

INTERAÇÃO ENTRE A DEFENSINA DE PLANTA *ApDef₁* E
Saccharomyces cerevisiae PROVOCA ESTRESSE OXIDATIVO
DESCONTROLADO POR UM PROCESSO DEPENDENTE DO
CICLO CELULAR E DE CASPASES

JÚLIA RIBEIRO SOARES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Julho – 2016

INTERAÇÃO ENTRE A DEFENSINA DE PLANTA *ApDef₁* E
Saccharomyces cerevisiae PROVOCA ESTRESSE OXIDATIVO
DESCONTROLADO POR UM PROCESSO DEPENDENTE DO
CICLO CELULAR E DE CASPASES

JÚLIA RIBEIRO SOARES

“Tese apresentada ao Centro de Biociências
e Biotecnologia da Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção do título
de Doutora em Biociências e Biotecnologia”

ORIENTADOR: PROF. ANDRÉ DE OLIVEIRA CARVALHO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Julho – 2016

INTERAÇÃO ENTRE A DEFENSINA DE PLANTA *ApDef₁* E
Saccharomyces cerevisiae PROVOCA ESTRESSE OXIDATIVO
DESCONTROLADO POR UM PROCESSO DEPENDENTE DO
CICLO CELULAR E DE CASPASES

JÚLIA RIBEIRO SOARES

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia”

Aprovada em 29 de Julho de 2016.

Comissão examinadora:

Prof. José Roberto da Silva (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Prof.^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (Doutor em Produção Vegetal) – UENF

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

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

(José de Alencar)

Dedico...

*Ao meu pai José Edmar e a minha mãe Maria de Lourdes por todo
apoio sempre.*

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar por me dar forças para seguir a diante mesmo nas horas mais difíceis;

Ao prof. André de Oliveira Carvalho, meu orientador, pela amizade, pela orientação, pelos conselhos e por todos os ensinamentos desde a minha graduação;

À prof.^a Valdirene Moreira Gomes pela amizade, colaboração e incentivos sempre;

Ao prof. Edésio pela colaboração e ensinamentos;

À prof.^a Maura Da Cunha pela colaboração;

Às professoras e colaboradoras Mariana Regente, Marcela Pinedo e Laura de la Canal pela dedicação, pelos ensinamentos e pela acolhida carinhosa durante a missão de estudos realizada na Universidad de Mar del Plata, Argentina.

À Dr.^a. Viviane Veiga do Nascimento pela atenção e disponibilidade para revisar esse trabalho;

Aos colegas do grupo “Val-André” que sempre estiveram prontos a ajudar e proporcionaram uma enriquecedora troca de experiências durante todos esses anos;

Aos demais membros do LFBM pelo agradável convívio, tornando os dias mais leves e divertidos;

Aos técnicos Luís Carlos de Souza, Valéria Miguelote e Noil Gomes pela dedicação com a manutenção do nosso laboratório e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos professores José Roberto da Silva, Antônia Elenir Amâncio Oliveira e Alessandro Ramos Coutinho, por terem aceitado participar da banca examinadora e pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho;

Aos meus familiares, amigos e ao meu namorado Vitor Mateus por torcerem tanto por mim;

À UENF e ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, pela estrutura, pela concessão da bolsa, pelo apoio e pela oportunidade de realizar esse curso;

Ao CNPq, Capes e a Faperj, pelo apoio financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e na realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Sumário.....	vii
Lista de figuras, tabelas e esquemas	xi
Lista de abreviaturas	xvii
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
1 Introdução.....	1
1.1 Peptídeos antimicrobianos	1
1.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	10
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	17
1.4 <i>Adenantha pavonina</i> L.	19
2 Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 Material e Métodos	23
3.1 Materiais biológicos.....	23
3.2 Obtenção da defensina <i>ApDef</i> ₁	23
3.2.1 Preparo da farinha de sementes.....	23
3.2.2 Extração protéica e fracionamento com sulfato de amônio	23
3.2.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE - Sepharose.....	24
3.2.4 Purificação <i>ApDef</i> ₁ através cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	26
3.3 Quantificação de proteínas	27
3.4 Eletroforese em gel de Tricina na presença de SDS.....	27

3.4.1	Preparo das amostras e condições de corrida	27
3.4.2	Coloração e descoloração do gel	27
3.5	Verificação da relação entre o ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> e a atividade antifúngica da <i>ApDef</i> ₁	28
3.5.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	28
3.5.2	Sincronização do ciclo celular utilizando hidroxauréia	28
3.5.3	Viabilidade das células sincronizadas após tratamento com a <i>ApDef</i> ₁	28
3.6	Análise da capacidade de ligação da <i>ApDef</i> ₁ ao DNA de <i>S. cerevisiae</i>	29
3.6.1	Extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	29
3.6.2	Preparo da reação de ligação	29
3.6.3	Preparo do gel de agarose	30
3.6.4	Mobilidade eletroforética do DNA na presença da <i>ApDef</i> ₁	30
3.7	Verificação da interferência do potencial de membrana sobre o efeito antifúngico da <i>ApDef</i> ₁	30
3.7.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	30
3.7.2	Análise da influência do potencial de membrana sobre a atividade antifúngica da <i>ApDef</i> ₁	30
3.8	Efeito da temperatura na atividade da <i>ApDef</i> ₁ sobre <i>S. cerevisiae</i> ...	31
3.8.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.8.2	Viabilidade das células tratadas com <i>ApDef</i> ₁ a 4 °C	31
3.9	Ensaio para a verificação da produção de H ₂ O ₂ em <i>S. cerevisiae</i>	31
3.9.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.9.2	Preparo da solução DAB	32
3.9.3	Detecção da produção de H ₂ O ₂ por microscopia óptica	32
3.9.4	Verificação da atividade antifúngica da <i>ApDef</i> ₁ na presença de agente antioxidante	32

3.9.5	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	32
3.9.6	Análise da viabilidade das células tratadas com a <i>ApDef</i> ₁ na presença de ácido ascórbico	32
3.10	Permeabilização da membrana plasmática da levedura <i>S. cerevisiae</i>	33
3.11	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	33
3.11.1	Ensaio para verificação da permeabilização de membranas.....	33
3.12	Análises das células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com <i>ApDef</i> ₁ por microscopias	34
3.12.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	34
3.12.2	Microscopia óptica	34
3.12.3	Microscopia eletrônica de transmissão	35
3.13	Detecção de atividade de caspase em células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com a <i>ApDef</i> ₁	35
3.13.1	Obtenção das células de <i>S. cerevisiae</i>	35
3.13.2	Detecção de atividade caspase	35
3.13.3	Inibição da atividade de caspase	36
4	Resultados	36
4.1	Purificação e isolamento da defensina <i>ApDef</i> ₁ de sementes de <i>A. pavanina</i>	36
4.2	Análise da relação do ciclo celular sobre o efeito inibitório da <i>ApDef</i> ₁	41
4.3	Análise da capacidade de ligação ao DNA da <i>ApDef</i> ₁	41
4.4	Análise da interferência do potencial de membrana na atividade antifúngica da <i>ApDef</i> ₁ sobre <i>S. cerevisiae</i>	43
4.5	Análise da influência da temperatura na atividade da <i>ApDef</i> ₁ sobre <i>S. cerevisiae</i>	44
4.6	Análise da produção de H ₂ O ₂ em <i>S. cerevisiae</i> induzido pela <i>ApDef</i> ₁	45

4.7	Análise da atividade antifúngica da <i>ApDef</i> ₁ sobre células de <i>S. cerevisiae</i> na presença do antioxidante ácido ascórbico	45
4.8	Análise da permeabilização de membranas de células de <i>S. cerevisiae</i> pela <i>ApDef</i> ₁	49
4.9	Análise das alterações ultraestruturais nas células de <i>S. cerevisiae</i> induzidas pela <i>ApDef</i> ₁	49
4.10	Detecção de condensação de cromatina em células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com <i>ApDef</i> ₁	56
4.11	Detecção de atividade de caspase	56
4.12	Análise da relação da atividade de caspase na morte de <i>S. cerevisiae</i> induzida pela <i>ApDef</i> ₁	57
5	Discussão	62
6	Conclusões	74
7	Referências bibliográficas	75
8	Anexos	97

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1: Modelo Shai–Matsuzaki–Huang, esquematizando o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (Huang, 2000; Matsuzaki, 1999; Shai, 1999). (A) Os peptídeos sem estrutura definida adotam uma estrutura secundária após a interação com a membrana (B). (C) Subsequentemente, os peptídeos são integrados ao folheto externo abrangendo a interface de membrana entre as cabeças polares e as cadeias acil dos fosfolipídeos, levando a um afinamento da bicamada. (D) Formação de um canal na membrana e posterior eventos que levarão o microrganismo à morte. Adaptado de Straus e Hancock (2006), com modificações. 3

Figura 2: Eventos na membrana plasmática bacteriana após adsorção de AMP. Estes eventos não são necessariamente excludentes. A) Modelo “aduela de barril”. B) Modelo “carpete”. C) Poro toroidal. D) Poro toroidal desordenado. E) Modelo afinador de membrana. F) Acumulador de lipídeos carregados. G) Formação de intermediários de membrana. H) Direcionamento a lipídeos oxidados. I) Carreador de ânions. J) Despolarização não lítica. K) Modelo eletroporação. Adaptado de Nguyen (2011), com modificações. 5

Figura 3: Classificação das estruturas tridimensionais dos peptídeos antimicrobianos em quatro famílias (Wang, 2010). São mostradas as estruturas representativas de cada família: (A) estrutura em α -hélice da catelicidina humana LL-37 (PDB: 2K6O) (Wang, 2008); (B) estrutura em folha- β do peptídeo de planta kalata B1 (PDB: 1JNU) (Saether et al., 1995); (C) estrutura em $\alpha\beta$ da defensina humana β -defensina-1 (PDB: 1IJV) (Bauer et al., 2001) e (D) estrutura não- $\alpha\beta$ do peptídeo bovino indolicidina (PDB: 1G89) (Rozek et al., 2000). Imagens: Zhou e Huang, (2015). 8

Figura 4: Imagens mostrando os aspectos morfológicos de *Adenantha pavonina*. Planta adulta (A) e alguns de seus órgãos: sementes (B e C) e fruto (D). Fonte: A e D: <http://www.botany.hawaii.edu>. B: <http://robertoitiz.blogspot.com.br>. C: Foto tirada no laboratório por André de Oliveira Carvalho. 21

Figura 5: (A) Cromatograma da fração F/0-90 em coluna de DEAE-Sepharose. D1, pico não retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0) e D2, pico retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna contendo NaCl 1 M. (B) Visualização eletroforética em gel de Tricina na presença de SDS das frações F/0-90, D1 e D2. F/0-90, fração obtida a 0-90% de saturação com sulfato de amônio; D1, pico não retido em coluna DEAE-Sepharose; D2, pico retido em coluna DEAE-Sepharose; M, Marcador com massa molecular indicada em kDa..... 37

Figura 6: Cromatograma do pico D1 obtido da cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC. A amostra deu origem a 23 novas frações, sendo uma não retida e 22 retidas e eluídas em gradiente de propanol. A linha oblíqua mostra o desenvolvimento do gradiente de propanol. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm..... 38

Figura 7: (A), (B) e (C) Visualização eletroforética dos 22 picos retidos após a cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de tricina na presença de SDS. A seta indica a banda correspondente da defensina ApDef₁ na fração H11. M, marcador de massa molecular indicada em kDa..... 39

Figura 8: (A) Cromatograma obtido da fração H11 em coluna de fase reversa C18 em sistema HPLC. A amostra foi eluída utilizando-se um gradiente de propanol a um fluxo de 0,6 ml/min. A linha oblíqua mostra o desenvolvimento do gradiente de propanol. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm. (B) Visualização eletroforética dos 3 picos oriundos da terceira etapa de purificação por cromatografia de fase reversa em coluna C18, por eletroforese em gel de tricina. Os picos P1, P2 e P3, foram eluídos com um gradiente de propanol. O pico P2 contém uma única banda que corresponde a ApDef₁. M, marcador de massa molecular com a massa indicada em kDa. ... 40

Figura 9: Relação entre o ciclo celular e o efeito inibitório da ApDef₁. (A) Imagem das placas de Petri mostrando as colônias de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas após a incubação das células fúngicas como descrito: 1) não sincronizadas com hidroxauréia; 2) sincronizadas com hidroxauréia e 3) sincronizadas com hidroxauréia e tratadas com ApDef₁ após 3 h de incubação. Notar que a concentração de hidroxauréia utilizada causou uma toxicidade para as células, mas ainda é possível ver que o ciclo celular influencia a ação de

ApDef ₁ . (B) Porcentagem da viabilidade das células de <i>S. cerevisiae</i> determinada após contagem do número de colônias que cresceram nas placas com os tratamentos indicados em (A).	42
Figura 10: Visualização eletroforética da mobilidade do DNA em gel de agarose 0,8% para avaliar a capacidade de ligação da ApDef ₁ ao DNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . O DNA de <i>S. cerevisiae</i> (100 ng) foi incubado com: (1) água (como controle negativo), (2) Poli-L-lisina como controle positivo e (3) com ApDef ₁ (7,8 μM). Gel foi corado com GelRed.	43
Figura 11: Relação entre o potencial de membrana e a atividade da ApDef ₁ . Imagem das placas de Petri mostrando as colônias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidas após a incubação prévia com CCCP durante 1 h e 30 min das células fúngicas e posteriormente com 7,8 μM da ApDef ₁ durante 18 h. Um controle sem o tratamento com o CCCP é mostrado.	44
Figura 12: Relação entre baixa temperatura e o efeito tóxico da ApDef ₁ . Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas com 7,8 μM da ApDef ₁ e incubadas a 4 °C por 18 h não perderam a sua viabilidade. Para comparação é mostrado um controle com células incubadas a 30 °C durante 18 h onde toda a população de células foi morta.	46
Figura 13: ApDef ₁ induz a produção endógena de H ₂ O ₂ . Imagens de microscopia óptica das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mostrando a produção de H ₂ O ₂ após 3 h de incubação com 7,8 μM da ApDef ₁ ou 200 mM de ácido acético (controle positivo). Notar a coloração marrom clara da reação do DAB nas amostras tratadas. Barra: 10 μm.	47
Figura 14: Relação do estresse oxidativo para a morte das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> induzida pela ApDef ₁ . Imagens das placas de Petri do ensaio de viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> após a incubação com 7,8 μM da ApDef ₁ e 100 mM de ácido ascórbico durante 3, 9 e 18 h. Notar que a presença do ácido ascórbico evita a morte celular induzida pela ApDef ₁ , indicando a dependência do estresse oxidativo para a ocorrência deste processo.	48
Figura 15: Permeabilização de membranas das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas com 7,8 μM da ApDef ₁ . (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com ApDef ₁ por 5,	

10, 15, 30 min e 1 h e incubadas com o corante fluorescente Sytox Green. A fluorescência verde indica a presença de células permeabilizadas. Imagens adquiridas com o mesmo tempo de exposição. Barra: 20 μm . (B) Porcentagem de células de *S. cerevisiae* permeabilizadas determinada após contagem do número de células observadas em campos aleatórios em DIC e Fluorescência. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %. 52

Figura 16: Permeabilização de membranas das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a ApDef₁ na presença de ácido ascórbico. (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células de *S. cerevisiae* tratadas com 7,8 μM da ApDef₁ durante 1 h na presença de 100 mM de ácido ascórbico e incubadas com o corante Sytox Green. A fluorescência verde indica a presença de células permeabilizadas. Imagens adquiridas com o mesmo tempo de exposição. Barra: 20 μm . (B) Porcentagem de células permeabilizadas determinadas após contagem do número de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100%. 54

Figura 17: Imagem por microscopia eletrônica de transmissão mostrando alterações ultraestruturais nas células de *Saccharomyces cerevisiae* induzidas pela ApDef₁ após 18 h de incubação. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das células do controle e das células tratadas com a ApDef₁. O núcleo apresenta áreas com coloração escura que indica condensação cromatina (setas). As mitocôndrias aparentam inchadas e com má visualização das cristas dentro delas. Controle = sem ApDef₁. M = mitocôndria, N = núcleo, PC = parede celular. 55

Figura 18: Condensação de cromatina das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a ApDef₁. Marcação com DAPI das células de *S. cerevisiae* controle e tratadas durante 18 h com 7,8 μM da ApDef₁. Note o brilho mais intenso nas amostras tratadas. Barra: 10 μm 57

Figura 19: Envolvimento da atividade de caspases na morte celular de *Saccharomyces cerevisiae* induzida pela ApDef₁. (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células controle e tratadas com 7,8 μM da ApDef₁ apresentando marcação para atividade de caspase através do marcador fluorescente FITC-VAD-FMK. As imagens representam um de três

experimentos independentes. Barra: 10 μm . (B) Porcentagem de atividade de caspase nas células de *S. cerevisiae*, determinado após contagem do número de células em campos aleatórios em DIC e as fluorescentes. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100%. 60

Figura 20: Envolvimento de caspases ativas na morte de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Imagens de placas de Petri mostrando as colônias de *S. cerevisiae* obtidas após a incubação das células fúngicas por 18 h com 7,8 μM da ApDef₁ na presença de 50 μM do inibidor de caspases Z-VAD-FMK. Notar que a adição do inibidor protegeu uma população de células da morte, indicando o envolvimento de caspases nesse processo. Como controles foram usadas células sem tratamento, células tratadas com a ApDef₁ e células tratadas com o inibidor. 61

Figura 21: Modelo sugerido da interação ApDef₁-*Saccharomyces cerevisiae* e mecanismos de ação baseados nos resultados apresentados neste trabalho. 73

Anexo 1: Ensaio da cinética da morte celular de *Saccharomyces cerevisiae* incubada com a ApDef₁. Imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade das células de *S. cerevisiae* incubadas com 7,8 μM da ApDef₁ (MIC) por até 21 h. Notar que nas placas de Petri que contém as células tratadas com a ApDef₁, o número de colônias diminui à medida que o tempo de incubação aumenta, perdendo todas as células a viabilidade com 18 h de incubação. Observar também que a população de células inicial não é homoganeamente afetada ao mesmo tempo. Resultado em Soares, 2012. 97

Anexo 2: Permeabilização das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a ApDef₁. Imagens das células tratadas com 3,9, 1,9, 0,98 e 0,49 μM da ApDef₁ por 36 h e incubadas com o corante fluorescente Sytox green para determinar a permeabilização da membrana plasmática por microscopia óptica. A fluorescência indica a presença de células permeabilizadas. Todas as imagens estão com o mesmo tempo de exposição. Na coluna da direita estão as imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade das células de *S. cerevisiae* das concentrações correspondentes. Barra: 20 μm . Resultado em Soares, 2012. 98

Anexo 3: Comparação da sequência de aminoácidos entre ApDef₁ e PsD1. A similaridade entre as duas defensinas de planta é indicada pela presença de 17 aminoácidos idênticos (35 %) e 22 aminoácidos positivos (44 %). **(Negrito)** indica aminoácidos idênticos. **(Negrito e itálico)** indica aminoácidos positivos com características bioquímicas similares. (-) Gaps foram introduzidos para melhorar o alinhamento. A sequência da ApDef₁ foi obtida por Soares et al. (2012) e a sequência da PsD1 foi obtida do UniProt (P81929-1). As sequências foram comparadas pelo BLAST suite-2sequences (em National Center for Biotechnology Information) com parâmetros predefinidos (Altschul et al., 1990). Resultado em Soares et al. (2012)..... 99

Esquema 1: Representação esquemática das etapas utilizadas para a extração proteica da farinha de cotilédones de *A. pavonina* seguida por etapas de purificação parcial para a obtenção da fração F/0-90 (Soares, 2012)..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Peptídeo antimicrobiano
<i>ApDef</i> ₁	<i>Adenantha. pavonina</i> Defensin one
ROS	Espécies reativas de oxigênio
MIC	Mínima concentração inibitória
F/0-90	Fração precipitada com 90% de Sulfato de amônio
DEAE	Dietilaminoetil
TFA	Ácido trifluoracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
nm	Nanômetro
HU	Hidroxiuréia
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
CCCP	Carbonilcianida m-clorofenilhidrazona
DAB	3,3'-diaminobenzidina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DMSO	dimetil sulfóxido
PBS	Tampão Fosfato, NaH ₂ PO ₄ 10mM e NaCl 0,15M
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
CaspACE FITC-VAD-FMK	Marcador de caspases ativadas
Z-VAD-FMK	Inibidor de caspase
DIC	Contraste de interferência diferencial

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são componentes essenciais do sistema de defesa imune inato e são amplamente encontrados na natureza e em uma variedade de organismos. Estes são moléculas de baixa massa molecular, anfipáticos e de carga líquida positiva em pH fisiológico. Entre os AMPs de planta mais estudados encontram-se as defensinas, as quais possuem múltiplas atividades biológicas, com destaque para sua atividade antimicrobiana. Neste trabalho foi estudada a interação entre a defensina *ApDef₁* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *ApDef₁* é uma defensina de sementes de *Adenantha pavonina* (L.) e possui forte atividade inibitória sobre células de *S. cerevisiae*. Inicialmente foi obtida desta semente uma fração rica em peptídeos e, posteriormente, esta fração foi submetida a processos cromatográficos para a obtenção da *ApDef₁*. A interação entre *ApDef₁*-*S. cerevisiae* foi estudada através de ensaios de viabilidade realizados na presença da hidroxauréia e de CCCP. Em seguida, foram feitas análises para verificar a ocorrência de permeabilização de membrana, indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), condensação de cromatina e ativação de caspases após tratamento com a *ApDef₁*. Posteriormente, foi estudado o envolvimento de estresse oxidativo e de caspases na morte celular induzida pela *ApDef₁*, com adicional análise da ultraestrutura celular. Após 3 h tratamento com a *ApDef₁*, sincronizadas 98,76 % da população de células sincronizadas morreram. O pré-tratamento com CCCP protegeu a levedura da morte induzida pela *ApDef₁* e a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* resultou em permeabilização da membrana, aumento da produção de H₂O₂, condensação da cromatina e ativação de caspases. O Ácido ascórbico impediu a morte celular e a permeabilização da membrana assim como o inibidor de caspases Z-VAD-FMK, que protegeu as células da morte. Como conclusão, a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* causou a morte celular através de um processo dependente do ciclo celular e que requer potencial de membrana preservado. Após a interação, a levedura sofreu uma descontrolada produção e acúmulo de ROS, levando a permeabilização da membrana plasmática, condensação de cromatina e, por último, a morte celular por ativação da via apoptótica dependente de caspase.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) are essential components of the innate immune defense system, are widely found in nature and in a variety of organisms. These are molecules that present low molecular weight, amphipathic character and net positive charge at physiological pH. Among the most studied plant AMPs are the defensins, which have multiple biological activities, especially antimicrobial activity. In this work we studied the interaction between the plant defensin *ApDef₁* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *ApDef₁* is a defensin from *Adenantha pavonina* (L.) seeds and it has a strong inhibitory activity on *S. cerevisiae* cells. Initially, it was obtained a seed fraction rich in peptides and, thereafter, this fraction was subjected to chromatographic processes to obtain *ApDef₁*. The interaction between *ApDef₁*-*S. cerevisiae* was studied by viability assays performed in the presence of hydroxyurea and CCCP. Then, analyzes were performed to verify the occurrence of membrane permeabilization, induction of reactive oxygen species (ROS), chromatin condensation and caspase activation. Subsequently, it was study the involvement of oxidative stress and caspases in cell death induced by *ApDef₁*, with additional analysis of the cellular ultrastructure. After 3 h of treatment with *ApDef₁*, 98.76% of the synchronized cells population died. Pretreatment with CCCP protected the yeast from *ApDef₁* induced death and *ApDef₁*-*S. cerevisiae* interaction resulted in membrane permeabilization, increasing H₂O₂ production, chromatin condensation and caspase activation. Ascorbic acid prevented cell death and membrane permeabilization, as well as, Z-VAD-FMK caspase inhibitor protected the cells from death. In conclusion, *ApDef₁*-*S. cerevisiae* interaction caused cell death through cell cycle dependent process which requires preserved membrane potential. After interaction, yeast underwent an uncontrolled ROS production and accumulation, which led to plasma membrane permeabilization, chromatin condensation and, ultimately, cell death by activation of caspase-dependent apoptosis via.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos antimicrobianos

Uma grande variedade de organismos é capaz de desenvolver uma resposta imunológica diante de estresses bióticos e abióticos. O estresse biótico é resultante da infecção por patógenos como vírus, bactérias e fungos e também ataques de nematoides e insetos. Estas agressões podem ativar na planta hospedeira a atuação de diferentes moléculas que precisam agir de uma maneira integrada para a manutenção da homeostase. A percepção pela célula hospedeira de patógenos ou predadores pode induzir uma resposta de defesa inata, que consiste no disparo de uma cascata de reações bioquímicas e liberação de compostos químicos direcionados tanto à defesa da planta agredida, como também, ao ataque do invasor. Como resultado desse processo, podemos destacar a liberação de moléculas antimicrobianas endógenas, dentre elas estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *AntiMicrobial Peptides*), cuja principal função é induzir uma atividade direta contra os patógenos bem como modular a resposta imune dos hospedeiros (Benko-Iseppon e Crovella, 2010; Lai e Gallo, 2009).

