

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E EVENTOS BIOQUÍMICOS LIGADOS À
MORTE CELULAR PROGRAMADA EM TEGUMENTOS DE SEMENTES DE
Glycine max EM GERMINAÇÃO

GUSTAVO LEMOS ROCHA

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JULHO DE 2017

GUSTAVO LEMOS ROCHA

- **ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E EVENTOS BIOQUÍMICOS LIGADOS À MORTE CELULAR PROGRAMADA EM TEGUMENTOS DE SEMENTES DE *Glycine max* EM GERMINAÇÃO:**

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes

**Campos dos Goytacazes - RJ
Julho de 2017**

- ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS E EVENTOS BIOQUÍMICOS LIGADOS À MORTE CELULAR PROGRAMADA EM TEGUMENTOS DE SEMENTES DE *Glycine max* EM GERMINAÇÃO

GUSTAVO LEMOS ROCHA

Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Aprovada por:

Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos (D. Sc., Bioquímica) - UFC

Dr. Fábio Lopes Olivares (D. Sc., Agronomia) - UENF

Dra. Olga Lima Tavares Machado (D. Sc., Bioquímica) - UENF

Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes (PhD, Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas) - UENF (orientadora)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sob orientação da Dr^a Kátia Valevski Sales Fernandes, financiado pela CAPES, CNPq e UENF.

Agradecimentos

Agradeço ao Criador pelas oportunidades de continuar aprendendo, tendo experiências maravilhosas dentro da área pelo qual sou apaixonado e pela chance de conhecer pessoas que ficarão sempre registradas nesse capítulo da minha história.

À minha orientadora Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes por todo o apoio, estímulo, confiança, dedicação e compreensão, assim como por todos os ensinamentos prestados ao longo desses anos da minha trajetória, desde a iniciação científica.

Aos membros da banca de defesa de tese que aceitaram de prontidão o convite para participação.

Ao Dr. Gabriel Bonan Taveira por ter aceitado revisar essa tese.

Ao Dr. André de Oliveira Carvalho, por todo o estímulo com os experimentos de biologia molecular, e à equipe do LFBM por estar sempre solícita e pela amizade.

À professora Dr^a. Maura da Cunha e toda a sua equipe, pelo apoio na parte de microscopia óptica e eletrônica de transmissão, além da amizade. Agradecimentos particulares à Fernanda, Camilla e Saulo pela parceria.

À professora Dr^a. Elenir Amâncio Oliveira e sua equipe por todo o apoio, prontidão e companheirismo.

À Giovana, técnica do setor de preparo de amostras do LBCT, pela ajuda na obtenção dos cortes em microscopia.

Aos professores, alunos e técnicos do LQFPP, que sempre estiveram de prontidão no auxílio na operação de equipamentos, esclarecimento de dúvidas e discussões.

Aos amigos Dayanni, Nathália, Lucilene, Jucélia, Janaína, Daniel, Gustavo e Cristóvão pelo incentivo e companheirismo.

À minha família, Gerlane, Gilmar, Gabriel e Judithy, pelo apoio incondicional, pela compreensão e por todo esforço para garantir a minha busca pelos meus objetivos.

À minha companheira Elaine por estar sempre ao meu lado, dando-me forças para enfrentar os desafios e seguir em frente, e dando-me segurança, em todos os sentidos, inclusive ao me fazer companhia em situações críticas de experimentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO	1
1.1- Proteases e suas funções nos organismos	1
1.2 - Morte celular programada.....	3
1.3 - Morte Celular Programada em Plantas.....	6
1.4 - Proteases cisteínicas e sua conexão com morte celular programada em plantas	8
1.5 - Metacaspases e morte celular programada em plantas	11
1.6 - Morte celular programada em sementes	16
1.7 - Morte celular programada e o tegumento de sementes	17
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 - Objetivo geral	23
2.2 - Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E METODOLOGIAS	24
3.1 - Materiais	24
3.2 - Esterilização das sementes	24
3.3 - Testes de embebição	24
3.4 - Análises estatísticas	24
3.5 - Remoção de pigmentos.....	25
3.6 - Extração proteica das amostras vegetais (I).....	25
3.7 - Extração proteica das amostras vegetais (II).....	26
3.8 - Dosagem de proteínas por BCA (Ácido Bicinconínico).....	26
3.9 - Eletroforese SDS-PAGE	26
3.10 - Eletroforese SDS-PAGE gelatina (Zimografia)	27
3.11 - Eletroforese SDS-PAGE gelatina (Zimografia) na presença e na ausência de inibidores de proteases.....	27
3.12 - Coloração por Coomassie Brilliant Blue e descoloração	28
3.13 - Ensaio de autólise de amostras de tegumento de sementes quiescentes	28

3.14 - Revelação por precipitação de nitrato de prata	29
3.15 - Eletroforese bi-dimensional para amostras de tegumento quiescente ...	30
3.16 - Preparo de amostra para identificação de peptídeos por espectrometria de massas	30
3.17 - Identificação de proteínas por espectrometria de massas.....	31
3.18 - Extração de proteínas do tipo globulinas e albuminas.....	32
3.19 - Análise da clivagem de substratos identificados por espectrometria de massas	32
3.20 - Avaliação do efeito do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO sobre o processo de germinação.....	33
3.21 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-VAD-fmk para amostras embebidas na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO	33
3.22 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-VEID-pNa na presença e na ausência do inibidor Ac-VEID-CHO	34
3.23 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-YVAD-fmk na presença e na ausência do inibidor Ac-YVAD-CHO	35
3.24 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Z-GGR-MCA.....	35
3.25 - Detecção de oligonucleossomos para as amostras de tegumento após a embebição	36
3.26 - Visualização da formação de “escada de DNA” - DNA ladder - em diferentes tempos após a embebição	37
3.27 - Obtenção da fração de proteínas citosólicas e mitocondriais a partir de sementes em diferentes estágios após a embebição	38
3.28 - “Western blotting” das frações de proteínas mitocondriais e citosólicas empregando o anticorpo anti-citocromo c.....	38
3.29 – Determinação da atividade da citocromo c oxidase.....	40
3.30 - Análise micro-morfológica do tegumento de sementes soja (<i>Glycine max</i>) ao longo do processo de germinação por microscopia óptica	40
3.31 - Análise subcelular do tegumento de sementes de soja (<i>Glycine max</i>) durante processo de germinação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	41
4.0. RESULTADOS.....	42
4.1 - Perfil proteico do tegumento de sementes de soja quiescentes e em diferentes tempos após a embebição	42
4.2 - Análise do padrão de atividades enzimáticas do tegumento de soja em diferentes tempos após a embebição, por zimografia	42
4.3 - Ensaio de autólise para extratos de tegumentos de sementes quiescentes de soja	47
4.4 - Eletroforese bidimensional para amostras de tegumento quiescente	48
4.5- Identificação de peptídeos por espectrometria de massas.....	49
4.6 - Análise da clivagem de substratos identificados por espectrometria de massas	58

4.7 - Análise do padrão de globulinas do tegumento de sementes de soja no estágio quiescente e em diferentes tempos após a embebição	59
4.8 - Avaliação de parâmetros fenotípicos do processo de germinação na presença do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO	60
4.9 - Eletroforeses do tipo SDS-PAGE-gelatina de proteínas de tegumentos das sementes e plântulas embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO e DMSO	64
4.10 - Eletroforese SDS-PAGE-gelatina para o eixo hipocótilo/radícula das sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO e DMSO	66
4.11 - Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato pancaspase Ac-VAD-fmk de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO	68
4.12- Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato Ac-VEID-pNa de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO	69
4.13 - Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato Ac-YVAD-fmk de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-YVAD-CHO.....	70
4.14 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Z-GGR-MCA de sementes embebidas na presença e ausência do inibidor H-EGR-cmk	71
4.15 - Detecção de oligonucleossomos em amostras de tegumentos em diferentes tempos após embebição	72
4.16 - Visualização da formação de “escada de DNA” (DNA laddering) em diferentes tempos após a embebição	73
4.17 - Detecção de citocromo c em frações mitocondriais e citosólicas de tegumentos de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição, por “Western blot”	74
4.18 – Atividade da citocromo c oxidase em frações citosólicas e mitocondriais de tegumentos	77
4.19 – Análise do tegumento de soja (<i>G. max</i>) durante processo de germinação por microscopia óptica	77
4.19 – Análise ultraestrutural do tegumento de sementes de soja (<i>G. max</i>) durante o processo de germinação	79
5.0 – DISCUSSÃO	81
6.0 – CONCLUSÕES	92
PERSPECTIVAS.....	93
7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de clivagem das quatro principais classes catalíticas das proteases.....	2
Figura 2: Principais vias apoptóticas em células animais.....	5
Figura 3: Representação dos principais domínios das caspases, metacaspases e paracaspases.	12
Figura 4: Modelo proposto de cascata de eventos proteolíticos disparados por um sinal indutor de morte em sistemas de morte celular programada de plantas.....	14
Figura 5: Eletroforese SDS-PAGE com gel a 12% para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4µg de proteínas/poço). Revelação por nitrato de prata.	42
Figura 6: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade de proteases cisteínicas por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de E-64 (10 µM).	43
Figura 7: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade de proteases cisteínicas (pH 7,5) por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de ácido iodoacético (5 mM). ..	44
Figura 8: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade suplementado com zinco por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de EDTA (10 mM).	45
Figura 9: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão acetato de sódio 50 mM, 1 mM DTT pH 5,6 por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de Ac-VAD-CHO (100 µM).	46

Figura 10: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão Tris/HCl 50 mM, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM CaCl ₂ pH 7,5 por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de H-EGR-fmk (100 µM).....	47
Figura 11: Eletroforese SDS-PAGE (12%) para amostras de tegumentos de sementes quiescentes de soja, incubadas com tampão citrato-fosfato 100 mM, DTT 1,5 mM e 0,1% de Triton X-100 por 16 h, a 37°C (Inc), sem incubação (Cont) e incubadas na presença de Ac-VAD-CHO 20 µM (+VAD).	48
Figura 12: Eletroforese bidimensional para proteínas de massa molecular superior a 66KDa das amostras de tegumentos de sementes quiescentes.....	49
Figura 13: Visualização eletroforética (SDS-PAGE 10%) do inibidor de tripsina de soja (Intrip), da fração de proteínas globulares (Glob) e da fração de proteínas albumínicas (Alb) antes da incubação (A) e após a incubação (B) com o extrato de tegumento quiescente de soja em tampão de atividade de proteases cisteínicas.	58
Figura 14: Visualização eletroforética (SDS-PAGE 15%) da fração de globulinas de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes tempos após a embebição. Revelação por precipitação de nitrato de prata.	59
Figura 15: Sementes e plântulas nos tempos de 6, 12, 24 (A), 36, 48, 60 e 72 HAE (B).	61
Figura 16: Peso das sementes (g) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM).....	62
Figura 17: Comprimento das sementes (mm) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM).	63
Figura 18: Largura das sementes (mm) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM).	63
Figura 19: Comprimento das radículas das plântulas (mm) após 36 horas de embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM).	64
Figura 20: Zimografias dos tegumentos das sementes e plântulas em diferentes tempos após a embebição e sob os tratamentos com o inibidor pancaspase e seus devidos controles. Os números representam as massas moleculares dos marcadores.	65

Figura 21: Zimografias do eixo hipocótilo/radícula das sementes e plântulas em diferentes tempos após a embebição e sob os tratamentos com o inibidor pancaspase e seus devidos controles.....	67
Figura 22: Determinação da atividade contra o substrato pancaspase Ac-VAD-fmk em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6, após o processo de embebição, para as amostras obtidas em diferentes tempos após a embebição. Barra hachurada clara= sem o inibidor; barra hachurada escura= na presença do inibidor.....	68
Figura 23: Determinação da atividade contra o substrato Ac-VEID-pNa (caspase 6), na presença e na ausência de Ac-VEID-CHO ao longo do processo de germinação, para as amostras obtidas a partir de vários tempos após a embebição e no estágio quiescente (0 HAE)..	69
Figura 24: Determinação da atividade contra o substrato Ac-YVAD-fmk (caspase 1), na presença e na ausência de Ac-YVAD-CHO ao longo do processo de germinação, para as amostras obtidas a partir de vários tempos após a embebição e no estágio quiescente (0 HAE)..	70
Figura 25: Determinação da atividade contra o substrato Z-GGR-MCA (metacaspases) na ausência e na presença do inibidor H-EGR-cmk, ao longo do processo de germinação.	71
Figura 26: Enriquecimento de DNA oligonucleosomal em frações citoplasmáticas de tegumentos de <i>Glycine max</i> ao longo da germinação.....	72
Figura 27: Gel de agarose para visualização de DNA extraído a partir do tegumento de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição.	73
Figura 28: Detecção da presença do citocromo c na fração mitocondrial de tegumentos de sementes em diferentes tempos após a embebição.....	75
Figura 29: Detecção da presença do citocromo c na fração citosólica de tegumentos de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição.	76
Figura 30: Tegumento da semente de <i>Glycine max</i> em germinação.	78
Figura 31: Análise do macrosclereíde do tegumento de sementes de <i>Glycine max</i> em processo de germinação por microscopia eletrônica de transmissão.	79
Figura 32: Análise do osteoclereíde (A, B e C) e de células parenquimáticas (D, E e F) do tegumento de sementes de <i>Glycine max</i> em processo de germinação por microscopia eletrônica de transmissão.	80

Figura 33: Representação esquemática dos principais eventos biológicos observados para o tegumento de *G. max* durante o processo de germinação. ... 91

ÍNDICE DE TABELAS

Quadro 1: Proteínas identificadas a partir da banda A, visualizadas em caixas na eletroforese mostrada na figura 11.....	48
Quadro 2: Proteínas identificadas a partir da banda B, circundada por boxe, na eletroforese vista na figura 11.	55
Quadro 3: Proteínas identificadas a partir do “spot 1” da eletroforese da figura 12.	57
Quadro 4: Proteínas identificadas a partir do “spot 2” da eletroforese da figura 12.	57
Tabela 1: Atividade da citocromo c oxidase para as frações citosólicas e mitocondriais de tegumentos.....	77

ABREVIATURAS

MCP - morte celular programada

DAE - dias após a embebição

DAP - dias após a polinização

HAE – horas após a embebição

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel

VPE - vacuolar processing enzymes

HEPES - hidroxietil piperazina ácido etanosulfônico

PVPP - polivinilpirrolidona

Z-GGR-MCA - Benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp methylcoumarin hydrochloride

Ac-VEID-pNA - N-acetyl-Val-Glu-Ile-Asp p-nitroanilide

Ac-YVAD-fmk - N-acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp trifluoromethylcoumarin

Ac-VAD-fmk - N-acetyl-Val-Ala-Asp trifluoromethylcoumarin

H-EGR-cmk – H-Glu-Gly-Arg chloromethylketone trifluoroacetate salt

Ac-VAD-CHO - N-acetyl-Val-Ala-Asp aldehyde

Ac-VEID-CHO - N-acetyl-Val-Glu-Ile-Asp aldehyde

Ac-YVAD-CHO - N-acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp aldehyde

TEMED – N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina

OsO₄ - tetróxido de ósmio

MET - microscopia eletrônica de transmissão

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CHAPS - 3-((3-Colamidopropil) dimetilamônio)-1-propanosulfonato.

DTT - Dithiothreitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

RESUMO

O tegumento é a região da semente que se constitui como a interface entre os tecidos internos e o ambiente externo. Nosso grupo verificou que o tegumento da semente da leguminosa *Vigna unguiculata* passa por eventos coordenados de morte celular programada (MCP) durante seu desenvolvimento. Com relação à germinação, pouco é conhecido sobre tais eventos. O objetivo principal do presente trabalho é investigar os aspectos bioquímicos do tegumento de uma leguminosa típica (soja – *Glycine max*) em germinação, tendo como foco suas atividades proteolíticas, considerando sua relação com eventos de MCP. Os perfis de atividades gelatinolíticas revelaram um complexo padrão de atividades de proteases cisteínicas, que se mostraram ativas desde o estágio quiescente, bem como de enzimas caspase-símile e metacaspases. A análise da clivagem de Ac-VEID-pNa revelou um pico de atividade em 24 HAE (horas após a embebição); para Ac-YVAD-fmk, foi detectado um pico em 60 HAE; para Z-GGR-MCA, a atividade lítica foi constante até 48 HAE, apresentando um aumento em 60 HAE e 72 HAE. Foi detectada uma redução no comprimento radicular em plântulas em 60 e 72 HAE sob tratamento com Ac-VAD-CHO. Várias proteínas do extrato protéico do tegumento quiescente foram identificadas como possíveis substratos de proteases cisteínicas da amostra, dentre as quais estavam inibidores de tripsina do tipo Kunitz e cadeias de proteínas de reserva. O padrão de fragmentos oligonucleossomais revelou um pico de detecção dos mesmos em 72 HAE. A detecção do citocromo c revelou que essa molécula encontra-se no citosol já a partir do estágio quiescente e o ensaio de atividade da citocromo c oxidase revelou a perda da integridade da membrana interna mitocondrial já a partir do estágio quiescente, estágio a partir do qual as análises ultraestruturais demonstraram a ausência de organelas em células de todas as camadas do tegumento. Esses dados juntos apontam para a presença de marcadores bioquímicos tipicamente associados à MCP em sementes germinantes de soja, o que pode ter ligação com os eventos de MCP descritos para o tegumento de *V. unguiculata*, no estágio de desenvolvimento.

Palavras-chave: Tegumento de sementes, morte celular programada, proteases cisteínicas, atividades caspase-símiles, germinação.

ABSTRACT

The seed coat is the region of the seed that establishes the interface between the inner tissues and the external environment. Our group has shown that the seed coat from the leguminous *Vigna unguiculata* undergoes coordinated events of programmed cell death (PCD) during its development. In relation to the germination stage, still little is known on PCD events. The main objective of this work was to investigate the biochemical aspects of the seed coat of a typical leguminous plant (soybean - *Glycine max*) under germination, focusing on its proteolytic activities considering the relation with PCD events. The gelatinolytic activity profiles revealed a complex pattern of protease activities of cysteine proteases, as well as of caspase-like and metacaspase-like enzymes. The cleavage of Ac-VEID-pNa revealed peak of activity at 24 HAI (hours after imbibition); for Ac-YVAD-fmk, it was detected a peak at 60 HAI; for Z-GGR-MCA, the activity was constant until 48 HAI, showing an increase at 60 and 72 HAI. A reduction in radicle length on seedlings germinated under Ac-VAD-CHO treatment was detected at 60 and 72 HAI. Various proteins from the quiescent seed coat extract were identified as possible endogenous substrates of cysteine proteases, amongst them Kunitz-type trypsin inhibitors and chains of storage proteins. The pattern of oligonucleosomal fragments revealed a peak 72 HAI. The detection of cytochrome c revealed that this molecule is located in the cytosol and the cytochrome c activity assay revealed the loss of integrity of the mitochondria inner membrane since the quiescent stage, at the same time when the ultrastructural analysis showed the absence of organelles in the cells of all seed coat layers. These data altogether suggest the presence of biochemical PCD hallmarks in germinating soybean seed coat, what can be related to the PCD events described for the stages of the development of the seed coat of *V. unguiculata*.

Keywords: Seed coats, programmed cell death, cysteine proteases, caspase-like activities, germination.

INTRODUÇÃO

1.1- Proteases e suas funções nos organismos

As enzimas que hidrolisam ligações peptídicas são conhecidas como peptidases ou proteases. Esse termo foi cunhado no início do século XX, como reflexo de evidências funcionais detectadas tanto de maneira direta como indiretamente, através de um estudo com algas, fungos e fanerógamas (Vines, 1903). Desde então, o conhecimento de importantes definições acerca da natureza da atividade catalítica, assim como das propriedades particulares de muitas enzimas proteolíticas, foi se estabelecendo.

Apesar de cada protease possuir particularidades, todas elas compartilham uma mesma estratégia de catálise (figura 1), na medida em que polarizam o grupamento carbonil da ligação peptídica alvo de seu substrato, por estabilização do átomo de oxigênio em um buraco oxaniônico presente no sítio ativo da enzima. Essa interação torna o átomo de carbono mais vulnerável ao ataque de um nucleófilo ativado. A natureza do nucleófilo apresenta variação e é determinante para o mecanismo empregado na catálise enzimática (Van der Hoorn, 2008). Como resultado dessa variabilidade, as proteases são agrupadas em seis classes catalíticas diferentes: proteases serínicas, glutâmicas, treonínicas, aspárticas, cisteínicas e metalopeptidases (<<http://merops.sanger.ac.uk/>>). As maiores famílias (proteases serínicas, aspárticas, cisteínicas e metalopeptidases) apresentam uma ampla distribuição nos organismos vivos, estando também representadas no grupo dos vírus (Rawlings, 2016).

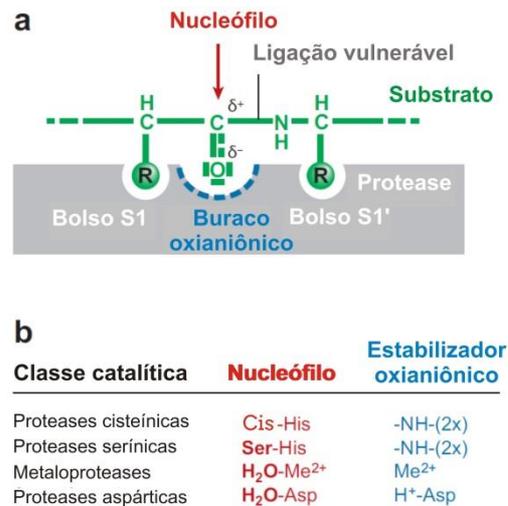


Figura 1: Mecanismos de clivagem das quatro principais classes catalíticas das proteases.

a: uma proteína substrato se liga ao sítio de ligação ao substrato da protease; b: principais diferenças entre as classes catalíticas. Adaptado de van der Hoorn (2008).

Como a clivagem peptídica do substrato alvo ocorre com grande especificidade, a ação de proteases se configura como uma estratégia eficaz na promoção da determinação do destino de outras proteínas. Dessa forma, essas enzimas participam da regulação de importantes vias celulares frente a fatores ambientais e a sinais de desenvolvimento (Van der Hoorn, 2008).

Isso é particularmente evidente quando se consideram situações em que ocorrem falhas na regulação do degradoma, o que está associado a diversas condições patológicas. Entre as vias afetadas por mudanças no degradoma humano, estão os processos de progressão do ciclo celular, o remodelamento tecidual, o crescimento neuronal, a cicatrização de feridas, a homeostase, a imunidade, a angiogênese e a apoptose (Pérez-Silva *et al.*, 2015).

Em plantas, o estabelecimento de degradomas ainda está em expansão, mas sabe-se que as proteases participam da regulação do destino de células epidérmicas, do tempo de florescência, da arquitetura da inflorescência, do desenvolvimento do pólen e do embrião, em processos de defesa contra patógenos, em resposta a fatores abióticos, na mobilização de reservas e em eventos de morte celular programada (MCP) (Van der Hoorn, 2008).

1.2 - Morte celular programada

A morte celular programada é um mecanismo fisiológico inato, que envolve a morte seletiva de células individuais, tecidos ou órgãos inteiros, de maneira controlada por um programa genético. Este mecanismo é diferente da necrose que, por sua vez, frequentemente ocorre de maneira passiva em resposta a perturbações do ambiente (Pennel e Lamb, 1997; Green e Llambi, 2015).

Com relação à MCP, os metazoários são os modelos de estudo mais bem conhecidos. Nestes, são reconhecidas duas categorias principais do evento: a apoptose e a autofagia, que são definidas com base em aspectos da morfologia celular e nas organelas envolvidas (Schweichel e Merkel, 1973; Clarke, 1990; Baehrecke, 2003; Gozuacik e Kimchi, 2004; Green e Llambi, 2015).

A apoptose é definida por um conjunto de características morfológicas principais: encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA nuclear, formação de corpos apoptóticos e engolfamento, seguida por sua degradação por células do sistema fagocítico. Essa caracterização pode ser estendida ao se considerar a paralela ativação de proteases caspásicas em conjunto com as referidas alterações (Schweichel e Merkel, 1973; Baehrecke, 2003; Green e Llambi, 2015).

A autofagia é o principal sistema de degradação e reciclagem em células eucarióticas contribuindo para a degradação de componentes celulares e porções citoplasmáticas, em repostas a estresses diversos, incluindo crises no metabolismo. Esse processo pode ocorrer de duas formas: através do sequestro de porções do citoplasma no interior do vacúolo, ou do sequestro de grandes porções do citoplasma, formando uma estrutura denominada autofagossomo (Otto *et al.*, 2003; Yoshimori, 2004; Levine e Klionsky, 2017).

Em situações pelas quais um conjunto celular passa por uma condição de estresse mais intenso, de modo que as células não sejam aptas a ativar a via de MCP apoptótica, ocorre morte celular por necrose, que é caracterizada por um inchaço do protoplasma devido à perda da habilidade de osmoregulação que resulta na migração de água e íons para o interior das células. Isso é acompanhado por alterações na estrutura de organelas sem que haja a condensação da cromatina e pela ruptura da membrana plasmática (Lennon *et al.* 1991; Fuchs e Streller, 2015).

Dentre as proteases envolvidas em MCP, o grupo mais bem conhecido é a

subfamília C14 do clã CD das proteases cisteínicas. Seus representantes incluem as metacaspases, as paracaspases e as caspases (Rocha *et al.*, 2017). As primeiras a serem descobertas e as mais conhecidas em termos de estrutura e função são as caspases. Os relatos iniciais das caspases e de proteínas relacionadas, são os trabalhos com os genes *ced-3* e *ced-4* de *Caenorhabditis elegans* (nemátodo) e seus produtos, além da enzima caspase 1 de mamíferos (Yuan e Horvitz, 1990, 1992; Yuan *et al.*, 1993; Cerreti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992; Shalini *et al.*, 2015).

Desses primeiros relatos até os dias atuais, foi confirmado que as caspases desempenham um papel central numa via que promove a mediação de uma morte celular altamente ordenada (Nicholson e Thornberry, 1997; Green e Llambi, 2015). De fato, estas enzimas são um ponto de convergência de vias bioquímicas que levam à ativação de uma cascata proteolítica (a cascata de caspase) ligada à apoptose.

A importância dessa cascata pode ser vista quando ocorrem distúrbios em sua regulação celular, o que, com frequência está relacionado à imunodeficiência, carcinogênese e outros problemas relacionados à MCP aberrante (Parrish *et al.*, 2013; Yuan e Yankner, 2000; Li e Yuan, 2008).

A visão geral da cascata revela dois grupos funcionais de caspases, de acordo com sua posição na sequência de eventos proteolíticos (figura 2).

As primeiras caspases a serem ativadas são as iniciadoras que se ativam pelo “mecanismo de proximidade induzida”, disparado por seu recrutamento por complexos de proteínas adaptadoras, tais como receptores de membranas ou por grandes complexos denominados apoptosomos. Essa proximidade induzida leva à oligomerização de moléculas de caspases, que se tornam capazes de promover a ativação das caspases efetoras pela clivagem de um pró-domínio, tendo em vista que essas enzimas são sintetizadas como zimógenos. Após essa clivagem, as caspases efetoras se organizam em heterodímeros e clivam os substratos apoptóticos, gerando a típica morfologia celular do evento (Vercammen *et al.*, 2007, Green e Llambi, 2015).

Existem duas formas principais de ativação da cascata de caspases. A via extrínseca é disparada pela detecção de sinais por receptores de membrana; a via intrínseca é impulsionada pela detecção de danos internos, como danos na molécula de DNA, estando sujeita a uma forte regulação. Nesse contexto,

destaca-se o papel dos fatores anti e pró-apoptóticos de origem mitocondrial que, em conjunto, orquestram o padrão de liberação do citocromo c da mitocôndria, que é um dos requisitos para a formação do apoptossomo (Joza *et al.*, 2001; Bras *et al.*, 2005; Tait e Green, 2010).

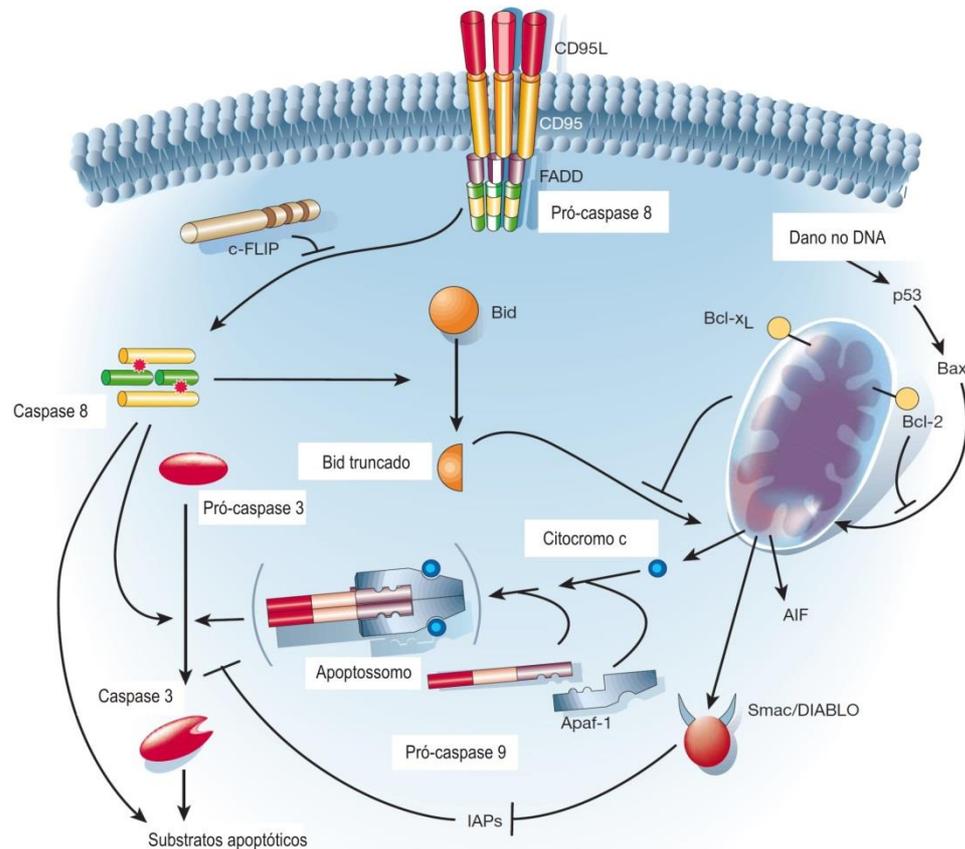


Figura 2: Principais vias apoptóticas em células animais. A via do receptor de morte é disparada por membros da superfamília dos receptores de morte (tais como CD95 e o receptor I do fator de necrose tumoral). A ligação do ligante de CD95 a CD95 induz à aglomeração de receptores e à formação do complexo de sinalização indutor de morte. Esse complexo recruta, via a molécula adaptadora FADD, múltiplas moléculas de pró-caspase 8, resultando na ativação da caspase 8 através de proximidade induzida. A ativação da caspase 8 pode ser bloqueada pelo recrutamento do homólogo degenerado de caspase c-FLIP. A via mitocondrial é disparada em resposta a sinais extracelulares e a danos internos, como danos no DNA. Frequentemente, essa via é iniciada pela ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Essa ativação pode levar à liberação do citocromo c da mitocôndria, que se associa com Apaf-1 e com a pró-caspase 9 para formar o apoptossomo. Tanto a via do receptor de morte, quanto a via mitocondrial levam à ativação da caspase 3, que pode ser antagonizada pelos inibidores IAPs, que por sua vez, são antagonizadas pelas proteínas Smac/DIABLO, liberadas pela mitocôndria. A caspase 3 ativa cliva os substratos apoptóticos, que levam à exibição dos fenótipos do fenômeno. Adaptado de Hengartner (2000).

Com relação à filogenia das caspases, é importante destacar que essas enzimas são únicas do reino Animalia, estando amplamente distribuídas entre seus Filos, estando presentes em organismos vertebrados, como o *Homo sapiens* e *Danio rerio* (peixe-zebra) e em invertebrados como *C. elegans* e *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) (Uren *et al.*, 2000).

1.3 - Morte Celular Programada em Plantas

Em plantas, a MCP permite plasticidade bioquímica em diferentes estágios do desenvolvimento e em interações com componentes diversos, já que quase todas as fases do ciclo de vida do organismo vegetal, da germinação até o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, bem como os processos de respostas a fatores bióticos e abióticos são influenciados por esse processo (Dangl *et al.*, 2000). Apesar do reconhecimento da relevância desse fenômeno, a dificuldade de categorização do mesmo tem gerado intensos debates na literatura.

Esse contexto é advindo da baixa caracterização das vias de MCP em plantas a nível molecular em relação aos graus de detalhe e complexidade que foram atingidos na pesquisa com modelos animais, sobretudo ao se considerar a ausência da MCP do tipo apoptótica em organismos vegetais (Salvesen *et al.*, 2016). Ainda assim, diferentes eventos de morte celular em plantas podem ser categorizados, o que demonstra a existência de vias organizadas e controladas nesses organismos (Van Doorn, 2011).

Os eventos de MCP que ocorrem durante a formação dos elementos traqueais do xilema (Obara *et al.*, 2004), na formação do aerênquima (Drew, 2000; Evans, 2003), bem como em alguns outros processos de desenvolvimento ocorrentes em sistemas vegetais, têm sido relacionados à autofagia. Nestes casos, há permeabilização ou ruptura do lisossomo ou tonoplasto, liberando enzimas hidrolíticas no citosol e estas degradam os componentes celulares (Lima *et al.*, 2012).

Em sementes em desenvolvimento ocorre morte celular de maneira ainda não totalmente compreendida, embora se saiba que não é por autofagia, já que a célula morta permanece inteira até a germinação e seus conteúdos são então mobilizados. Nenhuma evidência de permeabilização do tonoplasto foi encontrada

para células do endosperma de cereais, mas, se isso ocorre, o conteúdo vacuolar é incapaz de promover a degradação de macromoléculas em larga escala (Van Doorn e Woltering, 2005).

