrofotômetro a 600 nm (LGS, modelo UV VIS 53). Após esse período, foi adicionado à cultura 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo [IPTG (Ge Healthcare)]

e esta foi incubada a 27 °C por 3 h sob agitação constante de 250 rpm. Uma alíquota foi retirada imediatamente antes da adição do IPTG para ser usada como controle da indução.

### 3.2.4. Extração da Vu-Defr

Após a indução, as bactérias contendo a Vu-Defr expressa e a alíquota controle foram centrifugadas (10.000 x g por 10 min a 4 °C) e as células foram ressuspensas em **tampão A** (fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 e 300 mM de NaCl). As amostras foram divididas em lotes e estes tiveram as células rompidas por 5 pulsos de sonicação de 30 s, na potência de 7 watts (Unique) na presença de 3 mM de fluoreto de fenilmetilasulfonila (PMSF) (Ge Healthcare), 1% de triton-X 100 (Sigma) e 1 µg/mL de coquetel de inibidores [AEBSF 2 mM, aprotinina 0,3 M, bestatina 130 M, EDTA 1 mM, E-64 14 M e leupeptina 1 M (*Protease inhibitor cocktail for general use*, Sigma)]. Todo esse procedimento foi realizado em banho de gelo. Depois do rompimento das células a solução celular foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4° C. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi recuperado e armazenado a -20 °C e posteriormente usado para a purificação da Vu-Defr.

### 3.2.5. Purificação da Vu-Defr em coluna de afinidade a metal - Ni<sup>+</sup>-NTA agarose

A semipurificação foi realizada em coluna de níquel. O princípio dessa cromatografia é que as proteínas que possuem afinidade ao níquel, imobilizado na resina de agarose, irão se ligar à ele e as que não possuem serão eluídas com o tampão de equilíbrio. A proteína recombinante tem afinidade ao níquel devido à cauda de histidina. Para a eluição das proteínas com afinidade ao níquel foi necessária a utilização de uma concentração de imidazol, que vai servir para competir com a cauda de histidina pelo níquel. O tampão de equilíbrio (**tampão A**) contém sal e este tem a finalidade de impedir que ocorra interação entre as proteínas e a resina por carga.

Para a realização da purificação uma alíquota resultante da extração foi aplicada na coluna contendo 30 mL de resina Ni<sup>+</sup>-NTA agarose (Qiagen) e equilibrada com o **tampão A**. Em seguida o primeiro pico foi eluído com o **tampão B** (**tampão A** acrescido de 55 mM de imidazol) e o segundo pico com o **tampão C** (**tampão A** acrescido de 500 mM de imidazol). Foram coletadas frações de 7 mL e o fluxo foi de 30 mL.h<sup>-1</sup> ajustado em uma bomba peristáltica P1 (GE Healthcare).

Para a identificação dos picos, uma alíquota de 35 µL de cada tubo foi retirada e transferida para placa de cultura de 96 poços e a esta alíquota foram adicionados 50 µL do

reagente de Bradford. Após a incubação de 10 min foram realizadas leituras em um leitor de ELISA (Plate Chameleon™ V, HIDEX) a 540 nm. Brancos foram utilizados sendo constituídos apenas do tampão de cada etapa de eluição. As absorbâncias foram analisadas no programa Excel que nos forneceu um cromatograma com o padrão de eluição dos picos. Os tubos referentes a cada pico foram reunidos e as amostras foram dialisadas contra água destilada em tubo de diálise de celulose de alta retenção sem costura (Sigma), com 3 trocas diárias, por 3 dias, a 4 °C, liofilizados e então foram analisados por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida.

### **3.2.5.1. Análise dos picos cromatográficos por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida, usando o sistema de gel descontínuo, foi feita segundo método descrito por Laemmli (1970). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores e pentes de 0,75 mm (Mini protean II tetra system, BioRad). O gel de separação foi preparado numa concentração de 12% de acrilamida/bis-acrilamida (estoque a 30%) e o gel de concentração numa concentração de 5%.

#### **3.2.5.1.1. Preparo das amostras e condições de corrida**

O conteúdo proteico das amostras foi dosado por ácido bicinonínico (BCA) (Sigma, segundo protocolo fornecido com o produto, Technical bulletin B9643) e 10 µg de cada uma das amostras foram misturados com tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM pH 8,0, SDS 2%, sacarose 10% e azul de bromofenol 0,25%) e β-mercaptoetanol a 5% e a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 16.000 x g por 2 min. Após esses procedimentos, as amostras foram aplicadas no gel de concentração e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes.

Já as amostras da cultura bacteriana, retiradas imediatamente antes (não induzido) e após (induzido) a adição de IPTG, foram preparadas da seguinte forma: foram misturadas a 100 e 130 µL de tampão de amostra, respectivamente, e β-mercaptoetanol a 5%, aquecidas a 100 °C por 5 min e centrifugada a 16.000 x g por 2 min. Dessa mistura, 4 µL de não induzido e 2 µL de induzido foram aplicadas no gel. A corrida foi feita a 100 V por um período de, aproximadamente, 2 h. O tampão de corrida utilizado contém Tris-HCl 0,05 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%. Juntamente com as amostras foram utilizados marcadores de alta massa molecular composto por uma mistura das seguintes proteínas [albumina bovina, 66.000 Da

(Sigma A 7517), albumina de ovo, 45.000 Da (Sigma A 7642), triosefosfato isomerase, 35.200 (Sigma T 9400), anidrase carbônica 29.000 Da (Sigma C 2273) e tripsinogênio 20.100 (Sigma T 9767)].

### **3.2.5.1.2. Coloração e descoloração do gel**

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante (Coomassie Blue R 250 0,1%, ácido acético 10% e metanol 50% em água destilada) por aproximadamente 30 min. Passado esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 7% e etanol 10% em água destilada) e foi mantido nesta solução até a visualização das bandas protéicas e armazenado em água destilada até ser registrado (fotodocumentador LS500, GE HealthCare).

### **3.2.6. Corte da cauda de histidina da *Vu-Defr* pela Enteroquinase**

As amostras obtidas como descrito no item 3.2.5. foram separadas em lotes de acordo com a data da purificação, foram dosadas em relação ao seu conteúdo de proteínas. De cada lote foi retirado 1 mg de amostra que foi adicionado a tampão de clivagem 1x [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, 0,1% de Tween 20, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,02 unidades de enteroquinase (Sigma) para cada 1 mg de proteína recombinante]. Após todas as soluções serem pipetadas, estes foram incubados por 16 h a 25 °C. Uma alíquota da solução foi retirada imediatamente antes da adição da enteroquinase para servir de controle da clivagem.

### **3.2.7. Eletroforese em gel de Tricina na presença de SDS**

A análise da clivagem foi feita através de eletroforese em gel de tricina segundo metodologia de Schägger e von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores e pentes de 0,75 mm (Mini protean II tetra system, BioRad). O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9%.

#### **3.2.7.1. Preparo das amostras e condições de corrida**

Todo o procedimento foi feito como descrito no item 3.2.5.1.1., sendo neste caso o tampão de amostra constituído de Tris-HCl 125 mM pH 8,0, SDS 2,5%, sacarose 15% e azul de bromofenol 0,25% e  $\beta$ -mercaptoetanol a 5% e a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 16.000 x g por 2 min. Após este tratamento, as amostras foram aplicadas no gel

de concentração e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. Juntamente com as amostras foi aplicado o marcador de baixa massa molecular (MW-SDS-17S, Sigma) composto das seguintes proteínas com massa molecular em Da [Mioglobina (peptídeo inteiro 1-153 aminoácidos) peso molecular = 16.950, Mioglobina (fragmentos I + II, 1-131 aminoácidos) peso molecular = 14.440, Mioglobina (fragmentos I + III, 56-153 aminoácidos) peso molecular = 10.600, Mioglobina (fragmento I, 56-131 aminoácidos) peso molecular = 8.160, Mioglobina (fragmento II, 1-55 aminoácidos) peso molecular = 6.210 e Mioglobina (fragmento III, 132-153 aminoácidos) peso molecular = 2.510]. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de, aproximadamente, 16 h.

### 3.2.7.2. Coloração e descoloração do gel

Todo o procedimento foi feito como descrito no item 3.2.5.1.2.

### 3.2.8. Purificação final em cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema de alta eficiência

A partir de um padrão estabelecido em Souza (2012) foi feita a purificação da defensina clivada, obtida no item 3.2.5. Para a determinação deste padrão foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (Shim-pak VP-ODS, 250 x 4,6 mm, Shimadzu) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma). A coluna foi previamente equilibrada com ácido trifluoroacético 0,1% (TFA, Sigma). Foi então determinado o padrão, referente ao tempo de retenção da *Vu-Defr* previamente purificada pela coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA agarose. Neste sentido, o pico não retido na coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA agarose, sendo que após a clivagem o pico de interesse é o não retido, pois a *Vu-Defr* sem a cauda de histidina não tem afinidade ao Ni<sup>+</sup>. A *Vu-Defr* foi solubilizada em TFA 0,1% e 500 µL desta mistura foram injetados na coluna de fase reversa. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura de 38 °C em sistema de alta eficiência (Promenence, Shimadzu). Para a eluição das proteínas da coluna foi utilizado um gradiente de 0,1% de TFA e 2-propanol de 0 a 65 %. Inicialmente (5 primeiros minutos) a coluna foi lavada com TFA 0,1% em água ultra pura (solvente A), e em seguida foi formado um gradiente através da mistura do solvente A e 100 % de 2-propanol em TFA 0,1 % (solvente B) por cerca de 147 min. De 5 a 20 min foi formado um gradiente até atingir 10 % de solvente B, de 20 a 140 min foi formado um gradiente até atingir 20 % de solvente B e de 140 a 141 min até atingir 65 % de solvente

B. E de 141 a 142 min a concentração do solvente B foi mantida em 65 % e em 142.01 min voltando a passar o solvente A 100 %, totalizando 147 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector de arranjo de diodo (DAD), sendo as absorbâncias lidas a  $220 \pm 4$  nm.

Com este padrão foi passada a amostra da *Vu-Defr* clivada (sem ser passada na coluna de  $\text{Ni}^+$ -NTA agarose) e o pico referente ao tempo de retenção da *Vu-Defr* foi coletado.

### 3.3. Análise da *Vu-Defr* através de dicroísmo circular

A fim de confirmar se todo o processo de produção e enovelamento da *Vu-Defr* ocorreu corretamente foi feita a análise de dicroísmo circular comparando os espectros da *Vu-Defr* e da *Vu-Def*. Ambas as defensinas foram testadas com a mesma concentração de proteína,  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , estas foram dissolvidas em água ultrapura (TEDIA) e foram transferidas para uma cubeta de quartzo com comprimento óptico de 5 mm. O espectro do dicroísmo circular de ambos os peptídeos foram registrados separadamente no espectro CD J815 (Jasco) em uma faixa ultravioleta (185 a 275 nm) a  $20^\circ\text{C}$ . Para cada peptídeo foram feitos 5 scanners por espectro em uma velocidade de 10 nm/min e a curva foi desenhada baseada na média de 5 scanners.