Os AMPs são componentes essenciais do sistema de defesa imune inato e são constantemente observados na natureza. Estes também são amplamente encontrados em uma variedade de organismos, como, plantas, animais vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos), animais invertebrados (insetos, crustáceos, etc.) e microrganismos (fungos e bactérias) (Jenssen et al., 2006; Nakatsuji e Gallo, 2012). A produção destas moléculas corresponde a uma estratégia de defesa antiga e evolutivamente conservada, sendo eficiente e econômica para o organismo que a produz, pois são sintetizadas com um baixo consumo de energia e biomassa. Um mesmo organismo pode produzir diferentes classes de AMPs e isso está relacionado à proteção do organismo contra a invasão por uma grande variedade de espécies microbianas. Esses AMPs podem agir sozinhos ou em sinergismo, atribuindo uma maior capacidade de sobrevivência em ambientes repletos de microrganismos. Além disso, os AMPs não apresentam um modo específico de ação e isso faz com que seja bastante minimizado a chance de os

microrganismos desenvolverem resistência a esses AMPs. Outra característica favorável à presença dessa diversidade de AMPs é que eles apresentam diferentes atividades antimicrobianas e também outras atividades biológicas complementares à atividade antimicrobiana, além de serem específicos para diferentes tipos de microrganismos. Mesmo os peptídeos estruturalmente muito semelhantes possuem microrganismos-alvo específicos (Belarmino e Benko-Iseppon, 2010; Conlon et al., 2004; Nicolas et al., 2003; Odintsova e Egorov, 2012).

Algumas características em comum são compartilhadas pelos AMPs de um modo geral. Estes são moléculas protéicas pequenas com uma variada composição de aminoácidos e tamanho (mas possuindo menos do que 100 resíduos de aminoácidos), apresentam resíduos de cisteínas em número par (4, 6 ou 8) interconectadas por pontes dissulfeto. Estas pontes dissulfeto conferem aos AMPs uma alta estabilidade a duras condições físico-químicas (Broekaert et al., 1997). Além disso, os AMPs possuem carga líquida positiva em pH neutro e muitas regiões hidrofóbicas, características que fazem com que estas moléculas assumam uma estrutura anfipática possibilitando-as interagir e se inserir facilmente na membrana fosfolipídica dos microrganismos (Boman et al., 1993; Hancock e Sahl, 2006; Odintsova and Egorov, 2012; Parachin e Franco, 2014).

A membrana plasmática tem sido identificada como alvo primário para a maioria dos AMPs (Boman et al., 1993; Hancock, 2005; Kaas et al., 2010; Zasloff, 2002) e vários mecanismos para explicar a inespecífica interação entre estas moléculas e membranas plasmáticas de microrganismos têm sido sugeridos. A natureza catiônica e anfifílica dos AMPs garante a sua interação direta com as superfícies celulares aniônicas dos patógenos microbianos, como por exemplo, os lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas e ácido teicóico de bactérias Gram-positivas (Brazas e Hancock, 2005; Hancock, 2005; Kohn e Widger, 2005). Enquanto para membranas de mamífero tal efeito eletrostático é ausente, devido à carga elétrica neutra do folheto externo da membrana plasmática (Huang, 2006). Subsequentemente, os AMPs entram em contato com fosfolipídios da membrana e se inserem na bicamada lipídica (Shai, 1999) alterando sua organização e promovendo a formação de canais, tornando-a permeável (Fig. 1). Isto pode levar à degradação da parede celular

(Bierbaum e Sahl, 1985) ou modificação da composição dos lipídeos na bicamada da membrana (Matsuzaki, 1999), despolarização da membrana (Kourie e Shorthouse, 2000; Matsuzaki et al., 1997; Westerhoff et al., 1989), danos de processos intracelulares como a síntese de macromoléculas (Kragol et al., 2001) e, em casos extremos, a formação de micelas, levando ao extravasamento celular (Papo e Shai, 2005) e a morte do microrganismo.

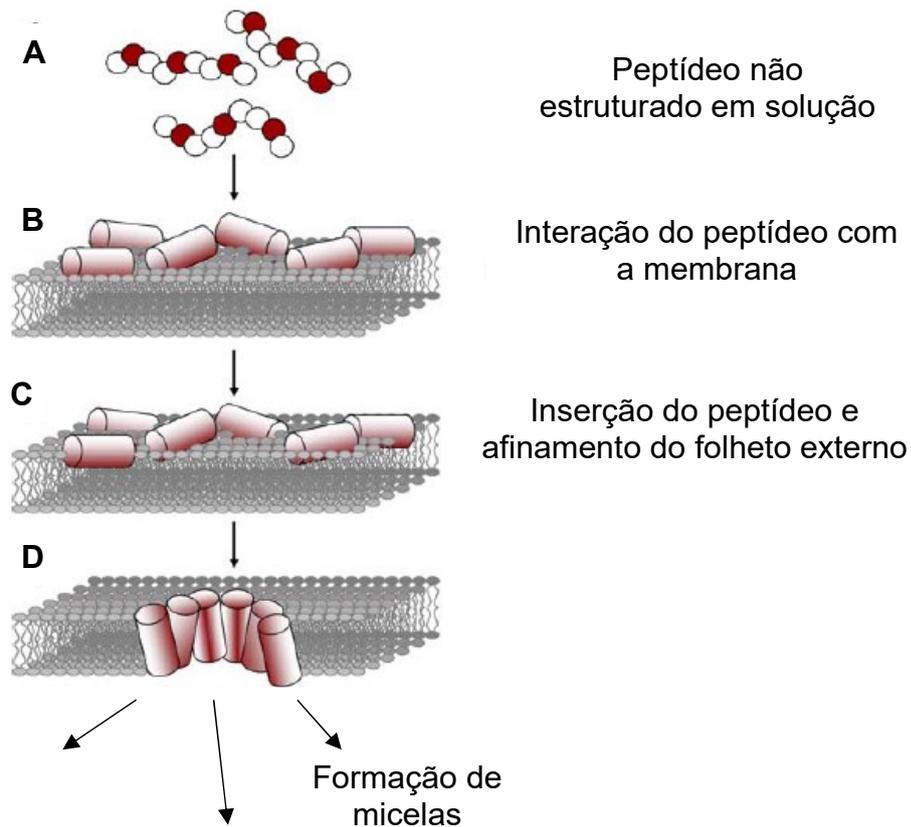


Figura 1: Modelo Shai–Matsuzaki–Huang, esquematizando o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos cationicos (Huang, 2000; Matsuzaki, 1999; Shai, 1999). (A) Os peptídeos sem estrutura definida adotam uma estrutura secundária após a interação com a membrana (B). (C) Subsequentemente, os peptídeos são integrados ao folheto externo abrangendo a interface de membrana entre as cabeças polares e as cadeias acil dos fosfolipídeos, levando a um afinamento da bicamada. (D) Formação de um canal na

membrana e posterior eventos que levarão o microrganismo à morte. Adaptado de Straus e Hancock (2006), com modificações.

Vários modelos têm sido propostos e descrevem como provavelmente ocorre a formação dos canais após a interação dos AMPs com a membrana plasmática. No modelo “aduelas de barril” os AMPs se inserem paralelamente à membrana de forma que a sua porção hidrofílica fique voltada para o interior do poro (Fig. 2A); no modelo “carpete” não é necessária a inserção do AMP na região da membrana em si, ou a adoção de uma estrutura específica quando em contato com essa. Quando a concentração de peptídeos na superfície supera o limiar mínimo, a bicamada lipídica é desintegrada, similar à ação de um detergente, podendo inclusive gerar micelas (Fig. 2B); no modelo “poro toroidal” é formado um poro com os peptídeos inseridos paralelamente à membrana e intercalados por lipídeos (Fig. 2C) (Hancock e Chapple, 1999; Hancock e Sahl, 2006; Matsuzaki, 1999; Nguyen et al., 2011; Wu et al., 1999). Estes são os principais modelos propostos e mais detalhados. Outros modelos são citados na figura 2 e foram propostos à medida que novos estudos mais aprofundados sobre mecanismos de ação dos AMPs foram sendo realizados, dentre eles, o modelo “poro toroidal desordenado” (Fig. 2D), onde uma menor concentração de peptídeo, disposta de forma mais desorganizada, forma o poro toroidal; o modelo “afinamento da espessura da membrana” (Fig. 2E), onde a atração de fosfolipídios carregados gera regiões menos espessas e mais frágeis na membrana; o modelo “remodelamento da membrana” (Fig. 2F), que forma domínios ricos em lipídios aniônicos, circundando os peptídeos. Em casos mais específicos, a presença de AMPs pode induzir a formação de intermediários de membrana diferentes da dupla camada (Fig. 2G); ou a adsorção do peptídeo pode ser aumentada (Fig. 2H) pela presença de lipídeos oxidados por espécies intermediárias de oxigênio. No modelo “carreador de ânions” (Fig. 2I), os AMPs podem atrair pequenos ânions, fazendo-os atravessar a membrana e causando uma perda do potencial eletrostático. Outro modelo propõe que a perda do potencial eletrostático pode ocorrer ainda sem a atração de íons (Fig. 2J). Por fim, no modelo “eletroporação” (Fig. 2K), os

AMPs podem afetar o potencial de membrana com consequente diminuição da permeabilidade a várias moléculas (Nguyen et al., 2011).

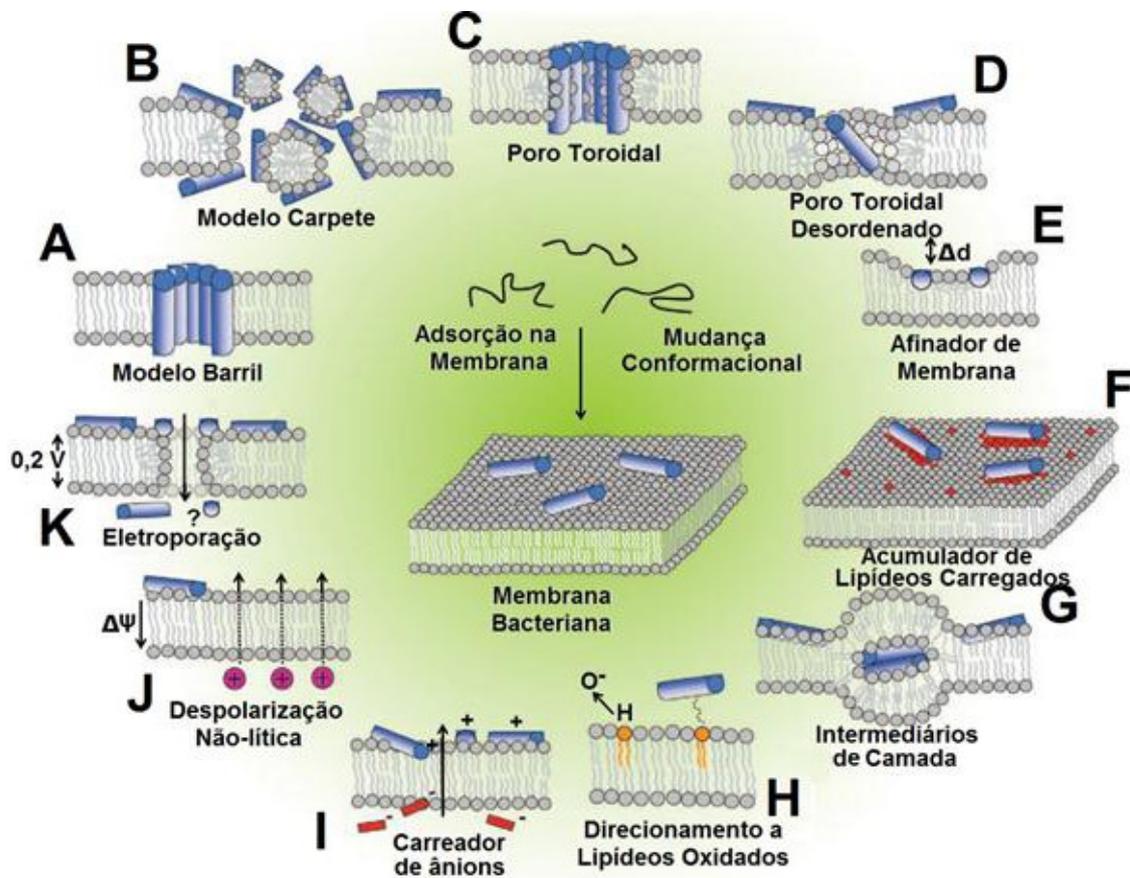


Figura 2: Eventos na membrana plasmática bacteriana após adsorção de AMP. Estes eventos não são necessariamente excludentes. A) Modelo “aduela de barril”. B) Modelo “carpete”. C) Poro toroidal. D) Poro toroidal desordenado. E) Modelo afinador de membrana. F) Acumulador de lipídeos carregados. G) Formação de intermediários de membrana. H) Direcionamento a lipídeos oxidados. I) Carreador de ânions. J) Despolarização não lítica. K) Modelo eletroporação. Adaptado de Nguyen (2011), com modificações.

Vários estudos já mostraram AMPs atuando diretamente sobre a membrana da célula-alvo (Gallo et al., 2002; Holm et al., 2005; Prenner et al., 1999). A carga líquida positiva dos AMPs promove uma ligação preferencial a alvos carregados negativamente em bactérias, o que pode explicar a seletividade dos AMPs (Hancock e Scott, 2000; Huang, 2006). Os primeiros

indícios de que os AMPs têm a membrana como alvo foram o seu amplo espectro de atividade e sua rápida velocidade de ação, muitas vezes dentro de minutos (*in vitro*). Além disso, muitos AMPs que foram sintetizados na configuração de D-aminoácidos, exibiram as mesmas atividades antimicrobianas dos seus peptídeos homólogos nativos (L-aminoácidos) (Bessalle et al., 1990; Cho et al., 1998; Wade et al., 1990; Yasin et al., 1996). Os resultados com AMPs na conformação D de aminoácidos implica que a ação dos AMPs não envolve receptores de proteína específicos; ou seja, a ação é o resultado de interação direta com a matriz lipídica das membranas (hidrofobicidade, cuja interação não depende de conformação). Adicionalmente, tem sido mostrado que não somente a natureza do peptídeo, mas também as características da membrana celular, bem como o estado metabólico das células alvos, determinam os mecanismos de ação dos AMPs (Falla et al., 1996; Gyurko et al., 2000; Liang e Kim, 1999). No entanto, mecanismos antimicrobianos alternativos e/ou coexistentes não podem ser excluídos neste estágio. Os AMPs podem se ligar a um receptor da membrana, levando a uma perda específica de sua função (Hoffmann et al., 1999; Yang et al., 1999). E como mencionado acima, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem agir ainda no interior da célula (Lobo et al., 2007), impedindo a síntese de metabólitos importantes para o microrganismo, como a síntese de DNA e RNA ou diminuir a síntese de proteínas (Boman et al., 1993; Gennaro et al., 2002; Hancock e Rozek, 2002). Alternativamente, alguns AMPs também podem afetar o correto enovelamento de proteínas e a atividade de certas enzimas (Jenssen et al., 2006). Um exemplo de mecanismo de morte não lítico seria o desempenhado pelo peptídeo PR-39 que mata a bactéria sem promover a lise celular, agindo através da inibição da síntese de proteínas requeridas para a replicação do DNA (Boman et al., 1993). Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses AMPs tornam-se candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (Lohner, 2003; Zasloff, 2002), além de servirem como vetores de entrega de drogas, facilitando a passagem para o interior da célula de drogas não permeáveis à membrana celular e as entregando em locais específicos para atuação (Pato et al., 2001; Pushpanathan et al., 2013). Com o passar dos anos um grande número de

AMPs foram sendo descobertos e estudados. Atualmente, já foram isolados e identificados 2.712 AMPs, segundo o *Antimicrobial peptide database* (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>; Wang et al., 2016), sendo eles oriundos de organismos de 6 reinos diferentes: 269 de bactérias, 4 de arquea, 8 de protistas, 13 de fungos, 333 de plantas e 2.036 de animais. Esse banco de dados fornece várias informações sobre os AMPs já descobertos e a tabela 1 mostra, por exemplo, a classificação desses AMPs de acordo com suas estruturas secundárias.

Tabela 1 – Quantidade e classificação dos AMPs de acordo com a estrutura, segundo o “*Antimicrobial peptide database*”

Estrutura	Número de peptídeos*	Porcentagem
α-hélice	386	14,23
Folha β	103	3,79
α-hélice/folha β não empacotada	3	0,11
Combinação de α-helix e folha β empacotada	101	3,72
Nem α-hélice nem folha β	17	0,62
Rico em aminoácidos não usuais	91	3,35
Com ponte dissulfeto	433	15,96
Estrutura 3D desconhecida	1578	58,18

* dados obtidos em Maio de 2016 em http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_structure.php

Embora na literatura haja diferentes formas de classificação estrutural dos AMPs (Boman, 2003; Epanand and Vogel, 1999; Hancock and Sahl, 2006; Lai and Gallo, 2009; Yeaman, 2014; Zasloff, 2002), o site APD, criado e atualizado por Wang et al. (2016), tem adotado uma classificação unificada proposta por Wang et al. (2010). De acordo com essa classificação os AMPs são divididos em quatro principais famílias: Família α , com peptídeos lineares que apresentam estruturas em α -hélice (Fig. 3A), família β , com peptídeos apresentando ao menos um par de folhas- β (Fig. 3B), família $\alpha\beta$, com peptídeos

apresentando em sua estrutura α -hélice e folha- β (Fig. 3C) e família não- $\alpha\beta$, com peptídeos que não apresentam nem α -hélice ou folha- β em sua estrutura (Fig. 3D), compreendendo estruturas formadas por ligações dissulfeto simples ou devido à presença de resíduos de prolínas na estrutura, e estruturas estendidas caracterizadas pela predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos na sequência primária (Rozek et al., 2000).

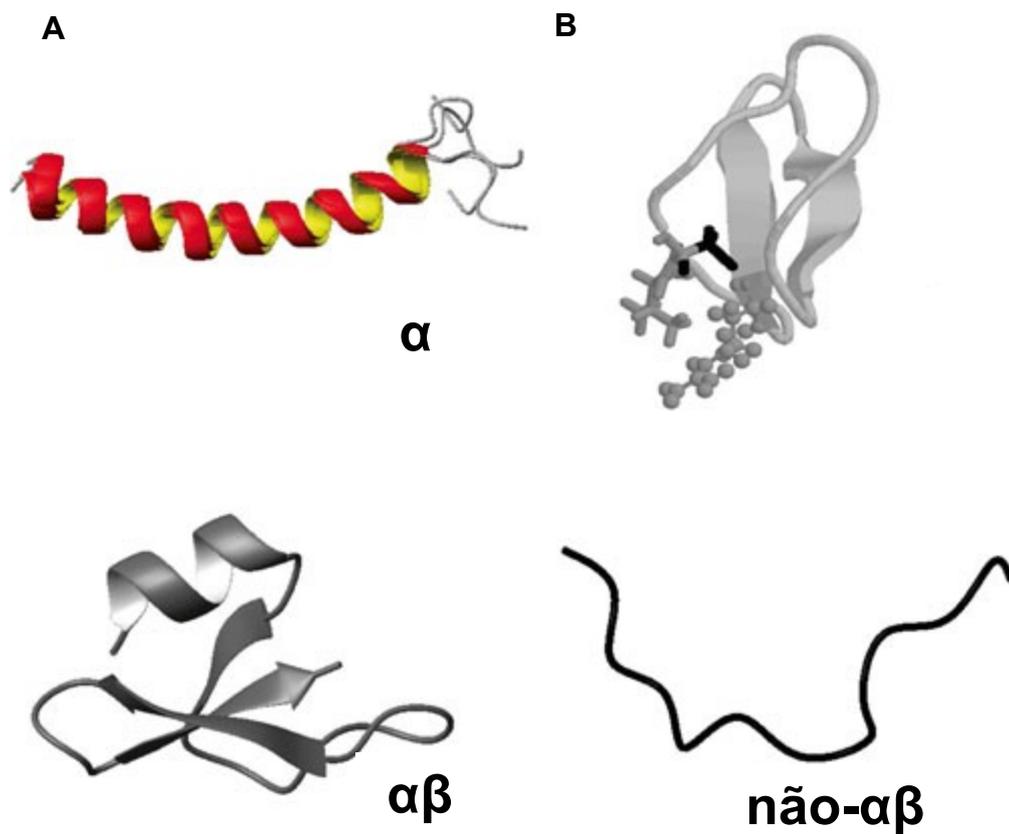


Figura 3: Classificação das estruturas tridimensionais dos peptídeos antimicrobianos em quatro famílias (Wang, 2010). São mostradas as estruturas representativas de cada família: (A) estrutura em α -hélice da catelidicina humana LL-37 (PDB: 2K6O) (Wang, 2008); (B) estrutura em folha- β do peptídeo de planta kalata B1 (PDB: 1JNU) (Saether et al., 1995); (C) estrutura em $\alpha\beta$ da defensina humana β -defensina-1 (PDB: 1IJV) (Bauer et al., 2001) e (D) estrutura não- $\alpha\beta$ do peptídeo bovino indolicidina (PDB: 1G89) (Rozek et al., 2000). Imagens: Zhou e Huang, (2015).

A vantagem dos AMPs como armas de defesa, é que, dada a inespecificidade do seu mecanismo e diversidade de AMPs produzidos por um único organismo, não é fácil para patógenos microbianos desenvolverem mutantes resistentes para vencer a intervenção do peptídeo. Eles também apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, como exemplificado na tabela 2, além de uma baixa toxicidade para as células de mamíferos.

Tabela 2 – Quantidade e classificação dos AMPs de acordo com a atividade biológica, segundo o “*Antimicrobial peptide database*”

Atividade	Número de peptídeos^{*1 *2}	Porcentagem
Antibacteriana	2.255	83,14
Antiviral	177	6,52
Antifúngica	988	36,43
Antiparasítica	84	3,09
Anticâncer	196	7,22
Antiprotista	4	0,14
Inseticida	28	1,03
Espermicida	12	0,44
Antibiofilme	21	0,77
Anti- HIV	109	4,01
Quimiotática	56	2,06
Cicatrização de feridas	15	0,55
Inibidor de protease	22	0,81

*1: dados obtidos em Maio de 2016 em http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_structure.php

*2: Com sobreposição de atividades.

A compreensão de como, quando e onde agem tornou-se então de grande interesse, fazendo com que o estudo dessas moléculas possa possibilitar o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, especialmente no contexto do crescimento a resistência microbiana aos antibióticos convencionais (Gallo et al., 2002). O esforço empenhado na pesquisa de AMPs

resultou em mais de 100 medicamentos à base de peptídeos disponíveis no mercado, com cerca de 500 a 600 candidatos em desenvolvimento de testes pré-clínicos (Craik et al., 2013).