Outro tipo de MCP presente em sistemas vegetais ocorre durante a senescência, onde os cloroplastos são degradados inicialmente, seguindo-se a uma disrupção de vacúolos e do núcleo (Thomas *et al.*, 2003; Van Durme e Nowack, 2016; Kabbage *et al.*, 2017).

O processo de MCP que ocorre durante as respostas defensivas contra patógenos, conhecidas como respostas hipersensitivas, não aparenta possuir características típicas de autofagia (VanDoorn e Woltering, 2005). Na resposta hipersensitiva da epiderme de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) contra o fungo *Uromyces vignae*, ocorre o dismantelamento do protoplasma, a clivagem de DNA nuclear (observada pela técnica de TUNEL), seguidos pelo encolhimento do protoplasma de uma maneira sugestiva, diferente daquela que ocorre com a perda de turgor (Ryerson e Heath, 1996).

O tipo de morte celular que envolve uma coordenada degradação do núcleo, assim como a condensação da cromatina e degradação do DNA, é também descrito para processos de desenvolvimento e tem sido referido como MCP apoptótico-símile (Fukuda, 2000; Hunt e McCabe, 2016).

Um marcador importante da MCP apoptótica que tem sido investigado em sistemas de MCP vegetal é a liberação do citocromo c da mitocôndria. Tem sido observada a translocação dessa molécula da mitocôndria para o citosol em células vegetais passando por MCP em diversas situações: Células de tabaco, tratadas com menadiona, exibiram esse fenômeno, que foi afetado pela presença do inibidor tetrapeptídico da caspase 3 (Sun *et al.*, 1999). Esse evento também foi constatado por Balk *et alii* (1999), em associação com a detecção de atividades de proteases e fragmentação de DNA, em um trabalho com cotilédones da semente de pepino sob estresse por alta temperatura. A translocação ao citosol também foi observada durante a MCP em células do suspensor durante o desenvolvimento embrionário de *Phaseolus coccineus* (feijão-da-espanha) (Lombardi *et al.* 2007 A), e em associação com a MCP que ocorre no desenvolvimento do tegumento da semente de *Vigna unguiculata* (Lima *et al.*, 2015).

Apesar dessas similaridades com o processo apoptótico, não há evidências

que sugiram a formação de corpos apoptóticos, o que dificulta a inserção dos casos estudados nessa categoria de MCP (VanDoorn e Woltering, 2005). Frente a essas informações, existe a proposta de agrupamento dos eventos de MCP de organismos vegetais em categorias próprias (Van Doorn, 2011; Lima *et al.*, 2012).

A primeira dessas categorias é a MCP do tipo “autolítica”, que se associa com a formação e com o colapso de um grande vacúolo. Durante a expansão dessa organela, há a degradação do conteúdo citoplasmático (o que inclui outras organelas). O processo de colapso vacuolar é dependente da liberação e da ativação de proteases, dentre as quais se destacam enzimas com atividade caspase-símile, saspases (proteases serínicas com atividade caspase-símile) e enzimas subtilisinas-símile, e frequentemente ocorre após uma série de eventos celulares coordenados, como a mobilização de macromoléculas, a redistribuição do cálcio intracelular, a acidificação do citosol e a degradação do DNA nuclear (Van Doorn, 2011; Lima *et al.*, 2012).

A outra categoria é denominada MCP “não-autolítica”. Nela, o citoplasma é degradado de forma mais rápida que na autolítica, ocorrendo também um influxo de cálcio para o citosol. Nesse processo pode ou não ocorrer o colapso vacuolar e ocorre uma intensa produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e outras moléculas associadas ao estresse oxidativo, o que pode provocar danos celulares. Há também um aumento na produção de ácido salicílico. De forma geral, a MCP “não-autolítica” ocorre em resposta a estresses variados, enquanto a “autolítica” ocorre em decorrência de eventos de desenvolvimento (Van Doorn, 2011; Lima *et al.*, 2012). Essa tendência pode se relacionar com a velocidade com a qual ocorre a degradação do conteúdo celular.

Considerando essas duas categorias de morte celular, é importante ressaltar que as mesmas compartilham o requerimento da participação de proteases como reguladores chave de seus eventos, incluindo proteases com atividade caspase-símile e metacaspases (Salvesen *et al.*, 2016).

1.4 - Proteases cisteínicas e sua conexão com morte celular programada em plantas

Como ressaltado anteriormente, as proteases se apresentam aos organismos vegetais como estratégias versáteis de controle de variados

processos ligados ao desenvolvimento e à respostas a estresses. Nesse contexto, destacam-se principalmente as proteases cisteínicas, cuja relação com o fenômeno de MCP vem se tornando bem estabelecida (Van Hautegeen *et al.*, 2015).

Embora não existam caspases em plantas, atividades caspase-símiles, frequentemente atribuídas a proteases cisteínicas, têm sido detectadas em organismos vegetais. Tal detecção se dá através do emprego de substratos tetrapeptídicos, desenhados a partir da sequência de aminoácidos que representam o sítio preferencial de clivagem consenso de membros da família das caspases de mamíferos (Bonneau *et al.*, 2008; Cai e Gallois, 2014). Esses substratos apresentam facilidade de encaixe no sítio ativo dessas enzimas e em outras proteases (Stennicke & Salvesen, 2000). Além disso, estudos com inibidores sintéticos de caspases, que bloqueiam atividades de caspases-símile, também têm sido realizados e apontam para a correlação entre essas atividades e a indução do processo de MCP (Bonneau *et al.*, 2008; Cai e Gallois, 2014).

No trabalho de Del Pozo e Lam (1998), a aplicação de dois inibidores de caspases (Ac-YVAD-CMK e Ac-DEVD-CHO) reduziu o número de lesões foliares no sítio de infecção durante a resposta hipersensitiva em folhas de plantas jovens de tabaco, infectadas por vírus do mosaico do tabaco. Atividades caspase-símile contra os substratos Ac-YVAD-AMC e Ac-DEVD-AMC foram detectadas *in vitro* a partir dos tecidos estudados, sendo que estas foram abolidas com o uso dos inibidores específicos. Esses dados foram os pioneiros na descrição de atividades caspase-símile em um sistema vegetal. Desde então, muitas dessas atividades vêm sendo relatadas em múltiplos tempos para várias espécies e em diversos tecidos ou tipos celulares (Bonneau *et al.*, 2008; Van Hautegeen *et al.*, 2015; Sahu *et al.*, 2016; Chai *et al.*, 2017).

Em um estudo de resposta hipersensitiva de folhas de tabaco contra a proteína VirD2 de *Agrobacterium tumefaciens*, foi constatada uma atividade de clivagem dessa proteína no mesmo sítio clivado pela caspase 3 humana. Essa atividade não pôde ser inibida por DEVD-CHO, mas sim pela sequência TATD-CHO, que também é específica para caspase 3, demonstrando maior especificidade de substrato da protease da planta em relação à caspase controle. A inibição *in vivo* dessa atividade com TATD-CHO também apresentou efeito significativo na redução do número de lesões nas folhas (Chichkova *et al.*, 2004).

Lombardi *et alli* (2007 C), em estudo com *Sechium edule* Sw. (chuchu) (Curcubitaceae), constataram que o nucelo, um tecido da semente de origem materna, apresentou marcadores apoptóticos de MCP por detecção, em gel, de fragmentação do DNA nuclear e marcação da degeneração de núcleos celulares por TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling”). Tais fenômenos foram associados com a presença de proteases com atividade contra Ac-YVAD-pNa, Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa, as quais foram propostas como sendo de origem vacuolar, liberadas a partir do colapso da organela.

Em contrapartida, um estudo utilizando um sistema livre de células baseado em extratos citosólicos de ovos de *Xenopus* (rã), em presença de mitocôndrias obtidas a partir de células embrionárias de cevada, mostrou que estas são capazes de iniciar a ativação de proteases caspase-3 símile. Também foi visto, através de um ensaio de micro-injeção em células internodais de *Chara*, que a localização destas atividades *in vivo* era citosólica (Korthout *et al.*, 2000).

Sabe-se que essas proteases caspase-símile não são aparentadas com caspases (Van der Hoorn e Jones, 2004). Mas, de forma geral, a constatação do envolvimento de atividades desse tipo em muitas respostas de morte celular programada e dos efeitos da inibição destas, sugere que elas façam parte de um mecanismo real de morte celular programada em plantas (Bonneau *et al.*, 2008).

Atualmente, apenas quatro elementos responsáveis por atividades caspase-símiles foram identificados em organismos vegetais: algumas enzimas de processamento vacuolar (VPEs), que exibem atividade caspase 1-símile (YVADásica) e controlam a ruptura do tonoplasto durante a MCP; a subunidade β -1 do proteassoma, detentora de atividade caspase-3 símile (DEVDásica), ligada à resposta hipersensível; as fitaspases, que apresentam atividade caspase 6-símile (VEIDásica), também participando de respostas hipersensíveis e as sapases, que possuem atividade caspase 6 e caspase 8-símile (VEHDásica e IETDásica, respectivamente), ligadas a respostas a estresses (Cai e Gallois, 2015).

Além das atividades dessa natureza, proteases cisteínicas que não exibem atividade caspase-símile vêm sendo descritas como importantes para processos de MCP. Zhao *et alli* (2013) verificaram que a protease cisteínica NtCP14 parece regular a MCP na linhagem celular derivada da célula basal do pró-embrião de tabaco. Essa enzima exibe atividade do tipo catepsina H-símile e tem sua atividade controlada pela cistatina NtCYS (exclusivamente expressa na célula

basal). Quanto ativa, a protease correlacionou-se com um fenótipo de MCP e com um aumento em atividades caspase-símile. Em outro relato, Zhang et alii (2014) constataram que a superexpressão do gene da protease cisteínica papaína-símile CEP1 em *Arabidopsis* promoveu a MCP prematura do tapetum e infertilidade de pólen. Mutantes para o gene dessa protease tenderam a apresentar uma menor tendência de um fenótipo TUNEL-positivo em células do tapetum e microsporos sem a formação de um único e grande vacúolo, o que resultou em grãos de pólen defeituosos.

1.5 - Metacaspases e morte celular programada em plantas

No fim de 2000, análises estruturais e sequenciais utilizando dados genômicos revelaram uma grande diversidade de genes de proteases aparentadas com caspases em plantas, fungos e protozoários, que foram designadas como metacaspases (Uren *et al.*, 2000). Estas foram encaradas como candidatas a desempenhar um papel central em MCP (Koonin e Aravind, 2002) (figura 3).

Baseado em sua arquitetura estrutural, as metacaspases são divididas em duas categorias: metacaspases do tipo I e metacaspases do tipo II. A subclasse do tipo I possui uma extensão N-terminal – um prodomínio com um motivo constituído por uma repetição rica em resíduos de prolina e um domínio do tipo Ild1 zinc finger- que está ausente nas metacaspases do tipo II, que por sua vez, possuem uma região de cerca de 200 resíduos de aminoácidos entre os domínios p10 e p20 (Lamkanfi *et al.*, 2002) (figura 3).

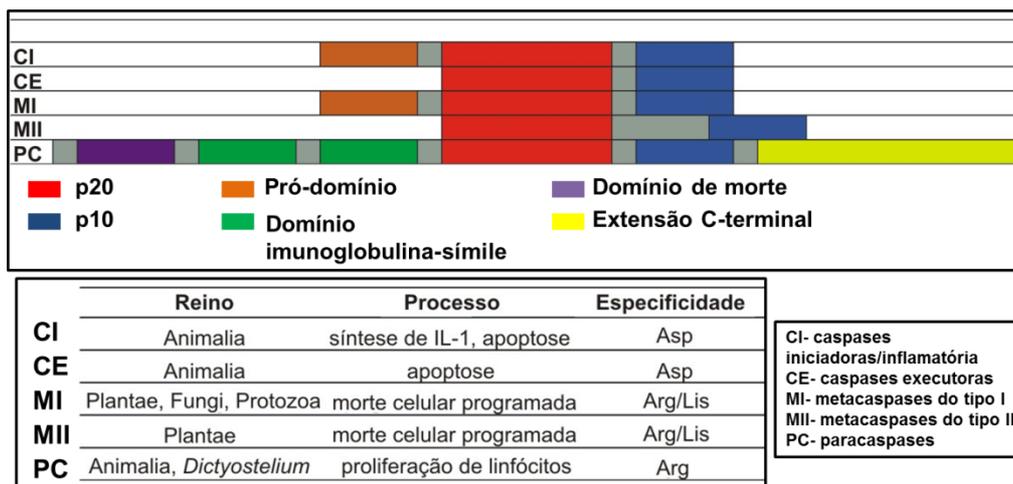


Figura 3: Representação dos principais domínios das caspases, metacaspases e paracaspases. Especificidade (de clivagem): resíduo na posição P1, após o qual a clivagem catalítica ocorre. Baseado em Vercammen *et alii* (2007).

Observações iniciais usando extratos celulares sugeriram que metacaspases poderiam ser responsáveis pelas atividades caspase-símiles detectadas em plantas (Suarez *et al.*, 2004). Entretanto, quatro casos demonstraram que metacaspases de plantas são incapazes de clivar substratos de caspases (Vercammen *et al.*, 2004; Bozkov *et al.*, 2005; Watanabe e Lam, 2005; He *et al.*, 2008). Este fato se dá em razão das metacaspases apresentarem especificidade de clivagem após os resíduos de aminoácidos arginina e lisina na posição P1, em seus substratos. Esses resíduos apresentam características químicas opostas ao preferido pelas caspases, que clivam seus substratos após resíduos de ácido aspártico (figura 3).

Apesar de as metacaspases não possuírem atividades caspase-símiles, muitos trabalhos sugerem que elas tenham um papel em MCP (Bonneau *et al.*, 2008). A inibição de uma metacaspase do tipo II suprimiu a MCP em células do suspensor de uma cultura embriogênica de *Picea abies* (Suarez *et al.*, 2004). Durante a embriogênese de *Picea abies* L. (Pinaceae), averiguou-se que uma protease cisteínica metacaspase II (MclIPa) é translocada do citosol para o núcleo, onde sua presença se correlacionou com detecção de fragmentação de DNA. Em experimentos com um sistema livre de células em presença de uma variante da proteína mutante para seu sítio ativo, não foram constatadas alterações nucleares. Esses dados indicam que MclIPa está diretamente envolvida em uma via que gera a degradação nuclear, que é um evento presente

na maioria dos programas de morte celular eucarióticos. Nessa via, a protease pode ter o papel de clivagem de proteínas estruturais do núcleo, similar ao que ocorre para as caspases efetoras de metazoários (Bozkov *et al.*, 2005).

A expressão heteróloga das metacaspases MCP1b e MCP2b de *Arabidopsis thaliana*, em uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente para o gene de sua única metacaspase, YCA1, foi capaz de disparar um fenótipo apoptótico-símile sob tratamento com peróxido de hidrogênio. Esse efeito foi abolido quando a cepa era suplementada com o inibidor pancaspase VAD, o que reforça um papel importante da metacaspase em MCP, de forma dependente de proteases com atividade caspase-símile (Watanabe e Lam, 2005).

O envolvimento das metacaspases em MCP também é sugerido por trabalhos com plantas sob ataque de patógenos. Folhas de plantas de *A. thaliana* infectadas por *Pseudomonas syringae* apresentaram altos níveis de expressão gênica da metacaspase MCA1 (Hao *et al.*, 2007). O mesmo pôde ser observado para os níveis de uma metacaspase do tipo II em plantas de tomate infectadas por *Botrytis cinerea* (Hoeberichts *et al.*, 2003).

Um mecanismo de cascata comparável ao de cascatas de caspases em sistemas vegetais foi proposto por Piszczek e Gutman, em 2007, no qual metacaspases do tipo I se tornariam ativas por sinais de morte celular, de forma análoga às caspases iniciadoras. Uma vez ativas, estas enzimas ativariam as metacaspases do tipo II, que estão no citosol sob a forma de zimógenos, e estas se tornariam aptas para clivar substratos pró-morte celular, tais como proteases com atividade caspase-símile e outros componentes celulares (figura 4).

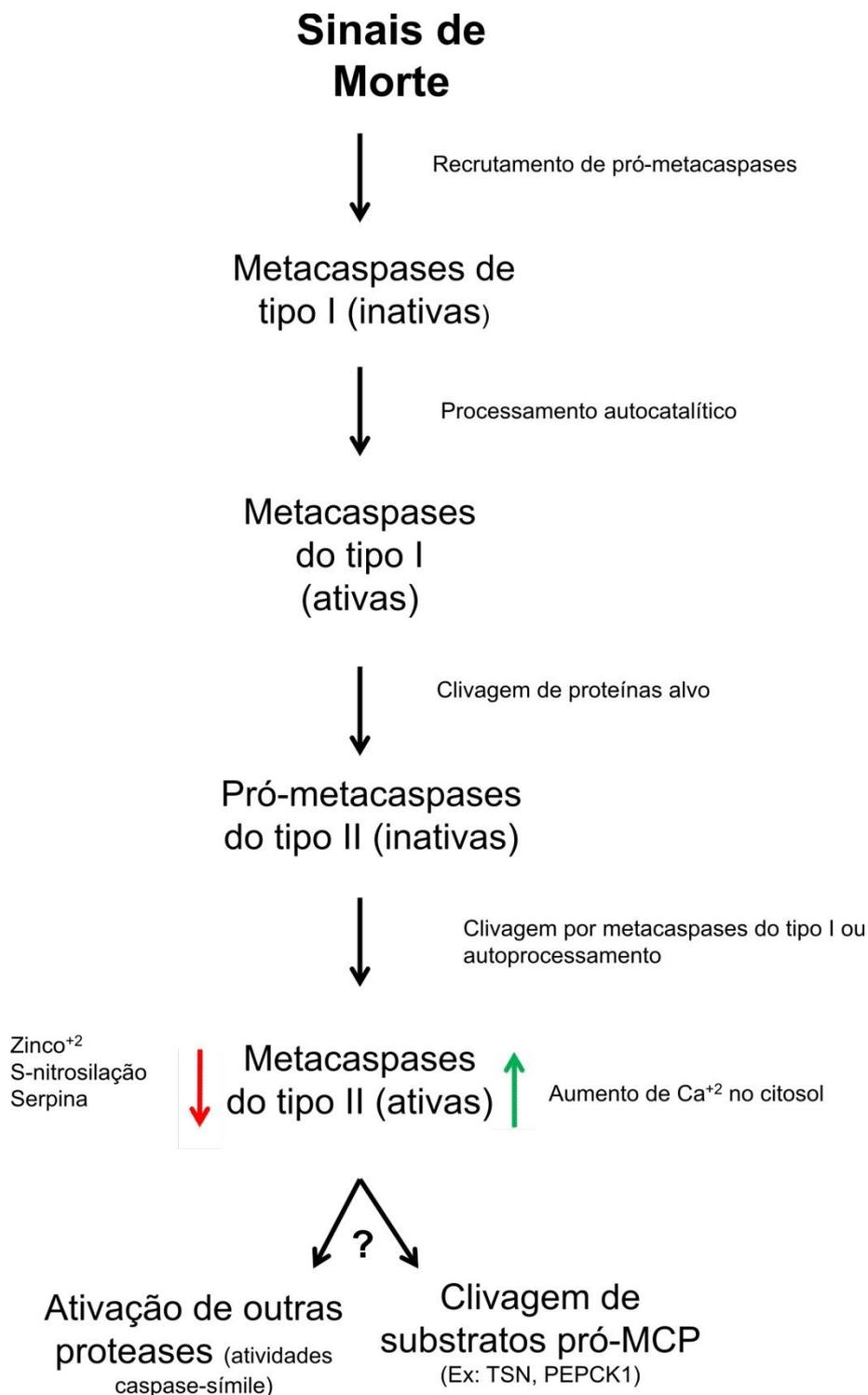


Figura 4: Modelo proposto de cascata de eventos proteolíticos disparados por um sinal indutor de morte em sistemas de morte celular programada de plantas. Inibidores (seta vermelha) e estimuladores (seta verde) das metacaspases do tipo II são mostrados, assim como os substratos possíveis. Adaptado de Rocha *et alii* (2017).

Bozhkov *et alii* (2005) reforçam a ideia de que a execução de MCP em plantas é controlada por dois grupos de enzimas com localização celular distinta: sendo um deles originados de compartimentos líticos e vacúolos, com o outro apresentando localização citoplasmática e nuclear, como no caso da metacaspase MCII-Pa.

Também foi visto que plantas transgênicas de tabaco, contendo genes anti-apoptóticos oriundos de genoma animal, exportaram as proteínas derivadas dos mesmos para os cloroplastos e mitocôndria. O tratamento dessas plantas com herbicidas tendo como alvo o cloroplasto não levou à morte nem à exibição de fenótipos apoptótico-símile nas plantas transgênicas, diferentemente das plantas selvagens, que morreram e exibiram características associadas à apoptose (Chen e Dickman, 2004). Sun *et alii* (1999) demonstraram anteriormente que ocorre a translocação do citocromo c da mitocôndria ao citosol durante morte celular induzida por menadiona, em protoplasto de tabaco. A adição de inibidores específicos de caspases ao sistema inibiu a clivagem de PARP (poli-ADP-ribose polimerase), que é um substrato conhecido da caspase 3, em contrapartida, esse tratamento não afetou a translocação do citocromo c. Também foi observado que o extrato de protoplasma de tabaco, quando na presença de mitocôndria de tabaco, parece induzir a degradação de PARP e a apoptose em células de fígado de camundongo. Esses dados sugerem que pode haver conservação no mecanismo de morte celular em plantas e animais, e que os reguladores mostram reduzida especificidade entre as espécies.

A constatação de diversas atividades caspase-símile em diferentes tecidos de espécies vegetais, o requerimento de determinadas metacaspases em MCP e seu provável envolvimento em cascatas de sinalização que geram a morte celular, bem como o indício de que existem passos conservados na via que gera MCP em plantas e apoptose em animais, apontam para a convergência ou a divergência evolutiva de passos básicos das vias de MCP em plantas e animais (Rocha *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, importantes informações acerca das funções biológicas das metacaspases, considerando seus alvos específicos - através da elucidação do degradoma da metacaspase 9 de *A. thaliana* (Tsiatsiani *et al.*, 2013), alguns de seus reguladores (Helmerson *et al.*, 2008; Lema Asqui *et al.*, 2017; Klemencic e Funk, 2017), têm sido obtidas. Com o número crescente de detalhes sendo

disponibilizado, um cenário mais próximo à realidade dos sistemas de MCP vegetais poderá ser idealizado.

1.6 - Morte celular programada em sementes

Apesar dos avanços no que diz respeito ao estabelecimento de uma base de conhecimentos acerca da MCP em organismos vegetais como um todo, assim como da relação desse fenômeno com a atividade coordenada de enzimas proteolíticas, ao se considerarem alguns tecidos ou órgãos individuais, ainda é necessário que mais informações sejam consolidadas. Isso é particularmente verdadeiro para as sementes e seus tecidos, já que mesmo com a importância dos processos de desenvolvimento e da germinação para o estabelecimento de uma nova planta, as sementes necessitam de uma maior atenção no que se refere aos eventos de MCP.

Mesmo com esse contexto, existe uma tendência de crescimento no número e na riqueza de detalhes a partir de trabalhos com essa temática. Em 1998, Schmid *et alii* descobriram que os ricinossomos, que são organelas comuns em células do endosperma da semente de *Ricinus communis* (mamona) apresentam elevadas quantidades da forma zimogênica de uma protease cisteínica, nomeada CysEP. Esta protease possui um pró-peptídeo N-terminal e um sinal C-terminal de retenção no retículo endoplasmático (KDEL). No ano seguinte, esse mesmo grupo constatou que as células do endosperma da mamona passam por eventos de MCP durante a germinação após a mobilização de seus compostos de reserva e que esse processo foi relacionado ao acúmulo e à liberação de proteases cisteínicas dos ricinossomos (Schmid *et al.*, 1999). Foi visto também que o ricinossomo é responsável pelo colapso celular, associado à acidificação do citosol, que promove a maturação da protease CysEP (Gietl e Schmid, 2001). Essa proteína foi vista como sendo ativada durante eventos de MCP em células do nucelo da semente de mamona, tornando-se então apta para a degradação de proteínas remanescentes (Greenwood *et al.*, 2005).

Em 2002, foi descrita a MCP como uma estratégia importante para a eliminação de embriões no processo de poliembrião típico de sementes de *Pinus silvestris* (pinheiro silvestre). A ocorrência desse fenômeno visa à prevenção de uma possível competição por recursos entre os embriões, ao permitir que apenas um deles se desenvolva (Filonova *et al.*, 2002). Neste mesmo

ano, Suarez *et alii* (2004) verificaram uma atividade de clivagem do substrato sintético de caspase VEID (atividade VEIDásica) como sendo a majoritária durante a embriogênese da planta *Picea abies*, correlacionando-a com a detecção de um fenótipo TUNEL positivo. A inibição de enzimas responsáveis por tal atividade comprometeu a diferenciação da massa pré-embrionária em embrião e suspensor.

Considerando ainda essa planta, foi demonstrado que uma metacaspase (mclI-Pa) está envolvida em MCP durante a formação do embrião. A metacaspase em questão apresentou uma distribuição coincidente com células TUNEL positivas, e sua distribuição intracelular foi demonstrada como obedecendo a um padrão que indica sua translocação do citosol para o núcleo. Ainda com relação a este trabalho, foi sugerida a presença de dois tipos de proteases envolvidas com MCP: uma enzima responsável pela clivagem de VEID e a própria mclIPa, que é incapaz de clivar esse substrato (Bozhov *et al.*, 2004).

Helmerson *et alii* (2008) relataram que a perturbação na homeostase do zinco pode desordenar o equilíbrio entre a proliferação celular e a MCP necessária à embriogênese, sendo o zinco apontado como um fator importante para governar o destino das células durante o desenvolvimento da planta.

Lombardi *et alii* (2007 A e B) descreveram eventos de MCP em células de suspensor de *Phaseolus coccineus*, relatando a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol e a ativação de proteases do tipo caspase-símile. Os mesmos autores, ainda em 2007, relataram a degradação do DNA, tanto por TUNEL, quanto por DNA laddering.

1.7 - Morte celular programada e o tegumento de sementes

Constituindo-se como uma interface entre os tecidos internos das sementes e o ambiente externo, o tegumento desempenha papéis importantes no ciclo de vida de muitas plantas. É atribuída a participação dessa região da semente no controle do desenvolvimento embrionário, da dormência e da germinação. Além disso, no tegumento ocorre a síntese de uma grande variedade de componentes, o que lhe confere um dinamismo fisiológico e metabólico (Moïse *et al.*, 2005). Dessa forma, as funções do tegumento suplantam os papéis de fornecimento de proteção e de promoção de dispersão.

Com relação à sua morfogênese, o tegumento origina-se dos integumentos (internos e externos) do óvulo. Muitos dos detalhes do integumento externo puderam ser conhecidos através de estudos com a planta modelo *A. thaliana* (Western *et al.*, 2000; Windsor *et al.*, 2000); considerando o integumento externo, maiores informações ainda são requeridas.

Em seu desenvolvimento, o tegumento passa por uma fase de expansão de camadas celulares, que é sucedida por uma fase, na qual ocorre o desaparecimento de tecidos presentes nos estágios iniciais. Para o integumento interno, por exemplo, ocorre a compressão de suas camadas celulares e a acumulação de pigmentos (Beeckman *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2002).

Em *Pisum sativum* (ervilha), ocorre a diferenciação de células protodérmicas em macrosclereídeos da zona da paliçada epidérmica, durante a fase de expansão celular do tegumento (entre 10 e 15 dias após a polinização – DAP). A hipoderme, que está localizada abaixo dessa região, é composta de células de aspecto similar ao observado nos tecidos parenquimáticos. Posteriormente essas células se diferenciam em osteosclerídeos que, em sua forma final (aproximadamente em 20 DAP) apresentam paredes celulares espessadas. O restante do tegumento consiste de células de tecido parenquimático, que é progressivamente desgastado em concomitância à expansão dos cotilédones e do embrião (Van Dongen *et al.*, 2003).

Considerando o processo de maturação do tegumento de *Arabidopsis*, foi possível o estabelecimento de noções importantes em relação a esse fenômeno. Foi visto que a morte celular que ocorre nas diferentes camadas dessa região se dá de forma altamente organizada, com as células morrendo em momentos distintos, iniciando-se a partir das duas camadas mais externas do integumento interno em direção às camadas do integumento externo e culminando com a morte das células de todas as camadas do tegumento no estágio maduro. Esse padrão sugere que a morte celular ocorra de forma programada, como parte de um processo do desenvolvimento (Haughn e Chaudhury, 2005).

De fato, existe um número emergente de relatos que correlacionam a morte celular que ocorre durante o desenvolvimento do tegumento a marcadores bioquímicos e moleculares observados em eventos de MCP, tais como a detecção de fragmentação do DNA nuclear e a presença e a atividade de proteases caspase-símile, assim como as evidências fornecidas pelo padrão de expressão

gênico das mesmas (Wan *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2015).

O estudo do desenvolvimento do tegumento da semente de *Brassica napus* (colza) revelou que a protease cisteínica BnCysP1 é sintetizada apenas durante a fase do desenvolvimento que precede a síntese de proteínas de reserva e sua expressão parece ser exclusiva do tegumento interno. Nesse estágio, houve a detecção de células TUNEL positivas nessa região do tegumento. Esses dados sugerem que a produção dessa protease é temporalmente e espacialmente controlada pela planta de modo a limitá-la à fase degenerativa do desenvolvimento do tegumento interno, o que pode relacioná-la a possíveis eventos de MCP que ocorrem no desenvolvimento desse tecido (Wan *et al.*, 2002).

Outra enzima cujos padrões de localização e função foram estudados é a Δ VPE (enzima de processamento vacuolar). Essa protease exibe atividade caspase-símile (YVADásica) e possui expressão específica em duas camadas do tegumento interno de *Arabidopsis*, tecido o qual sofre MCP em estágios muito iniciais do desenvolvimento e sofre uma redução em espessura. Plantas mutantes para a Δ VPE exibiram maior espessura desses tecidos, sendo esse fenótipo associado a um atraso na MCP. Em conjunto, esses dados sugerem que a Δ VPE seja responsável pela MCP de camadas específicas durante o desenvolvimento do tegumento (Nakaune *et al.*, 2005).

Esses dados são corroborados pelo trabalho de Rocha *et alii* (2013), que relataram o padrão de expressão dos genes de duas proteases cisteínicas papaína-símile e de duas VPEs (β -VPE e γ -VPE) durante fases do desenvolvimento do tegumento interno de *Jatropha curcas* (pinhão-manso), onde foi visto um padrão coincidente ao estágio no qual ocorrem de eventos de MCP. As proteases cisteínicas papaína-símile Jc-CysEP1 e Jc-CysEP2 exibiram um intrincado padrão de expressão durante o desenvolvimento, com a primeira aparentando possuir função restrita à MCP. Em relação às VPEs, foi sugerido que a β -VPE aparentemente está envolvida tanto no processamento de proteínas como em MCP e que a γ -VPE age de forma mais especificamente em MCP, tanto no tegumento interno como no endosperma.

Eventos típicos de MCP, associados a atividades caspase-símile também foram detectados durante o desenvolvimento do tegumento da semente de *V. unguiculata*. Nesse sistema, a MCP foi vista como sendo do tipo autolítica, ocorrendo de forma assíncrona, da camada paliçádica (mais externa) em direção

às camadas parenquimáticas (mais internas), a partir de 10 DAP. A partir desse estágio, as células do tegumento exibiram um progressivo fenótipo de MCP, tais como a perda da permeabilidade das membranas, a fragmentação do DNA nuclear e o desaparecimento de organelas. Durante esse processo, diferentes atividades caspase-símile foram detectadas, que exibiram um complexo padrão temporal-espacial (Lima *et al.*, 2015).

Em conjunto, esses trabalhos revelam que o tegumento de sementes em desenvolvimento constitui-se como um interessante modelo de estudo para eventos de MCP em organismos vegetais. Apesar da tendência no aumento no nível de detalhes disponíveis acerca desse fenômeno, sobretudo a partir dos avanços obtidos através dos estudos envolvendo mecanismos de controle genético e hormonal para o tegumento de *Arabidopsis*, pouco é conhecido sobre as mudanças nas propriedades mecânicas e bioquímicas que, em última instância, levam à ruptura do tegumento (testa) já amadurecido (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Em tabaco, a ruptura da testa tem início nas proximidades da extremidade micropilar que recobre a radícula, espalhando-se ao longo das cristas no tegumento. Essa ruptura é facilitada por estruturas similares a canais que circundam as cristas, o que sugere a existência de pontos de ruptura pré-determinados (Leubner-Metzger, 2003). A ruptura da testa de *Arabidopsis* também se inicia na extremidade micropilar, mas a existência de pontos de ruptura pré-determinados é desconhecida. Investigações futuras com enfoque em um potencial enfraquecimento enzimático, na redistribuição de água em conexão com a alongação celular e nos padrões de atividade transcriptômica são requeridos, no sentido de que podem esclarecer a forma como a ruptura da testa é controlada (Weitbrecht *et al.*, 2011).

Neste trabalho foram apresentados alguns dos fatores que levam as sementes a serem consideradas como fundamentais para o ciclo de vida de muitas plantas. O tegumento de sementes, por sua vez, exerce influências sobre diversos padrões que acabam por afetar as potencialidades de sobrevivência e de adaptação da nova planta em ambientes diversos. Puderam ser destacados também o papel e a importância de eventos de MCP na ontogenia não apenas dos tecidos embrionários, mas também do tegumento.

Apesar do crescente volume de informações acerca de aspectos

importantes do desenvolvimento da semente ao se considerar o padrão de acumulação de reservas, a biologia molecular do desenvolvimento embrionário e a maturação, quando se considera o desenvolvimento e os eventos relacionados à germinação que ocorrem no tegumento, torna-se evidente uma carência de maiores esclarecimentos.