### 3.4. Análise da atividade biológica da *Vu-Defr* contra *Leishmania amazonensis*

#### 3.4.1. Ensaio de eliminação do crescimento do protozoário

A *Vu-Defr* obtida como descrito no item 3.2.8 retirada uma alíquota referente à quantidade que foi utilizada no ensaio e esta foi liofilizada, em seguida para ser usada no ensaio, ela foi dissolvida no meio específico para cada protozoário e filtrada (Millex-GV  $0,22 \mu\text{m}$ , Millipore). Os parasitas que foram utilizados no ensaio foram crescidos como descrito no item 3.1.2. e sua concentração inicial foi de  $1,5 \times 10^6$  parasitas/mL.

Na realização do ensaio foram feitos testes na ausência (controle) e na presença da *Vu-Defr* (tratado). O controle consiste de  $3 \mu\text{L}$  de DMSO (equivale a 1,5 % do volume total do ensaio) juntamente com  $97 \mu\text{L}$  de meio específico para cada protozoário mais  $100 \mu\text{L}$  de meio contendo os parasitas. E o tratado consiste em  $3 \mu\text{L}$  de DMSO juntamente com  $100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  *Vu-Defr*, que foi dissolvida no meio específico para cada protozoário, mais  $100 \mu\text{L}$  de meio contendo os parasita. O ensaio foi feito em uma placa de 96 poços e o seu volume final foi de  $200 \mu\text{L}$ . Controles e tratados foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  e o crescimento dos protozoários foram

avaliados fazendo contagens das células em câmara de Neubauer em 24 e 48 h. O ensaio foi feito em triplicata e os resultados representam a média do número de células de cada amostra em relação ao tempo de cada tratamento. Cálculos do desvio padrão e do teste Tukey foram feitos com o *software* Prisma (versão 5.0).

Inicialmente este ensaio foi também feito com a *Vu-Def* para comparação do efeito com o peptídeo recombinante, do mesmo modo descrito para a *Vu-Defr*.

Após este teste foi feita uma curva de tempo do crescimento de *L. amazonensis* do mesmo modo como descrito acima, sendo que a contagem das células dos parasitas foi contada com intervalos de 0, 8, 16, 24, 32 e 48 h.

Com o tempo de 24 h do ensaio de inibição do crescimento foram realizados os ensaios de: permeabilização da membrana plasmática, funcionalidade mitocondrial e de indução da produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico.

#### **3.4.2. Permeabilização da membrana plasmática de *Leishmania amazonensis* pela *Vu-Defr***

Para este ensaio de permeabilização uma alíquota de 120  $\mu\text{L}$  da amostra foi retirada e em seguida foram adicionado 7  $\mu\text{L}$  de corante fluorescente *Sytox green* (concentração final 0,2  $\mu\text{M}$ ) (Molecular Probes, Invitrogen). Esta mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz com uma leve agitação. Antes de acrescentar o corante fluorescente *Sytox green* este material foi centrifugado por 10 min a 500 x *g* e em seguida foi descartado 80  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. O restante foi agitado levemente, e em seguida foi acrescentado o corante. Depois foram colocados 20  $\mu\text{L}$  do conteúdo em uma lâmina. Em seguida a lâmina foi observada no microscópio óptico Axioplan Zeiss com câmera Olympus DP72 equipado com um conjunto de filtros para detecção de fluorescência (excitação: 450-490 nm; emissão: 500 nm). Para visualizar as imagens foi utilizado o programa *Soft Imaging System Cell*. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

#### **3.4.3. Análise da funcionalidade da mitocôndria de *Leishmania amazonensis* tratadas com a *Vu-Defr* através do corante rodamina 123**

Para a análise da funcionalidade da mitocôndria, os protozoários foram tratados com a *Vu-Defr*, e então foram incubados com rodamina 123 (Sigma). Após o período de incubação dos protozoários com a *Vu-Defr*, foi retirada uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  do tratado e este foi transferido para uma lâmina tratada com poli-L-lisina 0,1 %. Esta foi incubada a 37 °C por 10

minutos em estufa bacteriológica. Após esse período foram acrescentados aos 30 µL do tratado, 10 µL da solução de rodamina 123 (10 µg.mL<sup>-1</sup>) e esta foi incubada por 30 min na ausência de luz. Em seguida a lâmina, juntamente com a lamínula, foi observada no microscópio óptico Axioplan Zeiss com câmera Olympus DP72. Para visualizar as imagens foi utilizado o programa *Soft Imaging System Cell*. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

Para o tratamento das lâminas com poli-L-lisina, estas foram lavadas com água e álcool, e após secas foram preparadas com poli-L-lisina 0,1 % dissolvida em água destilada, e secas em estufa 37 °C por 24 h.

#### **3.4.4. Efeito da Vu-Defr sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) em *Leishmania amazonensis***

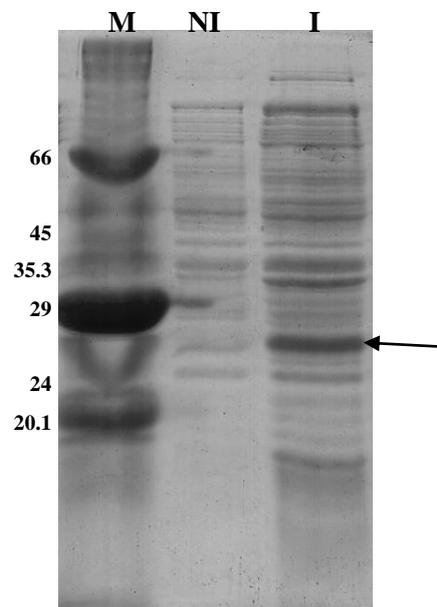
A indução da produção endógena de ROS em *L. amazonensis*, tratadas com a Vu-Defr após ensaio de inibição do crescimento, foi avaliada através da utilização do corante fluorescente 2',7' diclorofluoresceína diacetato, segundo metodologia descrita por Aerts *et al.* (2007) com algumas modificações. Após 24 h de crescimento, na ausência e presença da Vu-Defr, uma alíquota foi incubada sob constante agitação por 2 h com o corante fluorescente a uma concentração final de 20 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas tratadas com poli-L-lisina 0,1 %, cobertas com lamínulas e analisadas por fluorescência em microscópio óptico (Zeiss Axioplan). As imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan Zeiss acoplado com câmera Olympus DP72. Para visualizar as imagens foi utilizado o programa *Soft Imaging System Cell*. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

O mesmo procedimento foi feito para a detecção de NO sendo utilizado o corante fluorescente 3-amino, 4-aminometil-2',7' diclorofluoresceína diacetato.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Indução da *Vu-Defr*

A linhagem de *E. coli* Rosetta-Gami2 (DE<sub>3</sub>) pLysS contendo o clone da defensina de *V. unguiculata* foi induzida com IPTG e a indução foi analisada por eletroforese. Quando comparamos a raia contendo o extrato bruto bacteriano não induzido (NI) com a raia contendo o extrato bacteriano induzido (I) é possível identificar a presença de uma banda, em torno de 27 kDa (seta), que não está presente na raia NI. O peso molecular dessa banda corresponde ao tamanho esperado para *Vu-Defr* fusionada a cauda de histidina. Então como é possível observar na figura 5 a indução da *Vu-Defr* foi realizada com sucesso.

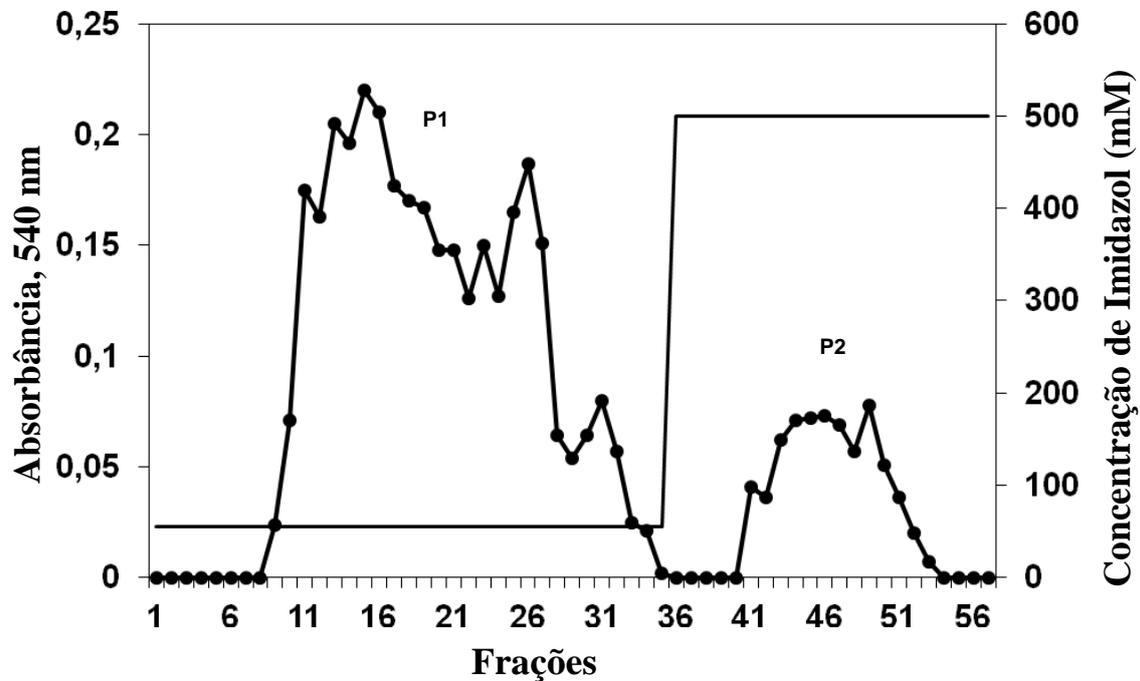


**Figura 5.** Visualização eletroforética dos extratos brutos bacterianos não induzido (NI) e induzido (I) com IPTG, em meio TB, em gel de Laemmli 12 %. A seta indica a posição da *Vu-Defr*. M - marcador de massa molecular em kDa. Gel corado com Coomassie Blue R 250.