1.2 Peptídeos antimicrobianos de plantas

Ao contrário dos animais, as plantas não têm a capacidade de escapar do ataque de predadores ou patógenos através do movimento, e com isso evoluíram uma impressionante variedade de moléculas de defesa para conferir proteção, uma vez que as barreiras físicas sejam ultrapassadas. Durante a interação planta-patógeno, as plantas resistem aos patógenos por dois mecanismos, sendo o primeiro representado pelas barreiras constitutivas pré-existentes (aquelas que existem na planta antes da percepção de ataque) e o segundo por mecanismos induzidos após a percepção do patógeno (García-Olmedo et al., 2001). Estes últimos envolvem reconhecimento de eliciadores seguido por transdução de sinais, que regulam a expressão de genes relacionados a defesa. Entre estes genes, são encontrados aqueles que expressam proteínas e AMPs e seus precursores (Castro e Fontes, 2005; García-Olmedo et al., 2001). Nos últimos anos um grande número de AMPs tem sido isolado de plantas, especialmente de sementes, local em que podemos encontrá-los em nível elevado quando comparados com as folhas, flores e demais órgãos da planta (Broekaert et al., 1997).

Apesar dos AMPs de plantas serem atribuídos a diferentes classes de acordo com suas estruturas específicas, todos compartilham algumas características importantes como descrito no terceiro parágrafo do item **Peptídeos antimicrobianos** (Lay e Anderson, 2005). Estes são moléculas catiônicas e com uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos (cerca de 30 %), que as permitem dobrarem-se em uma estrutura anfifílica com regiões distintas de aminoácidos hidrofóbicos e carregados positivamente (Hancock e Sahl, 2006). Estas propriedades estruturais em conjunto, permitem os AMPs interagirem com a membrana dos microrganismos diretamente ou utilizando receptores, destruindo assim a permeabilidade membranar e fazendo desta o seu principal alvo (Odintsova e Egorov, 2012).

Uma variedade de classes de AMPs de plantas tem sido discriminada e são classificados de acordo com suas sequências de aminoácidos e número de cisteínas (6-8 resíduos) formando pontes dissulfeto (3-4 pontes). Elas incluem as defensinas, tioninas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs, do inglês *Lipid Transfer Proteins*), peptídeos do tipo heveína, peptídeos do tipo knotinas e peptídeos macrocíclicos. Entretanto, outros tipos moleculares têm sido descritos e estes não estão incluídos nas classes acima, sendo específicos para algumas espécies de plantas (Garcia-Olmedo, 2001; Odintsova e Egorov, 2012). Esses incluem as snakinas, com 12 resíduos de cisteínas, isoladas de tomate (Berrocal-Lobo et al., 2002; Segura et al., 1999); as seferdinas, peptídeos lineares sem resíduos de cisteínas, isolada de raízes de *Capsella bursa-pastoris* (Park et al., 2000); peptídeos Ib-AMPs, com quatro resíduos de cisteínas, isolados de sementes de balsamina (*Impatiens balsamina*) (Tailor et al., 1997) e peptídeos MBP1, isolados de sementes milho (*Zea mays*), com quatro resíduos de cisteínas (Duvick et al., 1992). Apesar da diversidade estrutural, uma região estrutural comum conservada, chamada de γ -core, foi identificada em vários AMPs estudados que apresentam pelo menos duas folhas- β . É suposto que o γ -core seja um tipo de AMP ancestral, que foi modificado durante a evolução pela adição de diversos elementos estruturais (α -hélices e/ou folhas- β) (Yount e Yeaman, 2004).

Os AMPs de plantas têm um amplo espectro de atividade *in vitro*, inibindo o crescimento de patógenos em concentrações micromolares. O modo de ação dos AMPs de planta permanece em grande parte desconhecido e está somente começando a ser desvendado. Dentre os principais AMPs de plantas estudados, encontramos principalmente as tioninas, as LTPs e as defensinas.

As tioninas são um grupo de pequenos AMPs (45–47 resíduos), básicos, ricos em resíduos de arginina, lisina e cisteína. As tioninas adotam em geral uma forma semelhante à letra “L” (Stec, 2006) e sua estrutura consiste de uma folha- β seguida por duas α -hélices (hélice-volta-hélice) e uma segunda folha- β (Kass et al., 2010). Estes são predominantemente localizadas intracelularmente, mas são também encontradas no espaço extracelular, sendo relatadas em vários órgãos da planta, tais como sementes, caules e raízes (Selitrennikoff, 2001). As duas primeiras tioninas descobertas foram identificadas (Balls et al., 1942a,b) e isoladas (Fisher et al., 1968) de germen

de trigo (*Triticum aestivum*) e foram nomeadas de α - e β -purotioninas. As tioninas apresentam um elevado nível de similaridade de sequência e estrutura, além de exibir efeitos tóxicos sobre bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Castro e Fontes, 2005). Estudos analisando sequências e estruturas tridimensional de tioninas têm demonstrado que elas são capazes de atuar diretamente nas membranas celulares de patógenos (Hughes et al., 2000). Além disso, uma região de ligação ao DNA conservada foi identificada, sugerindo que elas podem interagir com o DNA dentro das células de microrganismos (Diamond et al., 1996). Adicionalmente também tem sido mostrado que a expressão heteróloga de tioninas promove uma proteção contra bactérias em muitas espécies de plantas transgênicas, como *Arabidopsis thaliana* (L.) (Epple, 1997), arroz (*Oryza sativa* L.) (Iwai et al., 2002) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Choi et al., 2008).

As proteínas transportadoras de lipídeos (*Lipid transfer proteins*-LTPs) são peptídeos catiônicos e são divididas em duas classes, baseado principalmente em seu peso molecular. Os membros da família 1, LTP1, apresentam aproximadamente 9 kDa, contendo de 90-95 resíduos de aminoácidos e a família LTP2 apresenta cerca de 7 kDa, possuindo em média 70 aminoácidos. Ambas as famílias compartilham algumas características como: 8 resíduos de cisteína, presença de quatro pontes de dissulfeto intramoleculares e carga líquida positiva em pH fisiológico. Em relação a estrutura, as LTP1 apresentam quatro α -hélices e uma região C-terminal longa desprovida de estrutura secundária, com exceção de uma α -hélice do tipo 3₁₀. Para a família LTP2 são três α -hélices e duas hélices de volta simples na região C-terminal. A principal característica estrutural dessas famílias é a presença de uma cavidade hidrofóbica, que na LTP1 se apresenta em forma de túnel e na LTP2 se apresenta como uma caixa triangular. Estas cavidades possuem a capacidade de se ligar e transportar moléculas lipídicas (Carvalho e Gomes, 2007; Samuel et al., 2002).

As LTPs da família 1 são conhecidas há mais tempo e também são bem estudadas (Kader et al., 1996; Kader, 1975). As LTP1s foram assim denominadas devido à habilidade de transferir lipídios entre membranas *in vitro* (Kader, 1975) e entre os lipídeos que são transferidos estão o fosfatidilinositol, a fosfatidilcolina e os galactolípídeos (Golshani et al., 2015; Kader et al., 1984).

Devido a essa habilidade, tem sido levantada a hipótese de que as LTP1s atuam no citoplasma regulando a concentração de ácidos graxos intracelulares e a biogênese da membrana (Tsuboi et al., 1992), mas estudos mais aprofundados demonstraram a existência de um peptídeo de sinal na região N-terminal que serve para orientar as LTPs para a via secretora da célula onde elas são exportadas para o apoplasto (Carvalho e Gomes, 2007). Um grande número de LTPs foram localizadas na parede celular (Carvalho et al., 2004; Thoma et al., 1993; Tsuboi et al., 1992), mas também já foram encontrados em outros compartimentos celulares, como os glioxissomos (Tsuboi et al., 1992) e vacúolos (Carvalho et al., 2004, 2001). Além de transportar lipídeos, outros papéis têm sido propostos para as LTPs como, por exemplo, a transferência de monômeros para a síntese de cutina (Domínguez et al., 2015), resposta ao estresse abiótico (Maldonado et al., 2002), β -oxidação (Tsuboi et al., 1992), embriogênese somática (Sterk et al., 1991), sinalização de defesa (Maldonado et al., 2002) e à proteção das plantas contra fungos, bactérias e vírus (Cammue et al., 1995; Safi et al., 2015; Selitrennikoff, 2001). Estudos já demonstraram que as LTPs apresentam a capacidade de inibir o crescimento de muitos fitopatógenos como *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* e *Cercospora beticola* (Carvalho et al., 2001; Kader et al., 1996; Molina et al., 1993; Terras et al., 1992). A toxicidade das LTPs tem sido relacionada com a capacidade destas proteínas de interagir com as membranas das células, promovendo a sua permeabilização através da formação de poros, levando ao efluxo de íons intracelulares e, por final, a morte celular (Cammue et al., 1995; Selitrennikoff, 2001).

As defensinas pertencem a maior e mais estudada família de AMPs e está amplamente distribuída, sendo encontradas em bactérias (Gao et al., 2009), fungos (Mygind et al., 2005), insetos (Yi et al., 2014), aves (Zhang e Sunkara, 2014) e mamíferos (Jarczak et al., 2013). Estes peptídeos em plantas foram inicialmente caracterizados a partir de grãos de trigo e cevada (Colilla et al., 1990; Mendez et al., 1990), sendo primeiramente chamados γ -tioninas por se assemelharem às α - e β -tioninas em relação a sua carga básica, tamanho e número de resíduos de cisteínas (Broekaert et al., 1995). Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que as defensinas compartilhavam mais características

das suas estruturas primárias e terciárias com defensinas de insetos e mamíferos do que com as tioninas (Bohlmann e Broekaert, 1994; Bruix et al., 1993; Terras et al., 1995, 1992), fazendo com que essa terminologia fosse abandonada.

Estes peptídeos são moléculas pequenas (~ 5 kDa) possuindo 45 a 54 resíduos de aminoácidos, básicas e com uma região característica de oito resíduos de cisteína formando quatro pontes dissulfeto (Carvalho e Gomes, 2009; 2011), com exceção de uma única defesina de flores da família Solanaceae, a PhD1, que possui cinco pontes dissulfeto (Janssen et al., 2003; Lay et al., 2003). A sua estrutura tridimensional globular compreende uma cadeia tripla de folhas- β antiparalelas e uma α -hélice, e é estabilizada pelas quatro pontes dissulfeto que ligam estes elementos estruturais (Almeida et al., 2002; Bloch et al., 1998; Fant et al., 1998). O principal elemento estrutural da molécula de defensina é o então chamado *CS α β motif* (*cysteine-stabilized α -helix β -sheet motif*), no qual dois resíduos de cisteínas localizados na α -hélice estão conectados a duas cisteínas localizadas na terceira folha β (Thomma et al., 2002). Exceto pelos resíduos de cisteínas, as sequências de aminoácidos das defensinas são altamente variáveis entre as espécies de plantas (Carvalho e Gomes, 2009; 2011).

A maioria das defensinas de planta foram isoladas a partir de sementes, no entanto, elas também já foram encontradas em outras partes da planta, como folhas, flores, tubérculos, vagens e frutas. Alguns membros da família são induzidas mediante ataque de agentes patogênicos, enquanto outras são expressas constitutivamente em tecidos ou órgãos específicos (Carvalho e Gomes, 2009; Lay e Anderson, 2005). A primeira defensina antifúngica de planta foi identificada em raízes e rizomas de *Urtica dioica* L. (Broekaert et al., 1989).

Estudos *in vitro* têm revelado uma gama de atividades biológicas para as defensinas de plantas, como por exemplo, atividades antivirais e inseticidas (López-Meza et al., 2011; Melo et al., 2002). Certas defensinas possuem propriedades de inibir enzimas como, por exemplo as α -amilases (Bloch e Richardson, 1991; Santos et al., 2010; Pelegrini et al., 2008; Wijaya et al., 2000). Um estudo com defensinas capazes de inibir proteinases (tripsina) permitiu a identificação de resíduos de aminoácidos básicos responsáveis pela

inibição (Huang et al., 2008; Melo et al., 2002; Wijaya et al., 2000). A maioria das defensinas de planta estudada apresenta atividade antimicrobiana - antifúngica e bactericida (Picart et al., 2012; Pitta et al., 2010; Terras et al., 1992; Wijaya et al., 2000; Zhu et al., 2007). Um fato que recebe especial atenção é que alguns membros da família das defensinas são ativos não apenas sobre fungos fitopatógenos, mas também sobre patógenos humanos como *Candida albicans* (Thevissen et al., 2004; Thomma et al., 2003). Além das atividades citadas acima também já foram descritas para as defensinas de plantas atividade de inibição da síntese de proteína *in vitro* (Mendez et al., 1990; 1996), bloqueio de canais de Ca²⁺ (Spelbrink et al., 2004) e sódio (Kushmerick et al., 1998), atividade citotóxica em células tumorais humanas (Anaya-López et al., 2006; Pelegrini e Franco, 2005; Pitta et al., 2010) e células vegetais em particular (Zélicourt et al., 2007; Letousey et al., 2007).

De acordo com o seu efeito sobre os fungos, as defensinas de planta podem ser separadas em dois grupos: as morfogênicas, causando alterações morfológicas em fungos, como alongamento das hifas e aumento da sua ramificação, e as não-morfogênicas, que apenas inibe o crescimento das hifas não levando a danos morfológicos significativos (Broekaert et al., 1995; Osborn et al., 1995; Thomma et al., 2002). A atividade antimicrobiana vai depender do tipo de defensina e do patógeno em questão. Apesar de já virem sendo estudadas há mais de 20 anos e muitos aspectos do mecanismo de ação das defensinas serem conhecidos, este ainda não é completamente compreendido. Em contraste com as LTPs e as tioninas, as quais não têm a membrana como alvo específico, muitas defensinas, como a Dm-AMP1 de dália (*Dahlia merckii*) (Thevissen et al., 2003a; 2000a,b), a Rs-AFP2 de semente de rabanete (*Raphanus sativus*) (Thevissen et al., 2004) e a Psd1 de ervilha (*Pisum sativus*) (Lobo et al., 2007), tem alvos moleculares específico na membrana plasmática de fungos.

Dm-AMP1 possui atividade antifúngica sobre o fungo filamentoso *Neurospora crassa* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em *S. cerevisiae* tem sido relatado que esfingolipídeos são essenciais para a sensibilidade à Dm-AMP1 (Thevissen et al., 2000b). Neste estudo, cepas mutantes de *S. cerevisiae* para o gene IPT1, que codifica a enzima (inositolfosfotransferase) necessária no passo final na síntese do manosildiinositolfosforilceramida (M(IP)₂C), um

esfingolipídeo complexo e altamente abundante na membrana de *S. cerevisiae* (van der Rest et al., 1995), foram testadas para a atividade da Dm-AMP1. Este mutante se mostrou resistente à defensina Dm-AMP1 (Thevissen et al., 2000a) e o gene foi identificado como o determinante da sensibilidade da *S. cerevisiae* a esta defensina. Estes resultados reforçam a ideia de que este esfingolipídeo atue como sítio de ligação para a Dm-AMP1 (Thevissen et al., 2003a). O aumento da ligação na presença do esteroide fúngico ergosterol também sugere o envolvimento de *rafts* lipídicos na interação da Dm-AMP1 com membranas (Thevissen et al., 2003a).

A defensina Rs-AFP2 não apresenta atividade sobre *S. cerevisiae*, mas é altamente ativa sobre *C. albicans* e *Pichia pastoris* (Thevissen et al., 2003b). Diferente da *S. cerevisiae*, estas leveduras apresentam em suas membranas o glicosilceramida (GlcCer), um outro tipo de esfingolipídeo (Sakaki et al., 2001), e acredita-se que a falta dele em espécies resistentes seja a diferença fenotípica entre espécies sensíveis e resistentes (Thevissen et al., 2003b). Da mesma forma que para a Dm-AMP1, a sensibilidade à Rs-AFP2 foi estudada para o GlcCer. Cepas mutantes de *C. albicans* e *P. pastoris* para o gene GCS foram resistentes ao peptídeo (Thevissen et al., 2004). Este gene codifica uma glicosilceramida sintase (UDP-glicose:ceramida Glicosiltransferase), que está envolvida no último passo da biossíntese da glicosilceramida. A interação entre a Rs-AFP2 e o GlcCer é independente do conteúdo de esteroide da membrana e é seletiva para o glicosilceramida de fungos. De forma muito interessante, a estrutura dos esfingolipídeos das membranas de mamíferos e plantas são diferentes e o glicosilceramida presente nestes não interage com a Rs-PAF2 (Thevissen et al., 2004). O fato do teor de esteroide não ter nenhum papel nesta interação mostra que o mecanismo de ação da Rs-AFP2 é diferente da Dm-AMP1 (Thevissen et al., 2004).

Ainda não se sabe ao certo se ocorre a internalização das defensinas de plantas acima citadas pelas células fúngicas, através de sua interação com os esfingolipídeos de membrana com consequente entrada para o interior da célula, ou se elas permanecem do lado de fora da célula e modulam processos que levam a morte celular via interação com os esfingolipídeos de membrana. No entanto, estudo recente mostrou que Rs-PAF2 induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) em *C. albicans*

e leva as células da levedura à apoptose (Aerts et al., 2007). Esta produção de ROS estava ligada a atividade antifúngica da defensina, uma vez que quando testada na presença de ácido ascórbico, um sequestrador de ROS, a produção de ROS era inibida e a atividade antifúngica evitada. Outro modo de ação foi relatado por Lobo e colaboradores (2007) ao mostrar a internalização da defensina Psd1 por células do fungo *N. crassa* e a sua interação com uma ciclina F, a qual participa na regulação do ciclo celular do fungo interferindo assim com sua progressão normal. Para a defensina NaD1, isolada de flores de *Nicotiana glauca*, foi mostrada que a atividade antifúngica sobre o fungo *Fusarium oxysporum* envolve a interação específica com a parede da célula fúngica, seguida da permeabilidade da membrana plasmática e da entrada de defensina no citoplasma, resultando na morte celular e subsequente granulação (van der Weerden et al., 2008; 2010; 2013). Além disso, estudos têm mostrado que a defensina MsDEF1 de alfafa (*Medicago sativa*) bloqueia canais de Ca^{2+} em células de mamífero, e tem sido sugerido que esta defensina haja da mesma maneira nas células fúngicas (Spelbrink et al. 2004).

Defensinas de plantas são candidatos atrativos na busca de novos compostos antimicrobianos (Carvalho e Gomes, 2009; Thevissen et al., 2007; Thomma et al., 2003). Os estudos têm mostrado a relativa facilidade de expressá-las como peptídeos recombinantes em sistemas de expressão comum (Medeiros et al., 2010). As defensinas de plantas têm sido também utilizadas no desenvolvimento de plantas transgênicas para aumentar a resistência à fitopatógenos (Lay e Anderson, 2005). Apesar dos estudos apresentados acima, o exato mecanismo pelo qual as defensinas de plantas exercem sua atividade antimicrobiana ainda é desconhecido.

1.3 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo conhecido e utilizado pelo homem há muitos anos em diversas áreas, principalmente na indústria alimentícia. Esta levedura é um dos organismos modelo mais utilizados para estudar outros organismos, interações de proteínas, descobrir estrutura e função de proteínas e várias outras abordagens (Hieter, 2008; Resnick e Cox, 2000), por se tratar de um organismo não patogênico, de fácil

manipulação em laboratório, de rápido crescimento, por permitir que sequências exógenas de DNA se integrem no seu genoma por meio de recombinação homóloga e por compartilhar semelhanças em diversos processos celulares com os demais eucariotos devido ao fato da grande variedade de processos intracelulares serem conservados ao longo da evolução (Barr, 2003). Tais fatos aliados ao sequenciamento de seu genoma, e a facilidade de manipulação genética e a bioquímica bem estabelecida elevaram este microrganismo à categoria de excelente modelo para decifrar diversas vias biológicas (Bolotin-Fukuhara et al., 2010; Goffeau et al., 1996; Suter et al., 2006). Essa levedura apresenta estágios haplóide e diplóide bastante estáveis, o que facilita o isolamento de mutações recessivas em linhagens haplóides e estudos de complementação podem ser efetuados em linhagens diplóides (Sherman, 2002). O genoma inteiramente sequenciado permite uma comparação de sequências de genes da mesma com as de organismos eucariotos complexos em busca de homólogos funcionais, que permitem sua utilização em estudos de análise funcional (Goffeau et al., 1996).

As possibilidades oferecidas por este organismo são inúmeras, sendo uma ferramenta prática para explorar e estudar outros organismos. Por exemplo, rápidos avanços no entendimento de muitos processos biológicos básicos em *C. albicans* têm sido feitos como resultado da sua similaridade a processos bem estudados em *S. cerevisiae*. Este organismo é um guia indispensável para estudar aspectos da progressão do ciclo celular, transdução de sinais, metabolismo, acasalamento e biossíntese de parede celular em *C. albicans*. Muitos genes de *C. albicans* têm sido identificados e/ou analisados usando *S. cerevisiae* como um “substituto”. Por exemplo, alguns genes de *C. albicans* foram clonados em *S. cerevisiae* na tentativa de se conferir novas propriedades às suas células, como a capacidade de aderência às células humanas (Berman e Sudbery, 2002; Fu et al., 1998; Gaur e Klotz, 1997). Dos genes clonados, dois agem diretamente codificando proteínas de parede celular que são importantes para a adesão em *C. albicans*, enquanto um terceiro afeta a adesão das células de *S. cerevisiae* através de um mecanismo indireto (Berman e Sudbery, 2002).

Nos últimos anos esta levedura tem se revelado um bom modelo para estudar e decifrar mecanismos moleculares envolvidos em uma variedade de

distúrbios neurodegenerativos causados por má enovelamento e deposição de proteínas impactando positivamente o entendimento de doenças provocadas por príons, doenças de Alzheimer e Huntington, e os mecanismos de agregação da proteína tau (Taupatia) (Bharadwaj et al., 2010; Tenreiro e Outeiro, 2010; Vanhelmont et al., 2010; Wickner et al., 2010). Adicionalmente, desde a década de 80, *S. cerevisiae* tem sido utilizada para a produção de medicamentos, como por exemplo a insulina, hirudina e vacina contra hepatite B. Mais recentemente, usando biologia sintética, novas cepas foram desenvolvidas para a produção industrial de pequenas moléculas terapêuticas, dentre elas, a hidrocortisona e a artemisinina, além da promissora produção de candidatos a vacinas anti-câncer por células recombinantes de *S. cerevisiae* (Ardiani et al., 2010). Adicionalmente, esta levedura também tem se tornado uma boa ferramenta para a identificação de novas drogas e seus alvos (Bidou et al., 2010; Delneri, 2010). Estes estudos e as contribuições já feitas mostram o quanto este microrganismo é útil, potente e versátil.

1.4 *Adenanthera pavonina* L.

A. pavonina é popularmente chamada de “olho-de-dragão” ou “Carolina” e pertence à família Mimosaceae (The International Plant Names Index). Esta é uma espécie florestal originária da Ásia, mas foi amplamente introduzida em diversas regiões do mundo. No Brasil, foi introduzida há muitos anos e encontra-se bastante adaptada e largamente distribuída, sendo utilizada para fins ornamentais (sombreamento e arborização de ruas, parques e jardins) e na fabricação de móveis e como lenho (TropilabR Inc. exporter). *A. pavonina* tem porte arbóreo, é decídua e possui flores pequenas e amarelas. Seus frutos, os legumes, possuem como característica marcante o formato de hélice. Suas sementes possuem forma lenticular (de contas) e são muito duras, vermelhas e brilhantes, sendo utilizadas na confecção de peças artesanais (Fig. 4) (Rocas, 2003). Estudos têm mostrado que as sementes cozidas são ricas em óleo e proteínas, e podem facilmente ser digeridas por humanos e animais domésticos. O óleo produzido por essas sementes é usualmente empregado na indústria de lubrificante (Rocas, 2003). Em alguns lugares várias partes dessa planta são utilizadas na medicina natural para o tratamento de asma,

diarreia, gota, inflamações, reumatismo, tumores e úlceras, e também como um tônico (Ara et al., 2013; Burkil, 1994; Kirtikar e Basu, 1981; Watt e Breyer-Brandwijk, 1962). Para as sementes já foi visto a sua eficácia no tratamento de doenças cardiovasculares (Chandra et al., 1982; Yeoh et al., 1984) e atividades anti-inflamatória (Ara et al., 2010a), analgésica (Ara et al., 2010b), antibacteriana (Jayasinghe et al., 2006), antifúngica (Ara et al., 2010b), antioxidante (Ara et al., 2010b), citotóxica (Rodrigo et al., 2007) e redução da pressão arterial (Adedapo et al., 2009) *in vitro* por extratos de *A. pavonina* foram descritas.