Considerando-se o tegumento de sementes de soja, que é o objeto de estudo do presente trabalho, é importante destacar que no estágio maduro, essa região já foi bem caracterizada (Winton and Winton, 1932; Williams, 1950; Corner, 1951), dispondo de uma monocamada mais externa composta por células denominadas macrosclereídes, cujas paredes celulares são espessadas; uma região hipodérmica também constituída por uma única camada de células - os osteosclereídes ou células ampulheta, e uma região multicelular composta por células parenquimáticas. Todas essas camadas são originadas do integumento externo. Abaixo dessa região, se encontra uma camada de células remanescente do endosperma, a camada de aleurona.

Shea Miller *et alli* (1999) descreveram em detalhes, a histologia do desenvolvimento do tegumento dessa semente, descrevendo os passos das transformações de suas camadas, que se dão de forma ordenada de modo a sugerir a ocorrência de morte celular programada. Foi visto que a partir de uma estrutura com apenas três camadas de tecidos compostos por células similares, emerge um órgão complexo em termos de composição de camadas celulares. Ocorre a compressão da região do parênquima do integumento interno, fato que se completa praticamente no final da segunda semana após a ântese. Em seguida, até pouco antes do final da terceira semana após a ântese, o integumento externo se transfoma de uma fina região parenquimática para um complexo de tecidos compostos por uma região de parênquima com células com parede espessada, uma região de parênquima com células de parede mais fina, uma camada de ampulheta (hipoderme) e uma camada paliçádica (epiderme). À medida que se aproxima do estado maduro, o tegumento torna-se bastante reduzido em complexidade e parcialmente achatado.

Ainda que essa redução na complexidade dessa região no estado maduro parece estar relacionada à MCP, trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa têm apontado evidências da existência de atividades de proteases, incluindo atividades caspase-símiles, originadas a partir de tegumentos de sementes

quiescentes de *V. unguiculata*, *Lens culinaris*, *Cicer arietinum* e *G. max* (Lima, 2001; Rocha, 2011; Rocha, 2013). O complexo padrão de atividades dessa natureza também foi descrito para o tegumento da semente de *V. unguiculata* ao longo do desenvolvimento, onde também foram registrados importantes detalhes, a nível ultraestrutural e bioquímico, dos eventos de MCP que ocorrem no processo (Lima *et al.*, 2015).

A relação entre as atividades enzimáticas encontradas e os eventos de MCP do desenvolvimento do tegumento começa a ser esclarecida quando é considerado um contexto global, no qual se inserem outros trabalhos (Wan *et al.*, 2002; Van Dongen *et al.*, 2003; Nakaune *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2015). Ainda assim, os aspectos funcionais e os demais atributos das proteases originadas a partir do tegumento no estágio quiescente e sua possível relação com eventos ligados à embebição e à germinação, assim como a eventos do desenvolvimento necessitam de um maior detalhamento, já que podem revelar a existência de eventos de MCP, mesmo que de forma pontual, após a maturação do tegumento, que sejam importantes para o enfraquecimento do tegumento para a facilitação do fenômeno da protrusão da radícula.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O desenvolvimento da presente pesquisa visa caracterizar elementos bioquímicos e estruturais da morte celular programada envolvida no desenvolvimento e na germinação de sementes de soja, tendo como foco o tegumento.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar o padrão de marcadores bioquímicos (fragmentação do DNA nuclear e liberação do citocromo c da mitocôndria ao citosol) importantes de morte celular programada a partir de amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e durante o processo de germinação, em diferentes horas após a embebição;

2.2.2 - Avaliar o perfil de atividade enzimática contra substratos sintéticos de caspases e metacaspases em tegumentos de sementes de soja quiescentes e durante o processo de germinação, em diferentes horas após a embebição.

2.2.3 - Avaliar as alterações morfológicas a nível tecidual e celular por microscopia óptica e de transmissão que estejam relacionadas ao evento de morte celular programada, em tegumentos de sementes de soja quiescentes e durante o processo de germinação, em diferentes horas após a embebição.

2.2.4 - Identificar substratos alvo das proteases cisteínicas caspase-símile, metacaspase-símile e papaína-símile do tegumento de soja, que sejam relevantes às alterações relacionadas à germinação.

3. MATERIAIS E METODOLOGIAS

3.1 - Materiais

No presente trabalho foram utilizadas sementes de *Glycine max* (cultivar TMG-132RR) obtidas junto à empresa “Tropical Melhoramento & Genética- TMG (<http://www.tmg.agr.br/>)”. O cultivar foi utilizado nas experimentações, onde parâmetros bioquímicos e fenotípicos dos tegumentos, assim como das sementes inteiras, foram analisados ao longo de diferentes tempos após o evento de embebição.

3.2 - Esterilização das sementes

As sementes utilizadas em todas as etapas deste trabalho passaram por um processo de esterilização empregando uma solução de álcool 70%, na qual as mesmas permaneciam em contato por 1 minuto. Em seguida, foram lavadas com uma solução contendo 0,5% de hipoclorito de sódio e 0,1% de SDS por 30 s, passando, por fim, por cinco lavagens com água destilada autoclavada, com duração de 5 min cada.

3.3 - Testes de embebição

O processo de embebição das sementes do cultivar se deu com a utilização de 20 sementes de cada cultivar por placa de Petri. Cada grupo foi acondicionado em uma placa, que fora previamente forrada com 7g de algodão hidrófilo hidratado com 100 mL de água destilada autoclavada. As placas foram acondicionadas em estufa simuladora de fotoperíodo, sob as condições de 60% de umidade, 27°C de temperatura e fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). As sementes e respectivas plântulas foram então acompanhadas até 72 h após a embebição (tempo em que todos os tegumentos encontraram-se desprendidos).

3.4 - Análises estatísticas

Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism versão 5, segundo o qual a análise de variância gerada por esse programa foi realizada através do teste ANOVA com intervalo de confiança de 95% e pós testes de

Bonferroni e de Tukey com $p < 0,05$.

3.5 - Remoção de pigmentos

Os tegumentos das sementes e os eixos hipocótilo-radícula das plântulas de cada tempo foram macerados em nitrogênio líquido e então passaram por um processo de despigmentação como o emprego de uma solução de metanol 80%, na proporção de 1:5 (g:mL), por 5 min. Esse procedimento foi repetido por 5 vezes.

3.6 - Extração proteica das amostras vegetais (I)

Após a remoção dos pigmentos como descrito na seção 3.4, foi realizado o procedimento de extração proteica com tampão fosfato de sódio monobásico pH 7,5, 100 mM, 1% PVPP a 4°C sob constante agitação, por 2 h. A extração foi processada respeitando uma razão massa/volume de 1:10 (g/mL).

A esses procedimentos, seguiu-se uma centrifugação a 10.000 x *g*, na temperatura de 4°C, por 20 min, para separação do sobrenadante e de um precipitado, dos quais o nosso interesse estava voltado ao sobrenadante, que representa a fração proteica solubilizada pelas condições de extração empregadas.

3.7 - Extração proteica das amostras vegetais (II)

Para os ensaios de atividade e de inibição *in vitro* contra substratos de caspases (descritos adiante) e contra z-GGR-MCA, foi empregada a metodologia de extração proteica descrita por Lombardi *et alii* (2007 A), com a utilização de tampão de extração de proteínas HEPES-KOH 50 mM pH 7,0, sacarose 10% (massa/volume), CHAPS 0,1% (massa/volume), DTT 5 mM, EDTA 1 mM, por um período de 2 h a 4°C, sob constante agitação. Cada 100 mg de cada amostra de tegumento em diferentes HAE foi ressuspendido em 0,8 volumes do tampão. Os sobrenadantes foram então separados dos precipitados (descartados) por centrifugação por 10 min a 20.800 x *g* a 4°C. Esse ensaio foi realizado apenas para as amostras de tegumentos das sementes com os pigmentos removidos segundo o item 3.4.

3.8 - Dosagem de proteínas por BCA (Ácido Bicinconínico)

O teor protéico das amostras foi estimado utilizando-se a metodologia baseada no emprego do BCA (Smith *et al.*, 1985). Uma curva utilizando a proteína padrão ovalbumina foi estabelecida utilizando-se poços de placas de ensaio, nos quais foram adicionadas as seguintes quantidades de proteína: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 µg, a partir de uma solução estoque de 1mg/mL. Em seguida, a cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução contendo sulfato de cobre e ácido bicinconínico na proporção de 1:50. Após isso, foi feita uma incubação por 30 min a 37°C seguida pela leitura dos poços a 540 nm. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação do fator a ser empregado na estimativa do teor proteico das amostras, seguindo a lei de Lambert-Beer. O volume utilizado para a dosagem de proteínas nas amostras-teste foi de 6 µL a partir de soluções estoque de 1mg/µL, e foram seguidos os mesmos passos metodológicos descritos para os poços da curva padrão.

3.9 - Eletroforese SDS-PAGE

O protocolo de eletroforese SDS-PAGE seguiu a metodologia descrita por Laemmli (1970). A concentração da mistura de acrilamida/bis-acrilamida foi adaptável de acordo com o experimento. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris/HCl 0,5 M pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS e 1% de Bromofenol

blue). Cada gel foi repetido pelo menos duas vezes.

3.10 - Eletroforese SDS-PAGE gelatina (Zimografia)

Os géis SDS-PAGE foram copolimerizados com gelatina na concentração final de 0,1%. A concentração dos géis foi de 12 %. Após a corrida, os géis foram lavados por 30 min por duas vezes com Triton X-100. Em seguida, foram incubados em tampão citrato fosfato (citrato de sódio 100 mM, Triton X-100 0,1%, DTT 1,5 mM pH 5,6), o que proporciona condições favoráveis para a ocorrência de atividades de proteases cisteínicas; ou em tampão Tris-HCl 100 mM, EDTA 30 mM pH 7,5, favorável à atividades de proteases com preferência por pH neutro; em tampão Tris-HCl 50 mM, cloreto de cálcio 5 mM, sulfato de zinco 100 µM pH 8,0, para a verificação do efeito de íons de zinco sobre as atividades enzimáticas (Seliestre de Araújo, 2000); em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6, DTT 1 mM, BSA 0,1%, favorável para atividades de proteases caspase-símile; e em tampão Tris-HCl pH 7,5, cloreto de sódio 150 mM, DTT 5 mM, cloreto de cálcio 100 mM, favorável a atividades de metacaspases (Moss *et al.*, 2007). Cada gel foi repetido pelo menos duas vezes.

3.11 - Eletroforese SDS-PAGE gelatina (Zimografia) na presença e na ausência de inibidores de proteases

Géis corridos conforme o item 3.9. As amostras foram pré-incubadas na presença de inibidores de proteases classe-específicos por 16 horas a 37°C. Os inibidores foram: E-64 (Sigma Aldrich E3132) na concentração final de 10 µM, para a inibição de proteases cisteínicas; ácido iodoacético (Sigma Aldrich I4386) na concentração final de 5 mM, para a inibição de proteases cisteínicas em pH alcalino; EDTA (Sigma EDS) na concentração final de 10 mM, para o sequestro de íons metálicos; Ac-VAD-CHO (Sigma A1210) na concentração final de 100 µM, para a inibição de proteases caspase-símile; e H-EGR-cmk (Bachem 4018214.0005) na concentração final de 100µM, para a inibição de metacaspases. Os géis foram corridos e incubados nos respectivos tampões de atividade por 5 h, a 37 °C, segundo o item 3.9, e então corados e descorados. O E-64 é um potente e altamente seletivo inibidor de proteases cisteínicas, que se

liga irreversivelmente a um grupo tiol ativo em suas proteases alvo. O ácido iodoacético é um inibidor irreversível de proteases cisteínicas, reagindo com diferentes radicais: com o grupo sulfidril de resíduos de cisteínas, com os nitrogênios da cadeia lateral de resíduos de histidinas, com o grupo tioeter de resíduos de metionina e com o grupamento amina de lisinas. A taxa e a especificidade da reação dependem do pH das condições de reação. Em pH levemente alcalino, este inibidor promove a S-carboximetilação específica de sulfidrilas livres. O EDTA é um quelante de metais alcalinos terrosos, tais como o ferro, o cobre e o zinco. O inibidor tripeptídico Ac-VAD-CHO, é um análogo do inibidor de caspases Z-VAD-fmk. Esse complexo penetra nas células, onde atua como pseudo-substrato, inibindo irreversivelmente as caspases através de ligação ao resíduo de cisteína de seu sítio ativo, atuando dessa forma, como inibidor pancaspase. O tripeptídeo sintético H-EGR-cmk é um inibidor irreversível da uroquinase. Este promove a alquilação do resíduo de histidina no sítio ativo da enzima, e tem sido empregado em estudos com metacaspases, tais como os trabalhos de Bozhkov *et alii* (2005) e Sundström *et alii* (2009). Cada gel foi repetido pelo menos duas vezes.

3.12 - Coloração por Coomassie Brilliant Blue e descoloração

Os géis foram corados com uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R, tendo sido posteriormente descorados com uma solução contendo metanol 35%, ácido acético 10% e água.

3.13 - Ensaio de autólise de amostras de tegumento de sementes quiescentes

Para a avaliação da clivagem de substratos endógenos por proteases dos tecidos dos tegumentos das sementes em seu estágio quiescente, foi estabelecida uma metodologia em que 2 mg de extrato, obtido tal como descrito pelo item 3.5, foram incubados com 1 mL de tampão citrato-fosfato 100 mM contendo 0,1% de Triton X-100 e DTT 1,5 mM pH 5,6. Amostras também foram incubadas com esse tampão na presença do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO, cuja concentração final foi 20 µM; um grupo controle, não submetido à

incubação, foi estabelecido. Os tubos (exceto o controle) foram incubados por 16 h a 37°C. Após isso, foi realizada uma precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA), em que 0,1 volume de TCA 100% foi adicionado a 0,9 volumes de solução de amostra e cada tubo foi mantido em gelo por 30 min. Em seguida, foram centrifugados a 20.000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de acetona 90%, com posterior homogeneização e nova centrifugação a 20.000 x g a 4°C por 3 min. A acetona foi removida e 1 mL de acetona 80% foi adicionado em cada tubo, os quais passaram por mais uma etapa de centrifugação por 3 min a 20.000x g a 4°C. O precipitado foi seco em speedvac por 10 min. Em sequência, foi realizada a solubilização destes materiais em tampão de amostra com SDS 2x para posterior análise por uma corrida eletroforética em gel a 12% e sob voltagem de 80 V. Esse ensaio foi repetido duas vezes.

3.14 - Revelação por precipitação de nitrato de prata

A revelação por prata seguiu a metodologia de Dunn *et alli* (1994). Nesse processo, os géis foram postos em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10%, formol 37%) por 1 h. Após isso, foram lavados com solução de etanol 50% durante 20 min por duas vezes e, em seguida, lavados com uma solução de etanol 30% durante 20 min. Subsequentemente foram realizadas três lavagens dos géis com água destilada de 20 min de duração cada uma. Aos géis foi então adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg/100 mL) com mais 75 µL de formol e isso foi seguido por duas novas lavagens com água destilada de 20 s de duração, cada. Em seguida, aos géis foi adicionada uma solução de carbonato de sódio (6 g/100 mL), formol (50 µL) e 400 µL de tiosulfato de sódio (1 mg/mL) por aproximadamente 10 min, até o aparecimento das bandas. A partir daí, a solução fixadora foi adicionada novamente para parar a reação da solução com as bandas dos géis, seguindo-se três novas lavagens com água destilada de 1 min, cada uma. O gel foi então armazenado com uma solução de glicerol 2% por um período de 1 h.

3.15 - Eletroforese bi-dimensional para amostras de tegumento quiescente

Uma faixa de gel foi obtida a partir de géis SDS-PAGE na concentração de 15% (ao qual foi fornecido material em quantidade suficiente para prover 800 µg de proteínas) de modo a selecionar proteínas acima da região demarcada pelo marcador de 66 kDa (região onde aparecem as atividades de proteases cisteínicas nas zimografias). Essa faixa foi sonicada com o emprego de sonicador de haste, em 5 mL de uma solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,8; uréia 6 M; 30% de glicerol; 2% de SDS; 0,002% de azul de bromofenol; 0,5% de anfólitos (pH 3-10); 50 µM DTT em gelo por 20 vezes (15 s, cada etapa) com intervalos de 1:30 min entre as repetições. O conteúdo foi então centrifugado a 10.000 rpm por 5 min a 4°C, sendo o sobrenadante retirado e armazenado. O teor protéico foi estimado utilizando o produto 2-D Quant Kit (GE Healthcare). O conteúdo de 200 µL da amostra foi reduzido a 100 µL por secagem em speed-vac e filtrado em um filtro de poro de diâmetro de 0,46 µm (Millipore), sendo então aplicado (40 µg de proteínas) na caixa de aplicação para focalização em um strip de gradiente de pH de 3-10. A focalização teve duração de 24 h. Após essa etapa, o strip foi transferido a um gel SDS-PAGE a 12% para a corrida na segunda dimensão. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

3.16 - Preparo de amostra para identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Nessa etapa foram utilizadas bandas de proteínas de géis descritos no item 3.12 (banda A = 24 kDa e banda B = inferior a 24kDa, raia “Inc”) e “spots”, provenientes do gel descrito no item 3.14 (“spot 1” = pl 3, banda de maior maior massa entre 45 e 60 KDa; “spot 2” = pl 3, banda de menor massa entre 45 e 60 KDa).

As bandas proteicas e os “spots” foram excisados, descorados e subsequentemente secados a vácuo a 30°C, utilizando-se um CentriVap (Labcomo, Kansas, MO, EUA) (Balbuena *et al.*, 2009). A digestão do material seguiu a metodologia descrita por Vale *et alii* (2014). Brevemente, foram adicionados 15 µL (33 ng/µL; Promega, Madison, WI, EUA) de solução de tripsina ou de um volume suficiente para cobrir por inteiro o material, preparados em bicarbonato de amônio 50 mM. O material foi incubado a 37°C por 16 h em um

agitador (Bioer Technology, China). Em seguida, foram adicionados 25-50 μL de ácido trifluoroacético 5 % (TFA) (Sigma-Aldrich) e acetonitrila 50% (v/v) (Tedia) nos tubos contendo os fragmentos de géis, seguido por agitação por 30-60 min, sendo o sobrenadante transferido para novos tubos. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Os extratos foram concentrados a 10 μL , utilizando-se um CentriVap, desalinizados por Zip Tip C18 (Millipore, Billerico, MA, EUA) e transferidos para “Total Recovery Vials” (Waters).

3.17 - Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para análise por espectrometria de massas, foi utilizada uma coluna NanoAcquity UPLC conectada a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters). Durante a preparação, as amostras foram aplicadas à coluna de captura C18 (5 μm) NanoAcquity UPLC (180 μm x 20 mm) com fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 3 min e então à coluna analítica de fase reversa NanoAcquity HSS T3 1,8 μm (100 μm x 100 mm), com um fluxo de 500 nL/min. Para eluição dos peptídeos, um gradiente binário foi utilizado, com a fase móvel A consistindo de água ultrapura (Tedia, Fairfield, Ohio, EUA) e ácido fórmico 0,1% (Sigma-Aldrich) e a fase móvel B consistindo de acetonitrila (Sigma-Aldrich) e ácido fórmico 0,1%. O gradiente iniciou-se a 7-40% de B em 0-33.21 min; 40-85% de B em 33.21-37.21 min; 85-85% de B em 37.21-41.21 min; 85-7% de B em 41.21-43.21 min. A espectrometria de massas foi realizada nos modos positivos e de resolução (V mode) e no modo de aquisição independente de dados (DIA mode). A energia de colisão transferida aumentou de 20 V a 35 V no modo de alta energia. As voltagens do cone e do capilar foram de 30 V e 2800 V, respectivamente e a temperatura fonte foi de 60°C. As taxas de varredura de aquisição espectral foram reguladas para 0,5. O fibrinopeptídeo B [Glu1] humano na concentração de 100 fmol/mL foi utilizado como um calibrador externo. O processamento de espectro e as condições de busca no banco de dados foram realizados através do service “Protein Lynx Global Service v.3.02” (PLGS, Waters) com os seguintes parâmetros: duas combinações mínimas por fragmento iônico, cinco combinações mínimas por proteína, duas clivagens perdidas, reagentes modificadores fixos por carbamidometil C e reagente modificador variável para oxidação M, utilizando-se bancos de dados de proteínas de *Glycine max*. A classificação funcional foi

realizada utilizando-se o programa Blast2Go v. 3.0 e UniProtKB (<http://uniprot.org>). A análise foi repetida duas vezes.

3.18 - Extração de proteínas do tipo globulinas e albuminas

Amostra de tegumento no estágio quiescente foi tratada como descrito no item 3.4 para a remoção de pigmentos. Após essa etapa, foi realizado o fracionamento de proteínas em fração globulínica e fração albumínica, utilizando-se farinha de tegumento dissolvida na proporção de 1:10 (g/mL), em tampão fosfato de potássio 0,1 M, NaCl 0,5 M e 1 % de PVPP pH 8,0. A suspensão foi agitada por 2 h a 4°C no referido tampão e posteriormente, o material foi centrifugado por 30 min a 10.000 x g a 4°C, sendo descartado o precipitado. O sobrenadante foi dialisado contra água por 48 h (6 trocas de água) a 4°C e, após isso, novamente centrifugados por 30 min a 10.000 x g a 4°C. O sedimento representou a fração globulínica, enquanto o sobrenadante, a fração albumínica. O sedimento foi lavado com água por 3 vezes, intercaladas por centrifugação a 10.000 x g a 4°C, para a remoção de resíduos da fração albumínica.

3.19 - Análise da clivagem de substratos identificados por espectrometria de massas

Foi realizada a análise da clivagem de substratos identificados por espectrometria de massas pelo extrato de tegumentos quiescentes através de eletroforese SDS-PAGE com gel a 12 % e espessura de 1 mm. Os substratos analisados foram o inibidor de tripsina de soja (1 mg/1 mL) adquirido comercialmente (Sigma) e proteínas da fração proteica globulínica do tegumento quiescente (fração onde estão presentes as proteínas de reserva). Foi aplicada uma quantidade de amostra suficiente para prover 10 µg de proteínas por poço para o inibidor de tripsina e 20 µg para a fração globulínica. Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados com uma solução contendo um volume de extrato suficiente para prover 1,3 µg de proteínas por mL, solubilizadas em tampão contendo citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, DTT 1,5 mM e 0,1 % de Triton X-100 pH 5,6, por 16 h a 37 °C. Após essa etapa, o gel foi corado como descrito no item 3.11.

3.20 - Avaliação do efeito do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO sobre o processo de germinação

As sementes foram embebidas em placas de Petri na presença ou ausência do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO, cuja concentração final no ensaio foi de 20 μ M, assim como descrito por Suarez *et alii* (2004). Também foi estabelecido um grupo controle para a avaliação do efeito do DMSO sobre os parâmetros a serem analisados no ensaio, tendo em vista que este componente está presente na solução na qual o inibidor é dissolvido e tem potencial efeito citotóxico. A placa de Petri referente a cada tratamento foi forrada com 3 g de algodão hidrófilo e hidratada com 35 mL de água, ou solução contendo inibidor e/ou DMSO. O volume final de DMSO do grupo controle foi 230 μ L. A quantidade de sementes por placa foi 20 para as placas nas quais estava presente o inibidor (foram utilizadas duas placas para este tratamento) e 25 para as placas dos grupos controle. As condições de incubação, incluindo fotoperíodo, obedeceram as descritas no item 3.3. Cada grupo teve seu processo de germinação acompanhado de 3 a 72 HAE (3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas), sendo separadas 3 sementes de cada tempo (triplicata). Essas foram fotodocumentadas, pesadas e medidas quanto à largura e comprimento. O comprimento das radículas também foi mensurado, e após isso, foram separados os tegumentos, os cotilédones e a região do eixo embrionário/radícula, para análises bioquímicas posteriores. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPadPrism, versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Os dados foram submetidos a uma análise através do pós-teste ANOVA/Bonferroni. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

3.21 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-VAD-fmk para amostras embebidas na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO

Para a determinação da atividade de lise do substrato Ac-VAD-fmk (Sigma-Aldrich A0723), foram estabelecidos poços contendo 40 μ L de cada amostra de extratos obtidos (extraídos segundo o item 3.6) a partir de tegumentos de

sementes germinadas na presença e na ausência de 20 μM de Ac-VAD-CHO (inibidor pancaspase A1210); 4,5 μL do substrato e 105,5 μL de tampão de atividade (acetato de sódio 50 mM contendo 1 mM de DTT pH 4,5). Foram estabelecidos também poços contendo 145,5 μL de tampão e 4,5 μL de substrato, como branco do substrato. Além disso, poços contendo apenas tampão (150 μL) foram utilizados, como branco do tampão. O volume final do ensaio foi de 150 μL , sendo a placa de ensaio incubada por 5 h a 37°C. Após o período de incubação foi realizada uma leitura no comprimento de 405 nm em fluorímetro, utilizando os filtros de excitação de 390-400 nm e de emissão de 510-540 nm. Após isso, foram mensuradas as intensidades de fluorescência de cada poço, sendo estas convertidas em unidades de intensidade de fluorescência por μg de proteína. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

3.22 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-VEID-pNa na presença e na ausência do inibidor Ac-VEID-CHO

Para a determinação da atividade de lise do substrato Ac-VEID-pNa (Sigma-Aldrich A5220), foram realizados ensaios em placas de micropoços, em que cada poço continha 80 μL de cada amostra (extratos proteicos de tegumentos em diferentes horas após a embebição, extraídos segundo o item 3.6); 50 μL de substrato e 170 μL de tampão de atividade (acetato de sódio 50 mM pH 5,6). Foram estabelecidos também dois poços contendo 250 μL de tampão e 50 μL de substrato, como brancos do substrato, e poços contendo 80 μL de amostra e 220 μL de tampão (brancos da amostra). Além disso, dois poços contendo apenas tampão (150 μL) foram utilizados, como branco do tampão. O volume final do ensaio foi de 150 μL , sendo a placa de ensaio incubada por 5 h a 37°C. A concentração final do substrato foi de 80 μM . Após o período de incubação foi realizada uma leitura no comprimento de 405 nm. A unidade de atividade foi calculada utilizando-se a leitura de 5 μg de paranitroanilida livre como produto de clivagem padrão, sendo os dados expressos em nmol/min/mg (nmol de substrato clivado por minuto para cada miligrama de proteína). Para os estudos de inibição, foram estabelecidos poços com o inibidor Ac-VEID-CHO (Sigma-Aldrich A6339) na concentração de 80 μM . As amostras dos poços contendo o inibidor foram

incubadas com o mesmo por 15 min, antes da adição do substrato para o início do ensaio. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

3.23 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Ac-YVAD-fmk na presença e na ausência do inibidor Ac-YVAD-CHO

Para a determinação da atividade de lise do substrato Ac-YVAD-fmk (Sigma-Aldrich A9965), foram realizados ensaios em placas de micropoços, em que cada poço continha 80 μ L de cada amostra (extratos proteicos de tegumentos em diferentes horas após a embebição, extraídos segundo o item 3.6); 50 μ L de substrato e 170 μ L de tampão de atividade (acetato de sódio 50 mM pH 5,6). Foram estabelecidos também dois poços contendo 250 μ L de tampão e 50 μ L de substrato, como brancos do substrato, e poços contendo 80 μ L de amostra e 220 μ L de tampão (brancos da amostra). Além disso, dois poços contendo apenas tampão (150 μ L) foram utilizados, como branco do tampão. O volume final do ensaio foi de 150 μ L. A concentração final do substrato foi de 80 μ M. Para os estudos de inibição, foram estabelecidos poços com o inibidor Ac-YVAD-CHO (Sigma-Aldrich T7438) na concentração de 80 μ M. As amostras dos poços contendo o inibidor foram incubadas com o mesmo por 15 min, antes da adição do substrato para o início do ensaio. Os tubos foram incubados a 37°C por 8 h, sendo mensurada a intensidade de fluorescência dos mesmos em fluorímetro utilizando o comprimento de excitação de 400 nm e de emissão de 505 nm. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo de intensidade de fluorescência por μ g de proteína. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

3.24 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Z-GGR-MCA

Para a determinação da atividade de lise do substrato Z-GGR-MCA (Sigma-Aldrich C9396), foram estabelecidos poços contendo o substrato na concentração final de 80 μ M e 80 μ L de amostras de tegumento extraídos com a metodologia descrita no item 3.6. O tampão de atividade utilizado no ensaio foi o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo 150 mM de NaCl, 5 mM de DTT e 10

mM de CaCl_2 , adicionado em quantidade suficiente para completar o volume de 500 μL (volume de reação). Foram estabelecidos tubos contendo apenas o tampão, apenas o substrato e apenas a amostra como brancos da reação, além disso, foram estabelecidos tubos com a adição do inibidor H-EGR-cmk (Bachem 4018214.0005), na concentração de 80 μM . Os tubos foram incubados a 37°C por 8 h, sendo mensurada a intensidade de fluorescência dos mesmos em fluorímetro utilizando o comprimento de excitação de 355 nm e de emissão de 460 nm. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo de intensidade de fluorescência por μg de proteína. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

3.25 - Detecção de oligonucleossomos para as amostras de tegumento após a embebição

Para a estimativa do teor de fragmentos oligonucleossomais das amostras de tegumento ao longo do processo de germinação (12-72 HAE), foi utilizado o produto “Kit Cell Death Detection – Elisa” (Roche 11544675001), assim como no estágio quiescente. Para tanto, 50 mg de tegumento (obtidos de aproximadamente 10 sementes) de cada tempo foram macerados em nitrogênio líquido. Os materiais obtidos foram transferidos para tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 400 μL de tampão de lise, seguido de incubação a 4°C por 30 min. Os tubos foram então centrifugados a 200 x *g* por 10 min. O volume de 20 μL de cada tubo foi transferido para uma placa de micropoços, além de 20 μL da solução controle positivo. Em seguida, em cada poço foram adicionados 80 μL da solução do imunoreagente (Anti-DNA-POD + Anti-histona-biotina) (à exceção do branco do ensaio).

A placa foi então incubada por 2 h, sob agitação, a temperatura ambiente. O conteúdo da placa foi descartado, sendo os poços lavados com 300 μL de tampão de incubação por três vezes e incubados com 100 μL de ABTS (1 pastilha em 5 mL de tampão do substrato) por cerca de 20 min (tempo para o processamento da reação). A todos os poços foram adicionados 100 μL de solução de parada. Foram estabelecidos brancos contendo apenas 100 μL de ABTS e 100 μL de solução de parada, além de um controle negativo (tecido embrionário no estágio quiescente) com os mesmos volumes das amostras.

O comprimento de leitura do ensaio foi 405 nm, sendo calculado o fator de enriquecimento de oligonucleossomos das amostras com a seguinte fórmula, segundo a instrução do fabricante:

Fator de enriquecimento = mU da amostra / mU do controle negativo

mU = absorvância x $[10^{-3}]$

3.26 - Visualização da formação de “escada de DNA” - DNA ladder - em diferentes tempos após a embebição

Para a visualização do padrão de fragmentos de DNA do tegumento, em diferentes HAE, as amostras passaram por uma extração de DNA, na qual foi empregado o “Apoptotic DNA Ladder Kit” (Roche 11835246001). Foram utilizados 100 mg de tegumento (obtidos de aproximadamente 20 sementes) de cada tempo, que foram dissolvidos e incubados por 10 min a 25°C em 400 µL de tampão de ligação/lise, fornecido pelo kit. Em seguida, foram adicionados 100 µL de isopropanol em cada tubo, que foram agitados em vortex por 1 min. O conteúdo de cada tubo foi transferido para tubos filtros (fornecidos pelo kit) que foram previamente combinados com tubos de coletas (fornecidos pelo kit). Os materiais foram centrifugados por 1 min a 8000 rpm e os fluidos foram descartados. Os tubos filtros foram então combinados a novos tubos de coleta, sendo adicionados 500 µL de tampão de lavagem (fornecido pelo kit) em cada um, seguido de nova centrifugação por 1 min a 8000 rpm. Para a remoção de tampão residual, foi realizada uma centrifugação por 10 s a 13000 rpm. Os tubos de coleta, com seus respectivos fluidos, foram descartados e os tubos filtro foram transferidos a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de volume.

Aos tubos filtro, foram adicionados 200 µL de tampão de eluição (fornecido pelo kit) pré-aquecido a +70°C, seguido por centrifugação por 1 min a 8000 rpm. O material obtido teve seu teor de DNA mensurado por nanodrop e foi preparado para corrida eletroforética. Os tubos foram agitados por 30 s e centrifugados por 1 min, em centrífuga de bancada. Em seguida, alíquotas foram retiradas em quantidade suficiente para prover 1 µg de DNA por amostra, as quais foram misturadas a tampão de amostra (2x concentrado) e 3 µL do corante Safer Dye

(KASVI K9-16C). Foi estabelecido um controle positivo (fornecido pelo kit), seguindo as instruções do kit. As amostras foram aplicadas em um gel de agarose na concentração de 1%, e a eletroforese processou-se sob uma voltagem de 80 V. Após a corrida, o gel foi fotodocumentado.

3.27 - Obtenção da fração de proteínas citosólicas e mitocondriais a partir de sementes em diferentes estágios após a embebição

A obtenção da fração de proteínas citosólicas e mitocondriais seguiu a metodologia descrita por Lombardi *et alii* (2007 A), com modificações. Os tegumentos de sementes quiescentes e nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 HAE foram cuidadosamente removidos, macerados em nitrogênio líquido a um pó fino e homogeneizados em tampão de extração (manitol 0,4 M, Hepes-KOH 20 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, 0,2% BSA, 0,6% PVPP, cisteína 8 mM) na proporção de 100 mg de amostra para 2 volumes de tampão por 30 min. Em seguida, o homogenato foi filtrado por miracloth (Calbiochem) e centrifugado por 10 min a 1000 x *g* a 4°C, para a remoção de fragmentos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado por 20 min a 15000 x *g* a 4°C, para a precipitação da fração mitocondrial. O sobrenadante foi identificado como a fração citosólica e armazenado a -70°C após a adição de 5% de DMSO. O precipitado passou por 3 lavagens com tampão de lavagem (manitol 0,4 M, Hepes-KOH 20 mM pH 7,4, EDTA 1mM) intercaladas por centrifugação por 10 min a 1000 x *g* a 4°C. Após as etapas de lavagem, o precipitado foi considerado como a fração mitocondrial, sendo ressuspendido em 100 µL de tampão de lavagem e armazenado a -70°C após a adição de 5% de DMSO. Todos os passos foram realizados em gelo.