### 4.2. Purificação da *Vu-Defr*

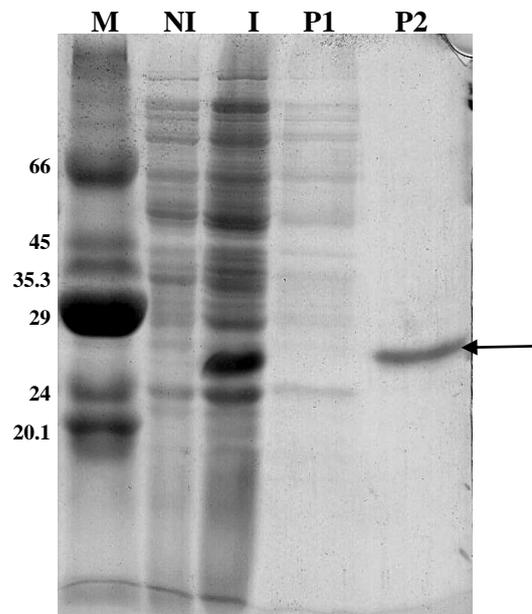
A purificação da *Vu-Defr* expressa em *E. coli* foi feita por cromatografia de afinidade à metal utilizando a coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA agarose. O cromatograma apresenta um largo pico denominado P1 não retido, que foi eluído com o tampão B e um pico retido (P2), que foi eluído com o tampão C (figura 6). No pico P1 encontram-se as proteínas não retidas e as proteínas que possuem fraca interação com o Ni<sup>+</sup> sendo estas proteínas eluídas com 55 mM de imidazol adicionado ao tampão B. No pico P2 encontram-se as proteínas que tem alta

afinidade ao  $\text{Ni}^+$  incluindo a proteína de nosso interesse, a *Vu-Defr* fusionada a cauda de histidina.



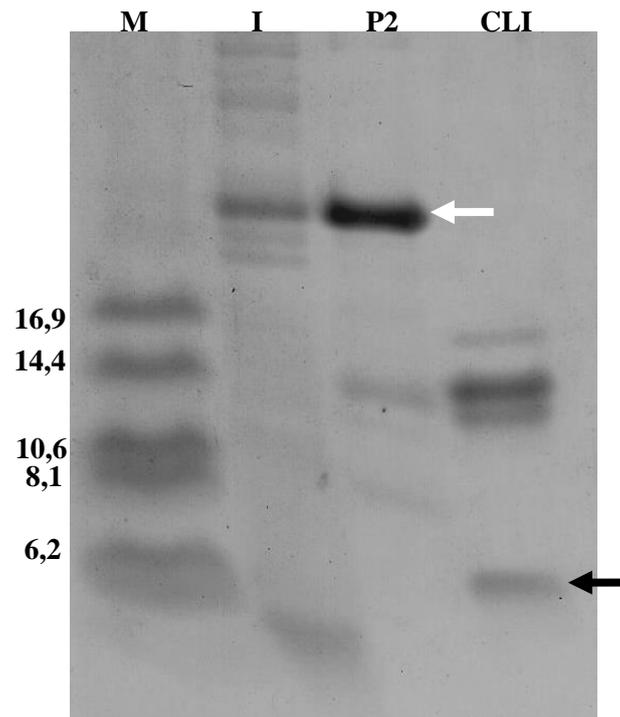
**Figura 6.** Cromatograma do extrato solúvel de *Escherichia coli* expressando a *Vu-Defr* feito em meio TB contendo Triton-X 100 após cromatografia em coluna de  $\text{Ni}^+$ -NTA agarose. A coluna foi previamente equilibrada com tampão A (fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0, contendo 300 mM de NaCl) e a eluição foi feita com um gradiente descontínuo de imidazol. P1 foi eluído com tampão B (tampão A acrescido de 55 mM de imidazol) e P2 foi eluído com tampão C (tampão A acrescido de 500 mM de imidazol). O fluxo foi de  $30 \text{ mL.h}^{-1}$  e foram coletadas frações de 7 mL em cada tubo, em um total de 56 tubos.

Os picos obtidos na cromatografia feita na coluna  $\text{Ni}^+$ -NTA agarose foram analisados em gel de Laemmli (figura 7). Na raia NI podemos ver o extrato bruto bacteriano não induzido, na raia I podemos ver o extrato bruto bacteriano induzido, na raia P1 podemos ver diversas proteínas que foram eluídas com tampão B e na raia P2 podemos ver uma banda, em torno de 27 kDa, que corresponde à *Vu-Defr*.



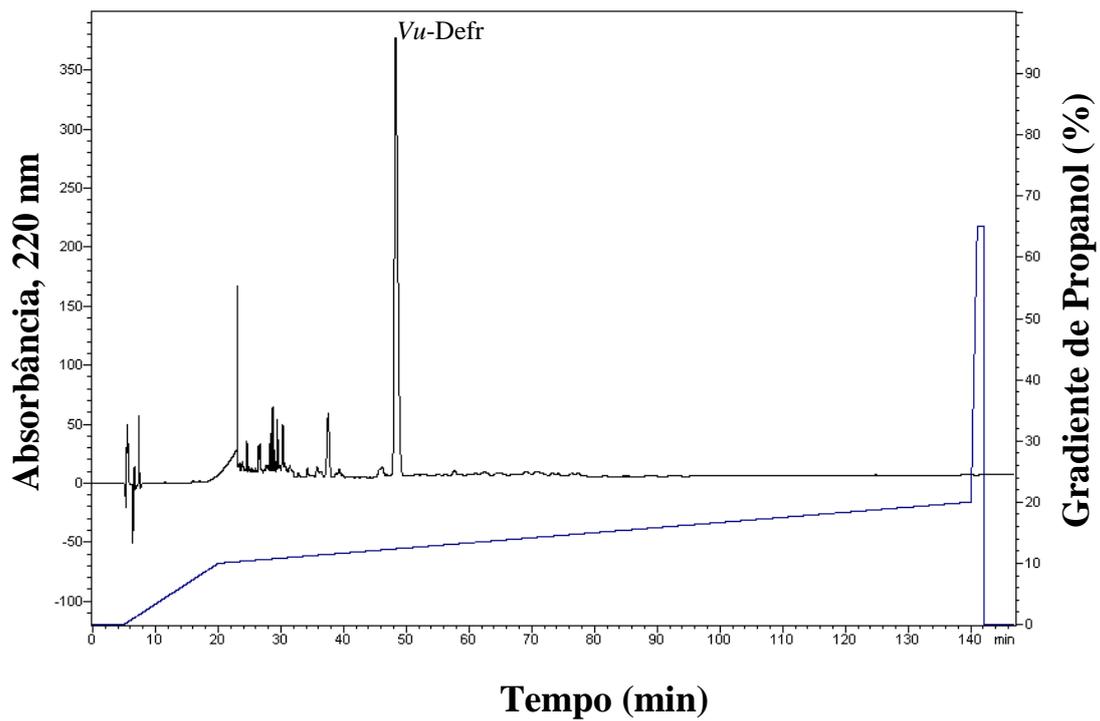
**Figura 7.** Visualização eletroforética em gel de Laemmli (12 %) dos picos obtidos após cromatografia em coluna de  $\text{Ni}^+$ -NTA agarose do extrato protéico solúvel contendo a *Vu-Defr* induzida em meio TB e extraída em tampão contendo Triton-X 100. NI – extrato bruto bacteriano não induzido; I – extrato bruto bacteriano induzido; P1 - pico retido e eluído com 55 mM de imidazol; P2 - pico retido e eluído com 500 mM. A seta indica a posição da *Vu-Defr*; M - marcador de massa molecular em kDa. Gel corado com Coomassie Blue R 250.

Após o processo de semipurificação observado no gel acima foi realizada a clivagem do P2 (figura 8). Após o processo de clivagem através da enzima enteroquinase podemos observar por análise eletroforética em gel de tricina o concomitante desaparecimento da banda de aproximadamente 26 kDa (raia P2) (seta branca) e o aparecimento de duas bandas predominantes, uma banda em torno de 13 kDa correspondente a cauda de histidina e outra banda em torno de 6 kDa, cuja massa molecular corresponde à da *Vu-Defr* (seta preta) (raia CLI). Também é possível observar contaminantes de baixa massa molecular que não puderam ser observado em gel de Laemmli (Figura 7).



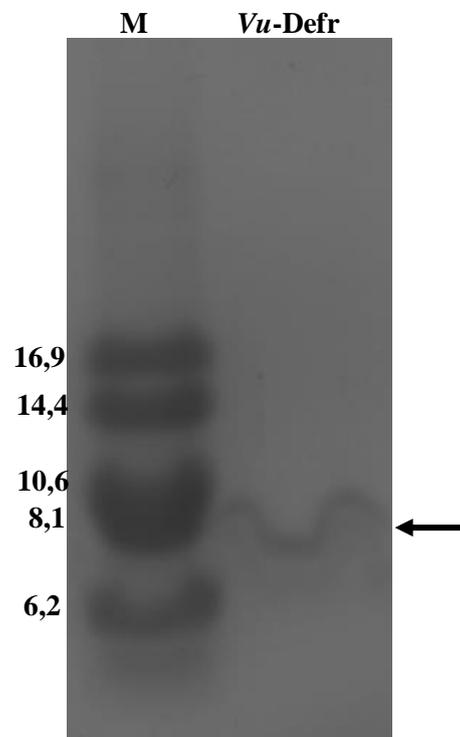
**Figura 8.** Visualização eletroforética da clivagem do P2 com enteroquinase em gel de tricina. I - extrato bruto bacteriano induzido; P2 – pico retido na coluna de Ni<sup>+</sup>-NTA agarose e eluído com 500 mM de imidazol; CLI – P2 após o tratamento com a enteroquinase. A seta branca indica a defensina recombinante ligada à cauda de histidina e a seta preta indica o aparecimento da banda de aproximadamente 6 kDa correspondente à *Vu-Defr* após clivagem. M - marcador de massa molecular em kDa. Gel corado com Coomassie Blue R 250.

Depois de clivada a amostra foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 no HPLC (figura 9) em gradiente contínuo de propanol. Baseado no padrão de tempo de retenção da *Vu-Defr* previamente purificada, apenas o pico referente ao tempo de retenção foi coletado.



**Figura 9.** Cromatograma da Vu-Defr após clivagem com a enzima enteroquinase (CLI da figura 8) em coluna de fase reversa C18. Baseado na determinação do tempo de retenção da Vu-Defr previamente purificada, último pico é referente à Vu-Defr. Os picos foram eluídos de acordo com o gradiente de propanol indicado pela linha oblíqua.

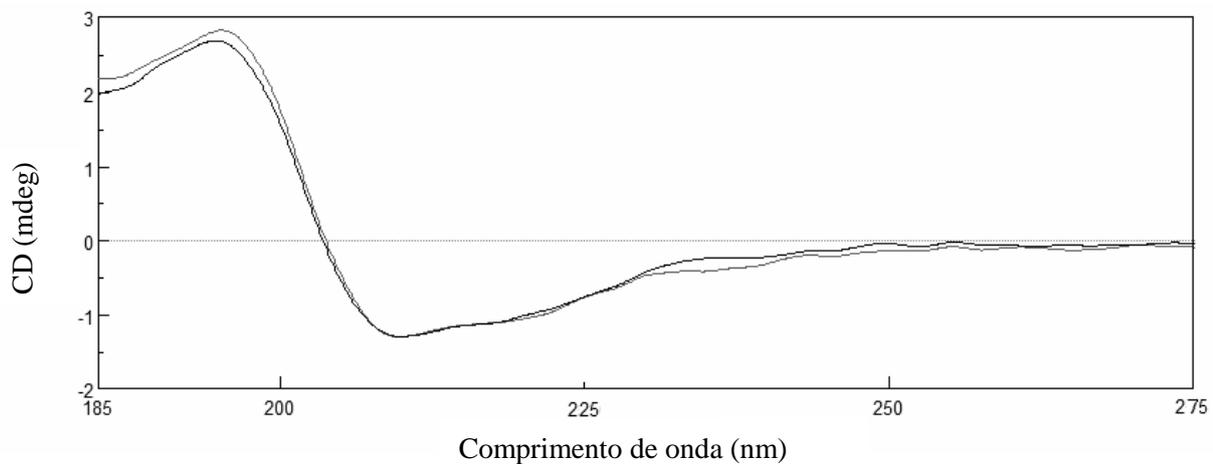
Na figura 10 podemos observar na segunda raia o último pico obtido na cromatografia de fase reversa, e nesta raia visualizamos a presença de uma única banda em torno de 6 kDa, que corresponde ao tamanho de Vu-Defr.