Nosso grupo previamente identificou nas sementes de *A. pavonina* uma defensina a qual foi chamada de *ApDef₁* (do inglês *A. pavonina Defensin one*) (Soares et al., 2012). Neste estudo foi visto que 80 µg/mL da fração H11, que continha a defensina, inibia o crescimento de células de *C. albicans* e *S. cerevisiae* por aproximadamente 42% e 83%, respectivamente, após 36 h de incubação, e também que o efeito de inibição desta fração era fungicida para *S. cerevisiae* e fungistático para *C. albicans* (Soares et al., 2012). A identificação e caracterização da *ApDef₁* nos permitiu aprofundar mais os estudos sobre esta defensina e posteriormente foi confirmado sua forte atividade antifúngica sobre células de *S. cerevisiae*, apresentando um MIC de 40 µg/mL. Além disso, estudo adicional mostrou que 18 h de tratamento com a *ApDef₁* eram suficientes para causar a morte de toda a população de células utilizadas no ensaio de inibição do crescimento (Soares, 2012). Neste trabalho, nós investigamos os mecanismos que estão envolvidos na interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* e que são responsáveis pela morte celular da levedura causada pela defensina.

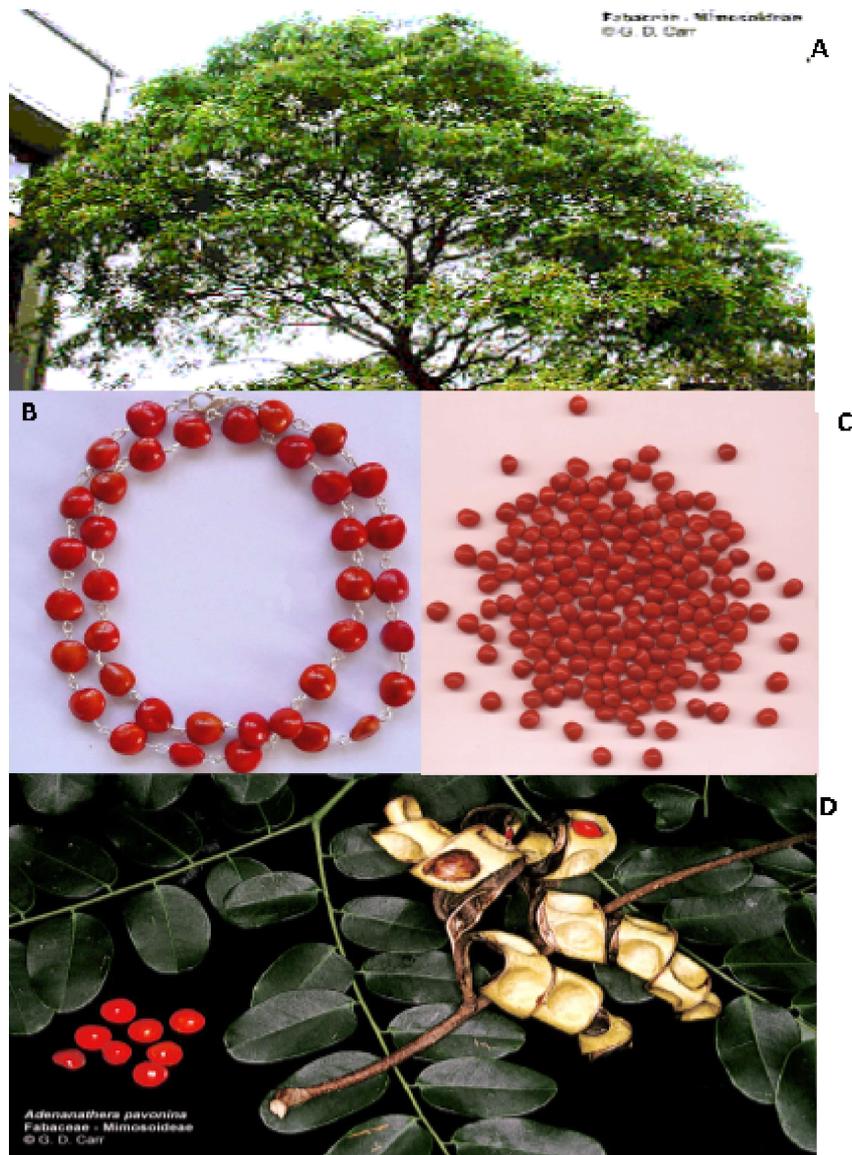


Figura 4: Imagens mostrando os aspectos morfológicos de *Adenanthera pavonina*. Planta adulta (A) e alguns de seus órgãos: sementes (B e C) e fruto (D). Fonte: A e D: <http://www.botany.hawaii.edu>. B: <http://robertoitiz.blogspot.com.br>. C: Foto tirada no laboratório por André de Oliveira Carvalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o mecanismo de ação da defensina de sementes de *Adenantha pavonina*, *ApDef₁*, sobre células de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Isolar e acumular a defensina *ApDef₁* a partir de sementes de *A. pavonina*;
- 2) Verificar a dependência do ciclo celular de *S. cerevisiae* para a atividade antifúngica da *ApDef₁*;
- 3) Verificar a capacidade de ligação ao DNA da *ApDef₁*;
- 4) Analisar a influência do potencial de membrana sobre a atividade antifúngica da *ApDef₁*;
- 5) Analisar a influência da temperatura sobre a atividade antifúngica da *ApDef₁*;
- 6) Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células de *S. cerevisiae* após tratamento com a *ApDef₁* e o seu envolvimento na morte das células;
- 7) Verificar a integridade da membrana das células de *S. cerevisiae* após tratamento com *ApDef₁*;
- 8) Analisar as possíveis alterações ultraestruturais nas células de *S. cerevisiae* após tratamento com *ApDef₁*;
- 9) Verificar a indução de eventos de apoptose, como condensação de cromatina e ativação de caspases após tratamento com *ApDef₁* e o papel destes na morte das células de *S. cerevisiae*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais biológicos

As sementes de *Adenanthera pavonina* L foram coletadas na região central de Campos dos Goytacazes, município localizado no norte do estado do Rio de Janeiro, BR, e foram mantidas em frascos fechados à temperatura ambiente. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (1038) foi mantida em ágar Sabouraud (peptona 10 g/L, glicose 20 g/L e agar 17 g/L, Merck Millipore) a 30 °C e repicada para um novo meio trimestralmente.

3.2 Obtenção da defensina ApDef₁

3.2.1 Preparo da farinha de sementes

Sementes de *A. pavonina* sem tegumento foram trituradas em processador de alimentos até a obtenção de uma farinha de fina granulação. A farinha obtida foi armazenada em temperatura ambiente ao abrigo da luz e umidade até a extração.

3.2.2 Extração protéica e fracionamento com sulfato de amônio

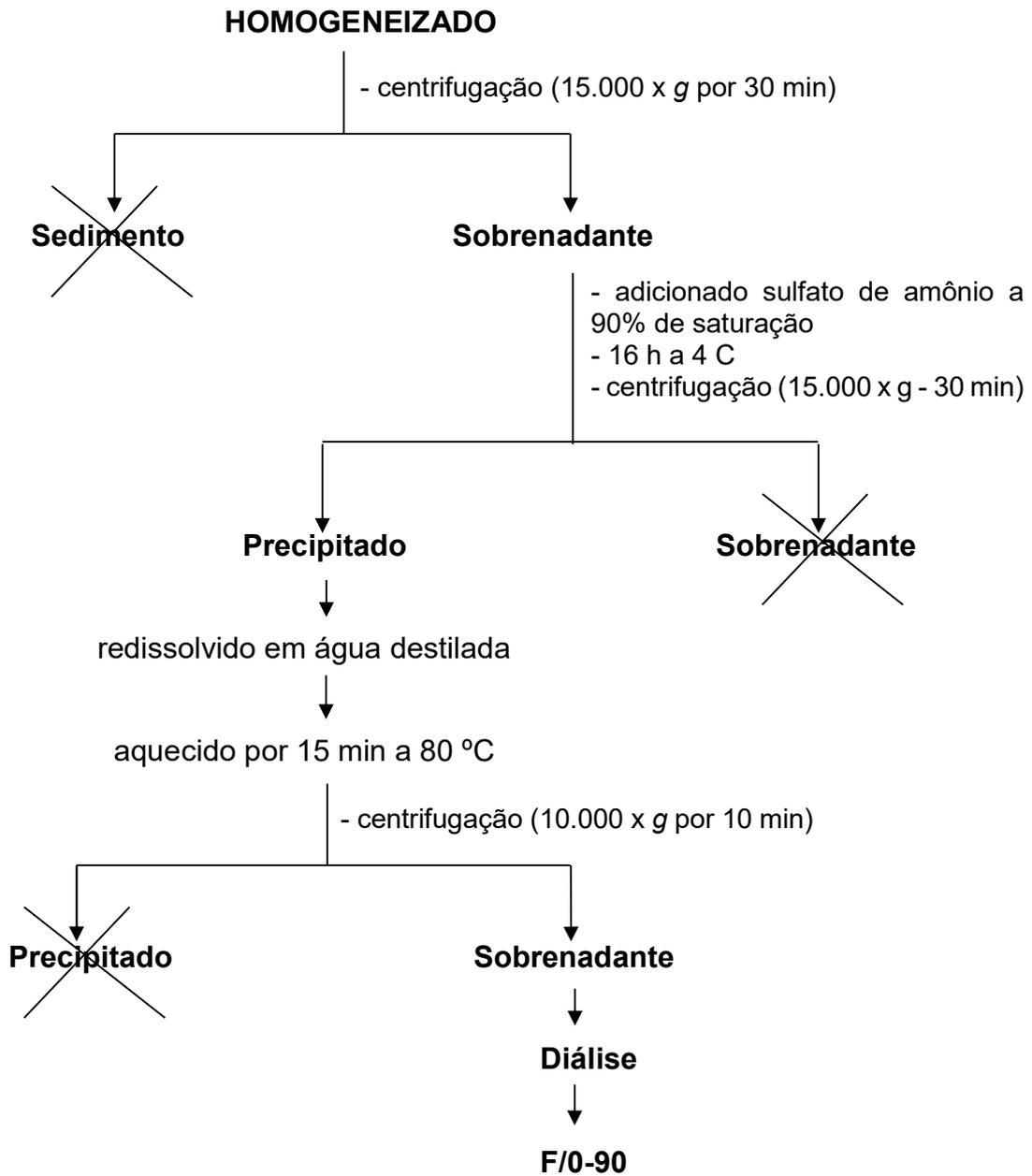
As proteínas da farinha de sementes de *A. pavonina* foram extraídas em tampão fosfato (Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 15 mM, KCl 100 mM e EDTA 1,5%) pH 5,4 na proporção 1:10 (farinha:tampão), deixado sob agitação constante por 3 h a 4 °C. O homogeneizado resultante foi submetido a centrifugação a 15.000 x g por 30 min sendo o precipitado descartado e ao sobrenadante adicionado sulfato de amônio a 90% de saturação. Esta solução foi mantida por 16 h a 4 °C. Após este processo, o material foi novamente submetido a centrifugação (15.000 x g por 30 min) e o precipitado resultante foi ressuspenso em 10 ml de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min e em seguida submetido a uma última centrifugação (10.000 x g por 10 min). O precipitado foi descartado e o sobrenadante dialisado (Tubo de diálise benzoilado 32 mm, Sigma-Aldrich) por

3 dias em um volume de 4 L de água destilada com três trocas diárias e então chamada de fração F/0-90 e utilizada no processo de purificação e isolamento da ApDef₁ (Terras et al., 1993 com modificações) (Esquema 1).

3.2.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE - Sepharose

A coluna contendo a resina DEAE-Sepharose (GE HealthCare) foi empacotada a um fluxo constante de 90 mL/h, e para a sua ativação, esta foi lavada (sempre com o volume duas vezes maior que o volume da resina) sequencialmente com água destilada, NaOH 0,1 M, água destilada, HCl 0,1 M, água destilada e, por fim, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 (tampão de equilíbrio da coluna).

A amostra aplicada na coluna foi preparada da seguinte forma: 4 mL de tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0, foram adicionados a 36 mL da amostra (F/0-90). Esta solução foi centrifugada a 16.000 x g por 3 min à temperatura ambiente, e o sobrenadante aplicado na coluna. Foram coletadas frações de 3 ml a um fluxo constante 90 mL/h. A amostra foi eluída inicialmente com o tampão de equilíbrio da coluna e, posteriormente, com o tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 1 M. As absorvâncias das frações foram lidas em espectrofotômetro (LGS53, BEL Photonics) a 220 nm. A fração básica proveniente desta cromatografia foi concentrada por liofilização (FreeZone 4.5, Labconco) (Soares et al., 2012).



Esquema 1: Representação esquemática das etapas utilizadas para a extração proteica da farinha de cotilédones de *A. pavonina* seguida por etapas de purificação parcial para a obtenção da fração F/0-90 (Soares, 2012).

3.2.4 Purificação *ApDef*₁ através cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

Foram realizadas duas etapas cromatográficas de fase reversa para a purificação da *ApDef*₁. A primeira etapa envolveu uma coluna de fase reversa C18 (Shim-pak VP-ODS, 250 x 4,6 mm, Shimadzu) acoplada a uma pré-coluna C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma-Aldrich), equilibrada com TFA 0,1% (Sigma-Aldrich). A fração básica (D1) obtida da F/0-90 na cromatografia em coluna DEAE-Sepharose e liofilizada foi solubilizada em 0,1 % de TFA, sendo 5 mL desta mistura injetada na coluna. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL/min à temperatura de 37 °C em sistema HPLC (Prominence, DGU-20A5, LC-20AT, CBM-20A, SPD-M20A, CTO-20A, Shimadzu). Para eluição das proteínas da coluna foi utilizado um gradiente de 2-propanol (Merck) de 0 a 50%. Inicialmente a coluna foi lavada com TFA 0,1% em água ultrapura (solvente A) por 7 min e em seguida foi formado um gradiente através da mistura do solvente A e 100% de 2-propanol em TFA 0,1% (solvente B) da seguinte forma: 0 a 42% do solvente B por 57 min, 42 a 50% do solvente B por 3 min, 50 a 0% do solvente B por 1 min e 0% do solvente B por 13 min. Durante esse período, a corrida é acompanhada por um detector do tipo DD, sendo as absorvâncias acompanhadas a 220 e 280 nm e os picos de interesse coletados com auxílio de tubos de vidro de 2 mL, sendo posteriormente concentrados por liofilização.

A segunda etapa também foi feita na mesma coluna e sistema HPLC citados acima e também nas mesmas condições. Das frações obtidas na segunda etapa cromatográfica, a fração H11 foi utilizada para a purificação da *ApDef*₁. A fração foi ressuspensa em 500 µl TFA 0,1% e aplicada na coluna. O fluxo do solvente foi de 0,6 ml/min e a temperatura de 37 °C e o seguinte gradiente de 2-propanol foi utilizado: 100% do solvente A (TFA 0,1%) por 5 min, 0 a 17% do solvente B (2-propanol 100% e TFA 0,1%) por 10 min, 22% do solvente B por 45 min e 0% do solvente B por 10 min. Os picos foram coletados como descrito acima.

3.3 Quantificação de proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinonínico (metodologia descrita pelo fabricante, Sigma-Aldrich) sendo a albumina da clara de ovo e/ou lisozima (Sigma-Aldrich) utilizadas como padrão.

3.4 Eletroforese em gel de Tricina na presença de SDS

O processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de tricina segundo a metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm.

3.4.1 Preparo das amostras e condições de corrida

As frações proteicas obtidas nos diferentes processos cromatográficos (aproximadamente 10 µg de proteína de acordo com a dosagem) foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5 %, azul de bromofenol 0,25% e sacarose 15%) e adicionado β-mercaptoetanol (concentração final de 5%). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e posteriormente centrifugadas a 16.000 x g por 3 min. Após esse procedimento, as amostras foram aplicadas no gel concentração e submetidas à eletroforese sob condições desnaturantes. Foram usados os seguintes marcadores de massa molecular (SDS-17S, Sigma-Aldrich): mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina I + III (10.600 Da), mioglobina I (8.160 Da), mioglobina II (6.200 Da), glucagon (3.400 Da) e mioglobina III (2.500 Da). A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente de 16 h.

3.4.2 Coloração e descoloração do gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução corante de Coomassie Blue R (0,05%) por

2 h. Após esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (ácido acético 10% e metanol 30% em água destilada) e mantido até a visualização das bandas de proteína.

3.5 Verificação da relação entre o ciclo celular de *S. cerevisiae* e a atividade antifúngica da *ApDef₁*

3.5.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

Inóculos das células da levedura *S. cerevisiae* foram retiradas de uma placa de Petri que possuía colônias já estabelecidas e colocadas para crescer em uma nova placa contendo meio sólido Sabouraud, por um período de 24 h a 30 °C. Após o crescimento, um inóculo foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido Sabouraud e incubado por 16 h a 30 °C sob agitação constante a 250 rpm. Após esse período as células foram quantificadas em câmara de Neubauer através de microscópio óptico (Axioplan.A2, Zeiss) e utilizadas nos ensaios.

3.5.2 Sincronização do ciclo celular utilizando hidroxiuréia

Após a quantificação, 10^6 células/ml foram transferidas para 5 mL de meio líquido Sabouraud ao qual foi adicionado 500 mM de hidroxiuréia (HU) (Sigma-Aldrich) para a sincronização das células na fase G1/S (Elford, 1968). Como controle, um segundo tubo sem adição de HU também foi feito. Os tubos foram mantidos sob agitação constante a 250 rpm, a 30 °C por 4 h e em seguida tanto as células do controle quanto as tratadas com HU foram lavadas 3 vezes em meio líquido Sabouraud e quantificadas.

3.5.3 Viabilidade das células sincronizadas após tratamento com a *ApDef₁*

Após nova quantificação do controle e das células sincronizadas com HU, um ensaio de inibição do crescimento e a análise da viabilidade celular foram realizadas segundo as metodologias adaptadas de Broekaert et al.

(1990) e Vermelho (2006). Em placa de cultura de células de 96 poços, 4.000 células/ml de cada condição (células sincronizadas e não sincronizadas) foram adicionadas a 100 µL de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 µM da ApDef₁ (concentração do MIC descrita em Soares, 2012). As células foram incubadas a 30 °C durante 3 h e em seguida todo o volume dos poços foi ressuspensão e plaqueado sobre placas de Petri contendo meio sólido Sabouraud e estas mantidas em estufa a 30 °C por 48 h. Após esse período, as colônias crescidas foram contadas e as placas fotografadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.6 Análise da capacidade de ligação da ApDef₁ ao DNA de *S. cerevisiae*

3.6.1 Extração de DNA de *S. cerevisiae*

Células da levedura *S.cerevisiae* foram crescidas em placas de Petri, contendo meio sólido Sabouraud por 24 h, a 30 °C. Após este período, as células foram retiradas do meio de cultura, com auxílio de um alça de platina e submetidas a maceração com nitrogênio líquido. A amostra foi submetida à extração de DNA de acordo com o manual de utilização do kit “DNeasy Plant mini kit” (Qiagen). O DNA resultante da extração foi dosado no Nanodrop 2000 (Applied Biosystems) e utilizado no ensaio de mobilidade eletroforética.

3.6.2 Preparo da reação de ligação

O DNA de *S. cerevisiae* (100 ng) foi incubado com 7,8 µM da ApDef₁ em 20 µL tampão ligação (glicerol 5%, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, ditiotretitol 1 mM, KCl 20 mM e BSA 50 µg/ml) e a reação foi incubada durante 30 min a 30 °C. Como controles foram utilizados DNA incubado com a água ultrapura (controle negativo) e DNA incubado com 100 µg/mL de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) (controle positivo), que tem capacidade de interagir com o DNA.

3.6.3 Preparo do gel de agarose

Um gel de agarose 0,8% foi preparado adicionando 0,4 g de agarose (Pronadisa) a 50 ml de tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM). A agarose foi fundida a alta temperatura com atenção para que a solução não entrasse em fervura, resfriada e então adicionado 3,5 µL do corante GelRed (Biotium). O gel foi homogeneizado e vertido sobre uma forma, aguardando até a completa solidificação para a sua utilização.

3.6.4 Mobilidade eletroforética do DNA na presença da *ApDef*₁

As amostras foram preparadas misturando-se os 20 µL das reações a 4 µl do tampão de amostra 6X DNA Loading (Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), azul de bromofenol 0,03%, xileno cianol FF 0,03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM, Thermo Scientific). As amostras foram homogeneizadas e todo o volume foi aplicado no gel. A corrida foi feita a uma voltagem de 4 V/cm² de gel e a imagem do gel após a corrida foi adquirida no ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare). Os procedimentos foram realizados como descrito por Park et al. (1998).

3.7 Verificação da interferência do potencial de membrana sobre o efeito antifúngico da *ApDef*₁

3.7.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.7.2 Análise da influência do potencial de membrana sobre a atividade antifúngica da *ApDef*₁

Após quantificação, em uma placa de cultura de 96 poços, 4.000 células/ml foram incubadas em 100 µl de meio líquido Sabouraud contendo 30 µM de carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma-Aldrich), um agente despolarizante (Falla et al., 1996), durante 1 h 30 min a 30 °C. Ao

término desse período foram adicionados 7,8 μM da *ApDef*₁ e o ensaio continuou por 18 h. Células sem tratamento e células tratadas apenas CCCP foram utilizadas como controles. No final do ensaio, as células controle tratadas com o CCCP foram ressuspensas contadas e diluídas (10^6 vezes) e plaqueadas. A mesma diluição foi feita para o controle não tratado com CCCP e para o teste tratado com CCCP e *ApDef*₁. As células foram plaqueadas em meio sólido Sabouraud e as placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 48 h. Após esse período as colônias foram contadas e as placas fotografadas. Este experimento foi realizado em triplicata.

3.8 Efeito da temperatura na atividade da *ApDef*₁ sobre *S. cerevisiae*

3.8.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.8.2 Viabilidade das células tratadas com *ApDef*₁ a 4 °C

Em placa de cultura de células de 96 poços, 4.000 células/mL foram adicionadas a 100 μl de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 μM da *ApDef*₁. A placa foi incubada por 18 h a 4 °C. Um controle foi feito como mesmo tempo de incubação, mas em estufa a 30 °C. Após este período, as células no poço foram ressuspensas e todo o volume do ensaio foi plaqueado em meio sólido Sabouraud. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 36 h e em seguida fotografadas. Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.9 Ensaio para a verificação da produção de H_2O_2 em *S. cerevisiae*

3.9.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.9.2 Preparo da solução DAB

A solução foi preparada como descrito por Thordal-Christensen et al. (1997) com modificações. Foi pesado 1 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich) e dissolvido em 1 mL água pH 5, ajustada com HCL (Vetec). A solução foi deixada sob vigorosa agitação ao abrigo da luz por 2 h e logo após foi filtrada (Millex-GV 0.22 µm, Merck Millipore).

3.9.3 Detecção da produção de H₂O₂ por microscopia óptica

Uma concentração de 40.000 células/mL foi transferida para uma placa de 96 poços contendo 90 µL de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 µM da *ApDef₁* e 10 µL da solução de DAB preparada logo antes do uso. Uma concentração mais elevada de células foi utilizada neste ensaio para permitir a sua visualização por microscopia. A placa foi incubada por 3 h a 30 °C e em seguida as células foram analisadas por microscopia óptica (Axioplan.A2, Zeiss) sendo as imagens capturadas através do software AxionVision LE (versão 4.8.2, Zeiss) e da câmera axio Can MR5 (Zeiss). Células tratadas com 200 mM de ácido acético foram utilizados como controle positivo para mostrar a indução na produção de H₂O₂ e células não tratadas foram utilizadas como controle para a produção basal de H₂O₂. Este experimento foi repetido duas vezes.