3.28 - “Western blotting” das frações de proteínas mitocondriais e citosólicas empregando o anticorpo anti-citocromo c

Essa etapa seguiu a metodologia descrita por Towbin *et alii* (1979), com modificações. As proteínas das frações citosólicas e mitocondriais, obtidas como descrito pelo item 3.26, foram separadas por eletroforese SDS-PAGE em gel na concentração de 12%. Foram aplicados 15 µL de cada material por poço, assim como 15 µL do controle positivo (citocromo c de coração equino – Sigma Aldrich

C7150 – na concentração estoque de 1 mg/mL). Após a corrida, os géis, os papéis filtro e as membranas de nitrocelulose (Hybond-C Amershan RPN303C) foram pré-equilibrados em tampão Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol pH 8,3) por 30 min. Em seguida, os componentes anteriores foram utilizados na montagem do sanduíche, em que 5 folhas de papel filtro foram posicionadas imediatamente acima do aparelho de transferência, em seguida foi posicionada a membrana de nitrocelulose, o gel e por fim mais 5 folhas de papel filtro, cuidadosamente para evitar a formação de bolhas. A transferência teve duração de 2 h, sendo o valor da corrente calculado segundo a razão de 1 V/cm². Após a etapa de transferência, as membranas foram reversivelmente coradas com a solução de Ponceau S (0,1% em ácido acético 0,5%) (Sigma Aldrich P7170) e lavadas com água destilada, para a remoção do corante. As membranas foram, então, bloqueadas com tampão bloqueador (fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 0,5 M pH 7,6, 1% de BSA) por 16 h a 4°C e lavadas com tampão de lavagem (fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 0,5 M pH 7,6, Tween 20 0,05%) por 5 vezes de 10 min. Em seguida foi adicionado à membrana, o anticorpo primário anti-citocromo c produzido em coelho (Sigma Aldrich, SAB4502234), diluído em tampão bloqueador com 0,05% de Tween 20 na proporção de 1:1000 por 16 h a 4°C. As membranas foram então lavadas por 5 vezes de 10 min, cada, com tampão de lavagem e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase produzido em cabra (Sigma Aldrich, 6154), diluído em tampão bloqueador com 0,05% de Tween 20 na proporção de 1:1000 por 2 h, a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com solução tampão de lavagem e 2 lavagens com tampão PBS (fosfato de sódio 100 mM, cloreto de sódio 0,5 M pH 7,6). Cada lavagem teve duração de 10 min. Após essa etapa, as membranas foram incubadas em uma solução contendo Tris-HCl 40 mM, Imidazole (Sigma Aldrich, I2399) 6 mM, 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich D8001) 2,8 mM e peróxido de hidrogênio (Sigma Aldrich, 349887) 0,03%, por 10 min a temperatura ambiente. A reação foi então interrompida com a adição de água destilada.

3.29 – Determinação da atividade da citocromo c oxidase

Para a determinação da atividade da enzima citocromo c oxidase, foi utilizado o “Cytochrome c oxidase assay kit” (Sigma Aldrich CYTOCOX1-1KT 097K4109). A metodologia seguiu as instruções do fabricante. Resumidamente, o espectrofotômetro foi previamente zerado com uma solução contendo 950 µL de tampão de ensaio (Tris-HCl 2 mM pH 7,0; KCl 24 mM), 100 µL de tampão de diluição da amostra (Tris-HCl 5 mM pH 7,0; sacarose 125 mM) e 50 µL da solução de ferrocitocromo c (2,7 mg/mL + 5 µL de DTT 0.1 M). Em seguida, foram realizadas as leituras das amostras, utilizando-se os volumes de 80 µL para as amostras das frações citosólicas e 15 µL para as amostras das frações mitocondriais, obtidas conforme o item 3.26. Estas foram adicionadas a tubos contendo respectivamente, 20 µL e 85 µL de tampão de diluição da amostra. Em seguida, foram adicionados 950 µL de tampão de ensaio e 50 µL da solução de ferrocitocromo c. O conteúdo foi gentilmente misturado por inversão, sendo imediatamente lido por seis vezes com 10 segundos de intervalo a 550 nm. Para o cálculo de unidades de atividade da citocromo c oxidase/mL foi utilizada a equação, sob instrução do fabricante:

$$\text{Unidades/mL} = \Delta A/\text{min} \times \text{dil} \times 1,1 / (\text{vol de enzima}) \times 21,84$$

Onde:

$$\Delta A/\text{min} = A/\text{min} (\text{amostra}) - A/\text{min} (\text{branco})$$

dil= fator de diluição da enzima ou amostra

1,1= volume da reação em mL

Vol da enzima= volume da enzima ou amostra em mL

21,84= $\Delta \epsilon^{\text{mM}}$ entre ferrocitocromo c e ferricitocromo c a 550 nm

Definição de unidade= uma unidade irá oxidar 1,0 µmol de ferrocitocromo c por minuto em pH 7,0 a 25 °C.

Após o cálculo das unidades de atividade por mL, os valores foram convertidos em unidades de atividade por grama de material.

3.30 - Análise micro-morfológica do tegumento de sementes soja (*Glycine max*) ao longo do processo de germinação por microscopia óptica

As sementes em diferentes HAE foram fixadas em uma solução contendo cacodilato de sódio 0,1 M, formaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% pH 7,2 por 48 h,

e lavadas 3 vezes (duração de 30 min) com tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2. Em seguida, as sementes foram pós-fixadas com tampão cacodilato de sódio 50 mM contendo 1% de OsO₄ por 1 h e lavadas 3 vezes (duração de 30 min) com tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2. Posteriormente, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e três vezes de 100%, por 1 h cada uma) e infiltradas em misturas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de epon (3 partes de acetona: 1 de epon; 2 partes de acetona: 1 de epon; 1 parte de acetona: 1 de epon; 1 parte de acetona: 2 de epon; 1 parte de acetona: 3 de epon), por 8 h cada uma. O processo de inclusão da resina foi realizado em epon puro e as amostras foram acondicionadas em estufa a 60 °C por 48 h para polimerização. Os blocos foram cortados em um ultramicrotomo (cortes de 0,5 µm de espessura), corados com azul de toluidina 1%, selados com Entellan R (Merck) e observados em microscópio de campo claro para avaliação da anatomia e morfologia dos tecidos do tegumento. Essa metodologia foi descrita por Lima *et alii* (2015).

3.31 - Análise subcelular do tegumento de sementes de soja (*Glycine max*) durante processo de germinação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os parâmetros ultraestruturais dos tegumentos de *G. max*, em diferentes HAE, foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, as sementes foram fixadas utilizando-se uma mistura de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 50 mM, pH 7,2 por 24 h a 4°C. Posteriormente, as sementes foram pós-fixadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e três vezes de 100%) e embebidas em resina epóxi (Epon®). Cortes ultrafinos (80 nm) foram montados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados em acetato de uranila alcoólico a 1%, seguidos por citrato de chumbo aquoso a 5%. As secções foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss TEM 900 (Zeiss, Wiesbaden, Germany) a uma voltagem de aceleração de 80 kV. Essa metodologia foi descrita por Lima *et alii* (2015).

4.0. RESULTADOS

4.1 - Perfil proteico do tegumento de sementes de soja quiescentes e em diferentes tempos após a embebição

O perfil proteico dos tegumentos de sementes quiescentes e em diferentes HAE (figura 5) revela uma diversidade de bandas de proteínas, sobretudo entre 15 e 70 kDa. Uma banda entre 35 e 40 kDa está presente do estágio quiescente a 36 HAE (retângulo). Outra banda de proteína entre 15 e 25 kDa parece reduzir-se em intensidade, estando mais bem representada no estágio quiescente e reduzindo-se continuamente até quase desaparecer nos tempos de 60 e 72 HAE (seta à esquerda). Uma banda entre 55 e 60 kDa mostrou-se presente apenas a partir de 36 HAE (pequena seta à direita).

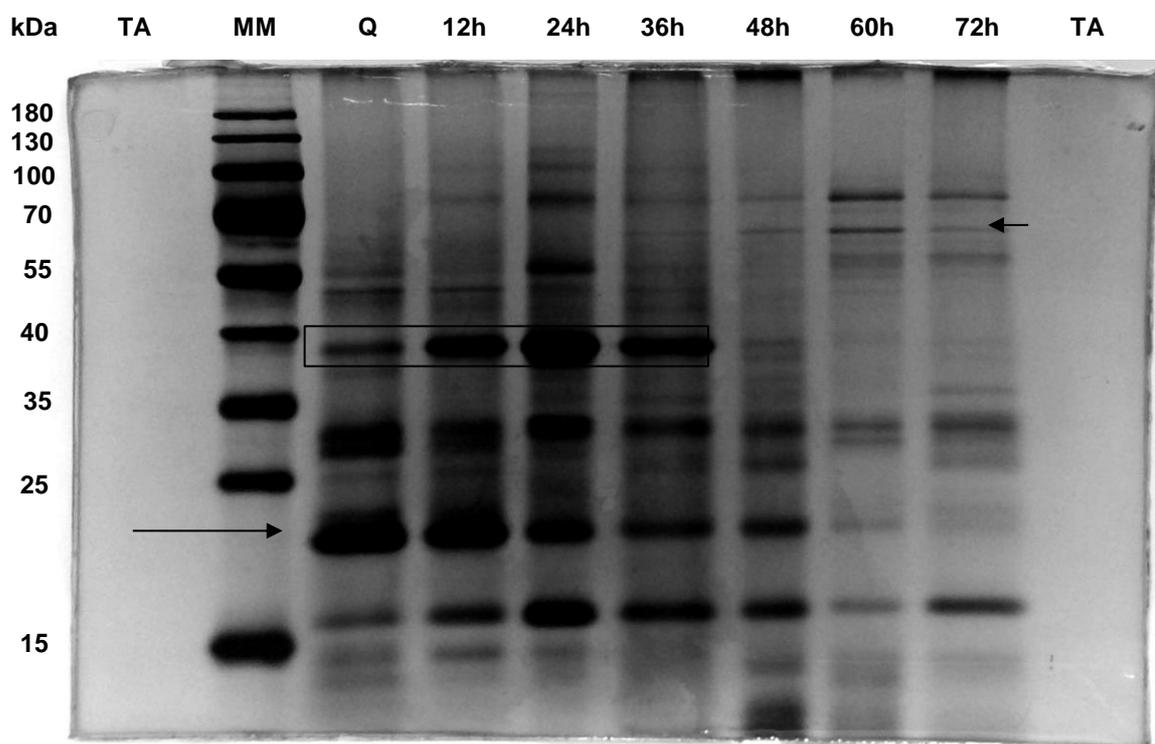


Figura 5: Eletroforese SDS-PAGE com gel a 12% para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4µg de proteínas/poço). Revelação por nitrato de prata. kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

4.2 - Análise do padrão de atividades enzimáticas do tegumento de soja em diferentes tempos após a embebição, por zimografia

As zimografias dos extratos protéicos, obtidos a partir de amostras de

tegumentos quiescentes e em diferentes HAE (extração com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5, 1% de PVPP por 2 h a 4°C), revelam uma riqueza de atividades proteolíticas. O perfil de atividade observado, quando os géis foram incubados em tampão favorável à atividade de proteases cisteínicas (tampão citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, DTT 1,5 mM, 0,1% de triton X-100 pH 5,6) (figura 6A), revela hidrólise de gelatina sob forma de arraste no estágio quiescente, numa faixa aproximada de 60 a 120 kDa. Bandas de atividade foram detectáveis apenas a partir do tempo de 12 HAE, sendo estas de massa molecular variável (entre 14 kDa e aproximadamente 55 kDa). Um arraste de aspecto similar ao detectado no estágio quiescente também pode ser constatado. Para o tempo de 24 HAE, apenas uma banda de massa molecular inferior a 40 kDa foi detectada, o que revela um padrão diferente ao observado nos outros estágios analisados. Com relação ao tratamento com o inibidor E-64 (figura 6B) (inibidor de proteases cisteínicas papaína-símile), a pré-incubação com o mesmo na concentração de 10 µM foi eficiente na redução e mesmo na completa inibição das bandas de atividade enzimática de massa molecular inferior a 55 kDa. O arraste não sofreu redução.

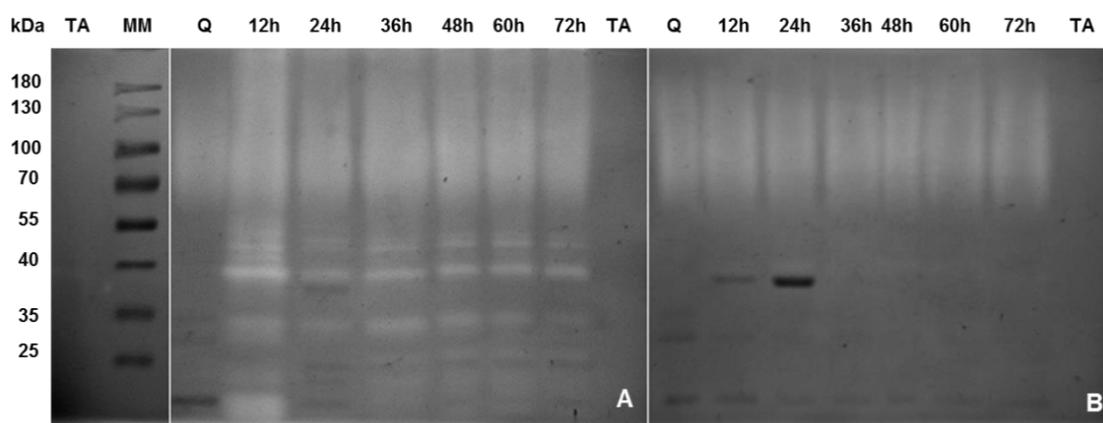


Figura 6: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade de proteases cisteínicas por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de E-64 (10 µM). kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

Com relação ao zimograma obtido a partir da incubação dos géis em tampão favorável à atividade de proteases em pH neutro (tampão Tris/HCl 100

mM pH 7,5, 30 mM de EDTA) (figura 7A), foi notória a intensa atividade gelatinolítica detectada a partir de tegumentos quiescentes, com um arraste detectável do topo do gel até a baixo de 70 kDa e bandas de atividade em um intervalo de uma região superior a 25 kDa até 55 kDa. Nos tempos de 12, 24 e 36 HAE há uma redução na intensidade das bandas, que voltam a aumentar em intensidade a partir do tempo de 48 HAE. Quando as amostras foram pré-incubadas com o inibidor de proteases cisteínicas, ácido iodoacético (5 mM) (figura 7B), houve inibição de bandas de atividade de massa molecular inferior a 55 kDa, além da redução da intensidade do arraste para o estágio quiescente, especialmente para amostras em 12 e 24 HAE. Para o tempo de 36 HAE houve a inibição de uma banda inferior a 25 kDa e uma redução na intensidade de uma banda entre 25 e 35 kDa. Para os demais tempos analisados, as atividades foram pouco afetadas.

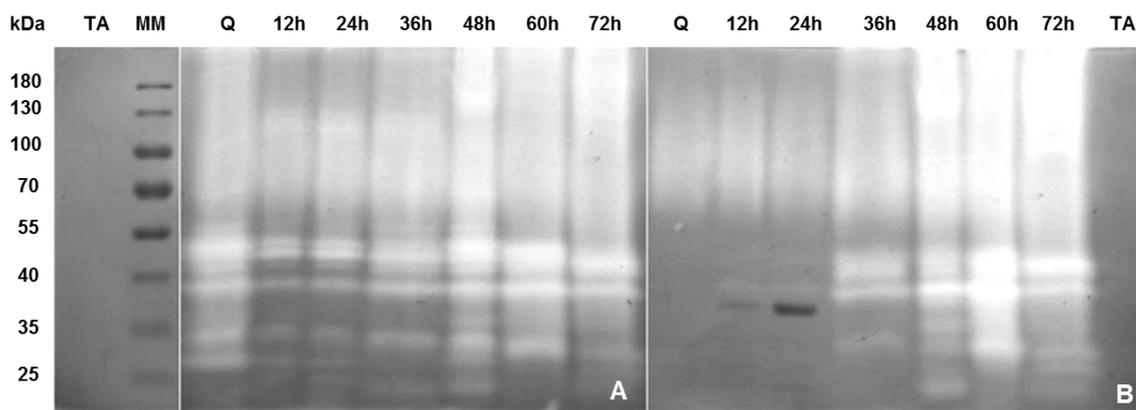


Figura 7: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade de proteases cisteínicas (pH 7,5) por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de ácido iodoacético (5 mM). kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

O perfil de atividades gelatinolíticas dos extratos protéicos, obtidos a partir de amostras de tegumentos quiescentes e em diferentes tempos após a embebição, em géis incubados na presença de tampão de atividade suplementado com zinco (tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, CaCl₂ 5 mM, ZnSO₄ 100 µM) (figura 8A), revela a presença de um arraste e uma banda de atividade de ~40 kDa para todos os estágios analisados, a qual aumenta em intensidade a

partir do tempo de 36 HAE. Ainda com relação a esse tempo, pode ser detectada uma banda de atividade entre 40 e 50 kDa, que também esteve presente em 48, 60 e 72 HAE. A partir de 36 HAE, também foi revelada uma banda de atividade inferior a 25 kDa. Na presença do inibidor EDTA (figura 8B), o perfil de atividade se altera, havendo a inibição apenas das bandas de massa molecular inferior a 25 kDa, detectadas a partir de 36 HAE. É notório que o tratamento com o inibidor permitiu a detecção de bandas, especialmente abaixo de 40 kDa, que não estão presentes no zimograma das amostras não incubadas com o inibidor (figura 6A).

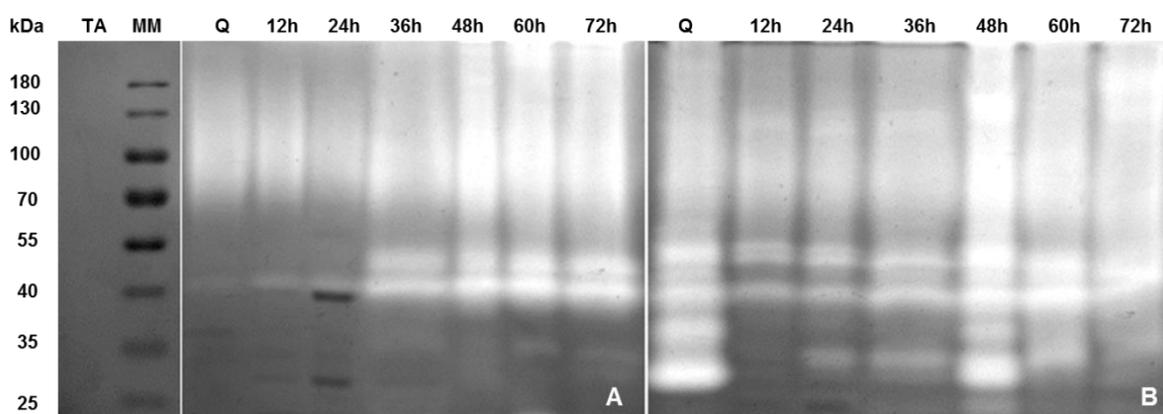


Figura 8: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão de atividade suplementado com zinco por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de EDTA (10 mM). kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

Com relação ao zimograma das amostras, após incubação com tampão acetato de sódio 50 mM, 1 mM DTT pH 5,6 (figura 9A) favorável à atividade de proteases caspases-símile, um arraste até uma região inferior a 70 kDa pode ser detectado, uma banda entre 100 e 130 kDa, além de bandas de atividade entre 35 kDa e 55 kDa. Sob tratamento com o inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO (figura 9B), uma banda entre 35 kDa e 55 kDa tem sua intensidade reduzida, assim como o arraste, e as demais bandas desaparecem.

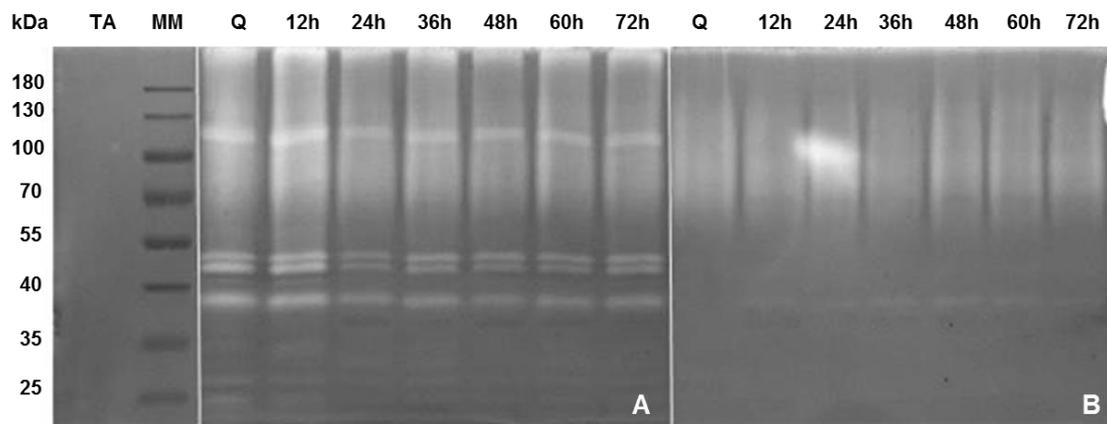


Figura 9: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão acetato de sódio 50 mM, 1 mM DTT pH 5,6 por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de Ac-VAD-CHO (100 µM). kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

O zimograma das amostras, após a incubação com o tampão favorável à atividade de metacaspases, Tris/HCl 50 mM, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM CaCl₂ (figura 10A), revela que já no estágio quiescente há uma diversidade de bandas de atividades proteolíticas: um arraste com duas bandas (entre 100 e 130 kDa; e entre 55 e 70 kDa), 8 bandas distribuídas entre 25 kDa e 55 kDa e uma banda na base do gel. Essa diversidade de bandas é reduzida nos tempos de 12 a 36 HAE. Em 48 HAE, há uma região de grande intensidade entre 130 e 180 kDa e o ressurgimento de uma banda entre 25 e 35 kDa, presente no estágio quiescente, mas ausente nos tempos de 12-36 HAE. Essa banda desaparece no tempo de 60 HAE. Na presença do inibidor de metacaspase H-EGR-CHO (figura 10B), ocorre redução na intensidade na região de arraste do estágio quiescente ao tempo de 24 HAE, também há a redução ou a completa inibição de bandas de atividade inferiores a 55 kDa, para os estágios já referidos. A banda de massa molecular entre 25 e 35 kDa, presente no tempo de 48 HAE, desaparece quando a amostra é pré-incubada com o inibidor. Também é notável que a presença do inibidor parece potencializar atividades enzimáticas inferiores a 25 kDa que são detectáveis na base do gel.

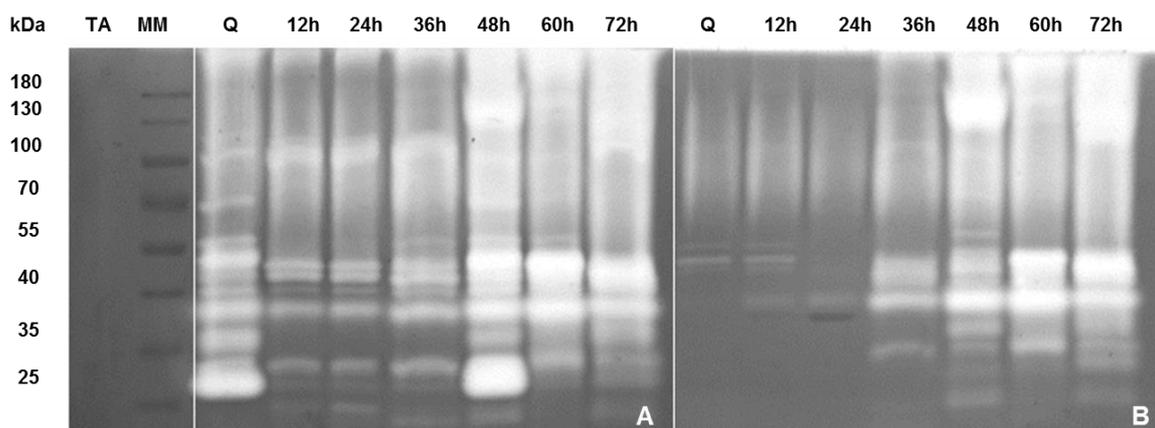


Figura 10: Eletroforeses do tipo SDS-PAGE gelatina (zimografia) em gel a 12%, com incubação em tampão Tris/HCl 50 mM, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM CaCl₂ pH 7,5 por 5 h, a 37°C, para amostras de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes horas após a embebição (4 µg de proteínas/poço), pré-incubadas por 16 h, a 37°C, na ausência (A) e na presença (B) de H-EGR-fmk (100 µM). kDa= Kilodaltons; TA= tampão de amostra; MM= marcadores moleculares; 0= estágio quiescente; 12-72= 12-72 horas após a embebição.

4.3 - Ensaio de autólise para extratos de tegumentos de sementes quiescentes de soja

Foi realizado um ensaio de autólise da amostra no estágio quiescente para a identificação de potenciais substratos das proteases cisteínicas responsáveis pelas atividades gelatinolíticas detectadas nas zimografias.

O ensaio de autólise para amostras de tegumentos de sementes quiescentes de soja (figura 11) revelou que a incubação das mesmas, em condições favoráveis para a atividade de proteases cisteínicas, gerou diferenças no padrão de bandas proteicas. Uma banda marcante, entre 24 e 35 kDa, presente na amostra controle, não foi detectada na amostra após o tempo de incubação permitido para que autólise pudesse ocorrer, sugerindo que a mesma foi degradada por proteases endógenas. As amostras incubadas apresentaram uma banda de 24 kDa (banda A) que não estava presente na amostra controle e outra banda, inferior a 24 kDa (banda B), de maior intensidade em relação ao controle, ambas realçadas na figura 11 por caixas pretas. As amostras incubadas na presença de 20 µM de Ac-VAD-CHO (inibidor pancaspase) não mostraram diferença de perfil protéico em relação às amostras incubadas na ausência deste inibidor.

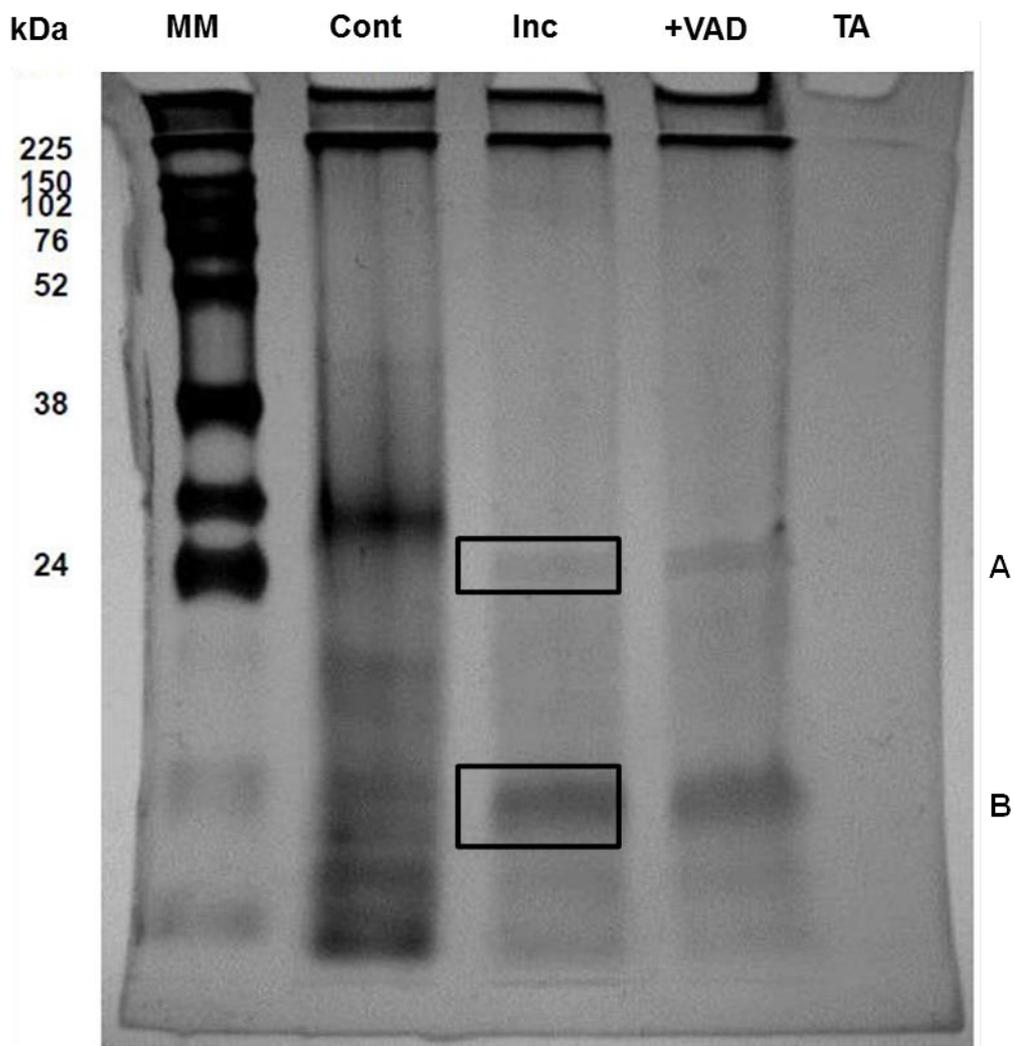


Figura 11: Eletroforese SDS-PAGE (12%) para amostras de tegumentos de sementes quiescentes de soja, incubadas com tampão citrato-fosfato 100 mM, DTT 1,5 mM e 0,1% de Triton X-100 por 16 h, a 37°C (Inc), sem incubação (Cont) e incubadas na presença de Ac-VAD-CHO 20 μ M (+VAD). MM= marcadores moleculares, TA= tampão de amostra, A= banda de 24 kDa, B= banda inferior a 24 kDa.

4.4 - Eletroforese bidimensional para amostras de tegumento quiescente

A eletroforese bi-dimensional das proteínas de massa molecular superior a 66 kDa das amostras de tegumento quiescente (figura 12), que representam a região onde as atividades proteolíticas são detectadas nos zimogramas, revelou apenas dois “spots”. Esses “spots” apresentaram massa molecular entre 45 kDa e cerca de 60 kDa, sendo a massa molecular do spot 1 superior a do spot 2.

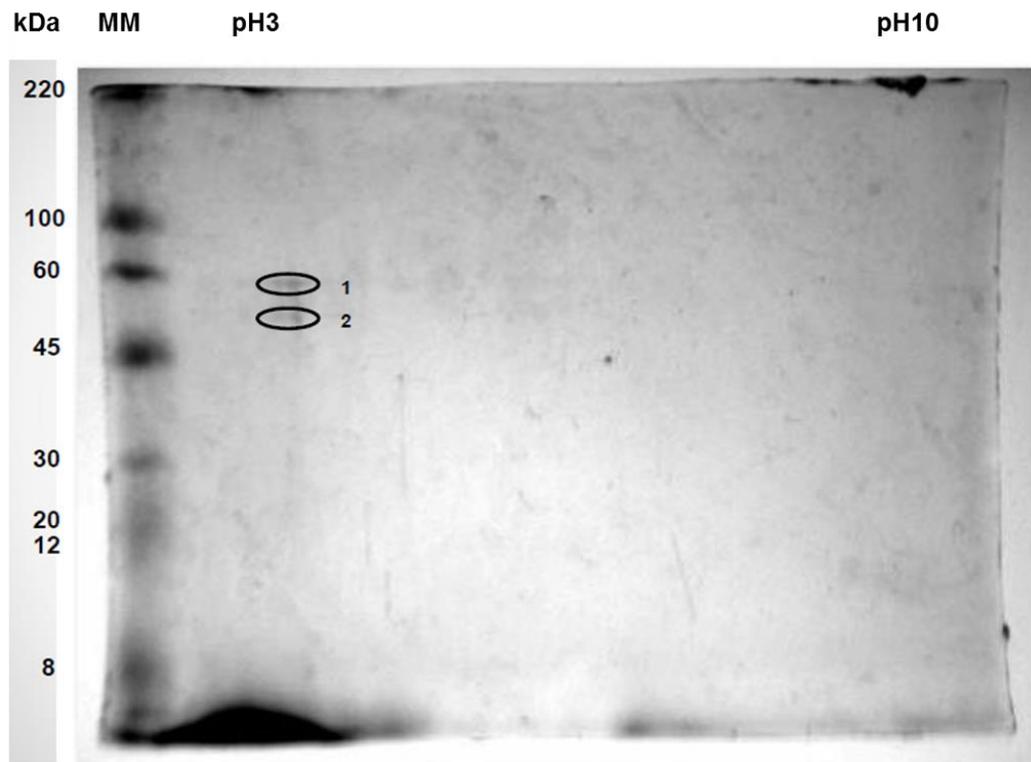


Figura 12: Eletroforese bidimensional para proteínas de massa molecular superior a 66KDa das amostras de tegumentos de sementes quiescentes. MM= marcadores moleculares; pH 3- pH 10 = gradiente de pH do strip utilizado na focalização isoeletrica; 1= “spot” entre 45 e 60 kDa, com maior massa; 2= “spot” entre 45 e 60 kDa, de menor massa, excisados para análise por espectrometria de massas. Quantidade de proteínas aplicadas em gel: 40 µg.

4.5- Identificação de peptídeos por espectrometria de massas

Essa etapa foi realizada para as amostras obtidas a partir de bandas e “spots” dos itens 4.3 e 4.4. As proteínas identificadas para a banda A (quadro 1) foram principalmente inibidores de tripsina da família Kunitz do tipo 1. O mínimo de fragmentos peptídicos obtidos foi de três para a proteína Q8W09; para as demais proteínas identificadas foram obtidos quatro fragmentos peptídicos. Para a banda B (quadro 2), foram identificadas 42 proteínas, dentre as quais destaca-se o número de sequências de inibidores de tripsina (13 proteínas) e a presença de sequências de proteínas de reserva como a glicinina e a β -conglucina.