**Figura 10.** Visualização eletroforética do pico denominado *Vu-Defr* obtido em coluna de fase reversa C18. M - marcador de baixa massa molecular em kDa; *Vu-Defr*, último pico obtido na cromatografia de fase reversa em coluna C18. A seta preta indica a *Vu-Defr*. Gel corado com Coomassie Blue R 250.

#### 4.3. Análise da *Vu-Defr* através de dicroísmo circular

Após a purificação da *Vu-Defr*, esta foi analisada por dicroísmo circular para confirmar o seu correto enovelamento, como parâmetro de comparação foi utilizada a *Vu-Def* (defensina natural) obtida diretamente da semente de feijão-de-corda. Na figura 11 podemos observar que os espectros da *Vu-Defr* e *Vu-Def* se sobrepõem indicando que os dois peptídeos possuem a mesma estrutura. Este resultado demonstra que os processos de produção recombinante e de purificação não alteram o enovelamento da *Vu-Defr*.

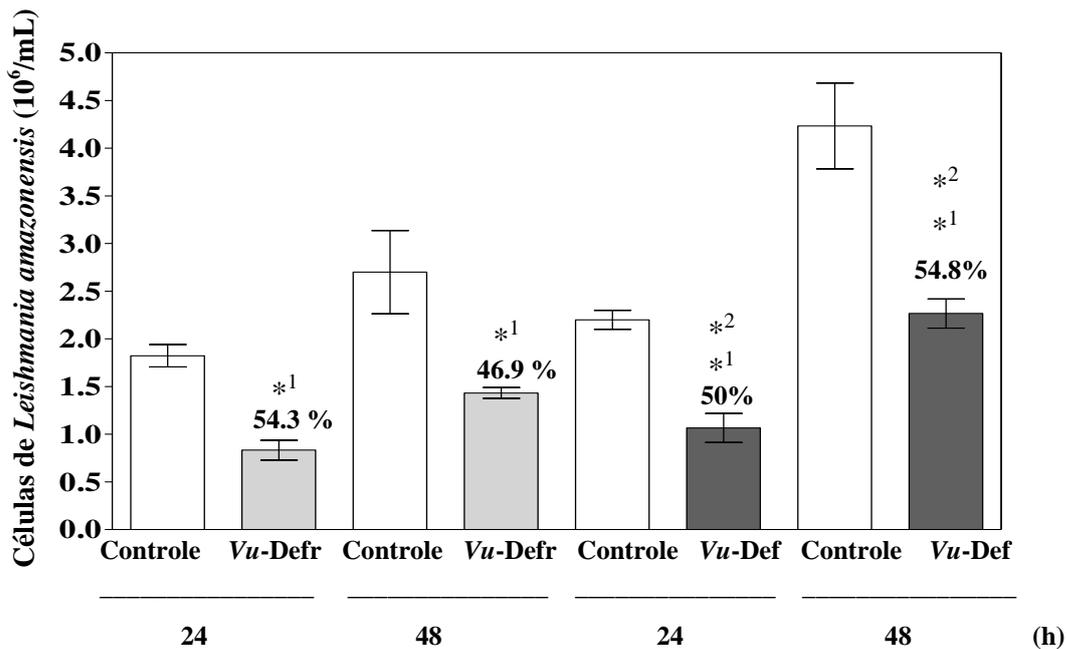


**Figura 11.** Sobreposição dos espectros do dicroísmo circular da *Vu-Def* (linha preta) e *Vu-Defr* (linha cinza).

#### 4.4. Análise da atividade biológica da *Vu-Defr* e da *Vu-Def* contra *Leishmania amazonensis*

##### 4.4.1. Ensaio de eliminação de *Leishmania amazonensis*

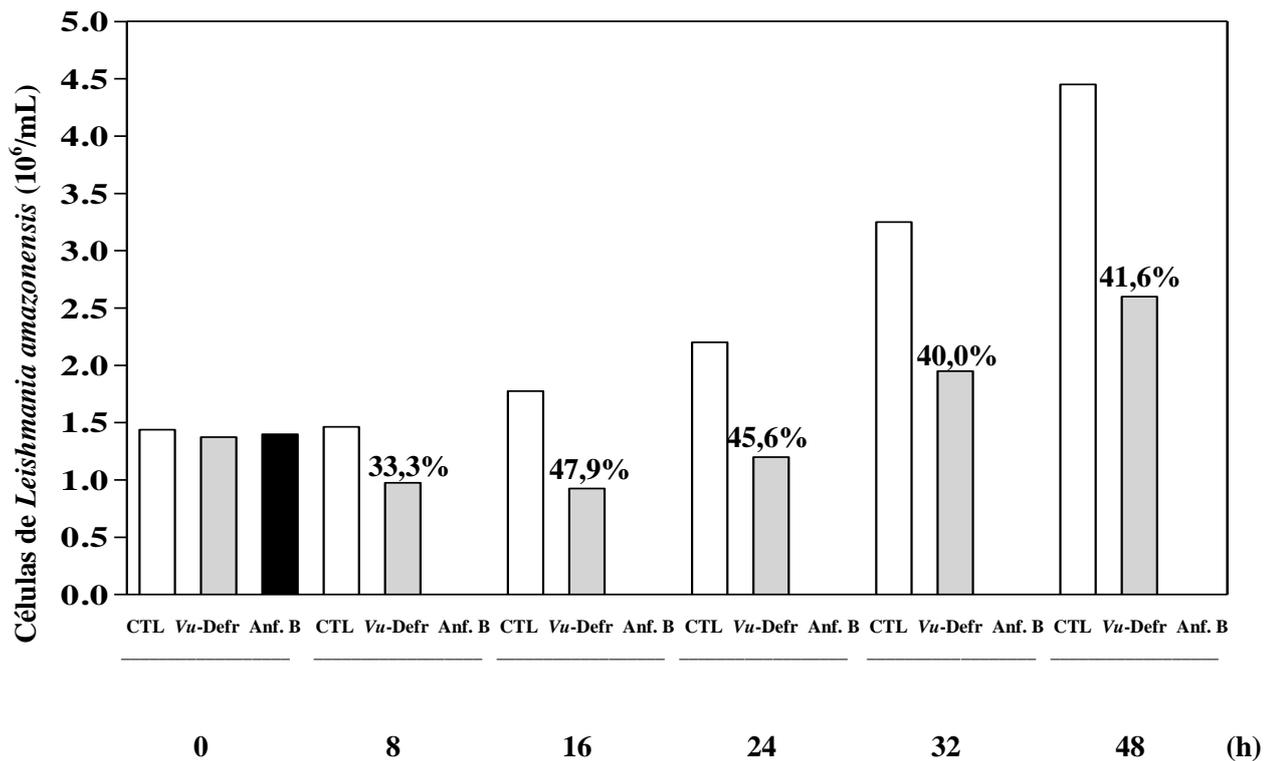
Na figura 12 podemos observar o efeito da *Vu-Defr* e da *Vu-Def* no crescimento de *L. amazonensis*. A população inicial usada foi  $1,5 \times 10^6$  parasitas/mL. Quando comparamos o controle (barra branca) com o tratado com a *Vu-Defr* em uma concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (barra cinza claro) observamos que ocorre uma inibição do crescimento de 54,3 % e 46,9 % nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente. Nessa figura também podemos observar a atividade da *Vu-Def*, comparando a barra do controle com a barra da *Vu-Def* (barra cinza escuro) e vimos que esta é capaz de inibir o crescimento em 50 % e 54,8 % em 24 e 48 h, respectivamente. Com a análise estatística das porcentagens de inibição da *Vu-Defr* e *Vu-Def* podemos afirmar que não há diferença significativa entre elas. Este resultado também mostra que a *Vu-Defr* manteve sua atividade biológica após a produção recombinante. Visto que as defensas possuem atividade biológica iguais estatisticamente, a partir deste ensaio apenas a *Vu-Defr* será usada.



**Figura 12.** Ensaio de eliminação de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de defensina recombinante (*Vu-Defr*) e natural (*Vu-Def*). As barras brancas representam os controles, as barras cinza claro representam *Vu-Defr* e as barras cinzas escuras a *Vu-Def*. O crescimento foi observado em 24 e 48 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados são as médias com os respectivos desvios padrão. Acima da barra do teste é mostrada a porcentagem de inibição em relação aos seus respectivos controles. \*<sup>1</sup> indica diferença significativa através do teste de Tukey ( $P < 0.01$ ) entre os experimentos e seus respectivos controles. \*<sup>2</sup> indica que não houve diferença significativa através do teste de Tukey ( $P < 0.01$ ) entre *Vu-Def* e *Vu-Defr*.

#### 4.4.2. Ensaio de eliminação de *Leishmania amazonensis* ao longo do tempo

Na figura 13 observamos o efeito de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de *Vu-Defr* e  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de anfotericina B no crescimento de *L. amazonensis* nos tempos de 0, 8, 16, 24, 32 e 48 h. Foi possível observar que no tempo de 8 h a *Vu-Defr* (barra cinza) quando comparada ao controle (barra branca) foi capaz de eliminar 33,3 % de protozoários. Porém nos tempos de 16, 24, 32 e 48 h foi possível observar uma retomada de crescimento do protozoário, o seu percentual de inibição passa a ser 47,9, 45,6, 40 e 41,6 % nos respectivos tempos citados acima. Essa retomada do crescimento acredita-se que ocorra devido aos protozoários que não foram eliminados no primeiro contato com o peptídeo. Nesta figura também podemos observar uma completa eliminação dos protozoários pela anfotericina B (barra preta), uma droga já utilizada no tratamento, em até 8 h de incubação.