3.9.4 Verificação da atividade antifúngica da *ApDef₁* na presença de agente antioxidante

3.9.5 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.9.6 Análise da viabilidade das células tratadas com a *ApDef₁* na presença de ácido ascórbico

Em placa de cultura de células de 96 poços, 4.000 células/mL foram transferidas para 100 µL de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 µM da *ApDef₁* e 100 mM do antioxidante ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) (solução estoque de 1 M em água previamente esterilizada por filtração (Millex-GV 0.22 µm, Merck Millipore). Nos tempos de 3, 9 e 18 h de incubação a 30 °C, todo o volume do poço foi ressuspensionado e espalhado sobre placas de Petri contendo meio sólido Sabouraud. As placas foram incubadas por períodos de 36- 48 h a 30 °C e após esse período foram fotografadas. Células crescidas na presença de 100 mM de ácido ascórbico em meio líquido ou apenas em meio líquido foram utilizadas como controles. O experimento foi realizado em triplicata.

3.10 Permeabilização da membrana plasmática da levedura *S. cerevisiae*

3.11 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.11.1 Ensaio para verificação da permeabilização de membranas

A permeabilização da membrana de células da levedura *S. cerevisiae* induzida após tratamento com defensina *ApDef₁* foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox Green (Molecular Probes), segundo metodologia descrita por Thevissen et al. (1999), com algumas modificações. Uma concentração de 40.000 células/mL foi transferida para uma placa de 96 poços e incubada com 100 µL de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 µM da *ApDef₁* durante 5, 10, 15, 30 min e 1 h a 30 °C. Uma concentração mais elevada de células foi utilizada neste ensaio para permitir a sua visualização por microscopia. O corante Sytox Green (0,5 µM concentração final em dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)) foi adicionado 5 min antes do tempo de conclusão da incubação e a placa foi protegida da luz. As células foram, então, montadas em lâminas de microscópio e visualizadas em um microscópio de fluorescência (Axioplan.A2, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros (excitação a 450-490 nm; emissão 500 nm). A permeabilização basal da

membrana das células não tratadas com a *ApDef*₁ foi utilizada como controle. Todas as imagens de fluorescência foram obtidas com o mesmo tempo de exposição (versão 4.8.2 AxionVision LE (Zeiss) com axio Can MR5 (Zeiss)). A porcentagem de células permeabilizadas foi calculada com base no número total de células vistas em contraste de interferência diferencial (DIC) e em fluorescência, em campos aleatórios para cada amostra e assumindo o número total de células de cada amostra no campo claro como 100%.

Este ensaio foi repetido na presença de 100 mM de ácido ascórbico, mas apenas com o período de incubação com a *ApDef*₁ de 1 h. Ambos os ensaios foram feitos em 2 repetições.

3.12 Análises das células de *S. cerevisiae* tratadas com *ApDef*₁ por microscopias

3.12.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.12.2 Microscopia óptica

Uma concentração de 40.000 células/mL foi transferida para uma placa de 96 poços e incubada com 100 µL de meio líquido Sabouraud contendo 7,8 µM da *ApDef*₁ durante 18 h a 30 °C. Para a marcação do núcleo, após o tempo de incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato de sódio (PBS), incubadas com 1 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) em PBS durante 10 min, lavado três vezes com PBS e então visualizadas com um microscópio DIC (axio Imager.A2, Zeiss) equipado com filtros de fluorescência (excitação 365 nm; emissão de 397 nm) de acordo com a metodologia descrita por Madeo et al. (1997). Todas as imagens de fluorescência foram obtidas com o mesmo tempo de exposição (versão 4.8.2 AxionVision LE (Zeiss) com axio Can MR5 (Zeiss)). Um controle com células aquecida a 100 °C durante 5 min foi feito.

3.12.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Células de *S. cerevisiae* cultivadas durante 18 h em meio líquido Sabouraud na presença ou ausência de 7,8 μM de *ApDef*₁, conforme descrito para a microscopia óptica, foram submetidas a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células após o ensaio foram fixadas durante 30 min à temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído (v/v) e 4% paraformaldeído em 100 mM de tampão (v/v) fosfato de sódio, pH 7,2. Após a fixação, as células foram lavadas em tampão fosfato de sódio, pós-fixadas em 1% (m/V) de tetróxido de ósmio em 100 mM de tampão fosfato, pH 7,2, durante 30 min à temperatura ambiente e novamente lavadas em tampão fosfato. As células foram desidratadas em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100% (v/v)) e embebidas em resina Epon (Polybeded). Cortes ultrafinos (0,1 μm) foram colocadas em grades de cobre e coradas com acetato de uranila durante 10 min, seguido por citrato de chumbo durante 5 min e secas à temperatura ambiente. Em seguida foram observadas com um microscópio eletrônico de transmissão ZEISS 900 operando a 80 kV.

3.13 Detecção de atividade de caspase em células de *S. cerevisiae* tratadas com a *ApDef*₁

3.13.1 Obtenção das células de *S. cerevisiae*

A obtenção das células de *S. cerevisiae* foi realizada como descrito na seção 3.5.1.

3.13.2 Detecção de atividade caspase

A detecção de caspase ativa foi realizada utilizando o marcador *In Situ* CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega), como descrito no manual do fabricante. Este marcador é um análogo fluorescente do inibidor de caspase Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone), que entra na célula e irreversivelmente se liga à caspases ativadas. Neste ensaio, 40.000

células/mL foram tratadas com 7,8 μ M da *ApDef*₁ em 100 μ L de meio líquido durante 30 min, 3, 9 e 18 horas e em seguida, lavadas uma vez em 1 mL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em 50 μ L da solução de marcação contendo 50 μ M do CaspACE FITC-VAD-FMK. Após incubação durante 20 min a 30 °C, as células foram lavadas em 1 mL de PBS, ressuspensas em 10 μ L de PBS e observadas por microscopia de fluorescência, tal como descrito na seção 3.11.1. O experimento foi repetido 3 vezes.

3.13.3 Inibição da atividade de caspase

Uma concentração de 4.000 células/mL foi incubada durante 2 h com 7,8 μ M da *ApDef*₁ e após esse período foram adicionados 50 μ M do inibidor de caspase Z-VAD-FMK (que se liga irreversivelmente ao sítio catalítico das caspases inibindo a indução de apoptose) foi adicionado e a incubação continuou por mais 18 h. Após este período, as células foram ressuspensas e espalhadas sobre placas de Petri contendo meio sólido Sabouraud e estas foram incubadas por 48 h a 30 °C e então fotografadas. Foram feitos outros três testes para análise comparativa: (1) apenas células em meio líquido Sabouraud (controle), (2) células tratadas com a *ApDef*₁ e (3) células na presença do inibidor Z-VAD-FMK. Este experimento foi repetido duas vezes.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação e isolamento da defensina *ApDef*₁ de sementes de *A. pavonina*

Todo o processo de purificação e isolamento da defensina *ApDef*₁ foi descrito por Soares et al. (2012). A obtenção da *ApDef*₁ iniciou primeiramente através de uma cromatografia de troca iônica da fração F/0-90 em DEAE-Sepharose onde foram obtidos os picos D1 e D2 (Fig. 5). Em seguida o pico D1 foi submetido à cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, a qual deu origem a 22 novas frações como mostrado na figura 6. A fração H11 que apresenta uma banda em torno de 7 kDa (Fig. 7) foi utilizada na quarta etapa

de purificação feita também em cromatografia de fase reversa, sendo então obtida a $A\beta$ Def₁ (Fig. 8).

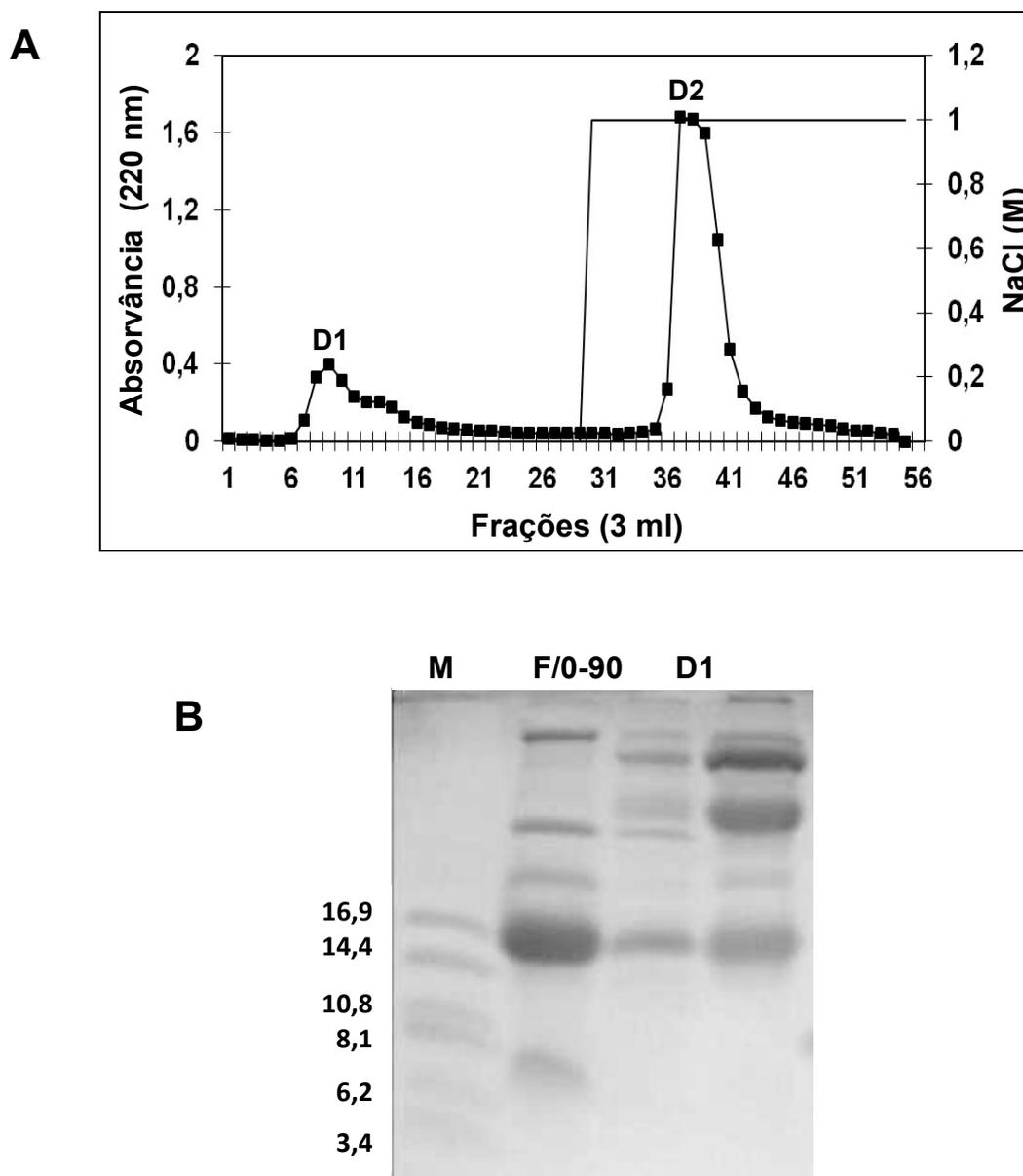


Figura 5: (A) Cromatograma da fração F/0-90 em coluna de DEAE-Sepharose. D1, pico não retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0) e D2, pico retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna contendo NaCl 1 M. (B) Visualização eletroforética em gel de Tricina na presença de SDS das frações F/0-90, D1 e D2. F/0-90, fração obtida a 0-90% de saturação com sulfato de amônio; D1, pico não retido em coluna DEAE-Sepharose; D2, pico retido em coluna DEAE-Sepharose; M, Marcador com massa molecular indicada em kDa.

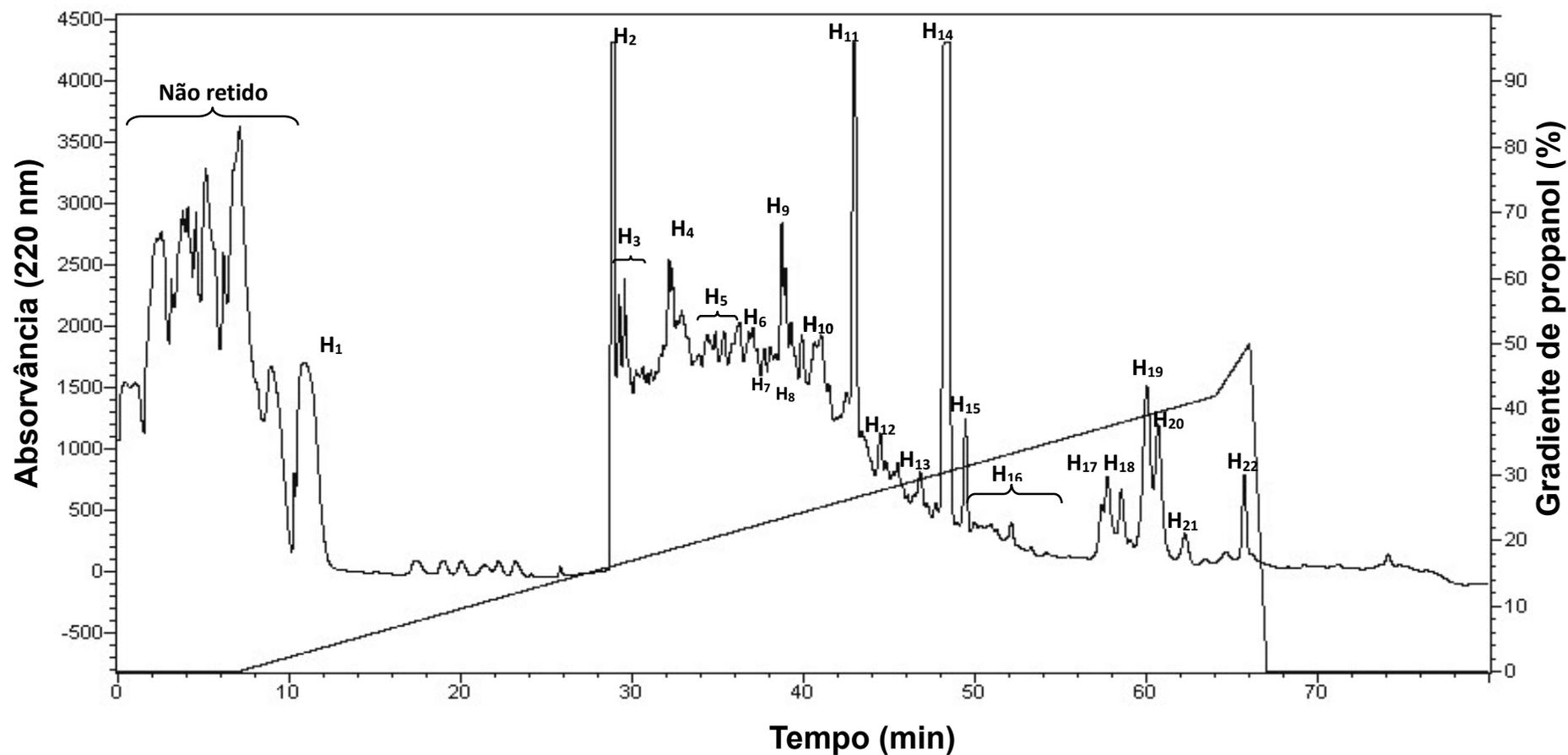


Figura 6: Cromatograma do pico D1 obtido da cromatografia de fase reversa em coluna C18 em sistema HPLC. A amostra deu origem a 23 novas frações, sendo uma não retida e 22 retidas e eluídas em gradiente de propanol. A linha oblíqua mostra o desenvolvimento do gradiente de propanol. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm.

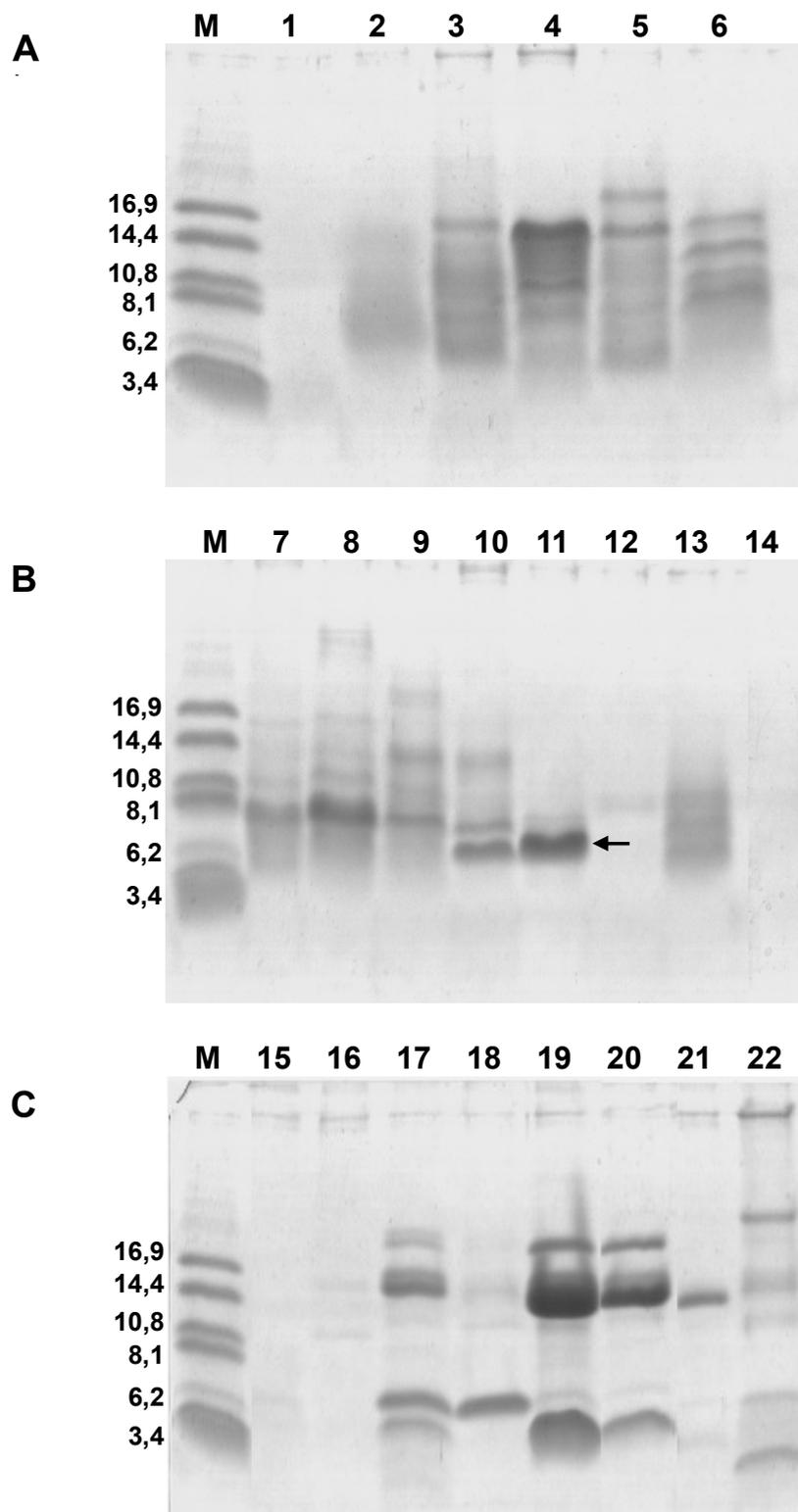


Figura 7: (A), (B) e (C) Visualização eletroforética dos 22 picos retidos após a cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de tricina na presença de SDS. A seta indica a banda correspondente da defensina ApDef₁ na fração H11. M, marcador de massa molecular indicada em kDa.

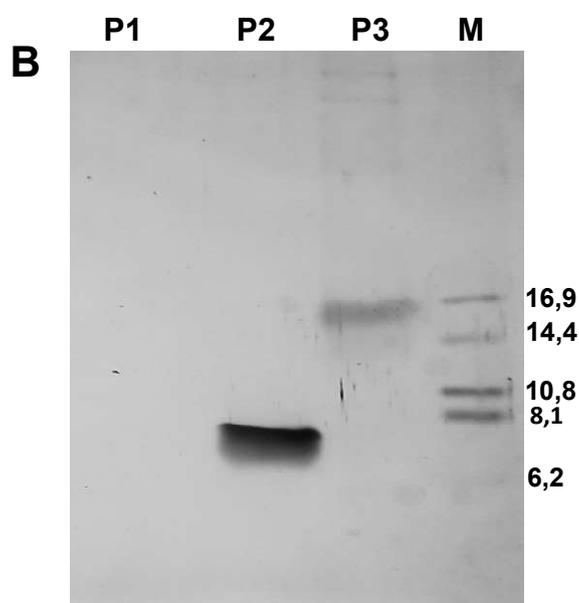
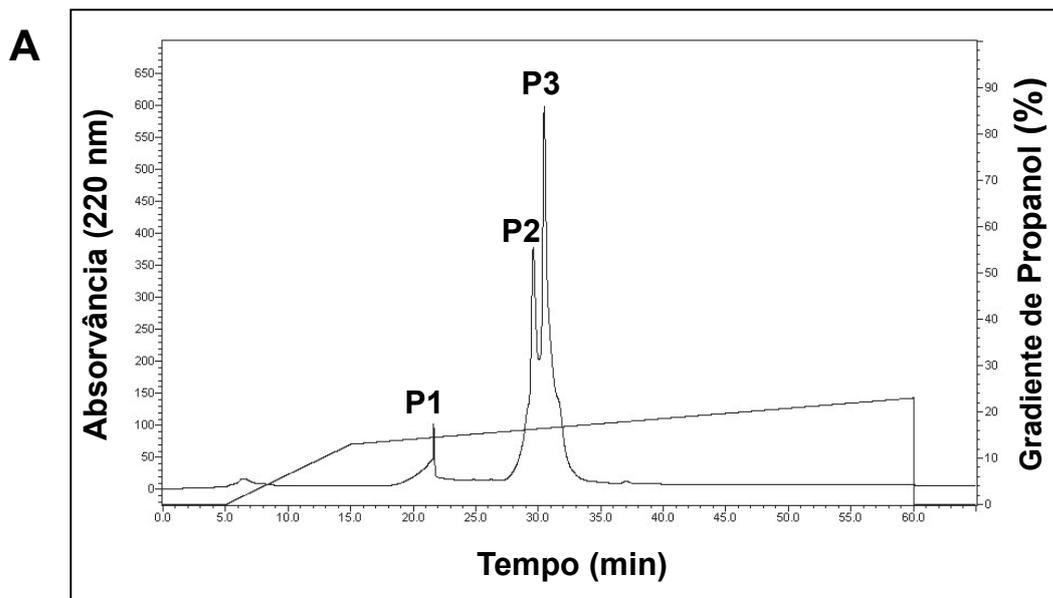


Figura 8: (A) Cromatograma obtido da fração H11 em coluna de fase reversa C18 em sistema HPLC. A amostra foi eluída utilizando-se um gradiente de propanol a um fluxo de 0,6 ml/min. A linha oblíqua mostra o desenvolvimento do gradiente de propanol. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm. (B) Visualização eletroforética dos 3 picos oriundos da terceira etapa de purificação por cromatografia de fase reversa em coluna C18, por eletroforese em gel de tricina. Os picos P1, P2 e P3, foram eluídos com um gradiente de propanol. O pico P2 contém uma única banda que corresponde a ApDef₁. M, marcador de massa molecular com a massa indicada em kDa.