Código (uniprot)	Gene	Proteína	Descrição	Massa (kDa)	Pontuação	Peptídeos	Identidade (%)	Cobertura (%)	Sequências peptídicas
C6T488	N/A	Proteína não caracterizada	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,403	1550,86	4	100	19,35	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK FIAEGHPLSLK
Q94IA1	Tie	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,333	1550,86	4	100	19,35	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK FIAEGHPLSLK
Q9ATY1	N/A	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,434	1550,86	4	100	19,44	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK FIAEGHPLSLK
Q39898	Ti-a	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,361	1550,86	4	100	19,35	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK FIAEGHPLSLK
ITRA	KTI3	Inibidor de tripsina A	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,290	1550,86	4	100	19,44	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK FIAEGHPLSLK
Q9LD16	N/A	Inibidor de tripsina (Kunitz tipo 3)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,295	1513,23	3	100	14,81	GIGTISSPYR VSDDEFNYYK FIAEGHPLSLK
Q9ATY0	N/A	Inibidor de tripsina Kunitz truncado	Inibidor tipo Kunitz ST1	16,134	1413,60	2	100	15,17	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK
Q8W0V9	N/A	Proteína de 24KDa SC24	Alginato Liase 2	24,626	837,13	4	100	27,40	VYGGSLTHYQSPTLEPNI YNR FNVIHDVGANNVK IFLNGEDNPR FGVYAQDGASNYMESR

Quadro 1: Proteínas identificadas a partir da banda A, destacada em caixa preta na eletroforese mostrada na figura 11.

Código (uniprot)	Gene	Proteína	Descrição	Massa (kDa)	Peptídeos	Pontuação	Identidade (%)	Cobertura (%)	Sequências peptídicas
C6T488	N/A	Proteína não caracterizada	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,403	7	5590,23	100	29,03	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NKPLVVQFQK NELDKGIGTISSPYR LERSDDEFNNYK IGENKDAMDGWFR
Q94IA1	Tie	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,333	6	5590,23	100	23,04	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NKPLVVQFQK NELDKGIGTISSPYR LERSDDEFNNYK
Q9ATY1	N/A	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,434	7	5590,23	100	29,17	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NKPLVVQFQK NELDKGIGTISSPYR LERSDDEFNNYK IGENKDAMDGWFR
Q39898	Ti-a	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,361	7	5590,23	100	29,03	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NKPLVVQFQK NELDKGIGTISSPYR LERSDDEFNNYK IGENKDAMDGWFR
P01070	KTI3	Inibidor de tripsina A	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,290	7	5590,23	100	29,17	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NKPLVVQFQK NELDKGIGTISSPYR LERSDDEFNNYK IGENKDAMDGWFR
Q9LD16	N/A	Inibidor de tripsina (Kunitz 3) tipo	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,295	6	4997,22	100	24,54	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK VSDDEFNNYK NELDKGIGTISSPYR

									LERSDDEFNYYK IGENKDAMDGWFR
Q9ATY0	N/A	Inibidor de tripsina incompleto	Inibidor tipo Kunitz ST1	16,134	4	4519,25	100	27,59	GIGTISSPYR FIAEGHPLSLK NELDKGIGTISSPYR IGENKDAMDGWFR
C6T588	N/A	Proteína não caracterizada	Betv1 (defesa)	16,817	6	2551,86	100	55,70	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK GVFTFEDETTSPVAPATLYK SVENVEGNNGPGTIK LAAGANGGSAGK SDALFKAVEAYLLAHPDYN
Q76B18	Tic	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,433	5	2334,51	100	21,66	FIAEGHPLSLK VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK LERSDDEFNYYK IGENKDAMDGWFR
K7L3M0	N/A	Proteína não caracterizada	Betv1 (defesa)	16,844	6	2152,19	100	46,84	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK SVENVEGNNGPGTIK LAAGANGGSAGK SDALFKAVEAYLLAHPDYN ALVTDADNVIPKALDSFK
Q8LJU1	N/A	Proteína PR10-símile	Betv1 (defesa)	13,640	4	2143,13	100	33,86	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK SVENVEGNNGPGTIK ALVTDADNVIPKALDSFK
C6T1G1	N/A	Proteína PR10-símile	Betv1 (defesa)	16,772	4	2143,13	100	27,22	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK SVENVEGNNGPGTIK ALVTDADNVIPKALDSFK
SAM22	N/A	Proteína SAM22 induzida por estresse	Betv1/MLP (defesa)	16,772	4	2143,13	100	27,22	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK SVENVEGNNGPGTIK ALVTDADNVIPKALDSFK
Q9FEZ8	dd4/62	Proteína SAM22-símile induzida por estresse	Betv1/MLP (defesa)	10,852	3	2049,06	100	27,45	ALVTDADNVIPK ITFLEDGETK ALVTDADNVIPKALDSFK
C6TFW4	N/A	Proteína não	Betv1/MLP	16,785	5	1518,96	100	44,30	ALVTDADNVIPK

		caracterizada	(defesa)						GVFTFEDETTSPVAPATLYK ITFVEDGESK SVENLEGNGGPGTIKK LAAGANGGSAGK
I1KMV1	N/A	Proteína não caracterizada	Betv1/MLP (defesa)	15,534	2	1175,79	100	17,12	ITFLEDGETK SVENVEGNGGPGTIK
I1J7G5	N/A	Proteína não caracterizada	-	18,568	5	1150,42	100	24,71	LYALDDELK LVSPAFSNEGK GLPEGFSGK NYTDEGQGAK LVSPAFSNEGKLPK
Q43453	N/A	RNA _m de gene induzido por estresse (H4)	Betv1/MLP (defensa)	16,813	4	1119,29	100	31,65	ALVTDADNVIPK ITFVEDGESK SVENLEGNGGPGTIKK LAAGANGGSAGK
ITRB	N/A	Inibidor de tripsina B	Inibidor tipo Kunitz ST1	20,268	2	1070,97	100	19,2	VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK
Q39899	Ti-b	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz)	Inibidor tipo Kunitz ST1	24,308	2	1070,97	100	11,05	VSDDEFNYYK NKPLVVQFQK
I1KMV0	N/A	Proteína não caracterizada	Betv1/MLP (defensa)	17,600	3	885,01	100	20,00	ALVTDADNVIPK SVENVEGNGGPGTIK ALVTDADNVIPKALDSFK
I1LRP2	N/A	Proteína não caracterizada	Disease-R_pln	19,490	3	593,01	100	18,89	ELSVVSGTGR GYAAFETVFYDPGTAHSVIR ESYKELSVVSGTGR
C6SWW4	N/A	Proteína não caracterizada	Inibidor tipo Kunitz ST1	22,731	1	593,01	100	1,49	NKPLVVQFQK
P25272	KT11	Inibidor de tripsina (tipo Kunitz) KT11	Inibidor tipo Kunitz ST1	22,831	1	545,89	100	1,49	NKPLVVQFQK
K7KDU7	N/A	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	PPI-ase (domínio FKBP)	11,662	3	545,89	100	39,22	LTDGTVFDSSFE NNPIEFELGTGQVIK TGDVTELQIGVK
C6SV88	N/A	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	PPI-ase (domínio FKBP)	16,004	3	545,89	100	27,21	LTDGTVFDSSFER NNPIEFELGTGQVIK TGDVTELQIGVK
I1JM67	N/A	Peptidil-prolil cis-trans	PPI-ase (domínio	16,103	3	545,89	100	27,21	LTDGTVFDSSFER NNPIEFELGTGQVIK

		isomerase	FKBP)						TGDVTELQIGVK
C6SYR2	N/A	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	PPI-ase (domínio FKBP)	16,884	3	447,83	100	25,97	LTDGTVFDSSFER NNPIEFELGTGQVIK TGDVTELQIGVK
I1JM68	N/A	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	PPI-ase (domínio FKBP)	13,274	2	379,69	100	23,14	LTDGTVFDSSFER NNPIEFELGTGQVIK
Q8W0V9	N/A	Proteína de 24KDa SC24	Alginato liase 2	24,626	3	226,61	100	20,09	VYGGSLTHYQSPTLEPNINR FNVIHVDVGANNVK IFLNGEDNPR
C6SWI5	N/A	Proteína não caracterizada	Inibidor tipo Kunitz ST1	21,981	2	226,61	100	11,06	DYYIKPAITDVGGR ITETPIK
I1LVB1	N/A	Proteína não caracterizada	Inibidor tipo Kunitz ST1	21,967	2	195,80	100	11,06	DYYIKPAITDVGGR ITETPIK
GLYG1	GY1	Glicinina G1	Reserva de nutrientes	56,333	8	85,54	100	18,18	SQSDNFEYVSFK VFDGELQEGR LSAEFGSLR LIQVVNCNGER FLVPPQESQK MAKLVFSLCFLLFSGCCFAFSSR YQQEQGGHQSQK GK MAKLVFSLCFLLFSGCCFAFSSR
I1KAB7	N/A	Proteína dissulfeto isomerase	Rearranjo de pontes dissulfeto	56,400	8	114,27	100	15,71	SEPIPETNDEPVK GESSVSGPVVR SDYDFGHTLNAK EFVLTLDHSNFHDTVSK DKPAQQEQGKDEQEQQK DLASQYDVK QSGPASTEIK NGGKNVQEYK
Q7XXT2	N/A	Prepro beta- subunidade alfa prime de beta conglucina	Reserva de nutrientes	72,532	5	114,27	100	10,59	VPAGTTYVVNPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR DSYNLQSGDALR
Q0MUU5	N/A	Subunidade alfa de beta conglucina	Reserva de nutrientes	70,172	5	114,27	100	10,61	VPAGTTYVVNPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR

									DSYNLQSGDALR
Q948Y0	N/A	Subunidade alfa prime de beta conglucina	Reserva de nutrientes	72,423	5	114,27	100	10,59	VPAGTTYVVPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR DSYNLQSGDALR
Q84UB3	GM7S	Subunidade alfa de beta conglucina	Reserva de nutrientes	45,019	5	114,27	100	10,93	VPAGTTYVVPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR DSYNLQSGDALR
Q9FZP9	N/A	Subunidade alfa de beta conglucina	Reserva de nutrientes	65,199	5	114,27	100	10,66	VPAGTTYVVPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR DSYNLQSGDALR
Q4LER6	Cgy-1	Subunidade alfa prime de beta conglucina	Reserva de nutrientes	72,228	5	114,27	100	10,59	VPAGTTYVVPDNDENLR NILEASYDTK LFEITPEK GPLSSILR DSYNLQSGDALR
K7KN23	N/A	Proteína não caracterizada	Atividade de alfa glicosidase	64,901	5	119,79	100	7,06	NYELKEGLLR AVAGTGMWECVDFPVS NWMNDPNGPMYYK YDYGIFYASK DPTTAWLTSEGK
I1K0L4	N/A	Proteína não caracterizada	Atividade de alfa glicosidase	71,986	5	119,79	100	10,63	NYELKEGLLR AVAGTGMWECVDFPVS NWMNDPNGPMYYK YDYGIFYASK DPTTAWLTSEGK
I1K0L5	N/A	Proteína não caracterizada	Atividade de alfa glicosidase	62,184	5	119,79	100	10,74	NYELKEGLLR AVAGTGMWECVDFPVS NWMNDPNGPMYYK YDYGIFYASK DPTTAWLTSEGK

Quadro 2: Proteínas identificadas a partir da banda B, destacada em caixa preta, na eletroforese vista na figura 11.

Os “spots” obtidos a partir de eletroforese bi-dimensional foram analisados com o intuito da detecção de seqüências peptídicas das proteases responsáveis pelas atividades gelatinolíticas, visualizadas nas zimografias. Os resultados das análises por espectrometria de massas tanto do “spot 1” (quadro 3) como do “spot 2” (quadro 4) não revelaram seqüências de proteases, mas sim a presença de outras proteínas.

Código (uniprot)	Gene	Proteína	Descrição	Massa (kDa)	Peptídeos	Pontuação	Identidade (%)	Cobertura (%)	Sequências peptídicas
C6T190	N/A	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	PPlase FKBP	12,154	2	182,14	100	26,79	IGQGSVIK SGTGPKPIPGQNVTVHCTGFGK
K7N1E3	N/A	Proteína não caracterizada	-	8,049	2	110	100	41,89	QAPSPVTTAKKPPPPGK SATISTTNQPHQER

Quadro 3: Proteínas identificadas a partir do “spot 1” da eletroforese da figura 12.

Código (uniprot)	Gene	Proteína	Descrição	Massa (kDa)	Pontuação	Peptídeos	Identidade (%)	Cobertura (%)	Sequências peptídicas
K7MIM6	N/A	Proteína não caracterizada	Transmembrane	40,028	110,85	2	100	4,09	LPLRPDK YYCMLSR
I1JGA3	N/A	Proteína não caracterizada	Kbox, MADsbox	28,092	90,77	3	100	13,77	IENLNSR ELQQLLENQLSEGMQSVKDK ELDGLSLK

Quadro 4: Proteínas identificadas a partir do “spot 2” da eletroforese da figura 12.

4.6 - Análise da clivagem de substratos identificados por espectrometria de massas

Dentre os substratos identificados por espectrometria de massas presentes na banda B, estavam presentes inibidores de tripsina e proteínas de reserva (quadro 2). A detecção da clivagem dessas proteínas por proteases do extrato protéico (obtido segundo o item 3.5) as indica como potenciais substratos de proteases do tegumento. A verificação da clivagem *in vitro* dessas proteínas pelas proteases do extrato (figura 13), as indica como potenciais substratos de proteases do tegumento. Apenas uma das bandas detectadas na fração globulínica (dentre as quais estão as proteínas de reserva) não foi degradada por proteases cisteínicas do extrato (figura 13B, seta). O inibidor de tripsina de soja foi completamente degradado, assim como as duas bandas presentes na fração de proteínas albumínicas e demais bandas da fração globulínica (figura 13B).

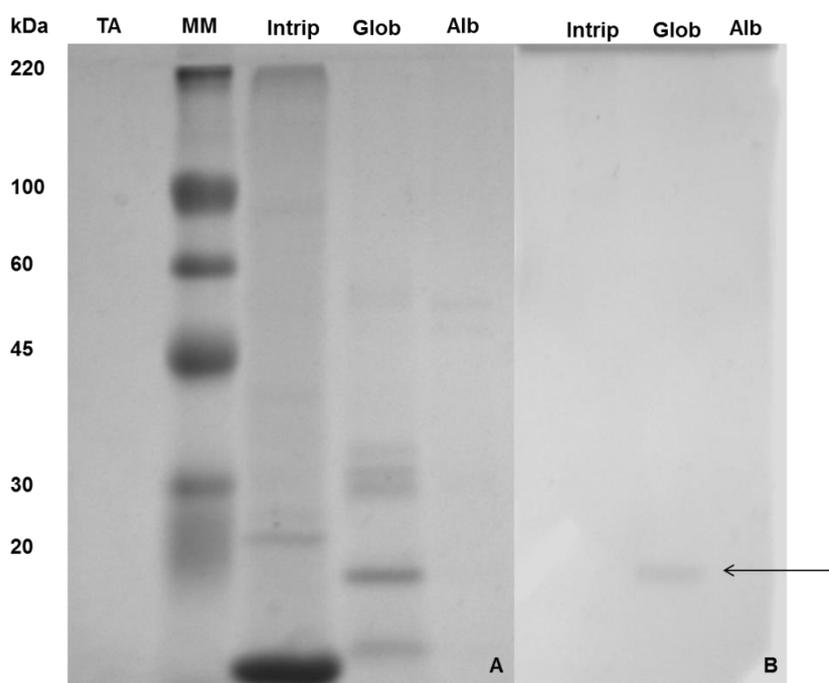


Figura 13: Visualização eletroforética (SDS-PAGE 10%) do inibidor de tripsina de soja (Intrip), da fração de proteínas globulares (Glob) e da fração de proteínas albumínicas (Alb) antes da incubação (A) e após a incubação (B) com o extrato de tegumento quiescente de soja em tampão de atividade de proteases cisteínicas. MM= marcadores de massa molecular; TA= tampão de amostra; Intrip= inibidor de tripsina; Glob= fração globulínica; Alb= fração albumínica.

4.7 - Análise do padrão de globulinas do tegumento de sementes de soja no estágio quiescente e em diferentes tempos após a embebição

O perfil de proteínas das frações de globulinas obtidas a partir de amostras de tegumento em diferentes HAE (figura 14) revela uma maior diversidade de bandas de proteínas para o estágio quiescente, que apresentou uma banda entre 15 e 25 kDa; duas bandas entre 25 e 30 kDa; e outras bandas entre 40 e 55 kDa; 55 e 70 kDa; 70 e 100 kDa e entre 100 e 130 kDa. Para os tempos de 12 e 24 HAE uma banda majoritária, pouco inferior a 40 kDa pode ser observada, estando presentes também bandas entre 55 e 70 kDa; entre 70 e 100 kDa, e entre 100 e 110 kDa. Para o tempo de 12 HAE, há a presença de uma banda entre 25 e 35 kDa que está ausente no tempo de 24 HAE, que possui, por sua vez uma banda entre 10 e 15 kDa que está ausente no tempo de 12 HAE. Após o tempo de 24 HAE poucas bandas são representadas, revelando-se com baixa intensidade, indicando que a partir deste tempo ocorre uma intensa mobilização de proteínas de reserva.

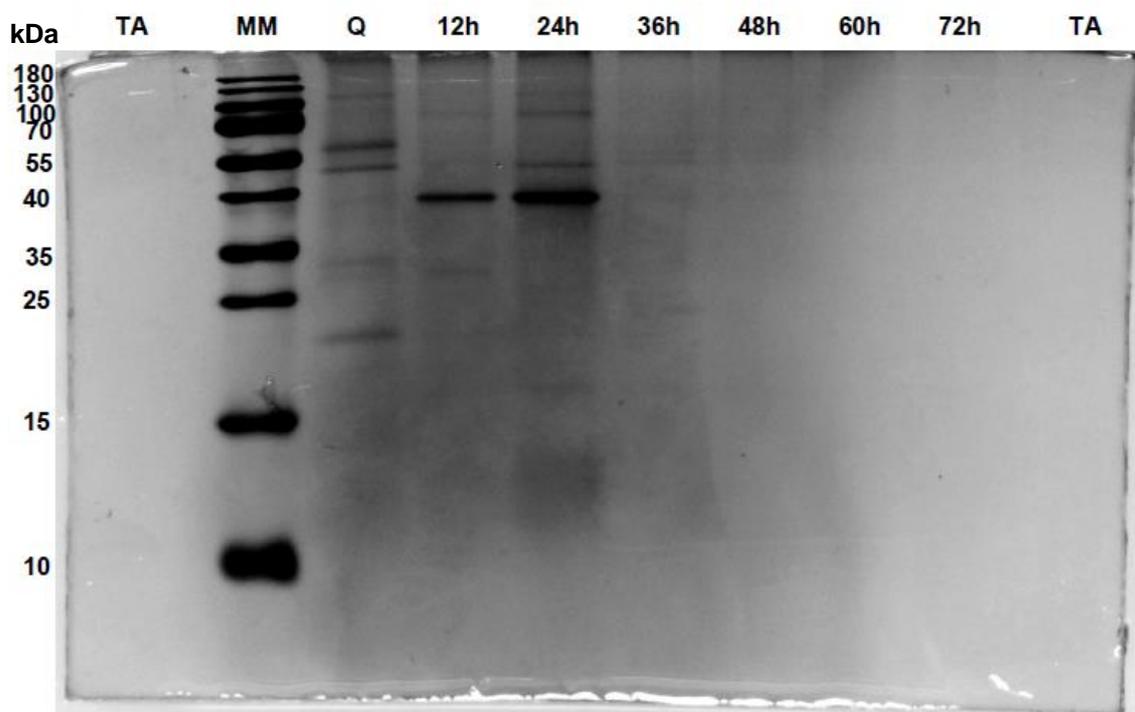
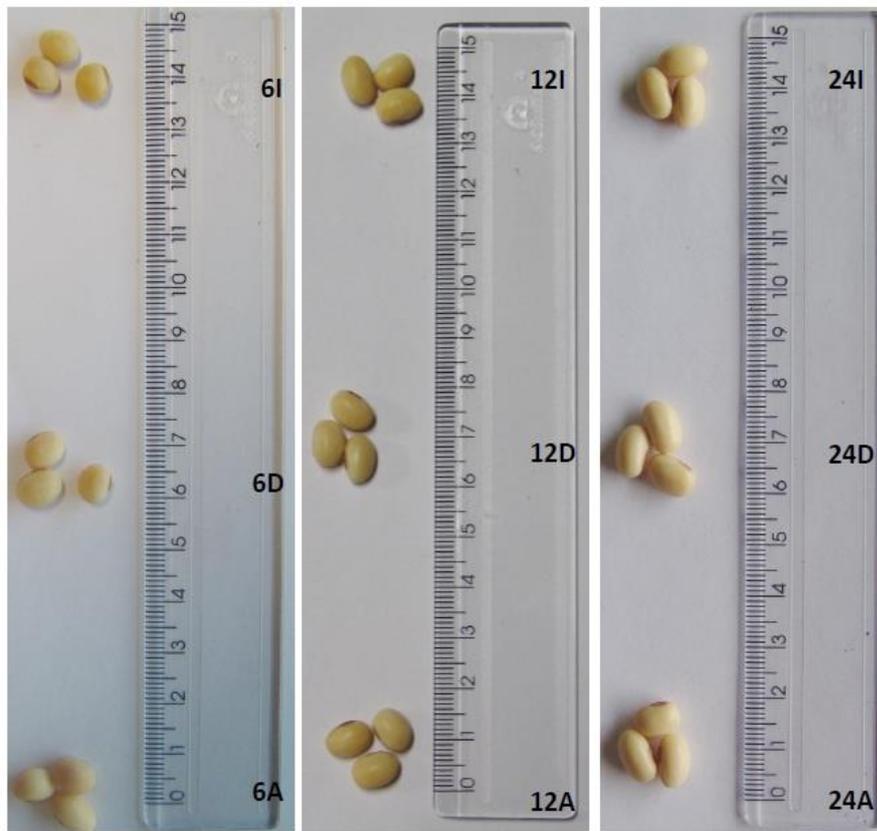


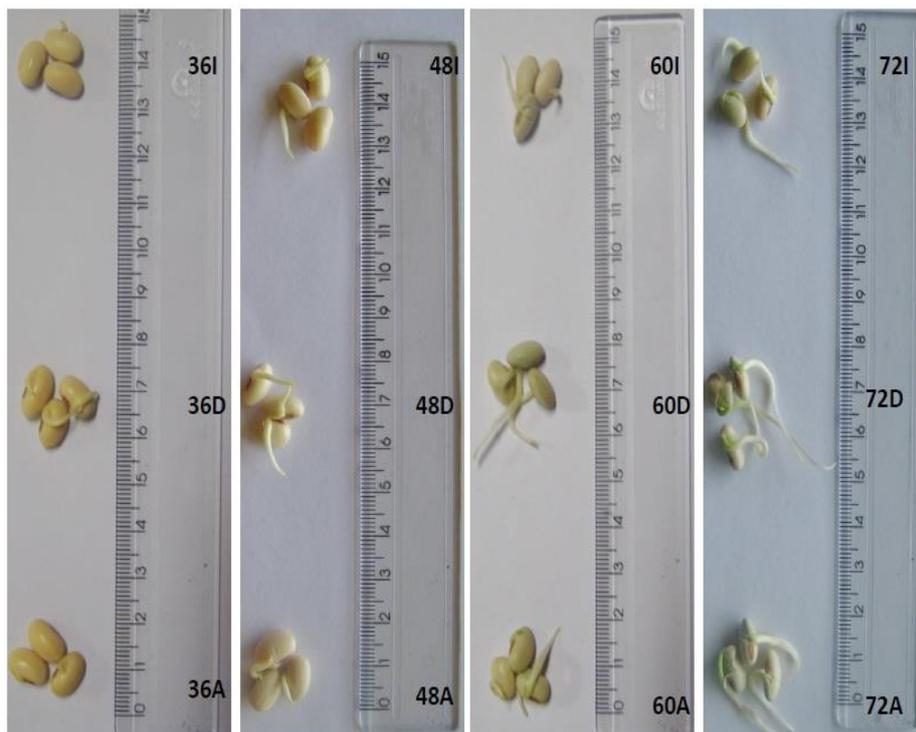
Figura 14: Visualização eletroforética (SDS-PAGE 15%) da fração de globulinas de tegumentos de sementes de soja quiescentes e em diferentes tempos após a embebição. Revelação por precipitação de nitrato de prata. MM= marcadores de massa molecular; TA= tampão de amostra; Q= quiescente; 12-72 (12-72 HAE).

4.8 - Avaliação de parâmetros fenotípicos do processo de germinação na presença do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO

Foram quatro os parâmetros morfológicos avaliados nas sementes após sua embebição em três tratamentos: na presença de 20 μ M de inibidor, na presença apenas de água e em água com a adição de DMSO (mesma concentração em que foi empregado para a dissolução do inibidor). O primeiro parâmetro baseou-se no aspecto da morfologia externa das sementes, que pode ser observado na figura 15. Através destas imagens, vê-se que apenas após 60 HAE, há diferença morfológica quando se comparam os grupos que entraram em contato com o inibidor e os controles. As diferenças perceptíveis remontam ao tamanho da radícula, que é menor nas sementes tratadas com o inibidor, estando muitas vezes não exteriorizadas, como o observado para uma das sementes dos tempos de 60 e 72 HAE; e à aderência do tegumento ao cotilédone, que é maior no grupo tratado com o inibidor.



A



B

Figura 15: Sementes e plântulas nos tempos de 6, 12, 24 (A), 36, 48, 60 e 72 HAE (B). I= sementes embebidas na presença de Ac-VAD-CHO; D= controle com DMSO; A= sementes embebidas com água.

O segundo parâmetro analisado foi o peso da semente inteira. Na figura 16 pode-se observar que, para os três tratamentos, houve um aumento de 100 mg de peso líquido quando se comparam as sementes dos tempos de 3 e 72 HAE. Em relação aos tratamentos, o único momento em que houve uma diferença estatisticamente significativa do peso das sementes em presença do inibidor, com relação ao tratamento com água e com água+DMSO, foi o tempo de 36 h. Outro fato importante que pode ser percebido com relação a esse parâmetro analisado é que nem a adição de DMSO, nem do inibidor, causaram diferença estatisticamente significativa no peso das sementes.

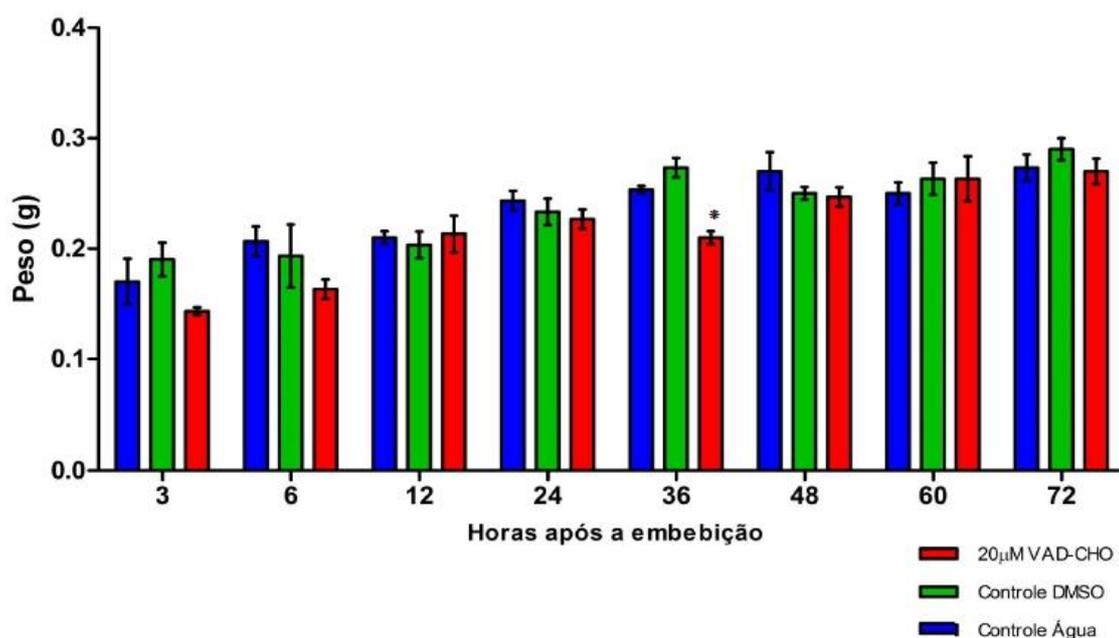


Figura 16: Peso das sementes (g) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM). *= valor com $P < 0,001$ (efeito estatisticamente significativo). A análise estatística foi realizada empregando o pós-teste ANOVA/Bonferroni do software GraphPrism.

Quanto aos parâmetros relativos às dimensões de comprimento e largura das sementes, não há diferenças significativas quando se analisam as sementes ao longo do evento, como pode ser observado pelas figuras 17 e 18.

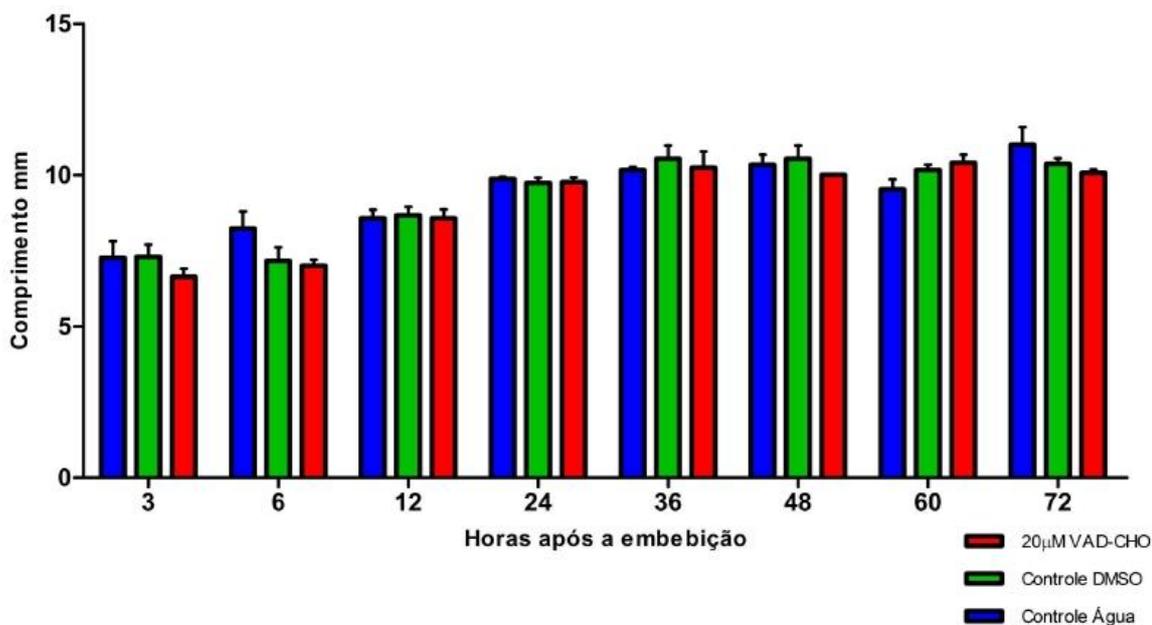


Figura 17: Comprimento das sementes (mm) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM). P<0,05 (efeito estatisticamente significativo). A análise estatística foi realizada empregando o pós-teste ANOVA/Bonferroni do software GraphPrism.

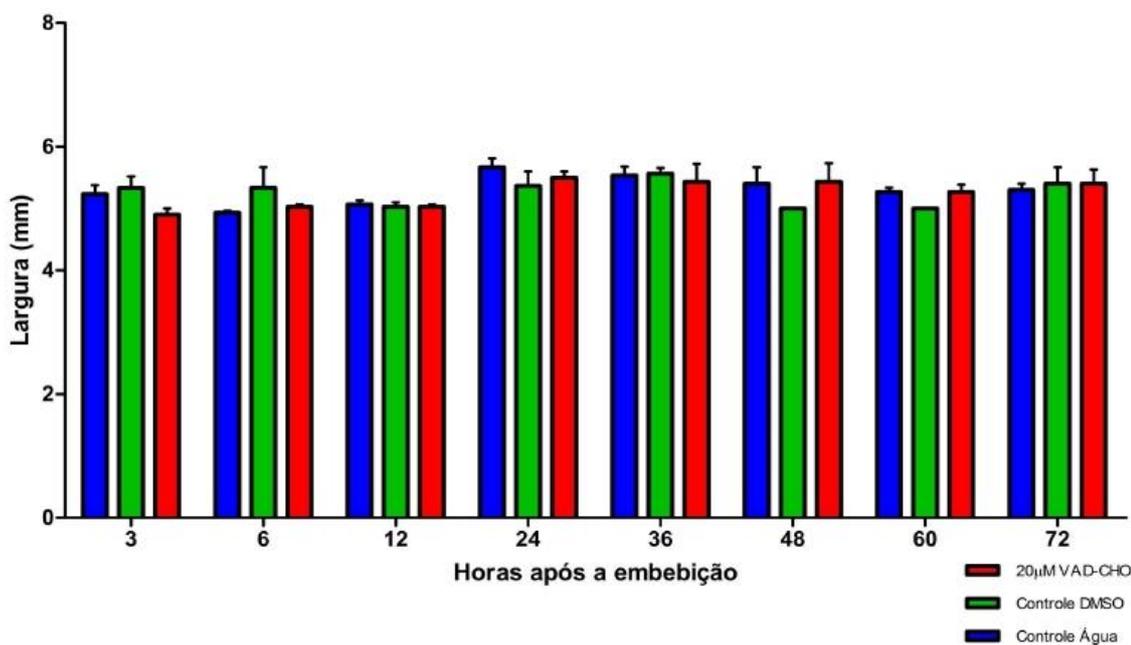


Figura 18: Largura das sementes (mm) após a embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM). P<0,05 (efeito estatisticamente significativo). A análise estatística foi realizada empregando o pós-teste ANOVA/Bonferroni do software GraphPrism.