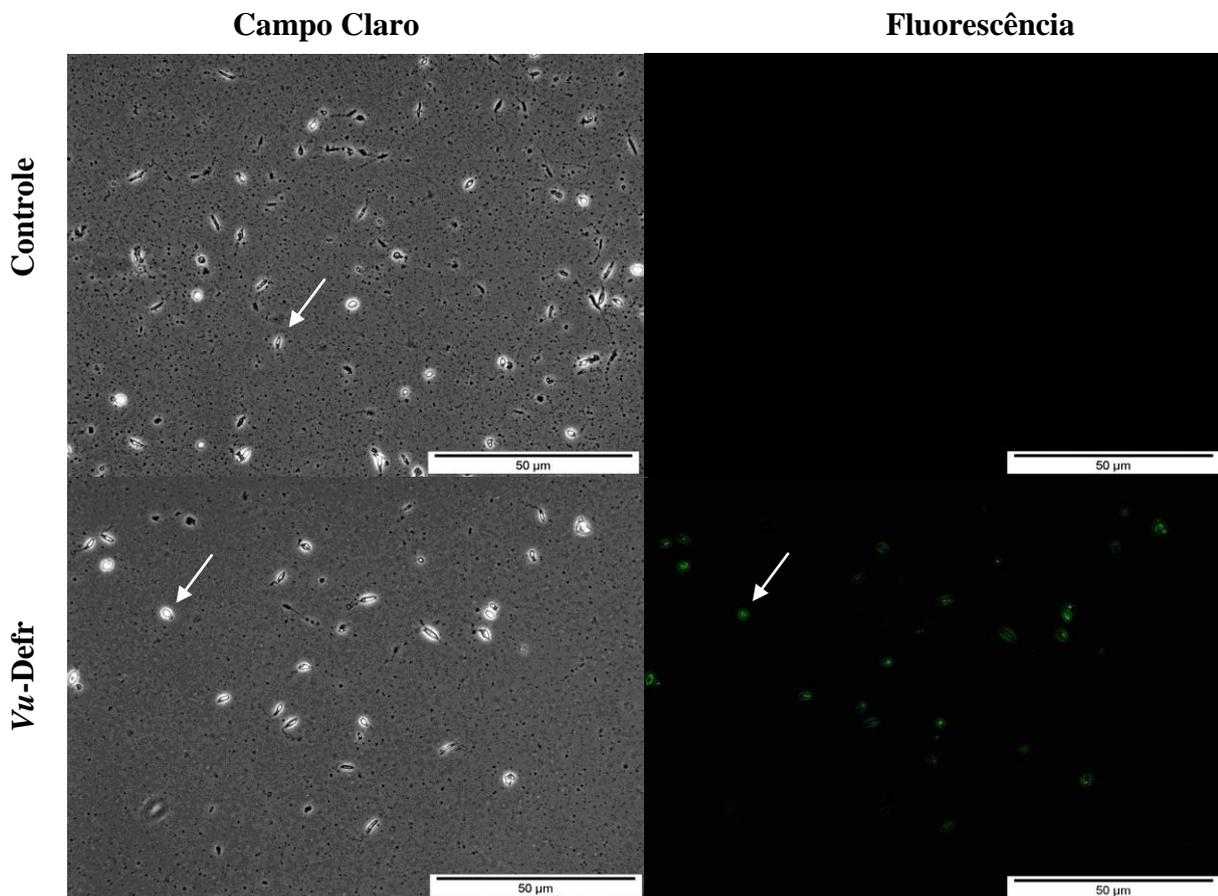


**Figura 13.** Ensaio de eliminação de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de *Vu-Defr* ao longo do tempo. As barras brancas representam os controles, as cinzas claro representam *Vu-Defr* e as pretas representam anfotericina B. O crescimento foi observado nos tempos de 0, 8, 16, 24, 32 e 48 h. Acima da barra da *Vu-Defr* é mostrada a porcentagem de inibição em relação aos seus respectivos controles. Para o tempo de 0 h, após o parasita ser adicionado ao meio contendo o *Vu-Defr* e anfotericina B, a cultura foi misturada homogeneamente e contada. As células do protozoário foram tratadas com uma droga de referencia, a anfotericina B, e foram completamente eliminadas em 8 h.

#### 4.4.3. Análise da permeabilização de membrana de *L. amazonensis* através do marcador *Sytox green*

Com o ponto de 24 h do ensaio de eliminação foi avaliada a permeabilização de membranas de células de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença da *Vu-Defr* ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para isso foi utilizado o corante *Sytox green* (Figura 14). Esse corante só penetra em células que apresentam a membrana plasmática comprometida e não entra em células com membrana íntegra. Apenas quando se ligam aos ácidos nucleicos é que passam a emitir fluorescência. Na fotomicrografia que indica o controle observado em fluorescência não visualizamos nenhuma fluorescência, indicando que a membrana do parasita permanece íntegra. Já na fotomicrografia que indica *Vu-Defr* quando observada em fluorescência

visualizamos algumas células fluorescentes, indicando, portanto que a membrana do parasita sofreu algum dano devido à presença da *Vu-Defr* no meio de incubação, permitindo a entrada do *Sytox green* na célula.

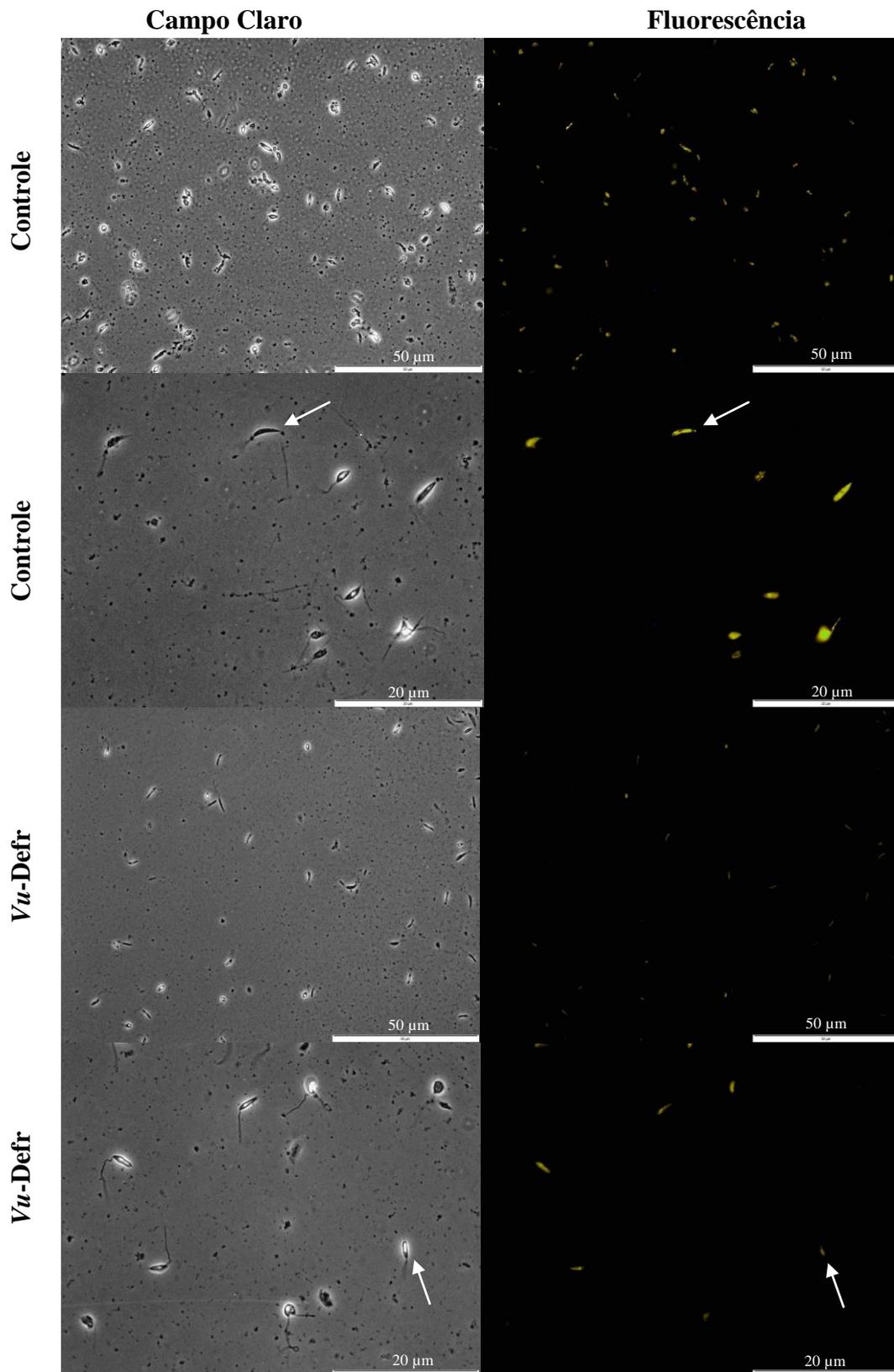


**Figura 14.** Fotomicrografia da permeabilização de membrana de células de *Leishmania amazonensis* tratadas com *Vu-Defr* ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 24 h e incubadas com o marcador fluorescente *Sytox green*. Note a fluorescência verde (seta) nas células tratadas com *Vu-Defr*, a qual indica permeabilização de membrana.

#### 4.4.4. Análise da funcionalidade mitocondrial de *L. amazonensis* através do corante rodamina 123

Com o ponto de 24 h do ensaio de inibição do crescimento foi avaliada a funcionalidade da mitocôndria de células de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença da *Vu-Defr* com a concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (figura 15). O corante utilizado (rodamina 123) marca mitocôndrias que estão funcionais. Nas fotomicrografias que indicam controle observado em fluorescência, observamos uma marcação bem forte nas mitocôndrias dos protozoários indicando que elas estão funcionais. Na fotomicrografia que indica *Vu-Defr* observadas em fluorescência é possível observar que a fluorescência aparece de forma mais