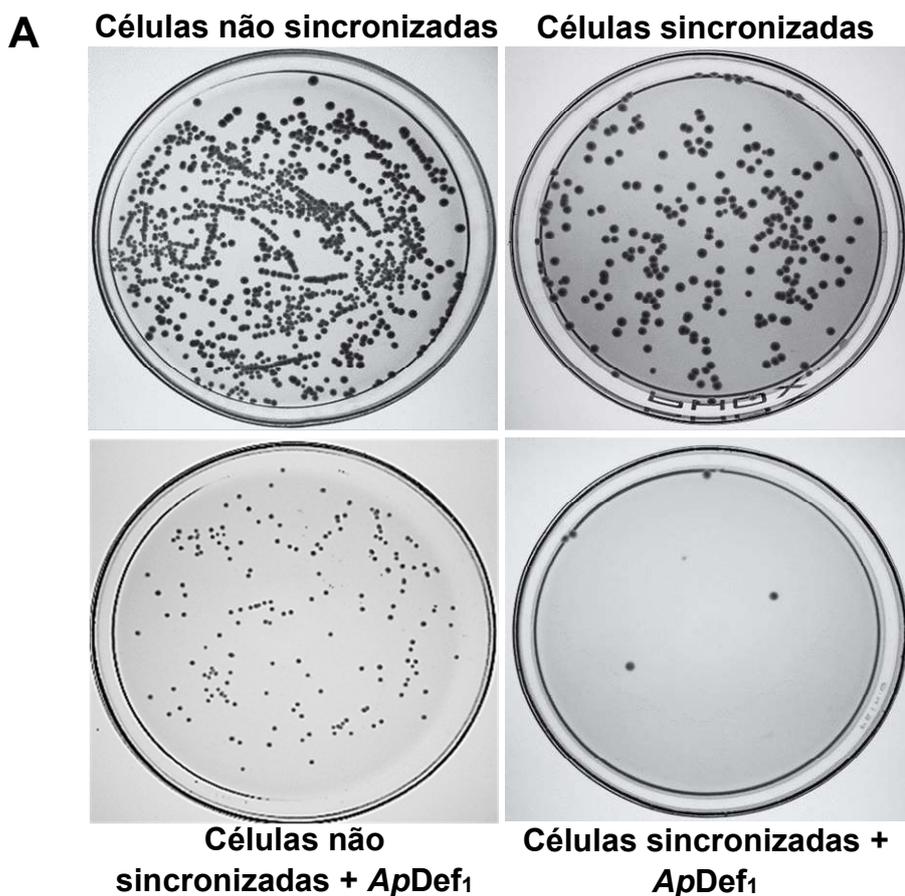
4.2 Análise da relação do ciclo celular sobre o efeito inibitório da *ApDef*₁

Em estudo anterior realizado por Soares (2012), foi visto que a defensina *ApDef*₁, quando utilizada na concentração da MIC, 7,8 µM, promove a morte das células de *S. cerevisiae* de forma gradual. A medida que avançava o tempo de incubação com a *ApDef*₁, uma população de células perdia a viabilidade, necessitando de 18 h para que toda a população das células tratadas morresse (Anexo 1). Para analisar a possível relação do ciclo celular da *S. cerevisiae* nesse processo de morte induzido pela *Apdef*₁, células da levedura foram sincronizadas com 500 mM de HU e então incubadas com a *ApDef*₁ durante 3 h.

Analisando a figura 9 (A e B) podemos notar que o tratamento das células sincronizadas com *ApDef*₁ promoveu 98,76% de morte celular dentro do intervalo de 3 h de incubação. Comparando o número de colônias da cultura sincronizada (4 colônias em média) (Fig. 9B) com o número de colônias da cultura não sincronizada e tratadas com a *ApDef*₁ (173 colônias em média), é possível concluir que uma fase do ciclo celular favorece a ação da *ApDef*₁. É importante notar que a HU causou uma toxicidade substancial para as células de *S. cerevisiae*, refletindo em um menor número de colônias desenvolvidas (321,67 colônias contra 1.299 no controle não tratado com HU) (Fig. 9A e B).

4.3 Análise da capacidade de ligação ao DNA da *ApDef*₁

Para verificar se o efeito no ciclo celular que leva à morte, causada pela *ApDef*₁, poderia estar relacionado com a interferência macromoléculas, um ensaio de ligação ao DNA foi feito. A figura 10 mostra a mobilidade do DNA de *S. cerevisiae* quando incubado com: com água (controle negativo) na raia 1, com poli-L-lisina que interage com o DNA (controle positivo) na raia 2 e com 7,8 µM da *ApDef*₁ na raia 3. O resultado deste ensaio demonstra que diferentemente da poli-L-lisina, a *ApDef*₁ não foi capaz de interferir com mobilidade do DNA de *S. cerevisiae* no gel de agarose, mostrando que esta defensina não se liga a esta macromolécula.



B

Teste	Número de colônias	Porcentagem de viabilidade
Não sincronizadas	1.299	-
Sincronizadas	321,67	100
Sincronizadas + ApDef ₁	4	1,24
Não sincronizadas + ApDef ₁	173	13,32

Figura 9: Relação entre o ciclo celular e o efeito inibitório da ApDef₁. (A) Imagem das placas de Petri mostrando as colônias de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas após a incubação das células fúngicas como descrito: 1) não sincronizadas com hidroxiuréia; 2) sincronizadas com hidroxiuréia e 3) sincronizadas com hidroxiuréia e tratadas com ApDef₁ após 3 h de incubação. Notar que a concentração de hidroxiuréia utilizada causou uma toxicidade para as células,

mas ainda é possível ver que o ciclo celular influencia a ação de *ApDef*₁. (B) Porcentagem da viabilidade das células de *S. cerevisiae* determinada após contagem do número de colônias que cresceram nas placas com os tratamentos indicados em (A).

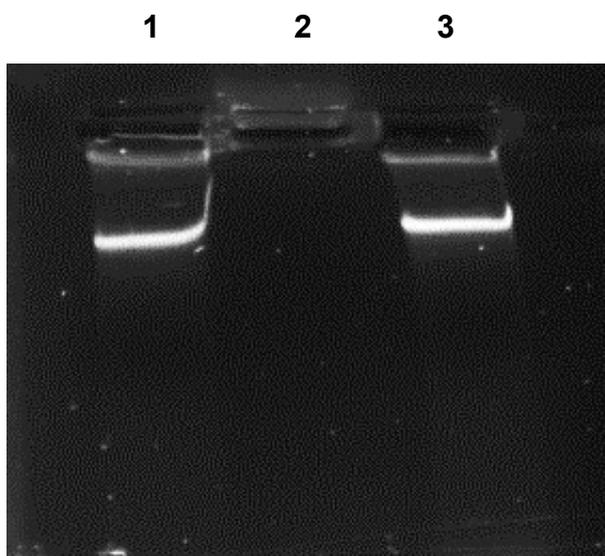


Figura 10: Visualização eletroforética da mobilidade do DNA em gel de agarose 0,8% para avaliar a capacidade de ligação da *ApDef*₁ ao DNA de *Saccharomyces cerevisiae*. O DNA de *S. cerevisiae* (100 ng) foi incubado com: (1) água (como controle negativo), (2) Poli-L-lisina como controle positivo e (3) com *ApDef*₁ (7,8 μ M). Gel foi corado com GelRed.

4.4 Análise da interferência do potencial de membrana na atividade antifúngica da *ApDef*₁ sobre *S. cerevisiae*

Para verificar se o potencial de membrana é necessário para a interação *ApDef*₁-*S. cerevisiae*, as células desta levedura foram previamente tratadas com CCCP, um agente despolarizante de membranas, antes de serem incubadas com 7,8 μ M da *ApDef*₁ por 18 h. É possível observar na figura 11 que o pré-tratamento com o CCCP protegeu 16,37 % das células da morte causada pela defensina. Este resultado indica que o potencial de membrana íntegro é necessário para a atividade da *ApDef*₁.

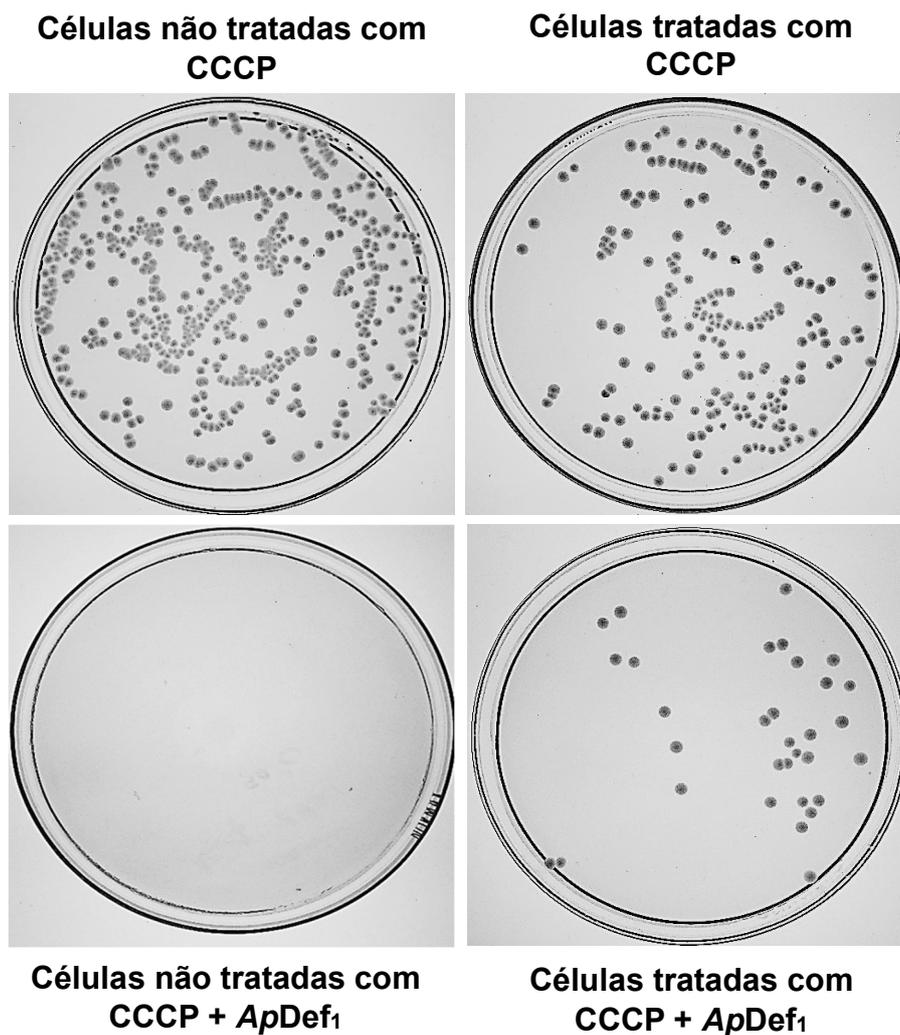


Figura 11: Relação entre o potencial de membrana e a atividade da *ApDef₁*. Imagem das placas de Petri mostrando as colônias de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas após a incubação prévia com CCCP durante 1 h e 30 min das células fúngicas e posteriormente com 7,8 μM da *ApDef₁* durante 18 h. Um controle sem o tratamento com o CCCP é mostrado.

4.5 Análise da influência da temperatura na atividade da *ApDef₁* sobre *S. cerevisiae*

Para analisar o efeito da temperatura, a incubação das células de *S. cerevisiae* com 7,8 μM da *ApDef₁* foi realizada a 4 °C durante 18 h. É possível observar que as células que foram incubadas a esta temperatura baixa não têm

a sua viabilidade afetada pelo tratamento com a *ApDef*₁ (Fig. 12). O oposto pode ser visto com células controles tratadas e incubadas a 30 °C, em que após 18 h toda a população inicial de células morreu. Isto indica que a baixa temperatura influencia negativamente a atividade fungicida da *ApDef*₁ sobre *S. cerevisiae*.

4.6 Análise da produção de H₂O₂ em *S. cerevisiae* induzido pela *ApDef*₁

O aumento endógeno da produção de H₂O₂ foi verificado nas células de *S. cerevisiae* tratadas com 7,8 µM da *ApDef*₁, através da polimerização do DAB. Na figura 13 é possível observar uma coloração marrom claro dentro das células após tratamento por 3 h com a *ApDef*₁ semelhante à observada nas células tratadas com 200 mM de ácido acético, o controle positivo para a reatividade do DAB, indicando aumento da produção de H₂O₂ pelas células. Nas células controle não houve nenhuma geração de H₂O₂ indicado pela ausência da coloração marrom clara. Este resultado mostra que o tratamento com a *ApDef*₁ aumenta a produção endógena de H₂O₂ em *S. cerevisiae*.

4.7 Análise da atividade antifúngica da *ApDef*₁ sobre células de *S. cerevisiae* na presença do antioxidante ácido ascórbico

Um ensaio utilizando o ácido ascórbico, um sequestrador de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi feito para determinar se o tratamento das células de *S. cerevisiae* com este composto as protegeria do efeito tóxico da *ApDef*₁. Neste ensaio, ácido ascórbico na concentração final de 100 mM foi adicionado ao mesmo tempo que a *ApDef*₁ (7,8 µM) ao meio de cultura e avaliado durante 18 h, que é o tempo necessário para a morte de 100% das células de *S. cerevisiae* na presença de 7,8 µM da *ApDef*₁. É possível observar que na presença do antioxidante as células não têm o seu crescimento afetado pela *ApDef*₁ durante as 18 h de tratamento (Fig. 14).

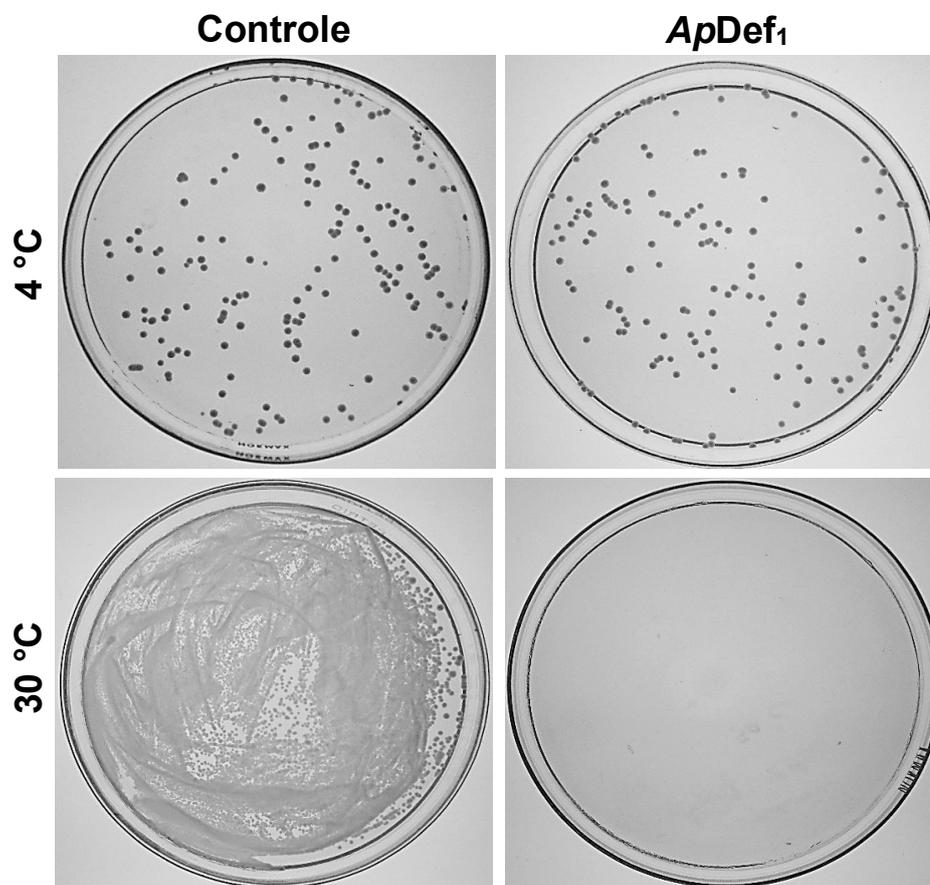


Figura 12: Relação entre baixa temperatura e o efeito tóxico da *ApDef₁*. Células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com 7,8 μ M da *ApDef₁* e incubadas a 4 °C por 18 h não perderam a sua viabilidade. Para comparação é mostrado um controle com células incubadas a 30 °C durante 18 h onde toda a população de células foi morta.

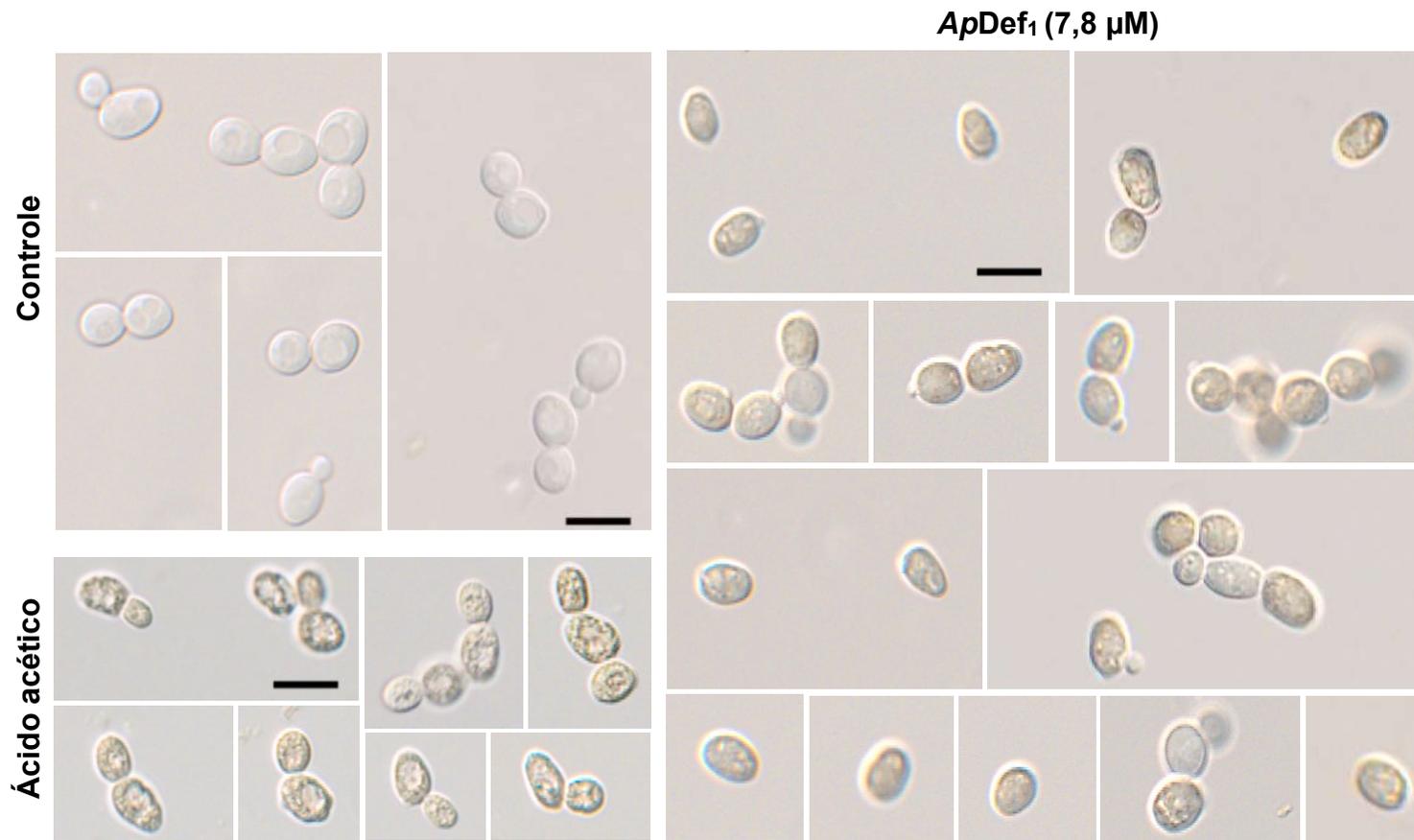


Figura 13: *ApDef₁* induz a produção endógena de H₂O₂. Imagens de microscopia óptica das células de *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando a produção de H₂O₂ após 3 h de incubação com 7,8 μM da *ApDef₁* ou 200 mM de ácido acético (controle positivo). Notar a coloração marrom clara da reação do DAB nas amostras tratadas. Barra: 10 μm.

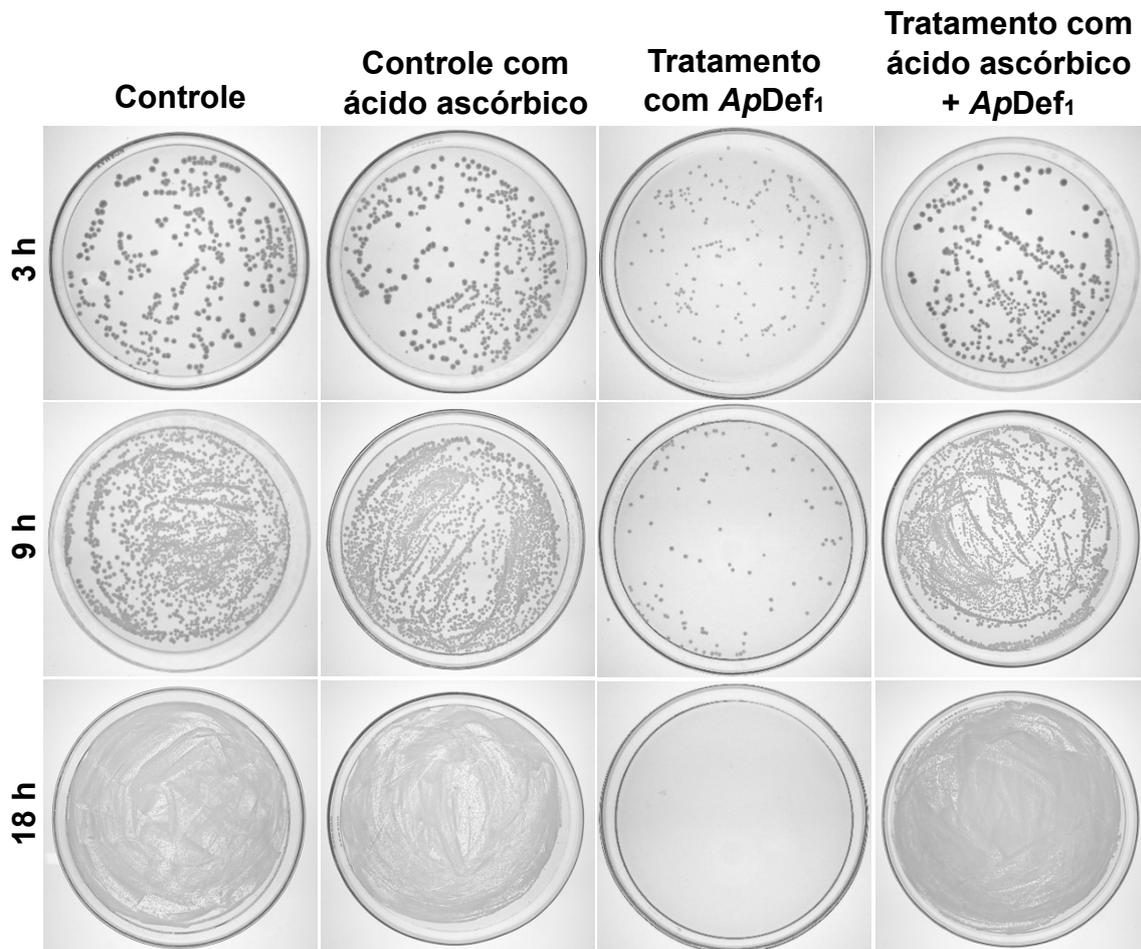


Figura 14: Relação do estresse oxidativo para a morte das células de *Saccharomyces cerevisiae* induzida pela *ApDef*₁. Imagens das placas de Petri do ensaio de viabilidade celular de *S. cerevisiae* após a incubação com 7,8 μ M da *ApDef*₁ e 100 mM de ácido ascórbico durante 3, 9 e 18 h. Notar que a presença do ácido ascórbico evita a morte celular induzida pela *ApDef*₁, indicando a dependência do estresse oxidativo para a ocorrência deste processo.