Outro parâmetro morfológico investigado foi o comprimento das radículas das plântulas (figura 19), o que foi feito apenas para as sementes a partir do

tempo de 36 HAE, já que nos estágios anteriores a extrusão da radícula não havia ocorrido. As análises estatísticas mostraram que apenas para os tempos de 60 e 72 HAE houve diferença significativa em relação ao comprimento das radículas das plântulas originadas a partir das sementes que foram embebidas com a solução contendo o inibidor pancaspase. Nestas, houve redução de 37,5 e 39,8% de seu comprimento, respectivamente, em relação às radículas controle de 60 e 72 HAE.

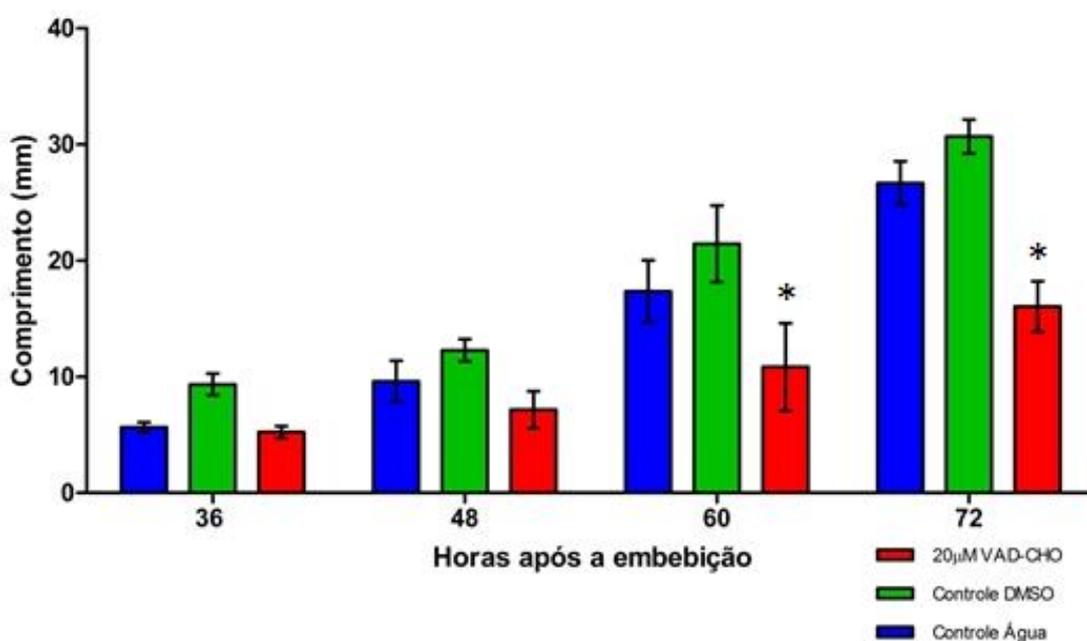


Figura 19: Comprimento das radículas das plântulas (mm) após 36 horas de embebição na presença e na ausência do inibidor Ac-VAD-CHO (20 µM). *= P<0,001 (efeito estatisticamente significativo). A análise estatística foi realizada empregando o pós-teste ANOVA/Bonferroni do software GraphPrism.

4.9 - Eletroforeses do tipo SDS-PAGE-gelatina de proteínas de tegumentos das sementes e plântulas embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO e DMSO

As zimografias (eletroforeses SDS-PAGE-gelatina) realizadas em condições favoráveis à atividade de proteases cisteínicas (figura 20) para as amostras em diferentes tempos após a embebição, revelam perfis de atividade enzimática semelhantes para os diversos tempos e tratamentos, com uma grande

mancha de atividade entre o topo do gel e o marcador de peso molecular de 66 KDa, e uma banda mais definida entre 45 e 66 kDa (seta). Uma banda de atividade entre 14,5 e 26 kDa pode ser observada para os controles nos tempos de 36 e 48 HAE, mas não nos poços referentes às amostras embebidas em solução contendo o inibidor pancaspase.

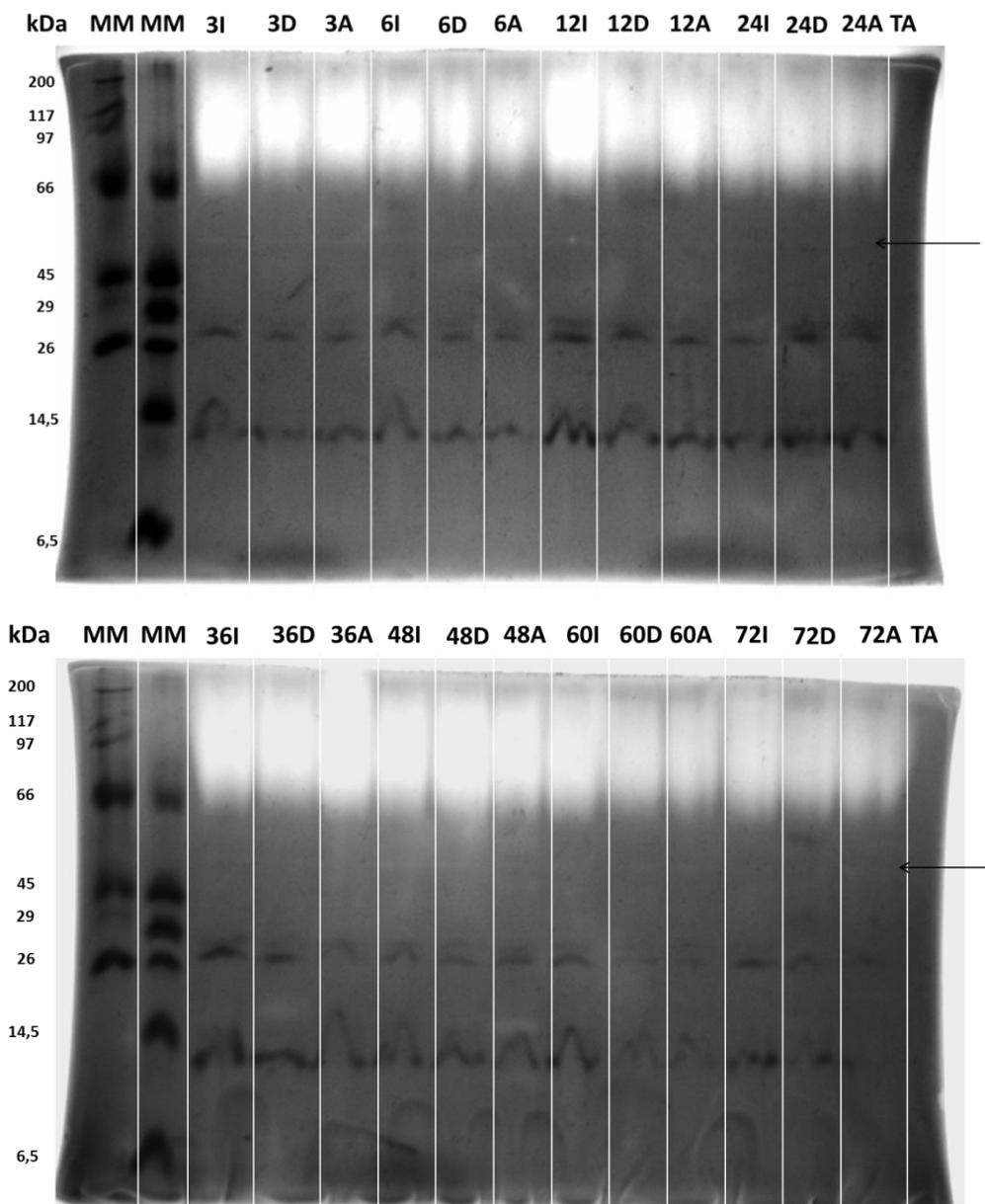


Figura 20: Zimografias dos tegumentos das sementes e plântulas em diferentes tempos após a embebição e sob os tratamentos com o inibidor pancaspase e seus devidos controles. Os números representam as massas moleculares dos marcadores. Os números acompanhados de letras no topo das figuras, representam os tempos de embebição e a condição de embebição das sementes com o inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO (letra I), apenas com água (A) e com água e DMSO (D) respectivamente. Gel a 12%.

4.10 - Eletroforese SDS-PAGE-gelatina para o eixo hipocótilo/radícula das sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO e DMSO

As zimografias realizadas em condições favoráveis à atividade de proteases cisteínicas (figura 21) para as amostras do eixo hipocótilo/radícula em diferentes tempos após a embebição revelam uma banda de atividade proteica de peso molecular aproximado de 45 kDa, a partir do tempo de 48 HAE. Uma mancha de atividade estendendo-se entre pouco abaixo de 60 kDa a aproximadamente 99 kDa pode ser observada a partir do tempo de 60 HAE, e esta aparenta sofrer redução quando as amostras são embebidas com o inibidor pancaspase.

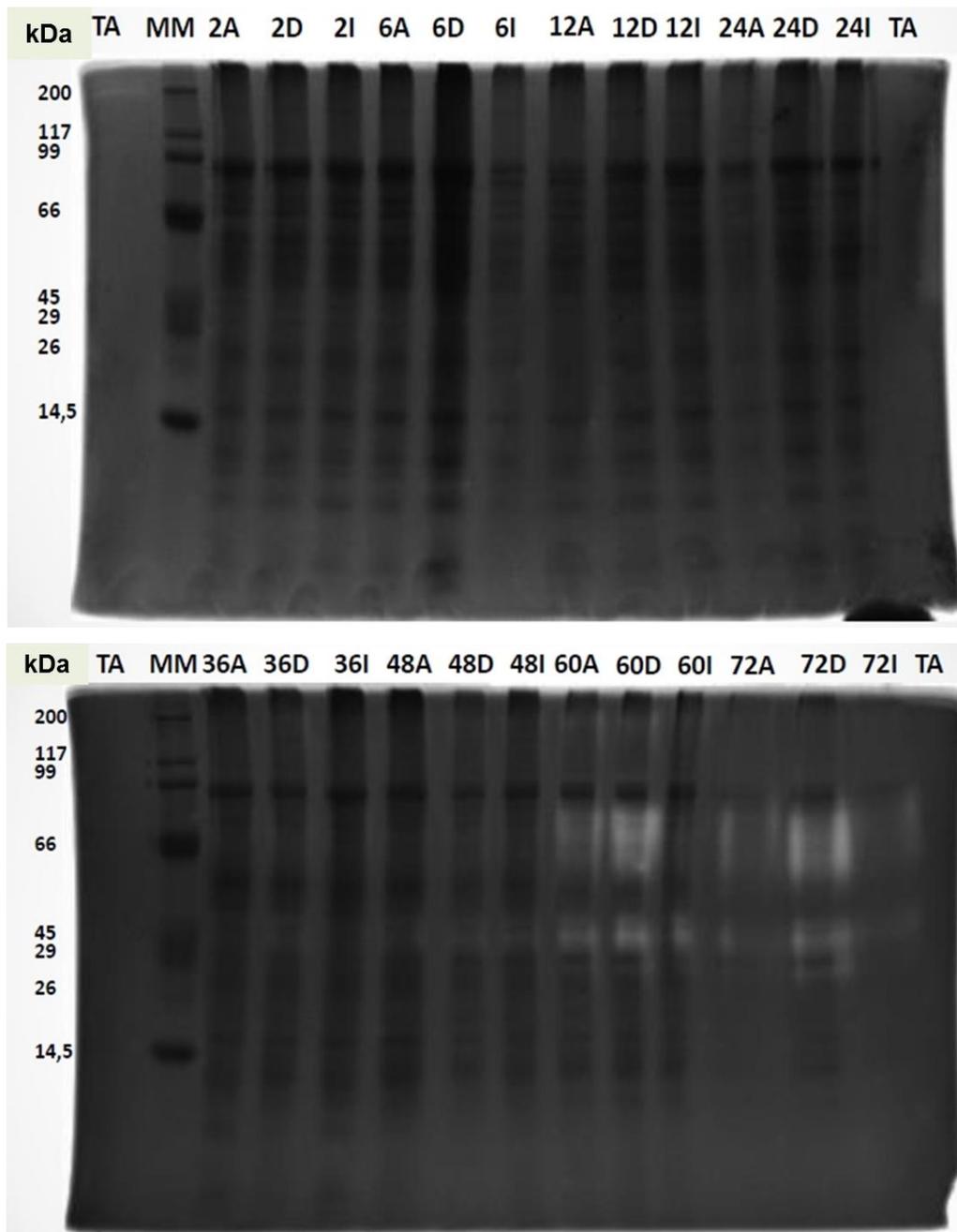


Figura 21: Zimografias do eixo hipocótilo/radícula das sementes e plântulas em diferentes tempos após a embebição e sob os tratamentos com o inibidor pancaspase e seus devidos controles. Os números representam as massas moleculares dos marcadores. Os números acompanhados de letras no topo das figuras, representam os tempos de embebição e a condição de embebição das sementes com o inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO (letra I), apenas com água (A) e com água e DMSO (D) respectivamente. Gel a 12%.

4.11 - Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato pancaspase Ac-VAD-fmk de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO

Após a detecção de atividades proteolíticas por zimografia, extratos protéicos de tegumentos das sementes foram avaliados em um ensaio para estimar a de atividade lítica das proteases das amostras contra o substrato Ac-VAD-fmk (figura 22). É possível observar atividade lítica contra o substrato desde o tempo de 3 HAE, sendo que o tempo que apresentou maior atividade foi o de 24 HAE. A partir deste estágio a atividade apresenta uma queda de mais de 50% e mantém-se constante até o tempo de 72 HAE. Quando avaliado o padrão de clivagem de Ac-VAD-fmk pelos extratos protéicos obtidos a partir de sementes que germinaram na presença de 20 μ M do inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO, nota-se uma redução, que é mais expressiva no tempo de 12 HAE e de cerca de 50% no tempo de 24 HAE.

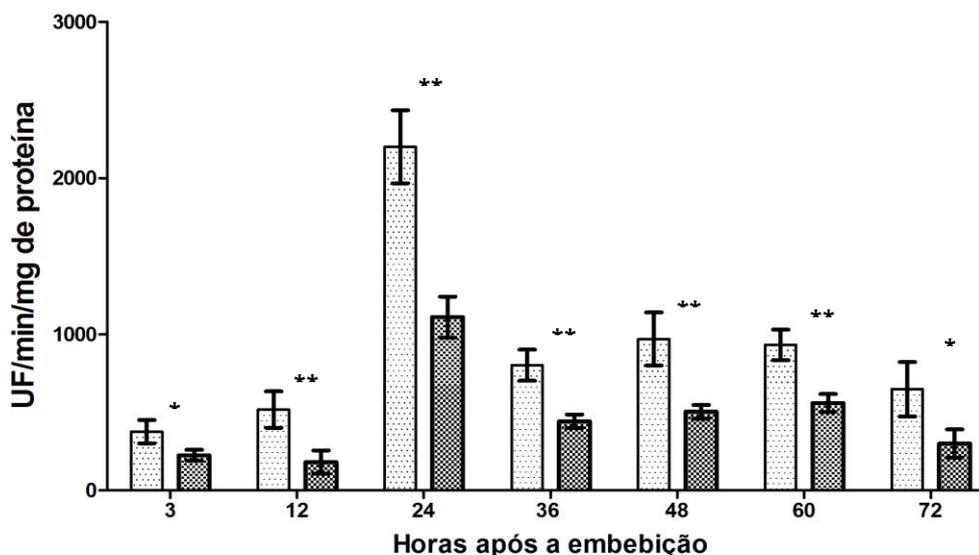


Figura 22: Determinação da atividade contra o substrato pancaspase Ac-VAD-fmk em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,6, após o processo de embebição, para as amostras obtidas em diferentes tempos após a embebição. Barra hachurada clara= sem o inibidor; barra hachurada escura= na presença do inibidor. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão da Média) a intensidade de fluorescência mensuradas a partir da clivagem do substrato, expressos em unidades de fluorescência por minuto por mg de proteína. *= $P < 0,05$; **= $P < 0,005$; ***= $P < 0,001$. Fator tempo: $P < 0,0001$. Análises estatísticas realizadas por Two Way ANOVA/ Bonferroni post test do programa GraphPad Prism.

4.12- Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato Ac-VEID-pNa de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-VAD-CHO

O acompanhamento da atividade contra o substrato Ac-VEID-pNa, sítio preferencial de clivagem da caspase 6 (figura 23), revela uma atividade de clivagem já no estágio quiescente. Após o início da germinação, a atividade máxima é detectada para os tegumentos em 24 HAE, sendo que essa atividade reduz-se drasticamente a partir do tempo de 36 horas, atingindo seu menor nível no tempo de 72 HAE, nos dois tratamentos. Na presença do inibidor há uma queda na atividade, sendo registrada uma redução de 42,8% na atividade enzimática para o estágio quiescente e de 66,6% de redução em 12 HAE. De forma geral, todos os estágios avaliados apresentaram uma redução de pelo menos 40% de sua atividade quando na presença do inibidor.

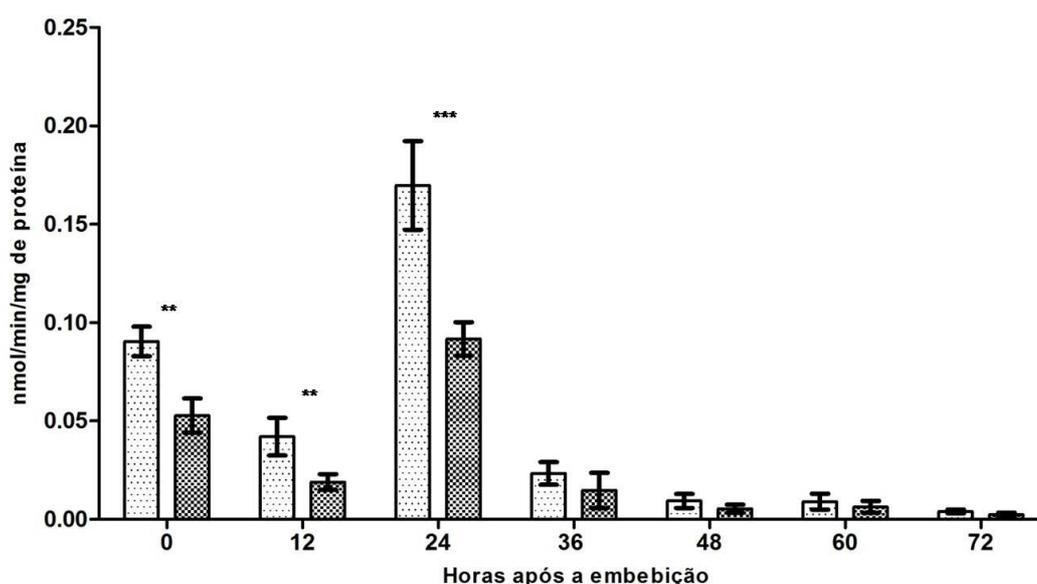


Figura 23: Determinação da atividade contra o substrato Ac-VEID-pNa (caspase 6), na presença e na ausência de Ac-VAD-CHO ao longo do processo de germinação, para as amostras obtidas a partir de vários tempos após a embebição e no estágio quiescente (0 HAE). Barra hachurada clara= sem o inibidor; barra hachurada escura= na presença do inibidor. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão da Média) da clivagem do substrato, expresso em nmol de substrato clivado por minuto por mg de proteína. **= $P < 0,005$; ***= $P < 0,001$. Fator tempo: $P < 0,0001$. Análises estatísticas realizadas por Two Way ANOVA/ Bonferroni post test do programa GraphPad Prism.

4.13 - Ensaio para detecção de atividade lítica contra o substrato Ac-YVAD-fmk de sementes embebidas na presença e ausência de Ac-YVAD-CHO

O acompanhamento da atividade contra o substrato Ac-YVAD-fmk, sítio preferencial de clivagem da caspase 1 (figura 24), revela baixos níveis de atividade do estágio quiescente a 24 HAE. Após esse período, ocorre um aumento na atividade, que atinge seu valor máximo em 60 HAE, a que se segue um decréscimo da mesma em 72 HAE. O tratamento com o inibidor específico Ac-YVAD-CHO, nas condições testadas (80 μ M), não foi capaz de inibir totalmente as atividades líticas contra Ac-YVAD-fmk, mas sim de reduzi-las. O tempo que apresentou maior redução na atividade quando na presença do inibidor foi 72 HAE, que teve uma redução de 52,86%. Essa redução foi mais expressiva que a observada para os tempos iniciais como 12 HAE, que apresentou uma queda de 38,81% de sua atividade.

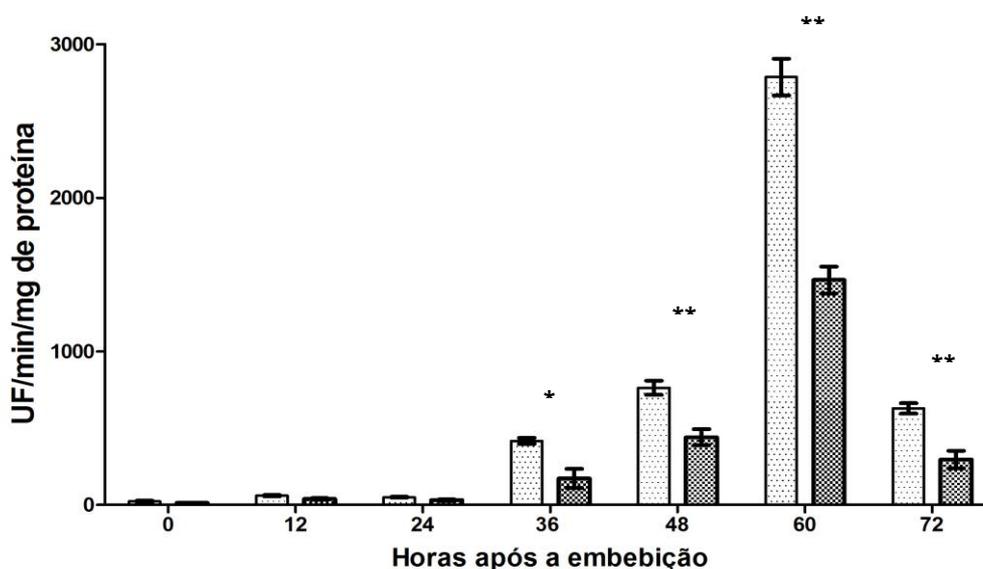


Figura 24: Determinação da atividade contra o substrato Ac-YVAD-fmk (caspase 1), na presença e na ausência de Ac-YVAD-CHO ao longo do processo de germinação, para as amostras obtidas a partir de vários tempos após a embebição e no estágio quiescente (0 HAE). Barra hachurada clara= sem o inibidor; barra hachurada escura= na presença do inibidor. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão da Média) da clivagem do substrato, expresso em nmol de substrato clivado por minuto por mg de proteína. **= $P < 0,005$; ***= $P < 0,001$. Fator tempo: $P < 0,0001$. Análises estatísticas realizadas por Two Way ANOVA/ Bonferroni post test do programa GraphPad Prism.

4.14 - Determinação da atividade de clivagem do substrato Z-GGR-MCA de sementes embebidas na presença e ausência do inibidor H-EGR-cmk

O perfil da atividade lítica contra o substrato Z-GGR-MCA (metacaspases) (figura 25), com amostras originadas a partir de diferentes estágios após a embebição, revela a presença de enzimas líticas já no estágio quiescente. A partir deste estágio há um aumento gradativo nos níveis de atividade até 72 HAE, quando a atividade atinge seu nível máximo na ausência do inibidor. Quando na presença de 80 μM do inibidor H-EGR-cmk, a atividade de clivagem é reduzida em até cerca de 70% para o tempo de 72 HAE.

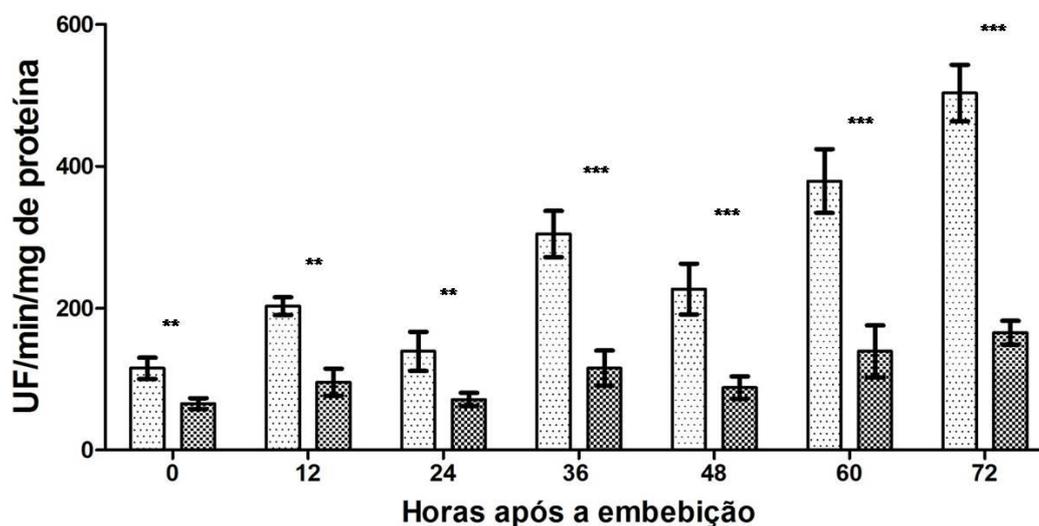


Figura 25: Determinação da atividade contra o substrato Z-GGR-MCA (metacaspases) na ausência e na presença do inibidor H-EGR-cmk, ao longo do processo de germinação. Barra hachurada clara= sem o inibidor; barra hachurada escura= na presença do inibidor. Os dados representam as médias (\pm Erro Padrão da Média) da clivagem do substrato, expresso em unidades de fluorescência por minuto por mg de proteína. **= $P < 0,005$; ***= $P < 0,001$. Fator tempo: $P < 0,0001$. Análises estatísticas realizadas por Two Way ANOVA/ Bonferroni post test do programa GraphPad Prism.

4.15 - Detecção de oligonucleossomos em amostras de tegumentos em diferentes tempos após embebição

Um marcador clássico de MCP é a presença e o padrão da fragmentação de DNA nas amostras avaliadas. A detecção do nível de oligonucleossomos nas amostras indica, de forma quantitativa, o estado celular do tecido estudado. A quantificação do enriquecimento de oligonucleossomos em amostras de tegumento no estágio quiescente e após embebição (figura 26) revela que, após a quiescência (0h), o fator de enriquecimento oligonucleossomal permanece constante até 60 HAE, havendo um pico de detecção de fragmentos oligonucleossomais em 72 HAE, que parece iniciar-se já em 60 HAE. Esses dados indicam um elevado grau de degradação do DNA nuclear nos tempos mais avançados da germinação.

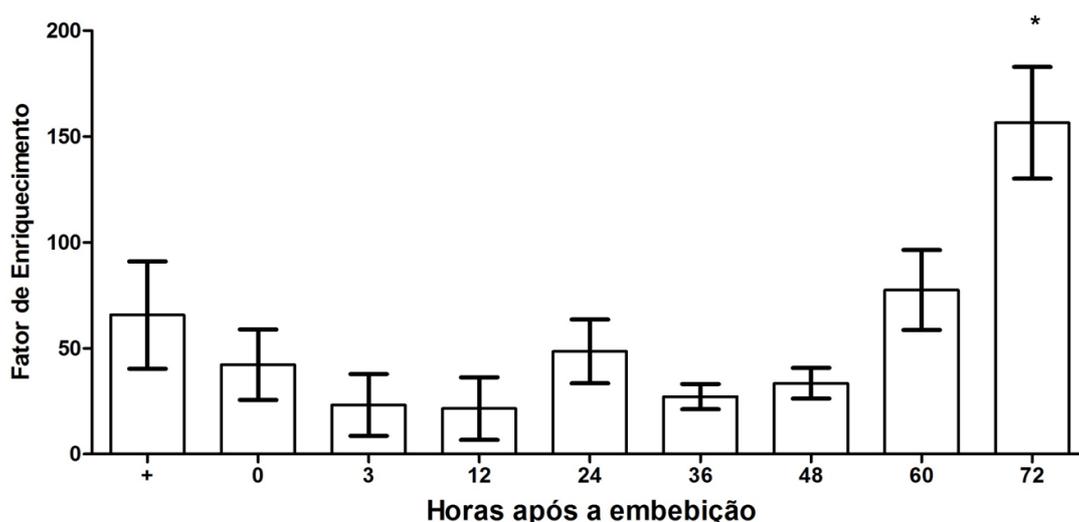


Figura 26: Enriquecimento de DNA oligonucleossomal em frações citoplasmáticas de tegumentos de *Glycine max* ao longo da germinação. Os níveis de fragmentação foram determinados utilizando-se o kit Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics) e expressos como correspondente enriquecimento oligonucleossomal. Os valores mostrados representam as médias (\pm Erro Padrão da Média) para três replicatas. *= valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$) com base em análise ANOVA/teste Tukey de múltipla comparação do programa GraphPad Prism.

4.16 - Visualização da formação de “escada de DNA” (DNA laddering) em diferentes tempos após a embebição

A eletroforese convencional do DNA total (figura 27) extraído a partir de sementes quiescentes em diferentes tempos após a embebição revela que o estágio quiescente já apresenta um nível basal de degradação de seu conteúdo de DNA. Esse conteúdo de DNA fragmentado é mantido estável até o tempo de 36 HAE, com uma zona entre 1500 e 5000 pares de base (pb), e uma banda de tamanho próximo ao do segundo menor marcador (entre 250 e 500 pb). A partir de 48 HAE, o DNA apresenta, em sua região de maior tamanho, a ausência de uma de suas bandas; além disso, a zona entre 1500 e 5000 pb mostra-se de forma mais evidente e a banda de menor tamanho tem sua intensidade gradativamente aumentada, sendo mais intensa no tempo de 72 HAE. É possível perceber, portanto, um maior grau de degradação de DNA após o tempo de 48 HAE.

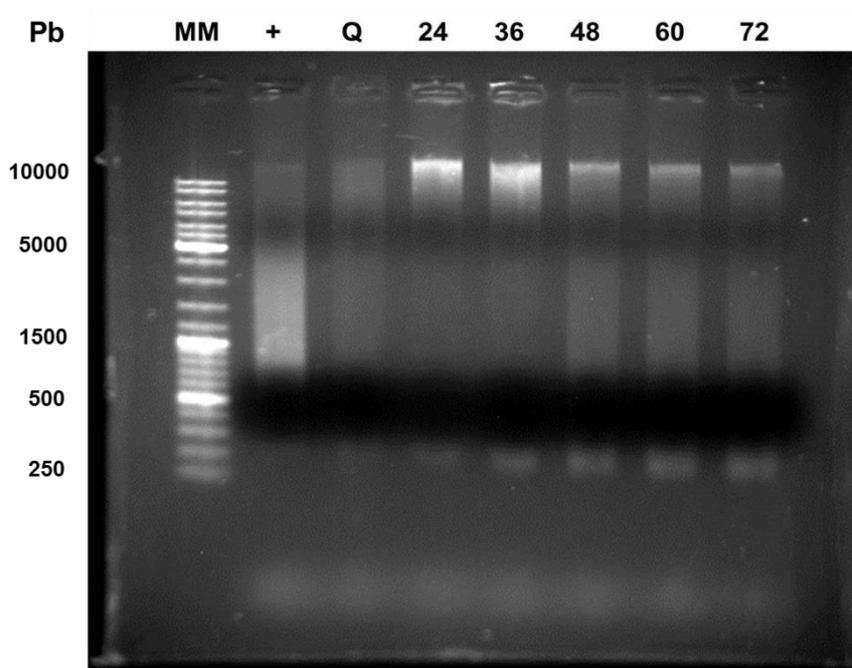


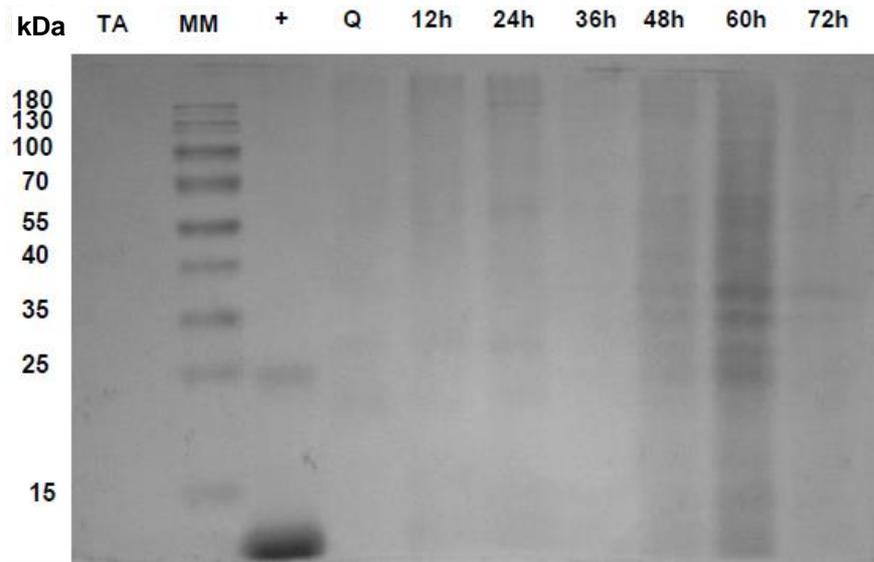
Figura 27: Gel de agarose para visualização de DNA extraído a partir do tegumento de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição. MM= marcadores moleculares por pares de base; += controle positivo; Q= quiescente; 24-72 HAE= tempos em horas após a embebição. Pb= pares de base.