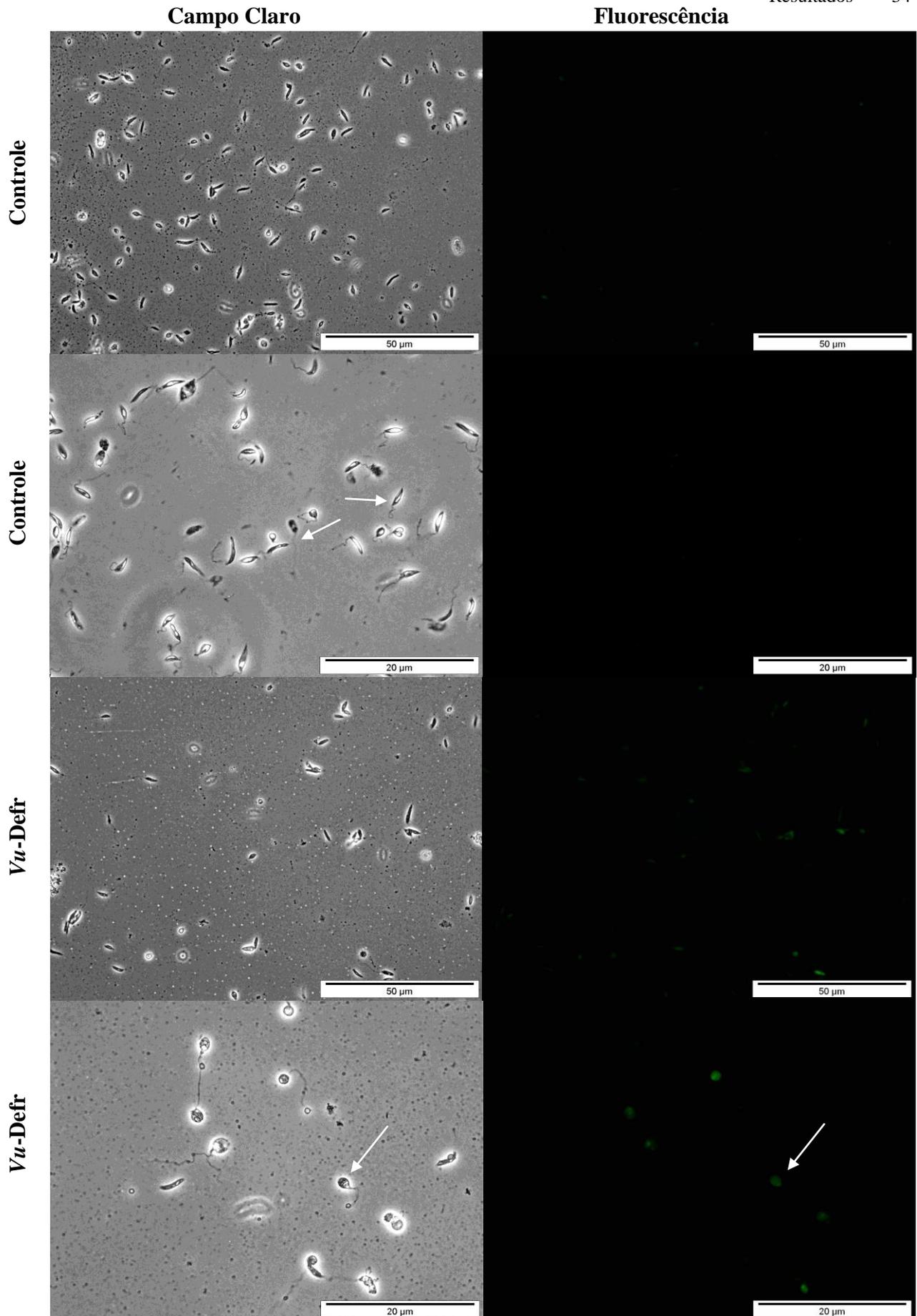
fraca quando comparada ao controle, indicando, portanto a perda da funcionalidade da mitocôndria.



**Figura 15.** Fotomicrografia da funcionalidade mitocondrial de células de *Leishmania amazonensis* tratadas com *Vu-Defr* ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) por 24 h e incubadas com o marcador Rodamina 123. Note a diminuição da fluorescência (seta) nas células tratadas com *Vu-Defr*.

#### **4.4.5. Efeito da *Vu-Defr* sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *L. amazonensis***

Com o ponto de 24 h do ensaio de inibição do crescimento foi avaliada a capacidade de produção de ROS em células de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença da *Vu-Defr* com a concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (figura 16). O corante utilizado (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) é sensível a ROS, ele penetra a célula e emite fluorescência quando sofre oxidação. Na fotomicrografia que indica *Vu-Defr* observadas em fluorescência é possível observar que a fluorescência aparece de forma mais forte quando comparada ao controle, indicando, portanto que a *Vu-Defr* nas condições desse teste é capaz de induzir a produção de ROS.



**Figura 16.** Fotomicrografia da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células de *Leishmania amazonensis* tratadas com Vu-Defr ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 24 h e incubadas com o marcador 2',7' diclorofluoresceína diacetato. Note a fluorescência (seta) nas células tratadas com Vu-Defr, indicando a indução de ROS nessas células. Souza, G. S.

#### **4.4.6. Efeito da *Vu-Defr* sobre a indução da produção endógena de óxido nítrico (NO) em *L. amazonensis***

Com o ponto de 24 h do ensaio de inibição do crescimento foi avaliado a capacidade de produção endógena de NO em células de *L. amazonensis* na ausência (controle) e na presença da *Vu-Defr* com concentração de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (resultados não mostrados). O corante utilizado (3-amino, 4-aminometil-2',7' diclorofluoresceína diacetato) é sensível a NO, ele penetra a célula e emite fluorescência quando entra em contato com o NO. Nesse teste não foi possível observar fluorescência no controle nem no tratado, indicando, portanto que a *Vu-Defr* nessas condições não induz a produção de NO.

## 5. Discussão

### 5.1. Expressão e purificação da Vu-Defr

Os AMPs de plantas podem ser obtidos através de extratos dos tecidos das plantas, no entanto existem dois principais impedimentos: AMPs de um modo geral estão presentes em baixas concentrações nos tecidos hospedeiros, o que requer uma grande quantidade de material biológico a ser processado e o segundo é a dificuldade de purificação, o que requer vários passos e/ou repetições, levando a um rendimento muito baixo no final do processo (Terras *et al.*, 1995; Odintsova *et al.*, 2008). Para aplicações que requerem maior quantidade de proteína como para estudos de estrutura tridimensional e relação estrutura função, há a necessidade de métodos que resultem em maior rendimento na obtenção de proteínas. Neste sentido a produção recombinante se torna uma atraente alternativa.

Porém para o uso das proteínas recombinantes tem que ser feito uma análise de qual é o melhor sistema de expressão e qual a melhor estratégia de purificação para a proteína será superexpressa (Gräslund *et al.*, 2008). Essa análise ajuda a evitar problemas frequentes que ocorrem na superexpressão de proteínas recombinantes como o enovelamento incorreto, dificuldade na formação de pontes dissulfeto, precipitação em corpos de inclusão e a não expressão da proteína, principalmente eucarióticas, que contém códons que raramente são usados pelas *E. coli*. Adicionalmente alguns vetores adicionam aminoácidos extras às proteínas recombinantes, sendo esta adição um requerimento da clonagem. Os problemas do enovelamento e da formação de pontes dissulfeto ainda podem levar a uma proteína recombinante que não tem atividade biológica (Gräslund *et al.*, 2008). Estes problemas são recorrentemente reportados em trabalhos de expressão heteróloga de proteínas. Marquès *et al.* (2009) expressaram a defensina AhPDF 1.1. em *E. coli* linhagem Rosetta sendo o peptídeo clonado no vetor pET-28-a(+). AhPDF 1.1. após a expressão em *E. coli* se acumulou em corpos de inclusão. Os autores para obterem a defensina ativa tiveram que fazer a desnaturação da AhPDF 1.1. e após a sua purificação fizeram a renaturação da mesma, o que torna o processo mais trabalhoso e com menor rendimento. Kovaleva *et al.* (2011) utilizaram a linhagem BL21 (DE3) com o vetor pET-42a, e conseguiram uma defensina solúvel, mas observaram que uma parte da proteína estava formando corpos de inclusão. Em relação à atividade biológica, Kristensen *et al.*, 1999 relataram que a defensina de folhas de *Beta vulgaris* (beterraba) AX2, na versão recombinante, apresentava uma pequena diferença na potência biológica. Diferentemente da AX2 natural, a AX2 recombinante tem uma potência

biológica menor, sendo necessária uma concentração maior de AX2 recombinante para inibir 50 % do crescimento do fungo *Cercospora beticola*, sendo esta diferença atribuída pelos autores à adição de um aminoácido extra na região N-terminal. Barlec *et al.* (2009) relataram que um peptídeo chamado brazeína, isolado da planta Africana *Pentadiplandra brazzeana*, o qual apresenta padrão muito similar de enovelamento com os observados nas defensinas de plantas e adicionalmente estimula a sensação de sabor doce em primatas, quando expressa recombinantemente apresentou menor intensidade de estímulo do sabor doce, e este fato, foi relacionado pelos autores a um enovelamento incorreto.

Para tentar evitar os problemas ligados à expressão de proteínas recombinantes, neste trabalho expressamos a defensina de feijão-de-corda (*Vu-Def*) no sistema de expressão formado por células de *E. coli* linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS e o plasmídeo pET-32 EK/LIC. A linhagem escolhida é derivada da BL21, porém desenhada para aumentar a expressão de proteínas eucarióticas, pois é suplementada com um vetor que contém condons de t-RNAs, o qual ajuda a superar o problema dos códons raros utilizados pelas *E. coli*, e também ajuda no enovelamento da proteína heteróloga, pois tem uma mutação nos genes tioredoxina redutase e glutathione redutase com isso ocorre um aumento na formação de pontes dissulfeto da proteína recombinante no citoplasma da bactéria. O plasmídeo usado contém uma cauda que consiste de duas regiões. A primeira é composta da proteína tioredoxina, que ajudará na solubilidade da proteína (Figura 5). A segunda região é composta por seis histidinas consecutivas, que irá auxiliar no processo de purificação. Esse sistema de superexpressão escolhido contém também o promotor T7 sob o controle do operador *lac* o que permite que a expressão da proteína só ocorra na presença do indutor IPTG. Este controle evita que a expressão ocorra de maneira casual minimizando a possibilidade de uma possível toxicidade que pode ser causado pela proteína recombinante e não permitindo a paralisação ou a diminuição do crescimento da bactéria transformada (Manual da Novagen, Competent Cells; Gräslund *et al.*, 2008). A superexpressão da *Vu-Def* ocorreu de forma satisfatória, pois apresentou proteínas solúveis (Figura 5) o que é um indicativo de que o enovelamento da proteína ocorreu corretamente.

Como já mencionado o plasmídeo utilizado possui uma região com seis histidinas, essa região possui afinidade ao metal  $Ni^{+}$ , portanto, para a purificação da *Vu-Def* foi utilizada a coluna de afinidade  $Ni^{+}$ -NTA agarose (Qiagen) (Figura 7). A *Vu-Def* não foi purificada no primeiro passo cromatográfico e este dado está de acordo com os resultados observados por

Kovaleva *et al.* (2011) e por Santos *et al.* (2010), que não apresentaram essa purificação inicial. Assim como nos trabalhos acima passamos para o passo de separação da proteína da cauda que contém a região para auxiliar a purificação. Em nosso trabalho assim como Santos *et al.* (2010) utilizamos a enzima enteroquinase (Figura 8). Outros autores usaram sistemas que geram caudas como glutatona S-transferase que usa cromatografia de afinidade à glutatona em vez de usar a enteroproteína enteroquinase, usaram Fator Xa para clivar a cauda GST da defensina (Kovaleva *et al.*, 2011). Outros autores não usam enzimas, preferem clivagem química como Marquès *et al.* (2009) que fez a clivagem da cauda de histidina com CNBr.

Após a clivagem o último passo cromatográfico foi a coluna de fase reversa C18 (Figura 9 e 10) e para confirmar o enovelamento correto da *Vu-Defr* sugerido pela solubilidade da proteína (Figura 5), foi feita a comparação dos espectros da *Vu-Defr* e da *Vu-Def* através do dicroísmo circular (Figura 11). A análise desses espectros mostra que eles possuem a mesma estrutura secundária composta principalmente por folhas  $\beta$ , que é uma característica presente nas defensinas de plantas (Samblanx *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006; Carvalho e Gomes, 2011; Thevissen *et al.*, 2013). Almeida *et al.* (2001) e Cabral *et al.* (2003) para confirmar o correto enovelamento da *Psd1r* também fizeram a comparação dos espectros da proteína recombinante com a natural, além de utilizarem espectrometria NMR e MOLDI-TOF, comparando assim suas estruturas terciárias e sua massa respectivamente.