4.8 Análise da permeabilização de membranas de células de *S. cerevisiae* pela *ApDef*₁

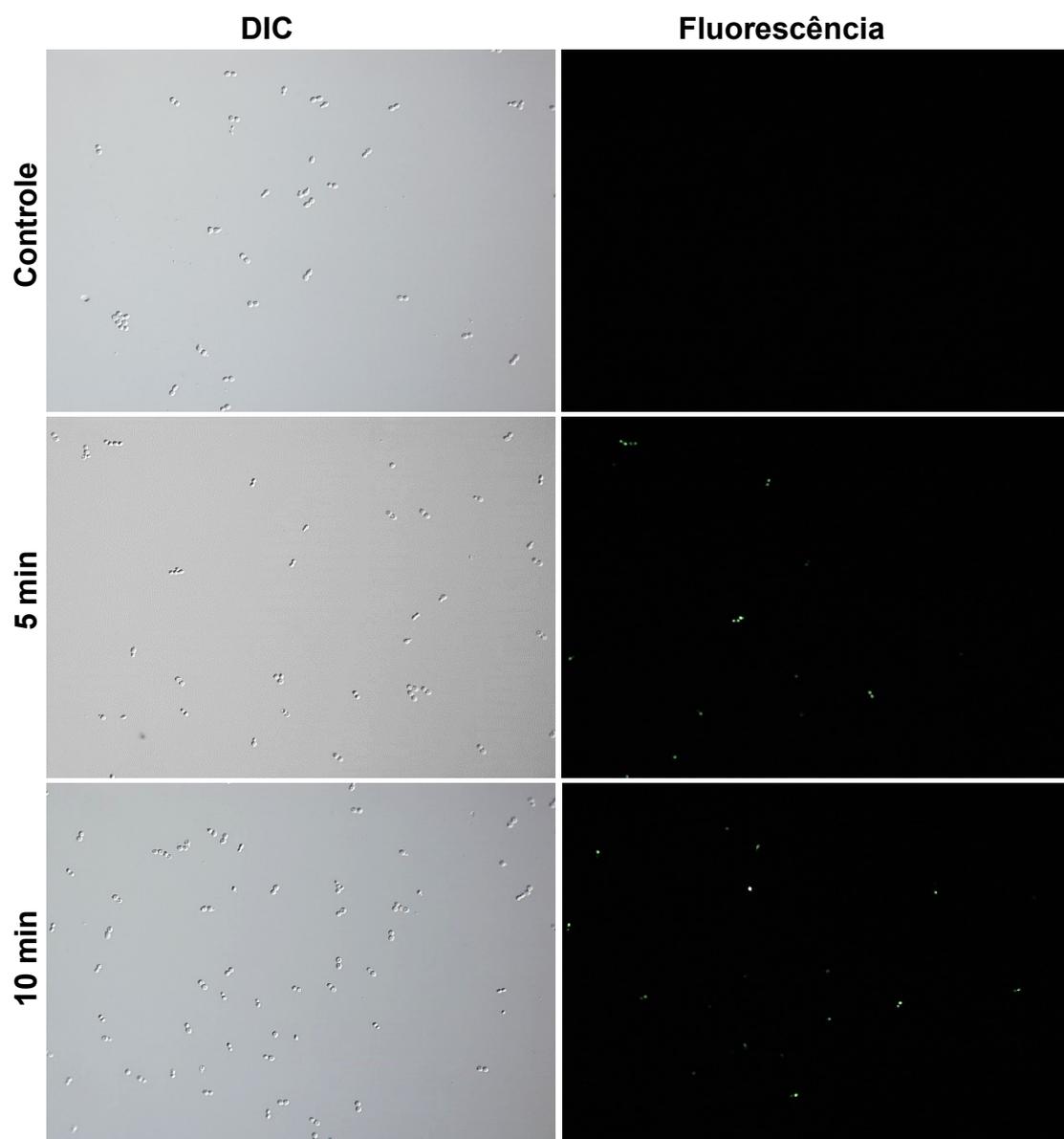
Foi investigado se o tratamento com a *ApDef*₁ causava a permeabilização de membranas, verificada através da entrada na célula do corante Sytox Green. Este corante se torna fluorescente após interagir com ácidos nucleicos e penetra apenas em células com membranas comprometidas. Esta análise indicou um aumento gradual no número de células fluorescentes conforme o período de incubação com 7,8 µM da *ApDef*₁ progride, a qual foi determinada calculando a porcentagem de células fluorescentes no controle e nas células tratadas. Após 5 minutos de interação já havia 19,4% de células permeabilizadas, chegando a atingir 76,8% após 1 h de contato com a defensina (Fig. 15 A e B). Este ensaio revelou que a interação *ApDef*₁-*S. cerevisiae* causou a permeabilização da membrana plasmática das células.

Para testar o possível envolvimento de ROS na permeabilização ocasionada pelo tratamento com a *ApDef*₁, o ensaio de permeabilização de membranas foi repetido na presença de ácido ascórbico e como pode ser observado na figura 16, as células não foram permeabilizadas. Esse resultado sugere que a permeabilização da membrana é um evento indireto da interação *ApDef*₁-*S. cerevisiae*.

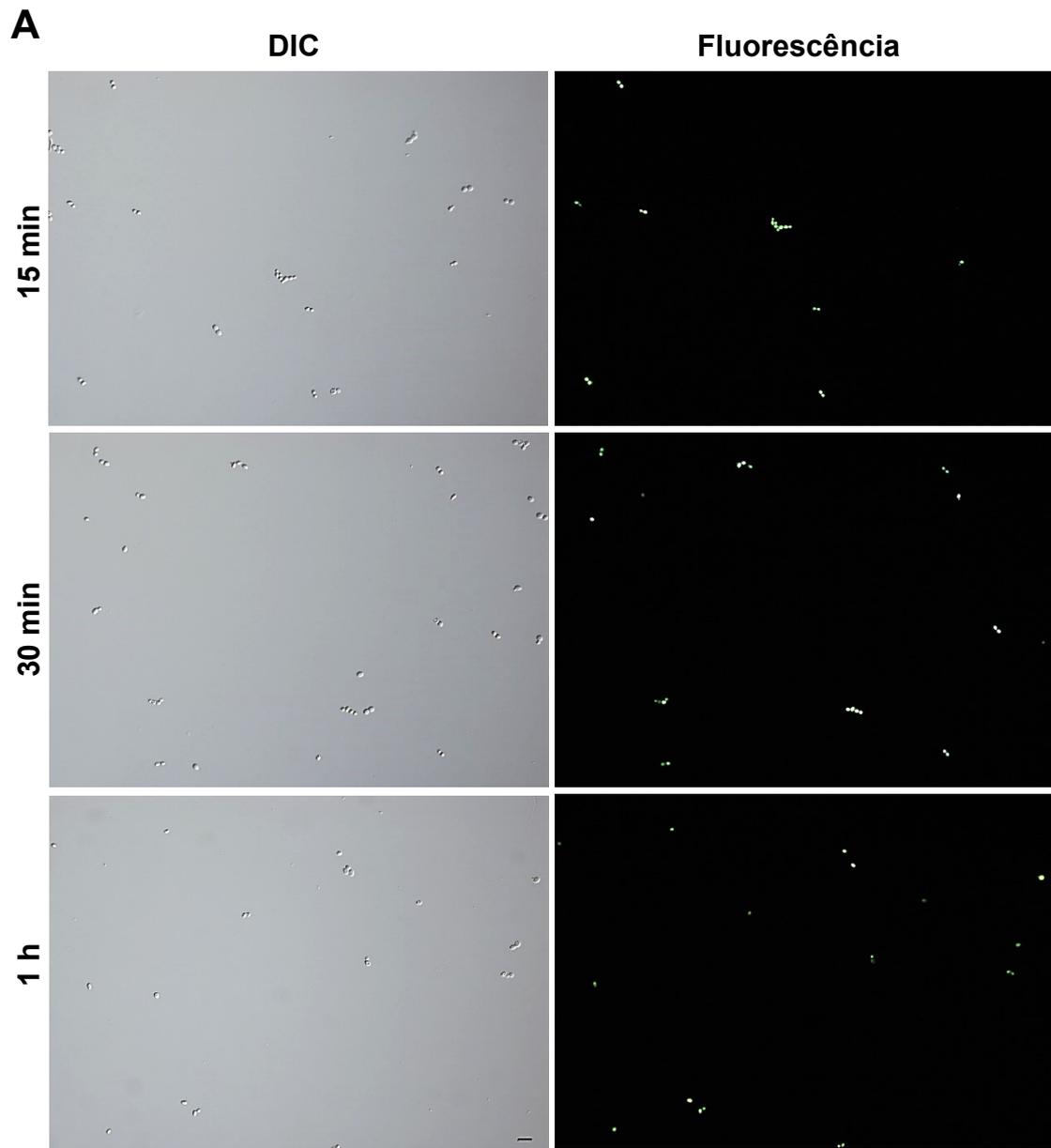
4.9 Análise das alterações ultraestruturais nas células de *S. cerevisiae* induzidas pela *ApDef*₁

Uma análise das células de *S. cerevisiae* tratadas com 7,8 µM da *ApDef*₁ por 18 h foi feita por microscopia eletrônica de transmissão. O resultado mostrou, quando comparado com o controle, que a *ApDef*₁ foi eficiente em alterar a organização de algumas organelas. O núcleo das células tratadas, quando comparadas com as do controle, apresentou áreas com coloração mais escuras as quais indicam a condensação de cromatina. As mitocôndrias mostram alteração de tamanho, aparentando um inchaço e as cristas não puderam ser vistas dentro delas (Fig. 17). Este resultado indica que a *ApDef*₁ induz alterações ultraestruturais nas células de *S. cerevisiae*.

A



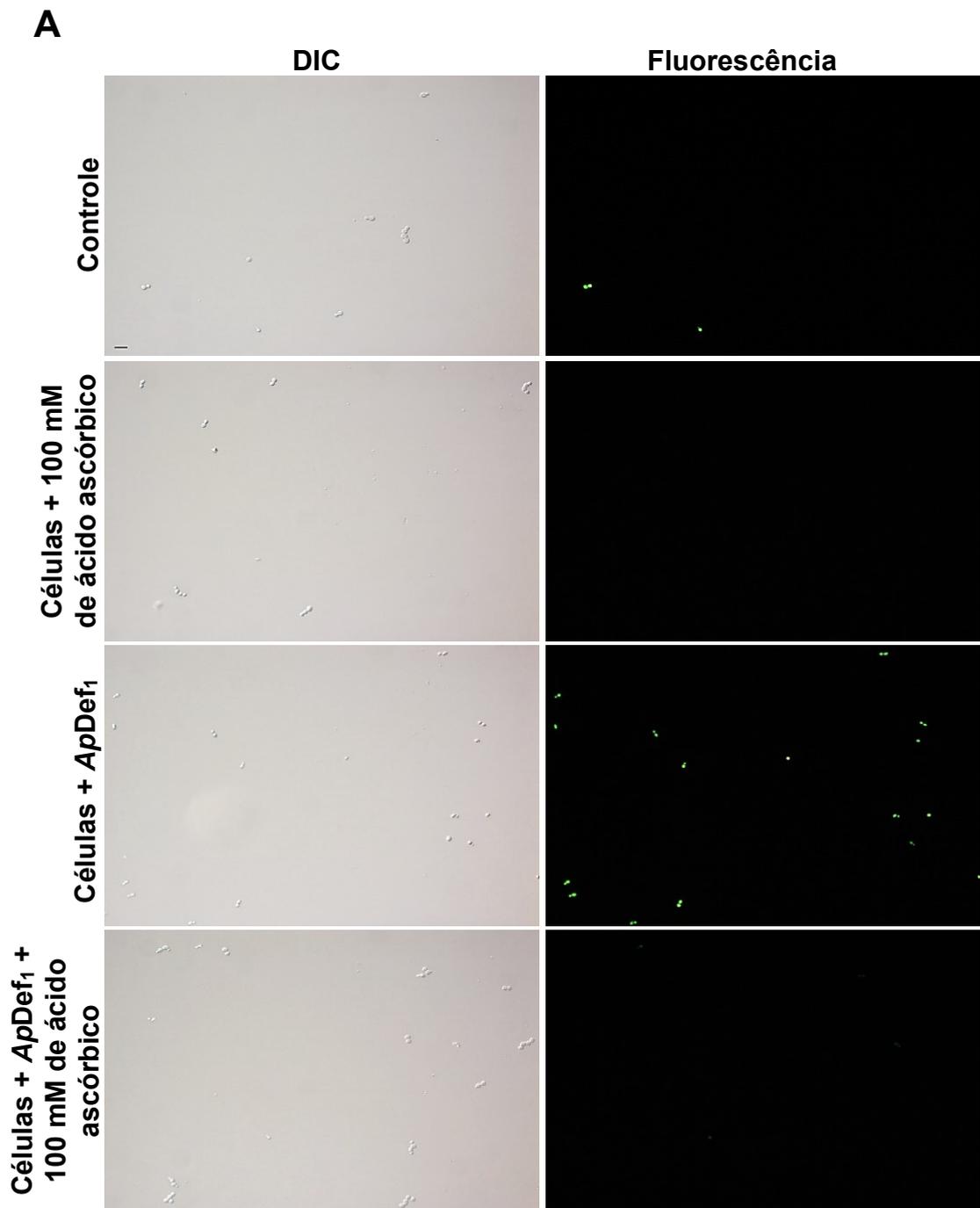
Continua na próxima página



B

Amostras	Número de células em DIC	Número de células Fluorescentes	Porcentagem de células permeabilizadas
Controle	48,8 ± 10,72	1,2 ± 0,96	2,46
5 min	125,8 ± 19,76	24,4 ± 6,48	19,4
10 min	62,6 ± 9,52	17,2 ± 3,76	27,48
15 min	49,8 ± 4,64	28,6 ± 3,28	57,43
30 min	32,4 ± 3,92	21,4 ± 3,92	66,05
1 h	16,4 ± 6,08	12,6 ± 3,92	76,83

Figura 15: Permeabilização de membranas das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com 7,8 μ M da ApDef₁. (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células de *S. cerevisiae* tratadas com ApDef₁ por 5, 10, 15, 30 min e 1 h e incubadas com o corante fluorescente Sytox Green. A fluorescência verde indica a presença de células permeabilizadas. Imagens adquiridas com o mesmo tempo de exposição. Barra: 20 μ m. (B) Porcentagem de células de *S. cerevisiae* permeabilizadas determinada após contagem do número de células observadas em campos aleatórios em DIC e Fluorescência. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100 %.



B

Amostras	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Porcentagem de células permeabilizadas
Controle	11,2 ± 1,8	1,6 ± 0,88	14,28
Células + 100 mM ácido ascórbico	17 ± 2,8	0,2 ± 0,32	1,17
Células + <i>ApDef</i> ₁	21,6 ± 2,72	20,6 ± 3,12	95,37
Células + <i>ApDef</i> ₁ + 100 mM ácido ascórbico	17,6 ± 3,92	2,8 ± 2,16	15,9

Figura 16: Permeabilização de membranas das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a *ApDef*₁ na presença de ácido ascórbico. (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células de *S. cerevisiae* tratadas com 7,8 µM da *ApDef*₁ durante 1 h na presença de 100 mM de ácido ascórbico e incubadas com o corante Sytox Green. A fluorescência verde indica a presença de células permeabilizadas. Imagens adquiridas com o mesmo tempo de exposição. Barra: 20 µm. (B) Porcentagem de células permeabilizadas determinadas após contagem do número de células observadas em campos aleatórios em DIC e fluorescência. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100%.

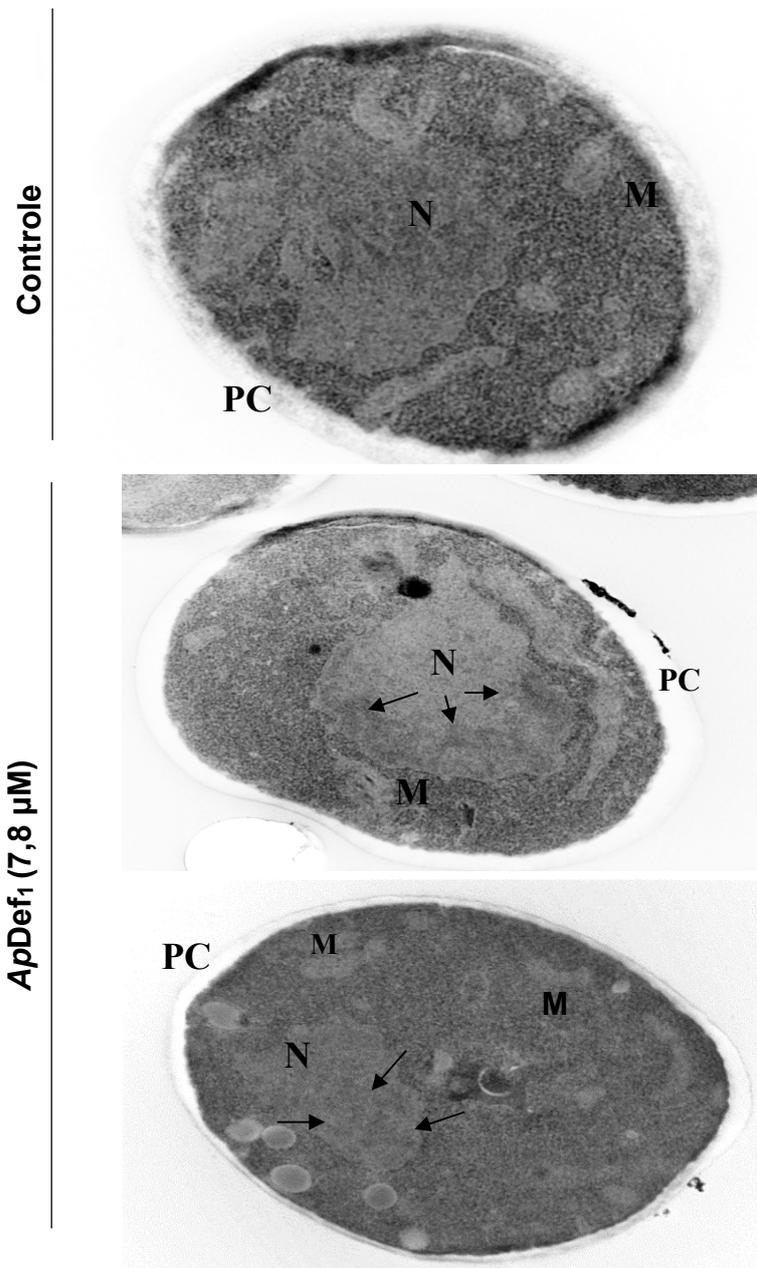


Figura 17: Imagem por microscopia eletrônica de transmissão mostrando alterações ultraestruturais nas células de *Saccharomyces cerevisiae* induzidas pela ApDef₁ após 18 h de incubação. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das células do controle e das células tratadas com a ApDef₁. O núcleo apresenta áreas com coloração escura que indica condensação cromatina (setas). As mitocôndrias aparentam inchadas e com má visualização das cristas dentro delas. Controle = sem ApDef₁. M = mitocôndria, N = núcleo, PC = parede celular.

4.10 Detecção de condensação de cromatina em células de *S. cerevisiae* tratadas com ApDef₁

Os resultados anteriores mostraram que ApDef₁ induz aumento da produção de ROS pelas células. Estas substâncias desempenham papel importante na apoptose e frente a isso foi investigado se a ApDef₁ induz outros marcadores de células apoptóticas. O núcleo celular de *S. cerevisiae* foi analisado através da marcação com DAPI, um composto que atravessa membranas quando estas estão permeabilizadas e se liga especificamente ao DNA, tornando-se fluorescente. Células tratadas com 7,8 µM da ApDef₁ apresentaram uma fluorescência nuclear concentrada e intensa, típica de células apoptóticas, o que indica condensação da cromatina (Fig. 18).

4.11 Detecção de atividade de caspase

Os resultados anteriores indicaram eventos relacionados a dois processos associados à apoptose, condensação da cromatina e indução de ROS. A partir destes resultados uma análise da ativação de caspases endógenas foi feita com o intuito de verificar uma possível indução de apoptose em células de *S. cerevisiae* tratadas com a ApDef₁. Esta análise foi feita utilizando o marcador FITC-VAD-FMK, que entra na célula e irreversivelmente inibe caspases através da ligação ao seu sítio ativo, tornando-se fluorescente. O tratamento das células com 7,8 µM da ApDef₁ por diferentes tempos resultou na ativação de caspases, sendo possível observar uma marcação positiva intensa já nas primeiras 3 h de tratamento (Fig. 19A). Para confirmar a marcação, as células foram contadas e a porcentagem de células fluorescentes foi avaliada. Esta análise mostrou que após 30 min 62,5% das células apresentavam marcação positiva para atividade de caspase e tempos mais longos de incubação levou a um aumento no número de células marcadas, chegando a atingir 98,45% (Fig. 19B). As células não tratadas não apresentaram marcação para atividade de caspase.

4.12 Análise da relação da atividade de caspase na morte de *S. cerevisiae* induzida pela *ApDef*₁

Para confirmar se a atividade de caspase induzida após tratamento com 7,8 μM da *ApDef*₁ poderia estar envolvida na morte das células de *S. cerevisiae*, foi realizado um ensaio antifúngico na presença do inibidor de caspases Z-VAD-FMK, que entra na célula e se liga irreversivelmente ao sítio catalítico de proteases caspases inibindo sua atividade e bloqueando a via de apoptose. A adição do inibidor na concentração de 50 μM no ensaio antifúngico, permitiu que uma população de células sobrevivesse aos efeitos tóxicos da *ApDef*₁ após 18 h de tratamento, indicando o envolvimento da atividade de caspases na morte celular induzida pela defensina (Fig. 20).