4.17 - Detecção de citocromo c em frações mitocondriais e citosólicas de tegumentos de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição, por “Western blot”

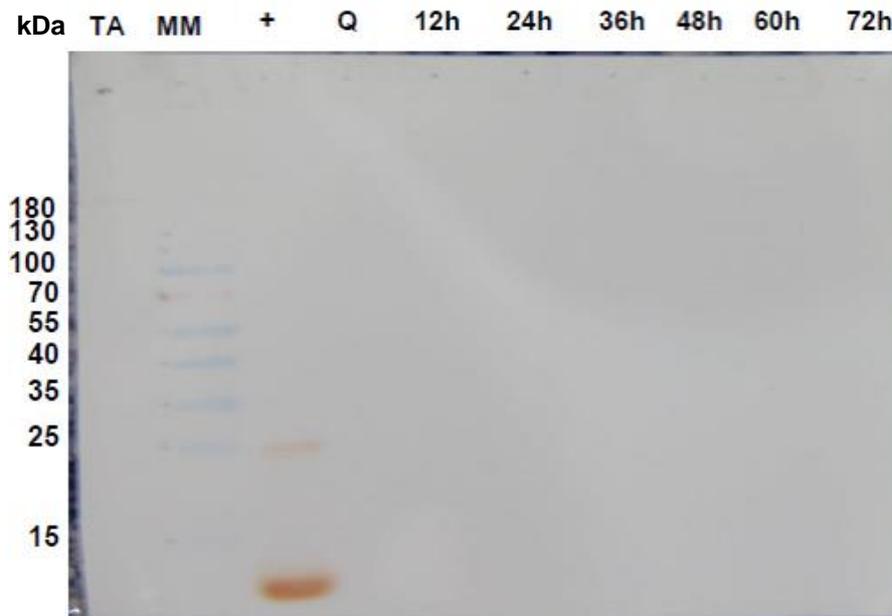
O western blot empregando o anticorpo anti-citocromo c para a identificação de presença de citocromo c em amostras de tegumentos, em diferentes tempos após a embebição, revela que esta molécula está ausente na fração mitocondrial (figura 28), já a partir do estágio quiescente.

Para a fração citosólica (figura 29), houve a detecção do citocromo c em três regiões de massas moleculares diferentes (banda inferior a 15 kDa; entre 15 e 25 kDa, e em cerca de 35 kDa). Para as amostras nos tempos de 24-48 HAE foi possível a detecção das três marcações. Os tempos de 60 e 72 HAE apresentaram apenas duas marcações (entre 15 e 25 kDa e em cerca de 35 kDa). Com relação ao padrão (citocromo c comercial), pode-se destacar que a dupla marcação no controle positivo sugere a formação de dímeros entre moléculas de citocromo c, já que o próprio revelou-se como duas bandas (inferior a 15 kDa, e com aproximadamente 25 kDa). (figuras 28B e 29B).

Esse padrão de detecção do citocromo c parece indicar a formação de interações ou complexos entre essa molécula e outros componentes da fração citosólica (figura 29B), com aparente diferenciação em três estágios: um primeiro estágio, para o tegumento quiescente e em 12 HAE, que não apresentam o complexo de ~35 kDa; um segundo estágio, de 24-48 HAE, com a detecção do citocromo c não complexado (~12,6 kDa), da banda de entre 15 e 25 kDa e da banda de ~35 kDa; e um terceiro estágio, de 60-72 HAE, com a detecção apenas das bandas entre 15 e 25 kDa e de ~35 kDa, mas não do citocromo c não complexado (inferior a 15 kDa).

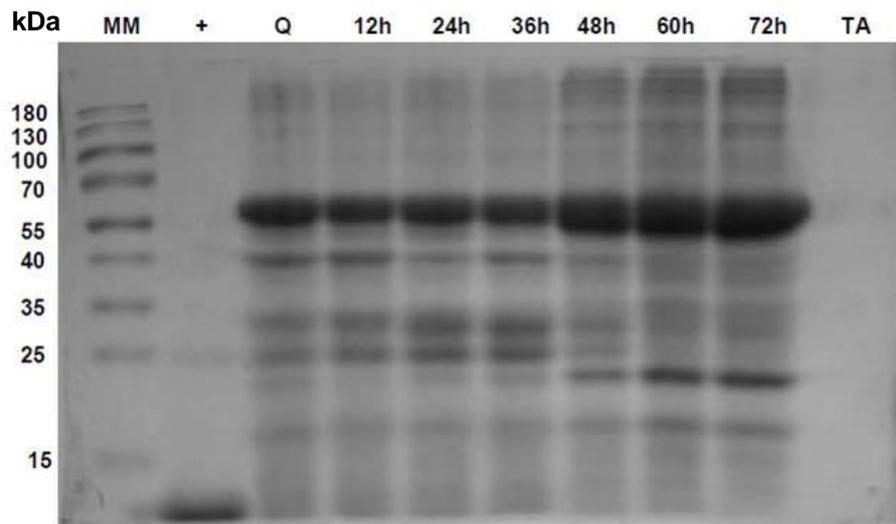


A

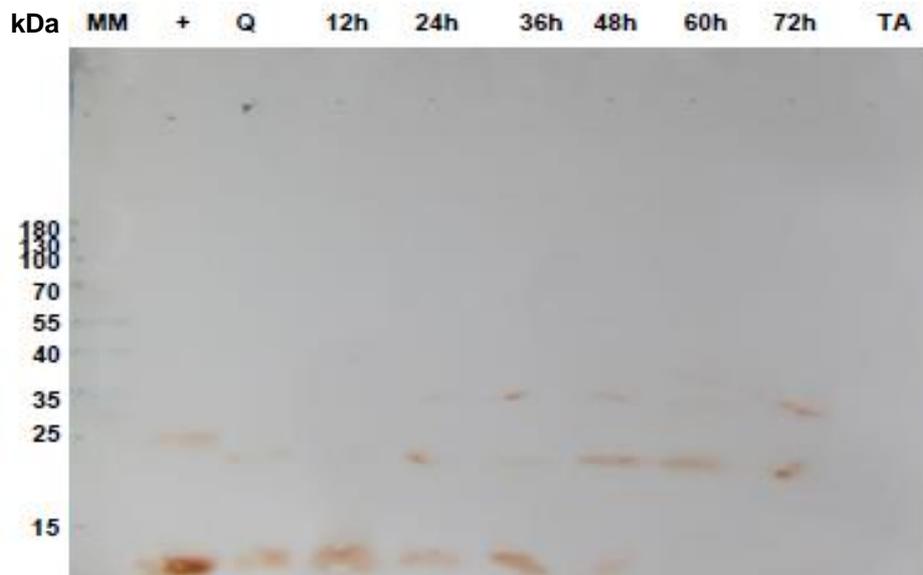


B

Figura 28: Detecção da presença do citocromo c na fração mitocondrial de tegumentos de sementes em diferentes tempos após a embebição. A= gel espelho; B= western blot MM= marcadores de massa molecular; += citocromo c comercial (controle positivo); Q= quiescente; 12-72 HAE= tempos em horas após a embebição. kDa= Kilodaltons.



A



B

Figura 29: Detecção da presença do citocromo c na fração citosólica de tegumentos de sementes de soja em diferentes tempos após a embebição. A= gel espelho; B= western blot
 MM= marcadores de massa molecular; += citocromo c comercial (controle positivo); Q= quiescente; 12-72 HAE= tempos em horas após a embebição. kDa= Kilodaltons.

4.18 – Atividade da citocromo c oxidase em frações citosólicas e mitocondriais de tegumentos

O ensaio realizado para a mensuração da atividade da enzima citocromo c oxidase (tabela 1) revelou atividades dessa enzima apenas para as frações citosólicas, do estágio quiescente até 72 HAE. A atividade se manteve constante até o tempo de 36 HAE. No tempo de 48 HAE, no entanto, foi registrado um pico de atividade, seguido por uma queda na intensidade de atividade. Os valores registrados para as frações mitocondriais foram zero ou próximos de zero. Em conjunto, esses dados indicam que houve a perda da integridade da membrana interna mitocondrial em estágios anteriores à quiescência.

Atividade da citocromo C oxidase (UA/g)							
	Q	12 HAE	24 HAE	36 HAE	48 HAE	60 HAE	72 HAE
F. Citosólica	0,285±0,040*	0,169±0,052*	0,232±0,065*	0,214±0,074*	0,459±0,053	0,306±0,060*	0,227±0,016*
F. Mitocondrial	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00

Tabela 1: Atividade da citocromo c oxidase para as frações citosólicas e mitocondriais de tegumentos. Q= estágio quiescente; 12-72 HAE= tempos avaliados (em horas após a embebição). *= P<0,01, segundo o teste de Tukey/Oneway ANOVA do software GraphPad Prism.

4.19 – Análise do tegumento de soja (*G. max*) durante processo de germinação por microscopia óptica

As micrografias do tegumento de *G. max* (figura 30) demonstram que essa estrutura (figura 30 A) apresenta-se dividida em três regiões: uma camada mais externa de células alongadas dispostas em paliçada, denominada epiderme paliçádica, constituída por macrosclereídes (m); uma camada de células que apresentam forma de ampulheta (osteoclereídes), com grandes espaços de ar na região intercelular, sendo conhecida como camada de ampulheta (os); e uma camada parenquimática, detentora de células alongadas tangencialmente, comprimidas e achatadas, cujo formato é irregular (parenq). As células da camada paliçádica apresentaram uma marcação de uma estrutura escurecida cujo aspecto lembra o de conteúdos celulares em processo de digestão. Em 72

HAE, a presença desse tipo de conteúdo foi drasticamente reduzida. De forma geral, a organização do tegumento mantém-se constante, apenas com uma leve tendência à desorganização da camada dos macrosclereídeos (m), de aumento no diâmetro das células da camada dos osteoclereídes (os) e de redução na complexidade da disposição das células parenquimáticas (parenq) no tempo de 72 HAE (C).

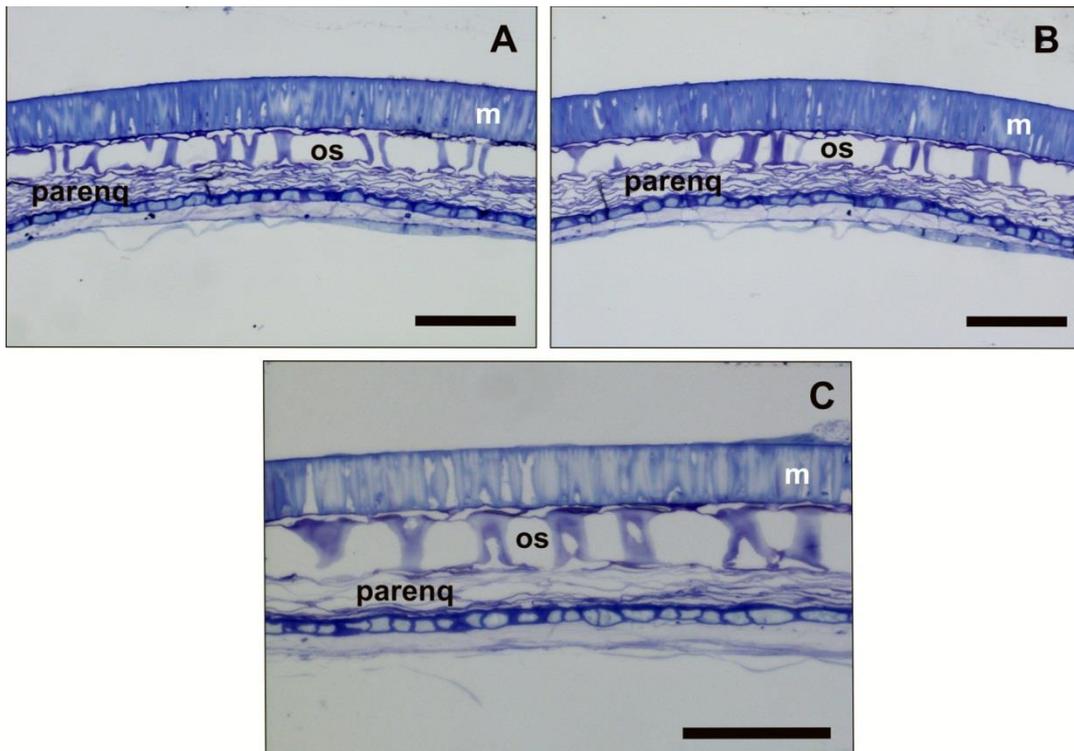


Figura 30: Tegumento da semente de *Glycine max* em germinação. A= tegumento quiescente; B= 36 HAE; C= 72 HAE. m= macrosclereídes; os= osteoclereídes; parenq= células parenquimáticas. Barra= 50 μ m.

4.19 – Análise ultraestrutural do tegumento de sementes de soja (*G. max*) durante o processo de germinação

A análise de células do tegumento por microscopia eletrônica de transmissão (figuras 31 e 32) revela que os macrosclereídes tendem a apresentar uma estrutura em seu eixo central, cuja natureza escurecida remete ao aspecto de conteúdos celulares em processo de digestão (RC) (figuras 31 A-F). Esse conjunto de micrografias demonstra que a digestão do conteúdo dessas células está em processo mesmo no estágio quiescente e persiste até o último estágio avaliado (60 HAE). Para os osteoclereídes, não houve a detecção de conteúdo celular (figura 32 A, B e C). As células parenquimáticas apresentaram-se com um padrão similar, à exceção da detecção de restos celulares dispersos em seu interior (figuras 32 D, E e F). Os dois últimos tecidos abordados parecem dispor de células cujo conteúdo está totalmente digerido já a partir do estágio quiescente.

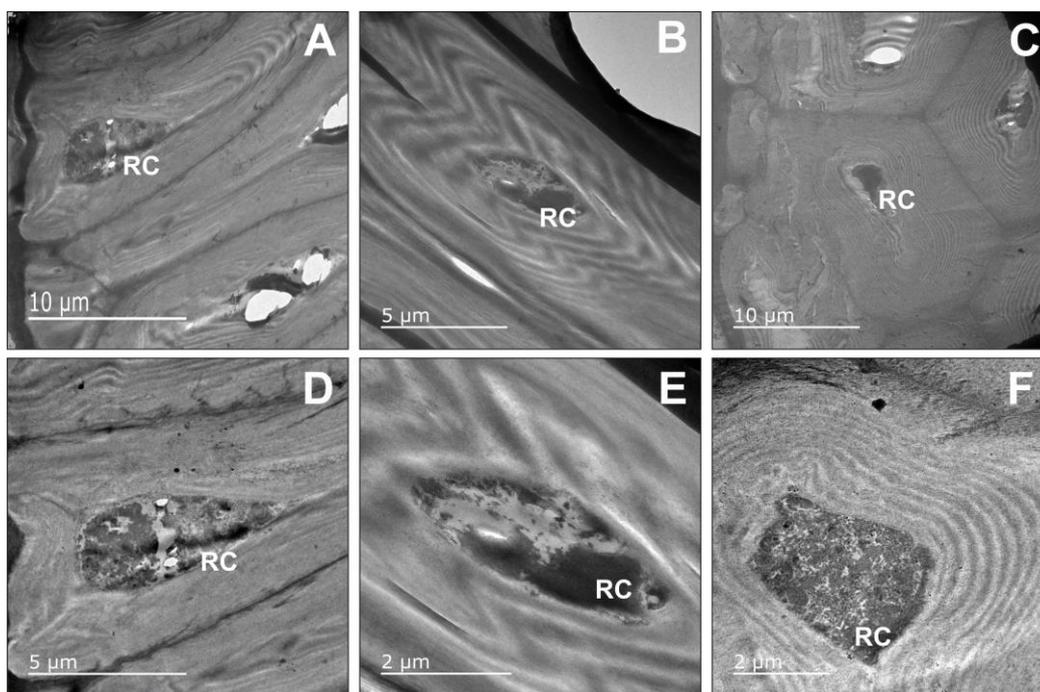


Figura 31: Análise do macrosclereíde do tegumento de sementes de *Glycine max* em processo de germinação por microscopia eletrônica de transmissão. A= tegumento quiescente; B= 36 HAE; C= 60 HAE; D= detalhe do resto celular do estágio quiescente; E= detalhe do resto celular de 36 HAE; F= detalhe do resto celular de 60 HAE. RC= restos celulares.

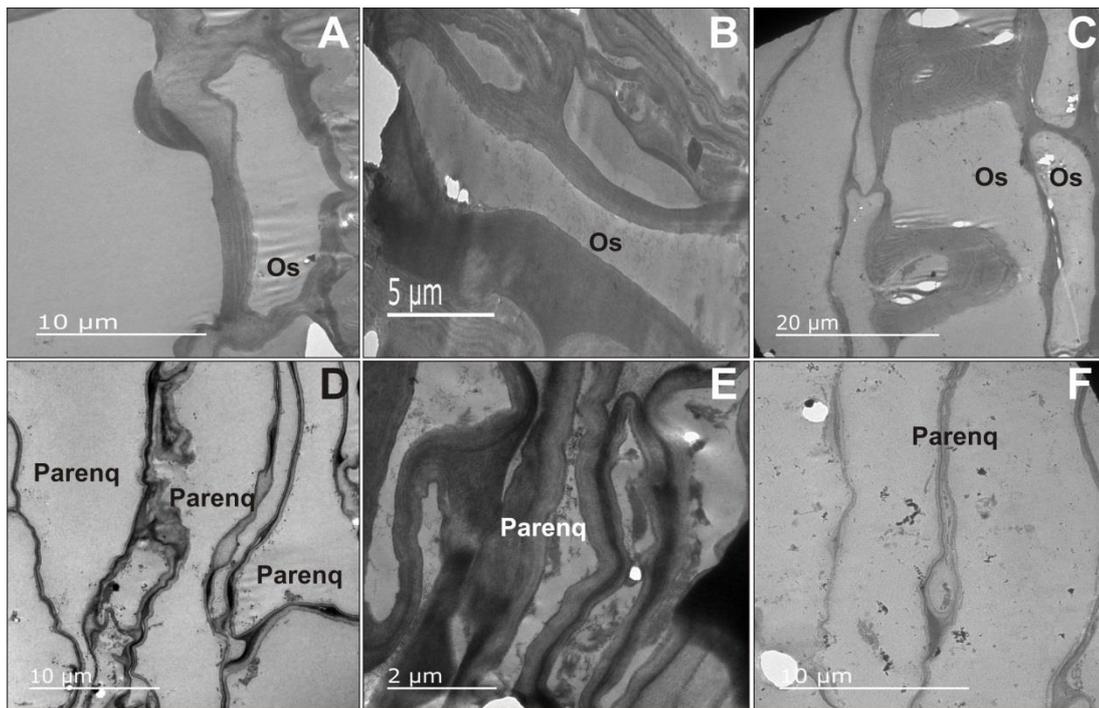


Figura 32: Análise do osteoclereíde (A, B e C) e de células parenquimáticas (D, E e F) do tegumento de sementes de *Glycine max* em processo de germinação por microscopia eletrônica de transmissão. A= tegumento quiescente; B= 36 HAE; C= 60 HAE; D= células parenquimáticas do estágio quiescente; E= células parenquimáticas do tempo de 36 HAE; F= células parenquimáticas do tempo de 60 HAE.

5.0 – DISCUSSÃO

O processo de embebição e a subsequente germinação de sementes são de crucial importância para a manutenção do ciclo de vida de muitos organismos vegetais. O presente trabalho descreve alguns dos aspectos anatômicos, ultraestruturais e bioquímicos relativos aos referidos processos, tendo como enfoque a região do tegumento e as atividades proteolíticas originadas a partir de seus tecidos.

A capacidade catalítica de proteases está associada a diferentes processos de transformação do desenvolvimento, que frequentemente requerem a ocorrência de eventos de MCP (Van Doorn, 2011). Os zimogramas apresentados no presente estudo demonstram a ação de proteases sob diferentes condições de ativação que refletem os requisitos de variados grupos e tipos de enzimas proteolíticas da classe cisteínica. Foram detectadas bandas e regiões de atividade em condições de incubação favoráveis à ação de proteases cisteínicas atuantes em pH ácido, em pH neutro, na presença de íons de zinco, e em condições favoráveis a enzimas caspase-símile e metacaspases (figuras 6-10). O tratamento com inibidores específicos, em conjunto com as condições de incubação apropriadas para as atividades proteolíticas alvo, demonstrou a presença de quatro bandas de atividade de proteases cisteínicas e caspase-símile com massa molecular entre 35 e 55 kDa. Em conjunto, essas atividades estiveram presentes já a partir do estágio quiescente (exceto para as proteases cisteínicas) e mantiveram-se até 72 HAE. Os perfis de atividade na presença de íons de zinco, na ausência de EDTA (figura 8A) e de metacaspases na presença de EGR-fmk mostraram-se semelhantes, o que sugere que as bandas de atividade inibidas por EGR-fmk (estágio quiescente a 24 HAE e a banda de 25 kDa em 48 HAE) (figura 10B) e as atividades detectadas com a incubação em tampão contendo zinco, que estiveram ausentes quando em tratamento com EDTA (figura 8B), sejam produto das mesmas enzimas. Nesse caso, o tratamento com EDTA, que promove a remoção de íons de zinco do tampão de atividade, determinaria uma condição favorável à ação das mesmas metacaspases inibidas por EGR-fmk. É importante ressaltar que a sensibilidade de atividades metacaspases-símiles a íons de zinco já foi demonstrada, como visto por Helmersen *et alii* (2008), que relataram que a suplementação com zinco reduziu a atividade metacaspase-símile para extratos

de células de culturas embrionárias de *Picea abies* entre 48 e 168 h de desenvolvimento.

O presente estudo também relata atividades de clivagem de substratos peptídicos sintéticos de caspases (Ac-VEID-pNa, Ac-YVAD-pNa) (figuras 23 e 24). A análise do padrão de atividade de clivagem contra o substrato Ac-VEID-pNa (sítio de clivagem da caspase 6) revela um pico em 24 HAE, com os demais tempos apresentando valores inferiores; com relação ao substrato Ac-YVAD-pNa (sítio de clivagem da caspase 1), níveis de atividade significativos foram encontrados apenas a partir de 36 HAE, sendo registrado um pico em 60 HAE, seguido por uma redução em 72 HAE. Atividades desta natureza, denominadas caspase-símile, têm sido documentadas em trabalhos com sistemas vegetais desde o final da década de 1990 e têm se relacionado à MCP, na maioria dos casos (Van der Hoorn, 2008). Dentre essas, atividades capazes de clivar substratos com a seqüência VEID e enzimas que interagem com formas inibitórias dessa seqüência estão bem documentadas e têm se revelado de particular relevância em processos ligados à embriogênese e em tecidos relacionados ao embrião (Bonneau *et al.*, 2008). Enzimas VEIDásicas foram descritas como especificamente localizadas em células embrionárias de *P. abies* durante o início da fase de execução de MCP e sua inibição bloqueou o fenótipo associado ao evento. Essas atividades apresentaram alta sensibilidade a pH, sal e íons de zinco (Bozhkov *et al.*, 2004). A atividade VEIDásica também foi demonstrada como sendo a atividade caspase-símile de maior proeminência no endosperma amiloso, no embrião e na cariopse de *H. vulgare*, estando localizada em autofagossomos de células em regiões que manifestaram fenótipo de MCP (Bóren *et al.*, 2006). O envolvimento de enzimas VEIDásicas na MCP em sementes de *P. coccineus* também é relatado através da detecção de atividades dessa natureza para vários tecidos, incluindo o suspensor, para o qual foi detectada a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol no estágio cotiledonário (Lombardi *et al.*, 2007 A). Mais recentemente foram descritas atividades VEIDásicas durante o processo de desenvolvimento do tegumento da semente de *V. unguiculata*, que passa por eventos marcantes de MCP. Essas atividades exibiram um intrincado padrão de picos em pHs neutro e ácido quando analisados diferentes estágios de desenvolvimento, permanecendo ativas em pH ácido até o estágio quiescente (Lima *et al.*, 2015). Tratando-se das atividades

YVADásicas (atividades de clivagem de substratos baseados na seqüência YVAD), é importante ressaltar que as mesmas têm sido atribuídas às enzimas de processamento vacuolar (VPEs- Vacuolar processing enzymes), que apesar de exibirem baixa identidade de seqüência com a caspase 1, acabam por apresentar uma semelhante organização quando são considerados seus bolsos de interação com o substrato, quando em estrutura tridimensional (Hatsugai *et al.*, 2015). O primeiro relato de YVADase foi registrado para folhas de plantas de tabaco sob infecção com vírus do mosaico do tabaco, com a atividade sendo detectada já nos estágios iniciais da resposta hipersensitiva disparada pela infecção (Del Pozo e Lam, 1998). Uma YVADase foi detectada para células embrionárias de *Hordeum vulgare* (cevada) em suspensão em 12 DAF (dias após a florescência). Essa atividade também foi registrada a partir de raízes não dominantes de plântulas de *Pisum sativum* (ervilha), ao passar por MCP (Belenghi *et al.*, 2004). A relação entre VPE, YVADase e a MCP que ocorre em camadas específicas do integumento interno de *Arabidopsis* foi demonstrada por Nakaune *et alii* (2005). Neste trabalho, foi visto que a Δ VPE foi inibida por YVAD-fmk e que mutantes deficientes para Δ VPE desenvolviam tegumentos mais espessos. Recentemente, foi descrita a expressão de genes de homólogos da VPE, como exclusiva de regiões do nucelo e da projeção nucelar em grãos de cevada durante o desenvolvimento da cariopse, de forma coincidente com o aumento de atividades caspase-símile, incluindo YVADase. Foi detectada a correlação positiva entre o aumento de atividades caspase-símiles e a MCP em tecidos do endosperma, o que possivelmente esteve relacionado com eventos de MCP no nucelo e na projeção nucelar (Tran *et al.*, 2014).

Ainda com relação às atividades caspase-símile, é importante ressaltar que a suplementação com o inibidor pancaspase Ac-VAD-CHO (20 μ M) durante os processos de embebição e de germinação promoveu uma redução no parâmetro fenotípico “comprimento da radícula”, nos tempos de 60 e 72 HAE (figura 19). Apesar dessa redução e da detecção de atividades de clivagem de seu substrato correspondente (Ac-VAD-fmk) *in vitro* (figura 22), a partir de tegumentos em diferentes HAE, o inibidor foi incapaz de alterar negativamente o perfil geral de atividade das proteases cisteínicas dos tegumentos quando analisado por zimografia (figura 20). Esse fato pode ser explicado pela existência de outras proteases cisteínicas, insensíveis a esse inibidor nas condições testadas, cujas

atividades possam mascarar uma possível inibição na atividade de enzimas caspase-símile. Diferentemente disso, as atividades gelatinolíticas observadas para as amostras de eixo embrionário exibiram uma sensibilidade aparente ao tratamento com o inibidor, sobretudo nos tempos de 60 e 72 HAE (figura 21). As informações disponíveis acerca de atividades contra substratos baseados na sequência VAD (atividades VADásicas) tratam principalmente da existência de enzimas capazes de interagir com sua forma inibitória correspondente, VAD-fmk. Em 2002, Elbaz *et alii* demonstraram que o tratamento de suspensão de células de *Nicotiana tabacum* (tabaco) com VAD-fmk bloqueou a MCP induzida por stauroporina ou pelo eliciador fúngico EIX. Os autores também relataram a presença de proteases ativas em células íntegras que foram capazes de se ligar a VAD-fmk marcado com FITC. Esse mesmo inibidor também foi capaz de reduzir o fenótipo TUNEL positivo observado durante a embriogênese de *P. abies* (Bozhkov *et al.*, 2004).

Outro substrato, cujo perfil de atividade foi verificado no presente trabalho, foi o tripeptídeo GGR (Z-GGR-MCA), que possui um resíduo de arginina na posição P1. Foi visto que os níveis de atividade de clivagem desse substrato foram constantes até 48 HAE, ocorrendo um aumento em 60 e 72 HAE (figura 25). Atividades enzimáticas que promovem a clivagem de substratos após resíduos de arginina (arginásicas) têm sido detectadas em sistemas de MCP de plantas, sendo atribuídas às metacaspases, que têm se consolidado como importantes reguladores e promotores da MCP em diversos sistemas vegetais (Rocha *et al.*, 2017). A inibição da metacaspase MCIIPa suprimiu a MCP em células do suspensor de uma cultura embrionária de *P. abies*. Neste mesmo trabalho também foi visto que a enzima era transportada do citosol para o núcleo, onde sua presença se correlacionou com a detecção da fragmentação do DNA (Suarez *et al.*, 2004). A expressão heteróloga das metacaspases MCP1b e MCP2b de *A. thaliana*, em uma linhagem da levedura *S. cerevisiae* defeituosa para o gene de sua única metacaspase, foi capaz de disparar um fenótipo apoptótico-símile sob tratamento com peróxido de hidrogênio. Esse efeito foi abolido pela suplementação com o inibidor pancaspase baseado na sequência VAD. Esses dados reforçam um papel das metacaspases em MCP, assim como o requerimento de proteínas com atividade caspase-símile (Watanabe e Lam, 2005). O envolvimento de metacaspases em MCP também é sugerido por

trabalhos com plantas sob ataque de patógenos. Alguns exemplos incluem a verificação do aumento nos níveis de uma metacaspase do tipo II em folhas de tomate sob infecção por *Botrytis cynerea* concomitantemente à detecção de fenótipo de morte celular (Hoeberichts *et al.*, 2003) e a detecção da expressão do gene da metacaspase MCA1 em folhas de *A. thaliana* infectadas por *P. syringae* (Hao *et al.*, 2007). Outro grupo de proteases que pode ser responsável pelas atividades detectadas no presente estudo é o grupo das proteases serínicas tripsina-símile, que também exibem uma preferência por resíduos de arginina ou lisina na posição P1 de seus substratos (Pozzi *et al.*, 2012). O fato de ter sido empregada a mesma condição de incubação que a utilizada pelo trabalho de Moss *et alii* (2007), para a verificação da atividade *in vitro* da metacaspase 2 de *Trypanosoma brucei*, assim como a verificação de redução da atividade na presença do inibidor EGR-fmk, que é amplamente utilizado em trabalhos com metacaspases (Tsiatsiani *et al.*, 2011), são indicativos de que a atividade descrita nesse trabalho possa ser de uma metacaspase.

Outra informação obtida pelo presente estudo é a de que a incubação do extrato protéico da amostra no estágio quiescente em condição que favorece a atividade de proteases cisteínicas (tampão fosfato de sódio 100 mM, citrato de sódio 100 mM, DTT 1,5 mM, triton X-100 0,1 %), resultou na detecção de bandas de proteínas que não estiveram presentes no extrato sem a incubação, o que indica a existência de produtos de degradação resultantes da atividade de proteases cisteínicas das amostras sob tratamento, que poderiam agir sobre substratos endógenos (figura 11). A identificação da natureza proteica de duas dessas bandas (quadros 1 e 2) revelou que dentre as seqüências estavam as de inibidores de tripsina do tipo Kunitz e cadeias da glicinina e da conglicinina. De fato, a clivagem de um inibidor de tripsina de soja obtido comercialmente e de proteínas presentes na fração globulínica (rica em proteínas de reserva) obtida a partir do tegumento no estágio quiescente foi demonstrada, *in vitro* (figura 13). Outro fato observado foi que, se as amostras são incubadas nas mesmas condições acima descritas, mas incluindo 20 µM de Ac-VAD-CHO, não observam-se diferenças em relação ao seu perfil protéico. Possivelmente a concentração empregada no ensaio não foi suficiente para inibir a ação das proteases endógenas sobre seus substratos ou as enzimas atuantes sobre tais alvos endógenos seriam refratárias à ação do inibidor empregado (figura 11, raia

+VAD). A análise dos perfis protéicos das frações globulínicas obtidas a partir das amostras no estágio quiescente e em diferentes tempos após a embebição (figura 14), revela que há uma mudança no padrão de bandas de proteínas entre o estágio quiescente e o tempo de 12 HAE. Os perfis dos tempos de 12 HAE e 24 HAE são similares, mas a partir de 24 HAE há uma drástica variação entre este tempo e os seguintes, já que de 36 HAE em diante poucas bandas de proteínas podem ser visualizadas. Em conjunto, essas análises apontam para a ideia de que a mobilização de bandas de proteínas da fração das globulinas (na qual se fracionam importantes proteínas de reserva) inicia-se já após a embebição, culminando em uma extensiva redução no conteúdo de bandas de proteínas já a partir do tempo de 36 HAE. A mobilização de proteínas de reserva e de inibidores de tripsina durante o desenvolvimento e a germinação de sementes é um fenômeno bem conhecido para tecidos classicamente associados ao armazenamento de reservas como o cotilédone e o endosperma (Tan-Wilson e Wilson, 2012). Para a semente de soja, foi visto que suas principais proteínas de reserva (cadeias α , α' e β da conglicina e a glicina) são mobilizadas de forma diferente durante a germinação. A mobilização das cadeias α e α' da conglicina inicia-se logo após a embebição e se completa em 8 DAE (dias após a embebição), enquanto a degradação completa da cadeia β se dá em 10 DAE; as cadeias ácidas da glicina são hidrolizadas a cadeias menores em 3 DAE e as cadeias básicas permanecem inalteradas até 8 DAE, sendo completamente degradadas a produtos não identificados em 10 DAE (Wilson *et al.*, 1986). Esse padrão é diferente do que foi demonstrado no presente estudo, já que a mobilização de proteínas no tegumento em germinação parece ocorrer de forma mais rápida, tendo em vista que após 24 HAE (1 DAE) já foi possível perceber que as proteínas não são detectáveis (figura 14).