## 5.2. Atividade biológica da *Vu-Defr*

Os resultados prévios, a solubilidade da *Vu-Defr* em gel (Figura 5) e o correto enovelamento (Figura 11), indicam que *Vu-Defr* estava biologicamente ativa. Para esta confirmação foi avaliada a funcionalidade da *Vu-Defr* por comparação da atividade da *Vu-Defr* e com a *Vu-Def* sobre o protozoário *L. amazonensis*. Ambas as defensinas se encontravam no mesmo meio e na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e apresentaram uma inibição em torno de 50 % em 48 h de incubação (Figura 12), comprovando que a *Vu-Defr* estava funcional. Após essa confirmação passamos a utilizar apenas a *Vu-Defr* para os demais testes.

Um novo ensaio de inibição foi realizado com a *Vu-Defr* nas mesmas condições do primeiro ensaio, porém este com a contagem das células de *L. amazonensis* de 8 em 8 h até 48 h. Nesse experimento observamos que nas primeiras 8 h de incubação  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  da

*Vu-Defr* foi capaz de eliminar 30,1 % dos protozoários (Figura 13) quando comparamos com o número de células presente no tempo zero, pois houve uma diminuição de  $1,375 \times 10^6$  para  $0,975 \times 10^6$  células/mL. As células de *L. amazonensis* que sobreviveram a esse primeiro contato com o peptídeo correspondem a 69,9 % do número de células iniciais (tempo zero). Quando passamos para o próximo tempo, observamos que o número de parasitas presentes no tratado não teve uma eliminação significativa, passando a ter  $0,925 \times 10^6$  células/mL indicando que não há mais peptídeo suficiente no meio para eliminar, mas que conseguiu retardar a retomada da proliferação de parasitas. O controle desse tempo continuou crescendo aumentando em 21,4 % o número de células de parasita quando comparado ao controle do tempo zero, com isso quando comparamos o tratado e o controle nesse tempo de 16 h a eliminação é de 47,9 %. No tempo de 24 h o número de parasitas no tratado passou para  $1,2 \times 10^6$  células/mL comparando com o tempo zero, portanto o parasita começou a crescer novamente. Esse aumento pode ser observado nos tempos de 24, 32 e 48 h (Figura 13).

Alguns trabalhos relacionam a atividade microbicida de AMPs sobre *Leishmania sp.* Bera *et al.* (2003) testaram três AMPs, indolicitina e outros dois peptídeos derivados da seminalplasma, SPFK e 27RP, e viram que esses AMPs possuíam atividade antileishmanicida com LD<sub>50</sub> nas seguintes concentrações  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4}$  e  $5 \times 10^{-8}$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Berrocal-Lobo *et al.* (2009) testaram quatro AMPs, tionina de trigo, LTP de cevada, defensina de batata (PTH1) e esnakinas, sobre *L. donovani*. Desses peptídeos testados apenas a PTH1 e a tionina apresentaram atividade contra *L. donovani*, o LD<sub>50</sub> delas é 33,4  $\mu\text{M}$  e 5,9  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Já foi demonstrado anteriormente que, as defensinas de plantas tem efeito fungistático ou fungicida dependendo da sua concentração, o efeito fungicida já foi demonstrado nas defensinas *Hs-AMP*<sub>1</sub>, *Rs-AFP*<sub>2</sub>, *Dm-AMP*<sub>1</sub> (Thevissen *et al.*, 2007) e NaD1 (van de Weerden *et al.*, 2010). Deste modo, acreditamos que no teste com diferentes tempos a quantidade de *Vu-Defr* utilizada não foi suficientemente tóxica para toda a população, mantendo dessa forma células viáveis, que depois de um determinado tempo continuaram o seu crescimento.

Em relação aos processos fisiológicos e morfológicos que levam a inibição do crescimento de culturas de microrganismos por AMPs, já foram demonstradas alterações na membrana plasmática levando ao aumento da permeabilidade, interação com alvos intracelulares e indução de mudanças bioquímicas que levam a apoptose (Bera *et al.*, 2003;

Mangoni *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006; Berrocal-Lobo *et al.*, 2009; Simmaco *et al.*, 2009; McGwire e Kulkarni, 2010).

Em nosso estudo assim conseguimos observar que  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de *Vu-Defr* é capaz de induzir a permeabilização de membrana (Figura 14), diminuir a funcionalidade mitocondrial (Figura 15) e a produção de ROS (Figura 16). Alguns autores reportaram que entre os processos biológicos que levam a inibição de microrganismos por AMPs está a permeabilização da membrana plasmática. van der Weerden *et al* (2010) descrevem que a defensina NaD1, o AMP híbrido cecropina-melitina CP-29, o peptídeo bovino BMAP-28 e o peptídeo humano LL-37 causam a permeabilização da membrana do fungo *Fusarium oxysporum*. Thevissen *et al.* (1999) relataram a permeabilização de membrana causada pela defensina de rabanete *Rs-AFP<sub>2</sub>* sobre o fungo *Neurospora crassa*. Estes estudos foram feitos com um corante fluorescente que só penetra células que estão estruturalmente com as membranas comprometidas onde a função de barreira seletiva foi comprometida pela interação desta com AMPs. Análise por microscopia mostra que a membrana de alguns microrganismos está estruturalmente danificadas. Wua *et al.* (2010) mostrou o dano estrutural na membrana de *Escherichia coli* tratada com um peptídeo análogo da tanatina, originalmente isolado de insetos, por microscopia eletrônica de transmissão e Mangoni *et al.* (2005) mostraram um efeito similar na membrana de *L. donovani* tratada com temporina, isolada da pele de sapo. O resultado mostrado neste trabalho (Figura 14) mostra que a membrana de *L. amazonensis* estava permeabilizada para o corante fluorescente *Sytox green*, permeabilização causada pela exposição à *Vu-Defr*.

É conhecido que ROS são geradas por células infectadas por patógenos para combater infecções. ROS também podem ser gerados em resposta a algumas substâncias, sendo esta propriedade importante porque causam destruição de componentes macromoleculares da célula causando inibição (Fonseca-Silva *et al.*, 2011). Em nossos estudos assim como visto no trabalho de Fonseca-Silva *et al.* (2011) conseguimos observar que  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de *Vu-Defr* foi capaz de induzir a produção de ROS (Figura 16) e de diminuir a funcionalidade mitocondrial (Figura 15). A indução de ROS já foi relacionada à inibição da levedura *C. albicans* tratada com a defensina *Rs-AFP<sub>2</sub>* (Aerts *et al.*, 2007). Estes autores também demonstraram que o tratamento da levedura com ácido ascórbico, um anti oxidante, revertia o efeito provocado pela *Rs-AFP<sub>2</sub>*, mostrando uma ligação direta da indução de ROS e do efeito inibitório. Em relação à disfunção mitocondrial, Luque-Ortega *et al.* (2008) demonstraram

que histatina-5, um peptídeo isolado da saliva humana, causa morte de *L. donovani* afetando a funcionalidade mitocondrial levando o protozoário a um colapso energético. Adicionalmente os autores também observaram a permeabilização de membrana, sendo o dano mostrado pelo ensaio de permeabilização com o corante *Sytox green* e por microscopia eletrônica.

Em relação aos mecanismos envolvidos na inibição ou morte do microrganismo por AMPs estão envolvidas alterações morfológicas e fisiológicas como demonstrado pelos exemplos citados acima. A elucidação destes mecanismos poderão futuramente pavimentar o caminho para um melhor entendimento deste processo inibitório e a possibilidade de usarmos AMPs biotecnologicamente, como por exemplo, para o desenvolvimento de drogas para tratamento de doenças.

## 6. Conclusão

- É possível concluir que a *Vu-Defr* e a *Vu-Def* possuem a mesma estrutura secundária, portanto, o enovelamento da proteína recombinante está ocorrendo corretamente;
- A *Vu-Defr* está funcional, pois assim como *Vu-Def* é capaz de inibir 50 % do crescimento da cultura de *L. amazonensis* na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;
- *Vu-Defr* é capaz de eliminar 30,1 % das células de *L. amazonensis* na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ;
- A *Vu-Defr* é capaz de permeabilizar a membrana das células de *L. amazonensis*;
- Na presença da *Vu-Defr* ocorre perda da funcionalidade mitocondrial da *L. amazonensis*;
- Nas condições testadas a *Vu-Defr* é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, porém não é capaz de induzir a produção de óxido nítrico em células de *L. amazonensis*.

## 7. Bibliografia

- Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, François IEJA, Madeo F, Santos R, Cammue BPA, Thevissen K (2009). The antifungal plant defensin *RsAFP<sub>2</sub>* from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett*, 583:2513-2516.
- Aerts AM, François IEJA, Cammue BPA, Thevissen K (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci*, 65:2069-79.
- Aerts AM François IEJA, Meert EMK, Li Q-T, Cammue BPA, Thevissen K (2007). The antifungal activity of *Rs-AFP<sub>2</sub>*, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13:243-247.
- Allen A, Snyder AK, Preuss M, Nielsen EE, Shah DM, Smith TJ (2008). Plant defensins and virally encoded fungal toxin KP4 inhibit plant root growth. *Planta*, 227: 331-339.
- Almeida MS, Cabral KS, Medeiros LN, Valente AP, Almeida FCL, Kurtenbach E (2001). cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein *Psd1* in the yeast *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, 15: 199-207.
- Almeida MS, Cabral KMS, Kurtenbach E, Almeida FCL, Valente AP (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J Mol Biol*, 315:749-757.
- Anaya-lópez JL, López-Meza JE, Baizabal-Aguirre VM, Cano-Camacho H, Ochoa-Zarzosa A (2006). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol Lett*, 28: 1101-1108.
- Benko-iseppon AM, Galdino SL, Calsa Jr. T, Kido EA, Tossi A, Belarmino LC and Crovella S (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pep Sci*, 11:181-188.
- Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasit*, 127: 23-35.
- Berlec A, Strukelj B (2009). Large increase in brazzein expression achieved by changing the plasmid/strain combination of the NICE system in *Lactococcus lactis*. *Lett in Appl Microbiol*, 48: 750-755.
- Berrocal-Lobo M, Molina A, Rodríguez-Palenzuela P, García-Olmedo F, Rivas L (2009). *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp Parasitol*, 122: 247-249.