Com o presente trabalho também foi possível detectar níveis de DNA oligonucleossomal do estágio quiescente (0 HAE) até 48 HAE (figura 26), a partir do qual houve um aumento, indicando a ocorrência de algum evento específico relacionado à fragmentação de DNA em 60 e 72 HAE. É interessante ressaltar que para esses mesmos estágios foi registrado um aumento na atividade proteolítica contra Z-GGR-MCA (figura 25) e a não-detecção da forma monomérica do citocromo c nas frações citosólicas (figura 29), o que sugere que esses eventos possam estar relacionados entre si. Quando se visualiza o

conteúdo de DNA extraído nos diferentes tempos após a embebição, verifica-se a presença de um arraste semelhante ao controle positivo para todos os estágios avaliados, o que indica a degradação do DNA de origem nuclear das amostras. A fragmentação do DNA tem sido relatada como um importante marcador de MCP em sistemas vegetais, tanto em respostas a fatores bióticos e abióticos, como em decorrência de processos de desenvolvimento. Em 1996, Levine *et alii* detectaram a formação de fragmentos de DNA genômico, em um padrão semelhante ao observado em células apoptóticas de metazoários, para folhas de plantas de soja após 15 h da inoculação com *Pseudomonas syringae* e tratadas com 8 mM de peróxido de hidrogênio. Essa detecção foi concomitante ao aumento do fenótipo de MCP, que se mostrou dependente de Ca^{+2} . No mesmo ano, foi relatada a clivagem do DNA nuclear, por meio da detecção de fragmentos oligonucleossomais e através do teste TUNEL para folhas de *Vigna unguiculata* sob infecção fúngica e estresse por baixa temperatura (Ryerson e Heath, 1996). Com relação ao fenômeno de senescência, Delorme *et alii* (2000), demonstraram a formação de escada de DNA em cotilédones de sementes de pepino no estágio de 48 DAE (dias após a embebição), enquanto a senescência de pétalas de *Gladiolus* foi verificada pela detecção de fragmentos de DNA em um padrão semelhante ao DNA em escada em dois dias após a abertura floral, fato esse que apresentou uma relação inversa aos níveis de expressão do gene *DAD1* (defender against apoptotic death) (Yamada *et al.*, 2004). Tratando-se de fenômenos ligados ao destino do embrião e de tecidos associados ao mesmo, foi visto que a região da camada de aleurônio próxima ao embrião de cevada apresentou conteúdo de DNA com a formação de escada e células TUNEL positivas já a partir de 2 DAE (Wang *et al.*, 1998). A degradação do DNA com esse mesmo padrão foi relatada para o endosperma de milho a partir de 32 DAP, período que coincidiu com uma queda na produção de etileno (Young e Gallie, 2000). Em 2002, Wan *et alii*, demonstraram a fragmentação do DNA por meio do ensaio TUNEL, associada a outros eventos ligados à MCP durante o desenvolvimento do integumento interno de *Brassica napus* (canola), sendo correlacionada à presença de um transcrito de uma protease cisteínica tecido-específica. Em 2002, Giuliani *et alii* evidenciaram sítios específicos de fragmentação de DNA em um padrão apoptótico-símile pelo ensaio TUNEL e por visualização eletroforética durante a formação do embrião. Neste relato, o

escutelo, o coleóptilo, a coifa e o suspensor apresentaram células TUNEL-positivas, enquanto o embrião como um todo se mostrou TUNEL-negativo após o processo de diferenciação. Ainda com relação a essa temática, foi demonstrada a degradação do DNA do suspensor de *Phaseolus coccineus* no estágio cotiledonário, embora em um padrão diferente do apresentado em sistemas que apresentam “ladderização”. Esse dado foi corroborado pela presença de células TUNEL-positivas nas amostras avaliadas (Lombardi *et al.*, 2007 B). Recentemente, foi visto por TUNEL, análises morfológicas e ultraestruturais, e por análise de liberação de oligonucleossomos, que durante o desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata* ocorre uma progressiva desorganização da cromatina e fragmentação do DNA, o que pode ser orquestrado por atividades caspase-símeles detectadas ao longo do processo (Lima *et al.*, 2015).

O padrão e liberação de oligonucleossomos apresentado no presente trabalho sugere que esse fenômeno possa representar uma continuação de eventos nucleares prévios, referentes ao desenvolvimento do tegumento, como relatado por Lima *et alii* (2015). O perfil de fragmentação de DNA visualizado por eletroforese em gel de agarose (figura 27) apresenta-se diferente do observado em casos de “ladderização”, sendo semelhante ao demonstrado no trabalho de Lombardi *et alii* (2007 B) para o suspensor de *P. coccineus*, onde foi apresentada a explicação de que a “ladderização” pode não ter sido demonstrada devido ao fato de o suspensor possuir uma pequena porcentagem de células passando por MCP no momento avaliado, já que o fenômeno pode ocorrer de forma progressiva, com um gradiente de células flutuando entre os diferentes estágios de viabilidade.

Considerando a localização celular do citocromo c (figuras 28 e 29), bandas dessa molécula foram detectadas com a mesma massa molecular de sua forma monomérica, indicando sua integridade nas frações citosólicas do estágio quiescente a 48 HAE. Bandas de massa molecular superior à apresentada pela forma monomérica também foram detectadas, o que sugere que essa molécula possa formar associações com outras proteínas presentes na fração. É importante ressaltar que o citocromo c é detectado com a massa molecular esperada para sua forma monomérica até 48 HAE, mesmo com a demonstração da ausência de mitocôndrias e de outras organelas a partir do estágio quiescente pelas micrografias (figuras 31 e 32), o que indica que essa molécula apresenta

resistência à degradação, permanecendo íntegra mesmo com o desaparecimento da organela em que originalmente se localizava. Outro fato relevante é a não detecção da banda monomérica do citocromo c para a fração citosólica nos tempos de 60 e 72 HAE, o que pode ter relação com as bandas de atividade gelatinolíticas detectadas nesses tempos e com a atividade proteolítica responsável pela clivagem do substrato Z-GGR-MCA, que apresenta uma maior atividade nesses tempos. Nesse caso, a detecção de bandas de maior massa molecular que a da forma monomérica pode indicar que a associação do citocromo c com outras proteínas presentes na fração citosólica pode prevenir a degradação dessa molécula pelas proteases nos tempos de 60 e 72 HAE.

A atividade da enzima citocromo c oxidase foi detectada apenas para as frações citosólicas (tabela 1), o que indica a perda da integridade da membrana interna da mitocôndria. Essa informação, em associação com a descrição ultraestrutural do tegumento de soja (figuras 31 e 32) e com o trabalho de Lima (2014), que descreve os eventos de MCP relacionados ao desenvolvimento do tegumento da semente de *Vigna unguiculata*, onde o citocromo c foi detectado em níveis mais altos nas frações citosólicas que nas frações mitocondriais em diferentes tempos de desenvolvimento, mantendo-se quantitativamente relevantes de 10-22 DAP, sugere que as mitocôndrias tenham sido degradadas antes do estágio quiescente.

Com relação à importância da liberação do citocromo c ao citosol, deve-se ressaltar que esse é um evento chave da MCP do tipo apoptótica que ocorre em animais, e que a importância em sistemas vegetais passou a ser verificada a partir do final da década de 1990. A maior parte desses trabalhos trata do papel da liberação do citocromo c em plantas respondendo a condições estressantes. Em 1999, Sun *et alii* verificaram um fenótipo apoptótico-símile, com a detecção do citocromo c na fração citosólica, em protoplastos de tabaco, já a partir de 1 h de tratamento com menadiona. A translocação da molécula ao citosol não foi observada nas plantas controle e não foi bloqueada na presença do inibidor Ac-DEVD-CHO (inibidor da caspase 3). Ainda no mesmo ano, Balk *et alii* detectaram a liberação seletiva do citocromo c da mitocôndria para o citosol em cotilédones de sementes de pepino, sob estresse por alta temperatura. Em 2003, Pasqualini *et alii* verificaram que o citocromo c era liberado da mitocôndria em plantas de tabaco sensíveis a ozônio, quando expostas a essa molécula. Esse fenômeno foi

acompanhado pela ativação de proteases e pela fragmentação do DNA nuclear. A liberação do citocromo c ao citosol também foi verificada em células de tabaco passando por 2-6 h de choque térmico (Vacca *et al.*, 2006). Nesse sistema, o citocromo c já pôde ser detectado no citosol a partir de 2 h de estresse de forma dependente da produção de espécies reativas de oxigênio, sendo progressivamente degradado. Essa degradação aparentou ser dependente de atividades caspase-símiles, sendo reduzida com o tratamento com o inibidor Ac-DEVD-CHO (inibidor da caspase 3). Considerando o papel dessa molécula em processos de MCP com função do desenvolvimento, poucos trabalhos apresentaram esse enfoque. Em 2002, Yu *et alii*, em um estudo com células de cultura de *Zinnia elegans* (zínia), viram que em uma fase anterior à autólise típica do desenvolvimento das células em questão, houve a liberação do citocromo c da mitocôndria. A MCP desencadeada nesses eventos pôde ser bloqueada, mesmo com a liberação do citocromo c. A liberação dessa molécula para o citosol também foi constatada durante a morte do suspensor no desenvolvimento embrionário de *Phaseolus coccineus*, fenômeno que foi relacionado com a presença de atividades proteolíticas contra os substratos Ac-YVAD-pNa, Ac-DEVD-pNa e Ac-VEID-pNa (Lombardi *et al.*, 2007 A). Esse trabalho, em conjunto com o relato de Lima (2014), são os únicos a ressaltar a ocorrência do fenômeno da liberação do citocromo c para o citosol em sistemas de MCP em eventos de desenvolvimento de sementes. O presente trabalho estende essa noção, no sentido de que demonstra que o citocromo c mantém-se no citosol das células dos tecidos estudados, mesmo após os mesmos terem possivelmente passado por eventos de MCP nos estágios anteriores à quiescência. Até a escrita deste documento, este é o primeiro trabalho a descrever um fenômeno dessa natureza em sistemas de MCP vegetais.

Como as células do tegumento encontram-se exibindo um fenótipo que indica a prévia ocorrência de MCP já no estágio quiescente e tendo este trabalho detectado atividades caspase-símile/metacaspase-símile a partir dessa região, é possível que essas enzimas estejam promovendo a digestão do conteúdo citosólico dessas células. Essa digestão exhibe um padrão que parece ser coordenado, tendo em vista que o citocromo c permanece íntegro até 60 HAE.

Tendo em vista os fenômenos estudados, a figura 33 sumariza as principais informações obtidas pelo presente trabalho a respeito do tegumento de

G. max em germinação. Nela se percebe que as atividades gerais de proteases cisteínicas (em diferentes condições de pH) foram detectadas a partir da quiescência, mantendo-se presentes até o último estágio avaliado (72 HAE). Atividades de natureza caspase-símile e metacaspase-símile também exibiram esse padrão de detecção. Também é possível averiguar que as atividades caspase-símile se dividiram em dois grupos (VEIDase e YVADase). O pico registrado para a VEIDase foi coincidente com o registrado para a atividade pancaspase (VADase), em 24 HAE. Com relação à atividade arginásica (GGRase), associada às metacaspases, o padrão observado registra atividades mais elevadas nos últimos estágios avaliados (60 e 72 HAE), o que foi coincidente com uma maior detecção de fragmentos oligonucleossomais e com a não detecção da forma monomérica do citocromo c nas frações citosólicas. Ressalta-se aqui que o citocromo c aparenta já ter sido translocado ao citosol, já a partir do estágio quiescente. Outras informações a serem destacadas incluem a mobilização de proteínas de reserva até 24 HAE, a não detecção de organelas citoplasmáticas para os estágios avaliados e a detecção de conteúdos celulares em digestão a partir dos macrosclereídes, ao longo do processo estudado.

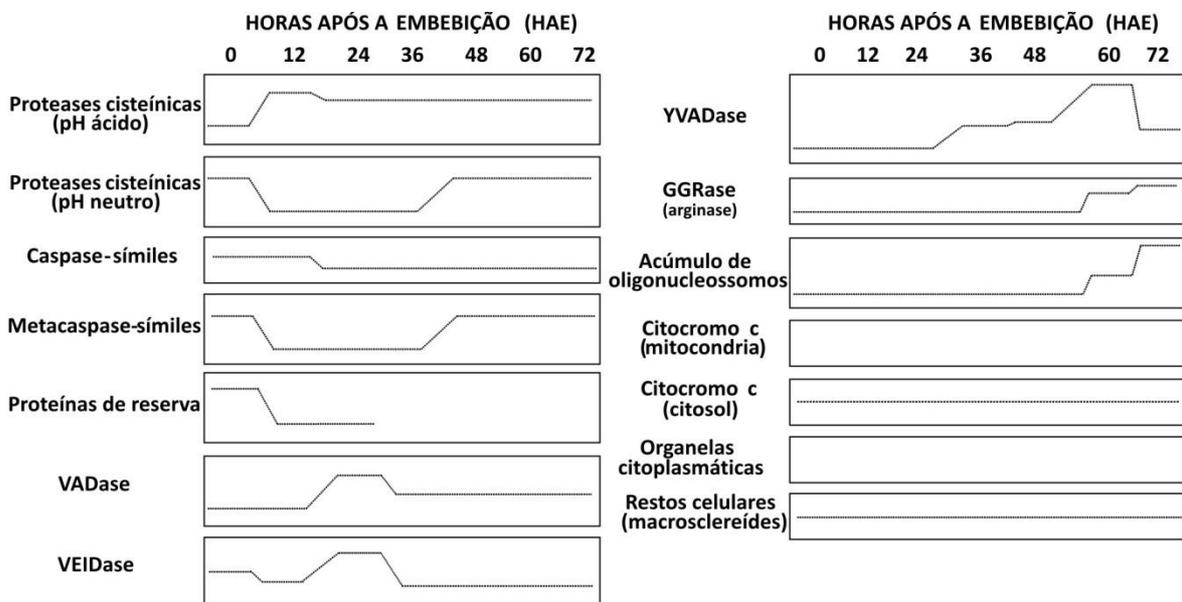


Figura 33: Representação esquemática dos principais eventos biológicos observados para o tegumento de *G. max* durante o processo de germinação.

6.0 – CONCLUSÕES

- Marcadores bioquímicos associados à MCP (liberação do citocromo c da mitocôndria ao citosol, atividade da citocromo c oxidase na fração citosólica e formação de fragmentos oligonucleossomais) foram detectados para o tegumento da semente de *G. max* em germinação.

- As células do tegumento encontram-se com citoplasma reduzido e não apresentam organelas, o que indica a ocorrência prévia do fenômeno de MCP.

- Foram detectadas atividades de proteases (zimografia) em condições favoráveis à atividade de proteases cisteínicas tanto em pH ácido como em pH próximo à neutralidade. Muitas dessas atividades foram inibidas quando na presença de inibidores classe-específicos. Com o tratamento com inibidores específicos, também foi possível identificar os perfis de atividades de enzimas com atividade caspase-símile e metacaspase-símile.

- Atividades caspase-símile puderam ser detectadas e perfiladas ao longo da germinação com o emprego dos substratos sintéticos das caspases 1 e 6, do substrato pancaspase Ac-VAD-fmk.

- Uma atividade metacaspase-símile também foi verificada, pelo emprego do substrato Z-GGR-MCA.

- Inibidores de tripsina do tipo Kunitz e cadeias de proteínas de reserva foram identificadas como alguns dos substratos de enzimas ativas em condições favoráveis à atividade de proteases cisteínicas.

- A mobilização de reservas no tegumento aparenta se completar já em 24 HAE.

- Dentre os marcadores bioquímicos verificados, a liberação de fragmentos oligonucleossomais revela que níveis mais altos dos mesmos são detectados apenas a partir de 60 HAE.

- A imunodeteção do citocromo c revelou que essa molécula encontra-se no citosol já a partir do estágio quiescente, sendo indetectável nas frações mitocondriais.

PERSPECTIVAS

Como foi demonstrado no presente trabalho, o tegumento de sementes em germinação dispõe de atividades de proteases que exibem especificidade de clivagem de seus substratos de forma semelhante à que se descreve para enzimas ligadas a fenômenos de MCP em outros sistemas vegetais, ainda assim, essa região da semente aparentemente não mais apresenta células viáveis após a maturação. Nesse sentido, o presente documento permite a sugestão de que enzimas que participariam de MCP no tegumento em eventos anteriores à maturação da semente podem dispor de novas funções nos estágios após a embebição. Como as sequências de aminoácidos, assim como os substratos dessas enzimas ainda não foram elucidados, esses pontos se configuram como metas importantes para trabalhos futuros, derivados dos questionamentos oriundos da presente pesquisa. A elucidação dessas questões será de grande valor para a compreensão do fenômeno de enfraquecimento do tegumento durante o processo de protrusão radicular, além de se configurar como um marco importante na compreensão da real potencialidade de enzimas ligadas à MCP em sistemas vegetais de uma forma global.

7.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baehrecke, E. H. (2003). Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death & Differentiation*, 10(9): 940-945.

Balbuena, T. S., Silveira, V., Junqueira, M., Dias, L. L., Santa-Catarina, C., Shevchenko, A., Floh, E. I. (2009). Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of proteomics*, 72(3): 337-352.

Balk, J., Leaver, C. J., McCabbe, P. F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS letters*, 463(1-2): 151-154.

Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., Inzé, D. (2000). Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 113: 139-148.

Belenghi B., Solomon M., Levine A. (2004). Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *Journal of Experimental Botany*, 55: 889-897.

Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G. E., Gallois, P. (2008). What happened to plant caspases? *Journal of Experimental Botany*, 59(3): 491-499.

Borén, M., Höglund, A. S., Bozhkov, P., Jansson, C. (2006). Developmental regulation of a VEIDase caspase-like proteolytic activity in barley caryopsis. *Journal of Experimental Botany*, 57(14): 3747-3753.

Bozhkov, P. V., Filonova, L. H., Suarez, M. V., Helmerssom, A., Smertenko, A. P., Zhivotovsky, B., Von Arnold, S. (2004). VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation*, 11: 175-182.

Bozhkov, P. V., Suarez, M. F., Filonova, L. H., Daniel, G., Zamyatnin, A. A., Rodriguez-Nieto, S., Smertenko, A. (2005). Cysteine protease mCII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40): 14463-14468.

- Bras, M., Queenan, B., Susin, S. A. (2005). Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2): 231-239.
- Cai, Y. M., Gallois, P. (2015). Programmed Cell Death Regulation by Plant Proteases with Caspase-Like Activity. In: *Plant Programmed Cell Death*. Springer International Publishing. p. 191-202.
- Cai, Y. M., Yu, J., Ge, Y., Mironov, A., Gallois, P. (2017). Two proteases with caspase-3-like activity, cathepsin B and proteasome, antagonistically control ER-stress-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist*.
- Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J. (1992). Molecular cloning of the interleukin-1beta converting enzyme. *Science*, 256(5053): 97.
- Chai, L., Tudor, R. L., Poulter, N. S., Wilkins, K. A., Eaves, D. J., Franklin, F. C. H., Franklin-Tong, V. E. (2017) MAP Kinase PrMPK9-1 Contributes to the Self-Incompatibility Response. *Plant Physiology*, 174(2): 1226-1237.
- Chen, S., Dickman, M. B. (2004). Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2617-2623.
- Chichkova, N. V., Kim, S. H., Titova, E. S., Kalkum, M., Morozov, V. S., Rubtsov, Y. P., Kalinina, N. O., Taliansky, M. E., Vertapetian, A. B. (2004). A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *The Plant Cell*, 16: 157-171.
- Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology*, 181(3): 195-213.
- Corner, E. J. H. (1951). The leguminous seed. *Phytomorphology*, 1: 117-150.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., Howard Thomas, H. (2000). Senescence and programmed cell death. In: Buchanan, B.B; Gruissem, W.; Jones, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD, USA: American Society of Plant Physiologists. 1: 1044-1100.

- Delorme, V. G., McCabe, P. F., Kim, D. J., Leaver, C. J. (2000). A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiology*, 123(3): 917-928.
- Del Pozo, O., Lam, E. (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*, 8:1129-1132.
- Drew, M., He, C., Morgan, W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in plant science*, 5(3): 123-127.
- Dunn, M. J., Crisp, S. J. (1994). Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels Using an Ultrasensitive Silver Staining Technique. In: Walker, J. *Methods in Molecular Biology*, Humana Press: New York, 113-118.
- Elbaz, M., Avni, A., Weil, M. (2002). Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Nature*: 726-733.
- Evans, D. (2003). Aerenchyma development. *New Phytologist*, 161: 35-49.
- Filonova L. H., von Arnold S., Daniel G., Bozhkov P. V. (2002). Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death & Differentiation*, 9: 1057-1062.
- Fuchs, Y., Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(6): 329-344.
- Fukuda, H. (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology*, 44: 245-253.
- Ge, Y., Cai, Y. M., Bonneau, L., Rotari, V., Danon, A., McKenzie, E. A., Gallois, P. (2016). Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in Arabidopsis. *Cell Death & Differentiation*, 23(9): 1493-1501.
- Gietl, C., Schmid, M. (2001). Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften*, 88(2): 49-58.

Giuliani C., Consonni G., Gavazzi G., Colombo M., Dolfini S. (2002). Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Annals of Botany*, 90(2): 287-292.

Gozuacik, D., Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16): 2891-2906.

Green, D. R., Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12): a006080.

Greenwood, J. S., Helm, M., Gietl, C. (2005). Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2238-2243.

Hao, L., Goodwin, P. H, Hsiang, T. (2007). Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. tomato, and the effect of silencing the gene on the host response. *Plant Cell Reports*, 26(10): 1879-1888.

Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I. (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in plant science*, 6: 234.

Haughn, G., Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 10(10): 472-477.

He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Gallois, P. (2008). Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2): 774-783.

Heath, M. C., Nimchuk, Z. L., Xu, H. (1997). Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus. *New Phytologist*, 135: 689-700.

Helmerson, A., von Arnold, S., Bozkov, P. V. (2008). The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos. *Plant Physiology*, 147: 1158-1167.

Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805): 770-776.

Hoeberichts, F.A., Ten Have, A., Woltering, E. J. (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta*, 217(3): 517-522.

Hunt, D. J., McCabe, P. F. (2016). Death and rebirth: Programmed cell death during plant sexual reproduction. In: Rose, R., J. *Molecular Cell Biology of the Growth and Differentiation of Plant Cells*. Boca Raton: CRC Press. 340-361.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Ferri, K. F. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828): 549-554.

Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., Williams, B. (2017). The life and death of a plant cell. *Annual Review of Plant Biology*, 68: 375-404.

Klemenčič, M., Funk, C. (2017). Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain. *The New phytologist*.

Koonin, E.V., Aravind, L. (2002). Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death and Differentiation*, 9: 394-404.

Korthout, H. A., Berecki, G., Bruin, W., van Duijn, B., Wang, M. (2000). The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. *FEBS Letters*, 475: 139–144.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., Vandenabeele, P. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell death and differentiation*, 9(4): 358-361.

Lema Asqui, S., Vercammen, D., Serrano, I., Valls, M., Rivas, S., Van Breusegem, F., Coll, N. S. (2017). AtSERPIN1 is an inhibitor of the metacaspase AtMC1-mediated cell death and autocatalytic processing in planta. *New Phytologist*.

Lennon, S. V., Martin, S. J., Cotter, T. G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24(2): 203-214.

- Leubner-Metzger, G. (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanase during seed germination, dormancy release and afterripening. *Seed Science Research*, 13: 17–34.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R., Lamb, C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, 6(4): 427-437.
- Levine, B., Klionsky, D. J. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2): 201-205.
- Li, J., Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48): 6194-6206.
- Lima, R. M. (2001). Proteinases cisteínicas e serínicas presentes em sementes de *Vigna unguiculata* em maturação, quiescentes e germinação. Dissertação de mestrado - Campos dos Goytacazes - RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 80 p.
- Lima, N. B., Oliveira, A. E. A., Fernandes, K. V. S., (2012). Programmed cell death in plants: the tip of the iceberg. *Recent Research Developmental Biochemistry*, 10: 13-31.
- Lima, R. M. (2014). Estudo do Desenvolvimento do Tegumento e Eventos de Morte Celular Programada, Envolvendo Caspases-símile, Metacaspases, e Cistatinas de Sementes de *Vigna unguiculata*. Tese de doutorado - Campos dos Goytacazes - RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 80 p.
- Lima, N. B., Trindade, F. G., Cunha, M., Oliveira, A. E. A., Topping, J., Lindsey, K., Fernandes, K. V. S. (2015). Programmed cell death during development of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed coat. *Plant, cell & environment*, 38(4): 718-728.
- Lombardi, L., Ceccarelli, N., Picciarelli, P., Lorenzi, R., (2007a) Caspase-like proteases involvement in programmed cell death of *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Science*, 172(3), 573-578.

Lombardi, L., Ceccarelli, N., Picciarelli, P., Lorenzi, R. (2007b) DNA degradation during programmed cell death in *Phaseolus coccineus* suspensor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3): 221-227.

Lombardi, L., Casani, S., Ceccarelli, N., Galleschi, L., Picciarelli, P., Lorenzi, R. (2007c). Programmed cell death of the nucellus during *Sechium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2949-2958.

MEROPS - The Peptidase Database. [on line] Disponível na Internet via WWW. URL: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>. Acesso em 6 de julho de 2017.

Moïse, J. A., Han, S., Gudynait-Savitch, L., Johnson, D. A., Miki, B. L. A. (2005). Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 41: 620-644.

Moss, C. X., Westrop, G. D., Juliano, L., Coombs, G. H., Mottram, J. C. (2007). Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS letters*, 581(29): 5635-5639.

Nakaune, S., Yamada, K., Kondo, M., Kato, T., Tabata, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2005). A vacuolar processing enzyme, deltaVPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell*, 17: 876-887.

Nicholson, D. W., Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(8): 299-306.

Obara, K., Fukuda, H. (2004). Programmed cell death in xylem differentiation. *Programmed cell death in plants*. Blackwell, Oxford, 131-154.

Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., Kessin, R. H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20): 17636-17645.

Parrish, A. B., Freel, C.D, Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6).

Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Della Torre, G., Ferranti, F. (2003). Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of

programmed cell death in lesion formation. *Plant physiology*, 133(3): 1122-1134.

Pennell, R.I, Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, 9(7): 1157.

Pérez-Silva, J. G., Español, Y., Velasco, G., Quesada, V. (2015). The Degradome database: expanding roles of mammalian proteases in life and disease. *Nucleic acids research*, 44 (1): 351-355.

Piszczek, E., Gutman, W. (2007). Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5): 391-398.

Pozzi, N., Vogt, A. D., Gohara, D. W., Di Cera, E. (2012). Conformational selection in trypsin-like proteases. *Current opinion in structural biology*, 22(4), 421-431.

Rawlings, N. D. (2016). Peptidase specificity from the substrate cleavage collection in the merops database and a tool to measure cleavage site conservation. *Biochimie*, 122: 5-30.

Rocha, A. J., Soares, E. L., Costa, J. H., Costa, W. L., Soares, A. A., Nogueira, F. C., Domont, G. B., Campos, F. A. (2013). Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *Plant science*, 213: 30-37.

Rocha, G. L. (2011). Atividades de Proteases Cisteínicas e Morte Celular Programada em Tegumentos de Sementes Quiescentes. Monografia – Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 73p.

Rocha, G.L. (2013). Proteases de Tegumentos de Sementes Quiescentes de *Glycine max* e sua Relação com Morte Celular Programada. Dissertação de mestrado – Campos dos Goytacazes – RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 78p.

Rocha, G. L., Fernandez, J. H., Oliveira, A. E. A., Fernandes, K. V. S. (2017). Programmed Cell Death-Related Proteases in Plants. *Enzyme Inhibitors and Activators*, InTech.

Ryerson, D. E., Heath, M. C., (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell*, 8(3): 393-402, 1996.

Sahu, P. P., Sharma, N., Puranik, S., Chakraborty, S., Prasad, M. (2016). Tomato 26S Proteasome subunit RPT4a regulates ToLCNDV transcription and activates hypersensitive response in tomato. *Scientific Reports*, 6(27078): 1-12.

Salvesen, G. S., Hempel, A., Coll, N. S. (2016). Protease signaling in animal and plant-regulated cell death. *The FEBS journal*, 283(14): 2577-2598.

Selistre-de-Araujo, H. S., de Souza, E. L., Beltramini, L. M., Ownby, C. L., Souza, D. H. (2000). Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. *Protein expression and purification*, 19(1): 41-47.

Schmid M., Simpson D., Kalousek F., Gietl C. (1998). A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome a putative lytic compartment. *Planta*, 206: 466-475.

Schmid M., Simpson D., Gietl C. (1999). Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 14159-14164.

Schweichel J. U., Merkel, H. J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissue. *Teratology*, 7: 253-266.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*, 22(4): 526-539.

Shea Miller, S., Bowman, L. A. A., Gijzen, M., Miki, B. L. (1999). Early development of the seed coat of soybean (*Glycine max*). *Annals of Botany*, 84(3): 297-304.

Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. (2000). Caspase assays. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology*, Academic Press: Massachusetts. 91-100.

Suarez, M. F., Filonova, L. H., Smertenko, A., Savenkov, E. I., Clapham, D. H., von Arnold, S., Bozhkov, P. V. (2004). Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14(9): 339-340.

Sun, Y. L., Zhao, Y., Hong, X., Zhai, Z. (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters*. 462: 317-321.

Tait, S., Green, D. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9): 621-632.

Tan-Wilson, A. L., Wilson, K. A. (2012). Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1): 140-153.

Thomas, H., Ougham, H. J., Wagstaff, C., Stead, A. D. (2003). Defining senescence and death. *Journal of Experimental Botany*, 54(385): 1127-1132.

Thornberry, N.A.; Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Elliston, K. O. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, 356 (6372): 768-774.

Towbin, H., Staehelin, T., Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyl paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 76(43504354): 17-22.

Tran, V., Weier, D., Radchuk, R., Thiel, J., Radchuk, V. (2014). Caspase-like activities accompany programmed cell death events in developing barley grains. *PloS one*, 9(10): 109426.

Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zavalov A., Lam E., Bozhkov P. V. (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1279-1288.

Tsiatsiani, L., Timmerman, E., De Bock, P. J., Vercammen, D., Stael, S., Van De Cotte, B., Gevaert, K. (2013). The Arabidopsis metacaspase9 degradome. *The Plant Cell*, 25(8): 2831-2847.

Uren, A .G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E.

- V., Dixit, V. M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*, 6(4): 961-967.
- Vacca, R. A., Valenti, D., Bobba, A., Merafina, R. S., Passarella, S., Marra, E. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiology*, 141(1): 208-219.
- Vale, E., Heringer, A. S., Barroso, T., da Silva Ferreira, A. T., da Costa, M. N., Perales, J. E. A., Silveira, V. (2014). Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome science*, 12(1), 37.
- Van der Hoorn, R. A. L., Jones, J. D. G. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Current Opinion in Plant Biolog.*, 7: 400-407.
- Van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology.*, 59: 191-223.
- Van Dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., Wouterlood, M., van Aelst, A. C., Borstlap, A. C. (2003). Structure and developing Pea seed coat and the post-phloem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany*, 91: 729-737.
- Van Doorn, W., Woltering, E. (2005). Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in plant science*, 10(3): 117-122.
- Van Doorn W. G. (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J. Exp. Bot.*, 21: 1-13.
- Van Doorn W. G., Beers E. P., Dangl J. L., Franklin-Tong V. E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A. J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P. V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18: 1241-1246.
- Van Durme, M., Nowack, M. K. (2016) Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Current opinion in plant biology*, 29: 29-37.

Van Hautegeem, T., Waters, A. J., Goodrich, J., & Nowack, M. K. (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in plant science*, 20(2): 102-113.

Vercammen, D., Van De Cotte, B., De Jaeger, G., Eeckhout, D., Casteels, P., Vandepoele, K., Van Breusegem, F. (2004). Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44): 45329-45336.

Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P., Van Breusegem, F. (2007). Are metacaspases caspases? *The Journal of Cell Biology*, 179(3): 375-380.

Vines, S. H. (1903). Proteolytic enzymes in plants. *Annals of Botany*, 17(65): 237-264.

Wan, L., Xia, Q., Qiu, X., Selvaaraj, G. (2002). Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *The Plant Journal*, 30: 1-10.

Wang, M., Oppedijk, B. J., Caspers, M. P., Lamers, G. E., Boot, M. J., Geerlings, D. N., Duijn, B. V. (1998). Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. *Journal of Experimental Botany*, 49(325): 1293-1301.

Watanabe, N., Lam, E. (2005). Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15): 14691-14699.

Weitbrecht, K., Müller, K., Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of experimental botany*, 62(10): 3289-3309.

Western, T. L.; Skinner, D. J.; Haughn, G. W. (2000). Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology*, 122:345-356.

Williams, L. F. (1950). Structure and genetic characteristics of the soybean. In: *Soybeans and soybean products*. New York: Interscience Publishers, 1: 111-134.

Wilson, K. A., Rightmire, B. R., Chen, J. C., Tan-Wilson, A. L. (1986). Differential proteolysis of glycinin and β -conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. *Plant physiology*, 82(1): 71-76.

Windsor, J. B., Symonds, V. V., Mendenhall, J., Lloyd, A. M. (2000). *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal*, 22: 483-493.

Winton, A.L., Winton, K. B. (1932). The structure and composition of foods. Cereals, starch, oil seeds, nuts, and forage plants. New York: Wiley and Sons, 1: 436-459.

Yamada, T., Takatsu, Y., Kasumi, M., Marubashi, W., Ichimura, K. (2004). A homolog of the defender against apoptotic death gene (DAD1) in senescing gladiolus petals is down-regulated prior to the onset of programmed cell death. *Journal of plant physiology*, 161(11): 1281-1283.

Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(2): 453-458.

Young, T. E., Gallie, D. R. (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant molecular biology*, 42(2): 397-414.

Yu, X. H., Perdue, T. D., Heimer, Y. M., Jones, A. M. (2002). Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell death and differentiation*, 9(2): 189.

Yuan, J., Horvitz, H.R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental Biology*, 138(1): 33-41.

Yuan, J., Horvitz, H. R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development*, 116(2): 309-320.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin- 1β -converting enzyme. *Cell*, 75(4): 641-652.

Yuan, J., Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407 (6805): 802-809.

Zhang, D., Liu, D., Lu, X., Wang, Y., Xun, Z., Liu, Z., Li, F., Lu, H. (2014). The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(7): 2939-2961.

Zhao, P., Zhou, X. M., Zhang, L. Y., Wang, W., Ma, L. G., Yang, L. B., Peng, X. B., Bozhkov, P., Sun, M. X. (2013). A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos. *PLoS Biology*, 11(9): e1001655.