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brenzan MA, Santos AO, Nakamura CV, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Correa AG, Alvim Junior J, Morgado-Díaz JA, Cortez DAG (2012) Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine*, 19: 223-230.
- Cabral KMS, Almeida MS, Valente AP, Almeida FCL, Kurtenbach E (2003). Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (Psd 1) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expr Purif*, 31: 115-122.
- Carvalho AO e Gomes VM (2011). Plant defensins and defensin-like-peptides biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*, 17(38):4270-93.
- Carvalho AO e Gomes VM (2009). Plant defensins – prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30:1007-1020.
- Carvalho AO, Filho GAS, Ferreira BS, Branco AT, Okorokova-Façanha AL, Gomes VM (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein Pept Lett*, 13: 1029-36.
- Carvalho AO, Machado OLT, Da Cunha M, Santos IS, Gomes VM (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol Biochem*, 39: 137-146.
- Cobb SL e Denny PW (2010). Antimicrobial peptides for leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs*, 11(8):868-875.
- Colilla FJ, Rocher A, Mendez E (1990). Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett*, 270: 191-194.
- De Coninck B, Cammue BPA, Thevissen K (2013). Modes of antifungal action and *in planta* functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Review*, 26: 109-120.
- De Coninck BMA, Sels J, Venmans E, Thys W, Goderis IJWM, Carron D, Delauré SL, Cammue BPA, De Bolle MFC, Mathys J (2010). *Arabidopsis thaliana* plant defensin AtPDF 1.1 is involved in the plant response to biotic stress. *New Phytologist*, 187: 1075-1088.
- Do HM, Lee SC, Jung HW, Sohn KH, Hwang BK (2004). Differential expression and *in situ* localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Plant Sci*, 166:1297-1305.

- Doughty J, Dixon S, Hiscock SJ, Willis AC, Parkin IAP, Dickinson HG (1998). PCP-A1, a defensin-like brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell*, 10: 1333-1347.
- Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE (2011). Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLOS One*, 6: 14666-
- Games PD, Santos IS, Mello EO, Diz MS, Carvalho AO, de Souza-Filho GA, Da Cunha M, Vasconcelos IM, Ferreira Bdos S, Gomes VM (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29:2090-2100.
- Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Woerner BM, Stark DM, Liang J, Rommens CM (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat Biotechnol*, 18:1307-1310.
- Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *CEJB*, 2(1):1-33.
- Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park H, Savchenk A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büssov K, Gunsalus KC (2008) Protein production and purification. *Nat Methods*, 5: 135-146.
- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM (2010). Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*, 135: 1-11.
- Glossário de doenças da Fiocruz: acessado no dia 01/03/12  
(<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm>)
- Huang GJ, Lai HC, Chang YS, Sheu MJ, Lu TL, Huang SS, Lin YH (2008). Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from

- sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam. 'Tainong 57'] storage roots. *J Agric Food Chem*, 56:2989-2995.
- Janssen BJC, Schirr HJ, Lay FT, Anderson MA, Craik DJ (2003). Structure of *Petunia hybrida* defensin1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry*, 42: 8214-22.
- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 19(3): 491-511.
- Jha S e Chattoo BB (2010). Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Res*, 19: 373–384.
- Kant P, Liu W-Z, Pauls KP (2009). PDC1, a corn defensin peptide expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* inhibits growth of *Fusarium graminearum*. *Peptides*, 30:1593-1599.
- Kovaleva V, Krynytskyy H, Gout I, Gout R (2011). Recombinant expression, affinity purification and functional characterization of Scots pine defensin 1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(4): 1093-101.
- Kragh KM, Nielsen JE, Nielsen KK, Dreboldt S, Mikkelsen JD (1995). Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 8:424-434.
- Kristensen AK, Brunstedt J, Nielsen JE, Mikkelsen JD, Roepstorff P, Nielsen KK (1999). Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 16:377-387.
- Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS, (2006). The major surface-metalloprotease of parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol*, 62:1484-1497.
- Kushmerick C, Castro MS, Cruz JS, Bloch Jr C, Beirão PSL (1998). Functional and structural features of gamma-zethionins, a new class of sodium channel blockers. *FEBS Lett*, 440:302-306.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA (2003). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol*, 131:1283-1293.
- Li D, Li J (2009). Antifungal activity of a recombinant defensin CADEF1 produced by *Escherichia coli*. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 1911-1918.

- Liu, Y-J, Chen C-S, Lai S-M, Hsu M-P, Chen C-S, Lyu P-C (2006). Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins*, 63:777-786.
- Lynn MA, Kindrachuk J, Marr AK, Jenssen H, Panté N, Elliott MR, Napper S, Hancock RE, McMaster WR (2011). Effect of BMAP-28 antimicrobial peptides on *Leishmania major* promastigote and amastigote growth: role of Leishmanolysin in parasite survival. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5):e1141. doi:10.1371/journal.pntd.0001141
- Lobo DS, Pereira IB, Fragel-Madeira L, Medeiros LN, Cabral LM, Faria J, Bellio M, Campos RC, Linden R, Kurtenbach E (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa cyclin F* related to the cell cycle. *Biochemistry*, 46:987-996.
- Luque-Ortega JR, van't Hof W, Veerman ECL, Saugar JM, Rivas L (2008). The human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *FASEB J*, 22:1817-1828.
- Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D (2004). Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 14:984-990.
- Marquès L, Oomen RJ, Aumelas A, Le Jean M, Berthomieu P (2009). Production of an *Arabidopsis halleri* foliar defensin in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*, 106:1640-1648.
- Marr AK, McGwire BS, McMaster WR (2012). Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiology*, 7(9): 1047-1059.
- McGwire BS e Kulkarni MM (2010). Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology*, 126: 397-405.
- Mello EO, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Santos IS, Da Cunha M, Santa-Catarina C, Gomes VM (2011). The antifungal activity of PvD1, a plant seed defensin of *Phaseolus vulgaris*, involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of reactive oxygen species in yeast cells. *Curr Microbiol*, 62:1209-1217.
- Mendez E, Rocher A, Calero M, Girbes T, Citores L, Soriano F (1996). Primary structure of omega-hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur J Biochem*, 239:67-73.
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, Soriano F, Salinas M, Haro C (1990). Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin,  $\gamma$ -hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem*, 194:533-539.

- Meyer B, Houlné C, Pozueta-Romeró J, Schantz M-L, Schantz R (1996). Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. *Plant Physiol*, 112: 615-622.
- Mihajlovic M e Lazaridis T (2010). Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim Biophys Acta*, 1798:14894–1502.
- Mirouze M, Sels J, Richard O, Czernic P, Loubet S, Jacquier A, François IE, Cammue BP, Lebrun M, Berthomieu P, Marquès L (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J*, 47: 329-342.
- Odintsova TI, Rogozhin EA, Baranov Y, Musolyamov AK, Yalpani N, Egorov TA, Grishin EV (2008). Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie*, 90: 1667-1673.
- Osborn RW, De Samblanx GW, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenborough S, Rees SB, Broekaert WF (1995). Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett*, 368:257-262.
- Park HC, Kang YH, Chun HJ, Koo JC, Cheong YH, Kim CY, Kim MC, Chung WS, Kim JC, Yoo JH, Koo SC, Lim CO, Lee SY, Cho MJ (2002). Characterization of a stamenspecific cDNA encoding a novel plant defensin in chinese cabbage. *Plant Mol Biol*, 50:59-69.
- Penninckx IA, Eggermont K, Terras FR, Thomma BP, De Samblanx GW, Buchala A, Métraux JP, Manners JM, Broekaert WF (1996). Pathogeninduced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 8:2309-2323.
- Pérez-Cordero JJ, Lozano JM, Cotés J, Delgado G, (2011). Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in na infection model with human dendritic cells. *Peptides*, 32:683-690.
- Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int J Antimicrob Agents*, 24:536-547.
- Samblanx GW, Goderis IJ, Thevissen K, Raemaekers R, Fant F, Borremans F, Acland DP, Osborn RW, Patel S, Broekaert WF (1997). Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 1171-1179.
- Santos IS, Carvalho AO, Souza-Filho GA, Nascimento VV, Machado OLT, Gomes VM, (2010). Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Protein Expr Purif*, 71 :8-15.

- Schägger H e von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166:368-379.
- Secretaria de Vigilância em Saúde: acessado no dia 16/10/13.  
([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_doenca\\_de\\_chagas.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_doenca_de_chagas.pdf))
- Singh N, Kumar M, Singh RK (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 485-497.
- Silva EC, Rayol CD, Medeiros PL, Figueiredo RCBQ, Piuveza MR, Brabosa-Filho JM, Marinho AF, Silva TG, Militão GCG, Casilhas APP, Andrade PP (2012) Antileishmanial activity of Warifteine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *The Scientific World Journal* doi:10.1100/2012/516408
- Silverstein KAT, Moskal Jr WA, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, VandenBosch KA (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J.*, 51:262-280.
- Simmaco M, Kreil G, Barra D (2009). Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788: 1551-1555.
- Slavokhotova AA, Odintsova TI, Rogozhin EA, Musolyamov AK, Andreev YA, Grishin EV, Egorov TA (2011). Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. *Biochimie*, 93:450-456.
- Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, Hockerman GH (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol*, 135:2055-2067.
- Solis J, Medrano G, Ghislain M (2007). Inhibitory effect of a defensin gene from the andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol*, 164:1071-82.
- Souza GS, Nascimento VV, Carvalho LP, Melo EJT, Fernandes KV, Machado OLT, Retamal CA, Gomes VM, Carvalho AO (2013). Activity of recombinant and natural defensin from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, 135: 116-125.
- Souza GS (2012). Padronização da superexpressão e purificação da defensina recombinante de feijão-de-corda e teste de sua atividade inibitória contra *Leishmania amazonensis*. Monografia apresentada no Centro de Biociências e Biotecnologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V, Raikhel NV, Osborn RW, Kester A, et al. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7:573-588.

- Terras FRG, Torrekens S, Van Leuven F, Osborn RW, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett*, 316:233-240.
- Terras FR, Schoofs HM, De Bolle MF, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J Biol Chem*, 267: 15301-15309.
- Thevissen K, Warnecke DC, François IEJA, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BPHJ, Ferket KKA, Cammue BPA (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, 279(6):3900-3905.
- Thevissen K, François IEJA, Takemoto JY, Ferket KKA, Meert EMK, Cammue BPA (2003a). Dm-AMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 226:169-173.
- Thevissen K, Ferket KKA, François IEJA, Cammue BPA (2003b). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24:1705-1712.
- Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 5451-8.
- Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl H-G (2012). Antimicrobial host defensins – specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Frontiers in immunology*, 3(249):1-4.
- van der Weerden NL, Hancock REW, Anderson MA (2010). Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.*, 285: 37513-37520.
- Wijaya R, Neumann GM, Condrón R, Hughes AB, Poly GM (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci*, 159:243-255.
- Wilmes M, Cammue BPA, Sahl HG, Thevissen K (2011). Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1350.
- Wong JH, Ng TB, Cheung RCF, Ye XJ, Wang HX, Lam SK, Lin P, Chan YS, Fang EF, Ngai PHK, Xia LX, Ye XY, Jiang Y, Liu F (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87:1221–1235.
- Wong JH, Zhang XQ, Wang HX, Ng TB (2006). A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides*, 27:2075-2081.

- Wong JH, Ng TB (2003). Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill). *Peptides*, 24:963-968.
- Wua G, Wub H, Li L, Fan X, Ding J, Li X, Xi T, Shen Z (2010). Membranes aggregation and perturbation induced by antimicrobial peptide of S-thanatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395: 31-35.
- Ye XY, Ng TB (2001). Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochem Biophys Res Commun*, 285:424-429.

# 8. Anexo