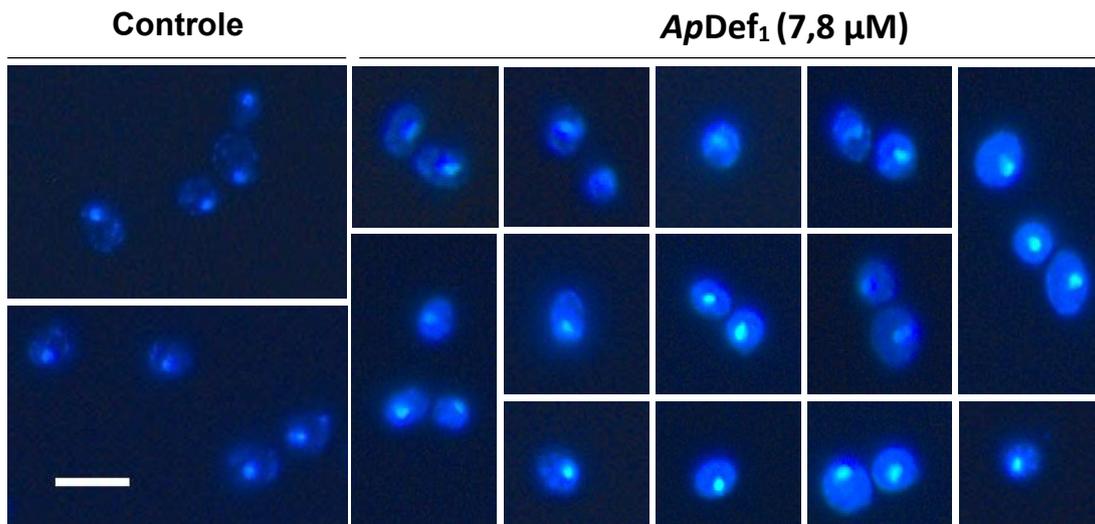
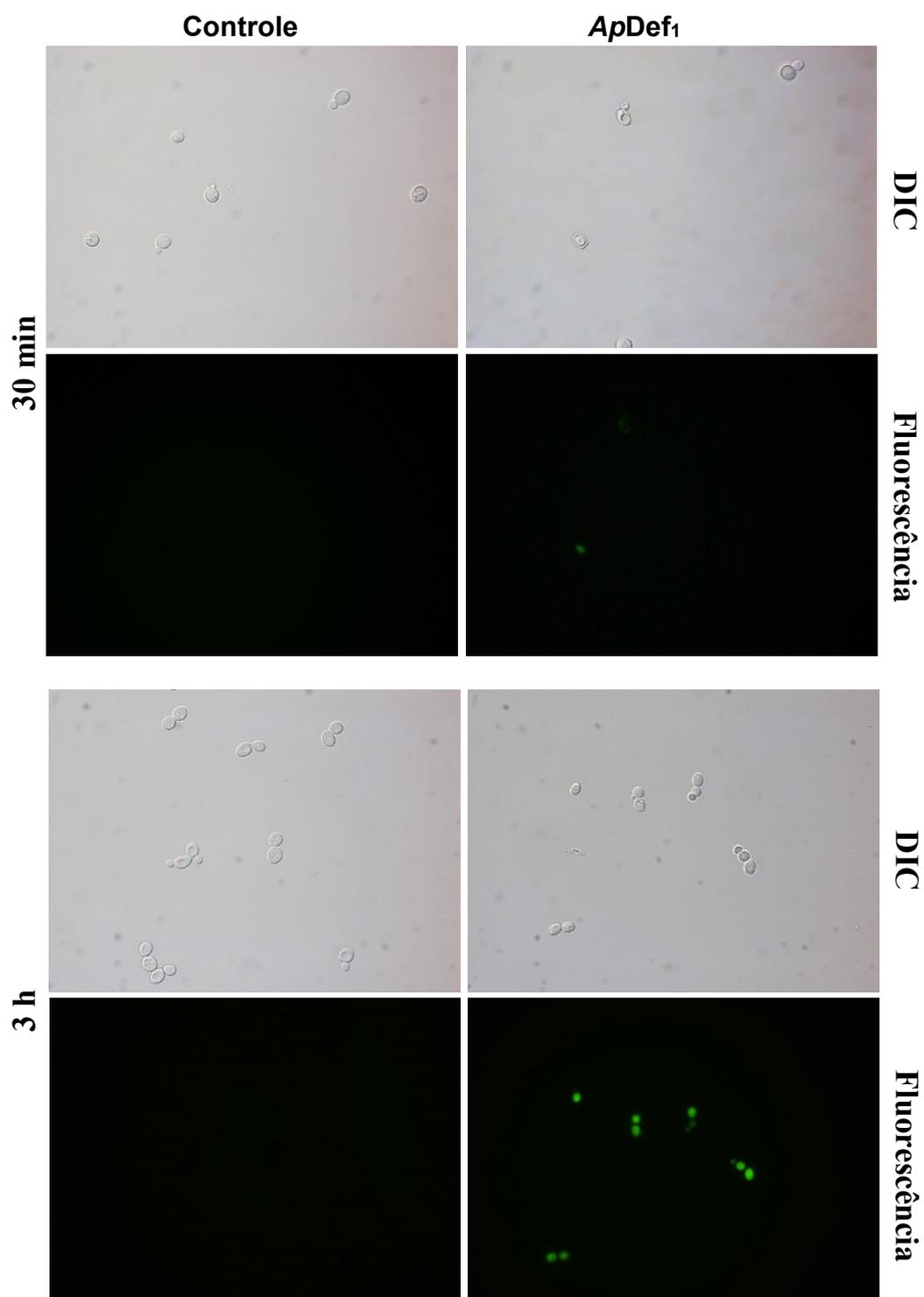
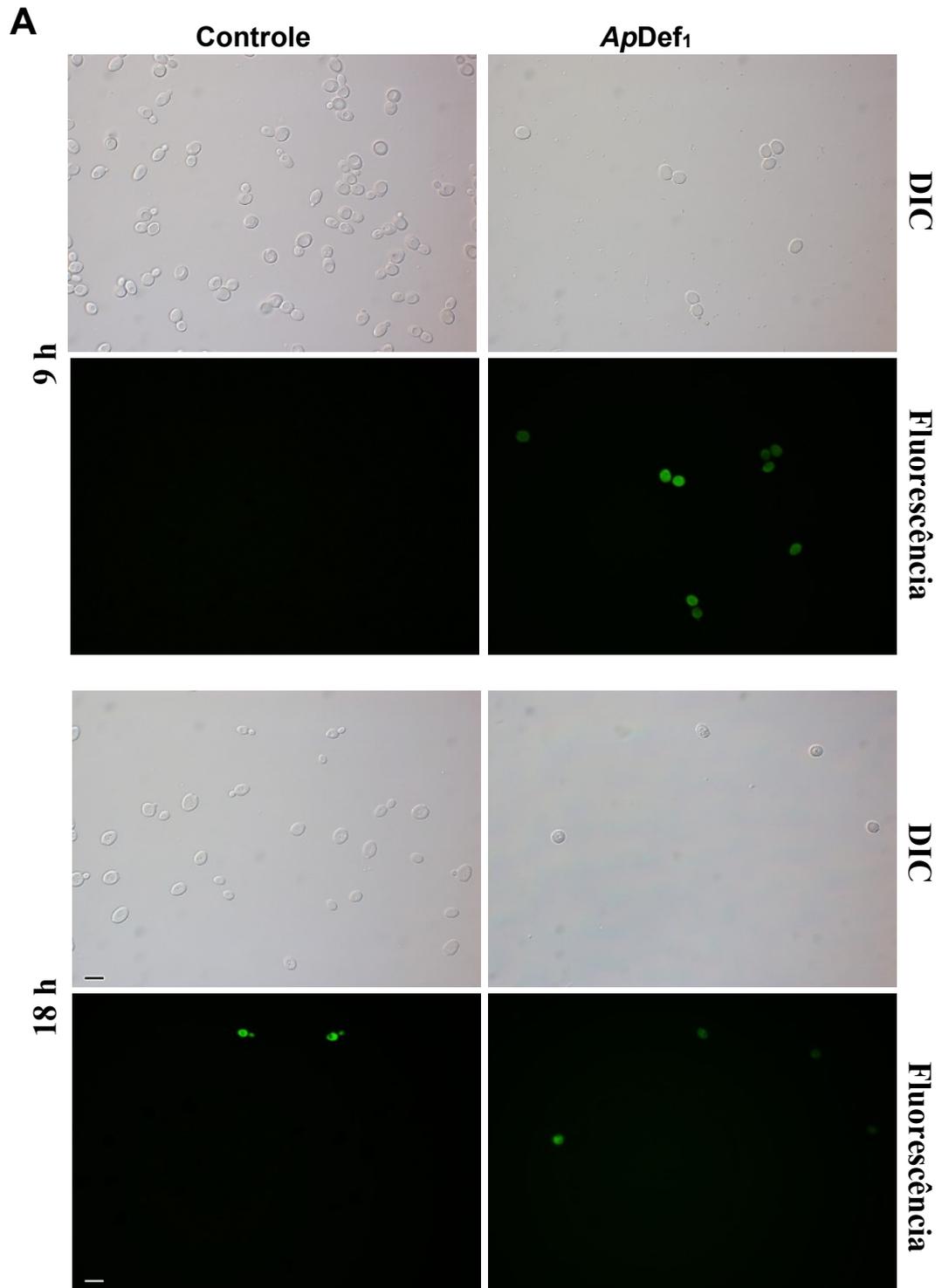


Figura 18: Condensação de cromatina das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a *ApDef*₁. Marcação com DAPI das células de *S. cerevisiae* controle e tratadas durante 18 h com 7,8 μM da *ApDef*₁. Note o brilho mais intenso nas amostras tratadas. Barra: 10 μm .

A



Continua na próxima página



B

Tempo	Controle		Teste		Porcentagem de células marcadas	
	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Número de células em DIC	Número de células fluorescentes	Controle	Teste
30 min	29 ± 6,8	0,2 ± 0,32	26 ± 5,5	16,25 ± 2,25	0,69	62,5
3 h	84,75 ± 7,12	0,5 ± 0,64	54 ± 6,4	50,4 ± 7,92	0,59	93,33
9 h	353 ± 40,72	5,2 ± 1,76	13,5 ± 0,5	12,5 ± 1,5	0,14	92,59
18 h	1646 ± 138	73,33 ± 7,55	22 ± 4	21,66 ± 4,22	4,45	98,45

Figura 19: Envolvimento da atividade de caspases na morte celular de *Saccharomyces cerevisiae* induzida pela *ApDef*₁. (A) Imagens de microscopia óptica (DIC e fluorescência) das células controle e tratadas com 7,8 µM da *ApDef*₁ apresentando marcação para atividade de caspase através do marcador fluorescente FITC-VAD-FMK. As imagens representam um de três experimentos independentes. Barra: 10 µm. (B) Porcentagem de atividade de caspase nas células de *S. cerevisiae*, determinado após contagem do número de células em campos aleatórios em DIC e as fluorescentes. O número de células em DIC de cada amostra foi considerado 100%.

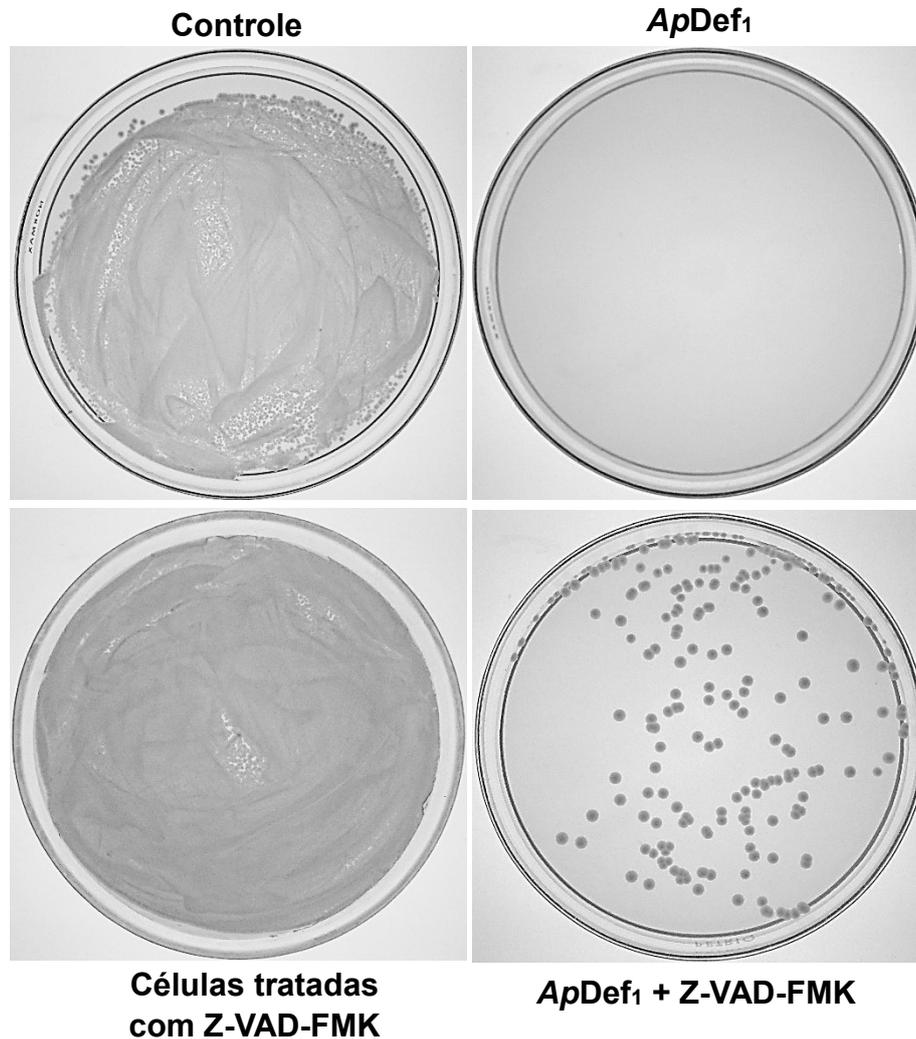


Figura 20: Envolvimento de caspases ativas na morte de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Imagens de placas de Petri mostrando as colônias de *S. cerevisiae* obtidas após a incubação das células fúngicas por 18 h com 7,8 μM da ApDef₁ na presença de 50 μM do inibidor de caspases Z-VAD-FMK. Notar que a adição do inibidor protegeu uma população de células da morte, indicando o envolvimento de caspases nesse processo. Como controles foram usadas células sem tratamento, células tratadas com a ApDef₁ e células tratadas com o inibidor.

5 DISCUSSÃO

Defensinas de planta são conhecidas desde o início da década de 90 (Colilla et al., 1990; Mendez et al., 1990) e seu mecanismo de ação contra fungos tem sido intensivamente estudado ao longo destas duas últimas décadas após sua descoberta, embora este ainda não esteja completamente compreendido. Em estudo anterior, a defensina *ApDef₁* foi purificada (Soares et al., 2012) e foi visto que ela era capaz de inibir fortemente o crescimento das células de *S. cerevisiae* e que o seu efeito sobre as células ocorria através de mecanismo fungicida, uma vez que as células tratadas com a *ApDef₁* perdiam a viabilidade (Soares, 2012). Este estudo também determinou o MIC para a *ApDef₁*, no valor de 7,8 μM (40 $\mu\text{g/mL}$) e mostrou que nesta concentração, a defensina induziu a morte de toda a população de células utilizadas no ensaio (4.000 células/mL) após 18 h de tratamento (Soares, 2012).

O trabalho apresentado aqui mostra os resultados obtidos da continuação desse estudo, avaliando as características da interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* envolvidas e necessárias para o efeito letal da *ApDef₁* sobre células de levedura. Os experimentos apresentados a seguir foram todos realizados com o MIC da *ApDef₁*, uma vez que associamos o MIC aos efeitos biológicos, como por exemplo, a morte celular de *S. cerevisiae* após interação com 7,8 μM da *ApDef₁* (Soares, 2012), e assim garantimos que os eventos observados são de fato relevantes e associados com a morte celular induzida pela *ApDef₁*. Esta precaução foi tomada para evitar uma má interpretação dos sinais envolvidos na morte celular, uma vez que concentrações da *ApDef₁* abaixo do MIC não causam a morte celular de *S. cerevisiae* (Anexo 2) (Soares, 2012), provavelmente porque as células da levedura na presença de baixas concentrações da *ApDef₁* são capazes de montar uma resposta de defesa, revertendo ou bloqueando assim a via que leva a morte celular induzida pela defensina.

Este trabalho foi iniciado com a obtenção da defensina *ApDef₁* através da extração da farinha das sementes de *A. pavonina*, seguindo metodologia descrita por Soares et al. (2012) ilustrada no esquema 1. A fração F/0-90% obtida da extração foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, originando dois picos, D1 e D2 (Fig. 5). O pico D1 foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada a uma pré coluna C8,

resultando em 22 novas frações (Figuras 6 e 7). Este último processo também é aplicado à fração H11, quando é finalmente obtida a purificação da *ApDef*₁ (Fig. 8A), sendo possível observar no pico P2 a presença de apenas uma única banda proteica de aproximadamente 7 kDa (Figura 8B) correspondente à defensina *ApDef*₁ isolada, como descrita por Soares et al. (2012). Obtida a defensina, foi dado prosseguimento ao estudo da caracterização dos possíveis mecanismos subjacentes à interação entre *ApDef*₁ e *S. cerevisiae*. O estudo preliminar mostrou que a cada intervalo de 3 h de incubação com *ApDef*₁, uma subpopulação de células de *S. cerevisiae* perdia a viabilidade, e dessa forma prosseguia gradualmente até atingir 18 h de incubação onde não havia mais células viáveis (Soares, 2012). Este resultado levantou o questionamento do porquê das células após contato com a *ApDef*₁ morrerem em diferentes momentos e não todas de uma vez, como era esperado. Nós esperávamos uma maior uniformidade neste evento de morte celular devido as características físico-químicas universais dos AMPs que são conhecidas por reger a interação dos AMPs com microrganismos, como por exemplo, a sua carga positiva a pH neutro e a estrutura tridimensional anfifílica (Powers e Hancock, 2003). Apesar de em geral, a estrutura tridimensional das defensinas de planta não apresentarem a estrutura anfifílica dos AMPs lineares ou helicoidais, vários trabalhos têm apontado que uma sequência mínima em resíduos de aminoácidos seja requerida e responsável pela atividade das defensinas de planta. Essa sequência encontra-se em um trecho localizado na volta entre as folhas β 2 e β 3, abrangendo aproximadamente 19 resíduos de aminoácidos (Samblanx et al., 1996; Sagaram et al., 2011; Schaaper et al., 2001). Esse trecho apresenta aminoácidos com características polares e apolares e demonstrou ser importante para a atividade antifúngica da defensina Rs-AFP2 (Schaaper et al., 2001). Sagaran et al. (2011) demonstraram que os resíduos de aminoácidos catiônicos (hidrofílicos) e hidrofóbicos nesta região são importantes para as atividades antifúngica das defensinas MsDEF1 e MtDEF4 (de *Medicago truncatula*). A interação dos AMPs com microrganismos tem sido mostrada ocorrendo em primeiro lugar pela atração das cargas opostas entre o AMP carregado positivamente e o alvo carregado negativamente na superfície do microrganismo, como por exemplo, a cabeça dos fosfolipídios carregados negativamente (Giuliani et al., 2007). Em segundo lugar a face hidrofóbica do

AMP interage com a parte hidrofóbica da membrana e, neste momento, o AMP é capaz de se inserir na membrana causando uma desorganização e, conseqüentemente, a sua permeabilização (Giuliani et al., 2007). Alguns estudos comprovam essa visão, por exemplo, (1) sabe-se que NaCl e MgCl₂ bloqueiam o efeito antimicrobiano de AMPs por romperem a atração inicial promovida pelas cargas opostas (Ganz e Lehrer, 1999; Vylkova et al., 2007), (2) microrganismos mutantes deficientes em componentes carregados negativamente em suas membranas são mais resistentes à ação dos AMPs, como por exemplo a *Leishmania donovani*, deficiente na produção do lipofosfoglicano aniônico (Bera et al., 2003), (3) algumas bactérias desenvolveram mecanismos de defesa que alteram a carga negativa de moléculas de superfície, como o ácido teicóico ou lipopolissacarídeos, e também alteram a fluidez da membrana para evitar a interação de AMP (Peschel, 2002). Estes são mecanismos particularmente interessantes porque as modificações induzidas por estas bactérias em resposta à percepção de AMPs são feitas nos sítios onde a interação AMP-microrganismo ocorrem. (4) A característica anfipática dos AMPs pode ser emprestada às outras moléculas, dotando-as com atividade antimicrobiana (Palermo e Kuroda, 2010). Por estas razões, nós esperávamos uma maior uniformidade na interação ApDef₁-*S. cerevisiae*, mesmo sabendo que pode haver alguma heterogeneidade na população de células por causa da dessincronização do ciclo celular de *S. cerevisiae* (Dirick et al., 1995; Henson, 2003a, 2003b).

Com base em todas as razões expostas, foi levantada a hipótese de que a ação da ApDef₁ que leva ao processo de morte celular da *S. cerevisiae* seria dependente do ciclo celular. Para testar essa hipótese, o ciclo celular da *S. cerevisiae* foi sincronizado utilizando HU. Esta droga é um inibidor da divisão celular especificamente na fase G1/S, agindo através inativação da enzima ribonucleotídeo redutase que transforma ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos e conseqüentemente inibe a síntese de DNA (Elford, 1968; Sinha e Snustad, 1972). Após o período de tratamento com a HU as células são sincronizadas na mesma fase do ciclo celular. Esta sincronização é reversível e quando as células são transferidas para meio de cultivo de novo, sem a droga, de onde elas continuam o ciclo celular na mesma fase. As células sincronizadas foram tratadas com a ApDef₁ durante 3 horas e após esse período 98,76% das células morreram (Fig. 9A e B). Este resultado indica que a morte

celular de *S. cerevisiae* induzida pela *ApDef*₁ é dependente do ciclo celular e que a *ApDef*₁ atua em um determinado momento do ciclo, e isso contrasta claramente em relação às células não sincronizadas, as quais requerem um tempo total de 18 h para perderem 100% da viabilidade (Soares, 2012). Hultmark et al. (1983) relataram que as proteínas antibacterianas atacinas (da hemolinfa de pupas imunizadas da mariposa *Hyalophora cecropia*) podem ter como alvo o ciclo celular do mutante *envA* de *Escherichia coli* que fenotípicamente formam cadeias no processo de divisão celular.

Uma das possíveis explicações para a influência da fase do ciclo celular na morte celular induzida pela *ApDef*₁ poderia ser a interferência com o metabolismo de macromoléculas aniônicas, como DNA, através da ligação direta ou pela inibição de sua síntese. Há relatos de AMPs que interferem ou interrompem a síntese de DNA como mecanismo para a atividade antimicrobiana. Estudos mostraram a incorporação de [³H] timidina no DNA sendo parada em *E. coli* pela PR-39 (AMP do intestino delgado de porco) (Boman et al., 1993) e em *Entamoeba histolytica* pela criptidina-2 (defensina de células Paneth de rato) (Preet et al., 2011). Também para os AMPs indolicitina (de grânulos citoplasmáticos de neutrófilos bovinos) e buforina-II (derivada buforina I do sapo asiático *Bufo bufo garagrizans*) foi demonstrado que se ligam diretamente ao DNA (Park et al., 1998; Subbalakshmi, 1998). Nosso resultado mostrou que a *ApDef*₁ não se liga ao DNA de *S. cerevisiae* (Fig. 10) e, dessa forma, outro mecanismo deve estar envolvido no efeito tóxico da *ApDef*₁ dependente do ciclo celular. Outra possibilidade para a interferência do ciclo celular na ação da *ApDef*₁ foi demonstrada por Lobo et al. (2007), o qual mostrou por meio de sistema duplo-híbrido em levedura, que a defensina de planta *PsD1* (*Pisum sativus*) interage com ciclina F do fungo *Neurospora crassa*, uma proteína relacionada com o controle do ciclo celular. Isto desestabilizaria a translocação nuclear de ciclina B, interferindo assim com a progressão do ciclo celular normal (Kong et al., 2000; Lew e Reed, 1993). Estudos *in vivo* utilizando tecido da retina em desenvolvimento de ratos recém-nascidos, como um modelo para a progressão do ciclo celular, foi mostrado que *PsD1* bloqueia o papel da ciclina F na transição da fase S para G2, impedindo a progressão do ciclo celular por perturbar a migração nuclear e endorreduplicação (Lobo et al., 2007). Portanto, uma possível explicação para a interferência do ciclo celular na atividade da

ApDef₁ pode ser a interação desta com algum componente de controle do ciclo celular, como as ciclinas por exemplo. O sítio de ligação da ciclina da PsD1 ainda não foi mapeado, o que impede a realização de uma análise comparativa mais precisa. No entanto, a *ApDef₁* e a PsD1 compartilham 17 resíduos de aminoácidos idênticos (35% de identidade) e 22 resíduos de aminoácidos positivos (44% de similaridade) entre suas sequências (Anexo 3) (Soares et al., 2012), mas é preciso mais estudos para testar tal suposição.

Outro mecanismo necessário para a interação AMP-microrganismo é o potencial elétrico da membrana plasmática. Então, para verificar se o potencial de membrana é necessário para a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae*, foi utilizado o desacoplador e protonóforo CCCP como agente despolarizante de membrana. O pré-tratamento das células de *S. cerevisiae* com CCCP protegeu 16,37% das células da morte (Fig. 11), mostrando que o potencial de membrana íntegro é necessário para a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae*. O potencial de membrana tem sido relatado sendo necessário para alguns AMPs exercerem o seu efeito tóxico, tal como demonstrado para células de *E. coli* pré-tratadas com 100 mM do despolarizante CCCP, as quais foram resistentes à indolicitina (Falla et al., 1996) e o mutante *petit* de *Candida albicans* (deficiente na respiração celular devido a uma mutação no DNA mitocondrial) que foi resistente à ação da histatina-5 (Gyurko et al., 2000). Uma maior proteção foi observada quando as células de *S. cerevisiae* foram incubadas com a *ApDef₁* a 4 °C (Fig. 12), indicando que a temperatura baixa influencia negativamente a atividade fungicida da *ApDef₁*. A mesma proteção foi relatada por Gyurkó et al. (2000) para *C. albicans* quando exposta à histatina-5 a 4 °C, sendo o efeito observado relacionado com baixo estado metabólico da célula. Os AMPs PR-39 (Boman et al., 1993) e atacinas (Hultmark et al., 1983) não apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias que não estão crescendo. Estes estudos corroboram com os resultados apresentados acima, os quais indicaram que o potencial de membrana está envolvido na interação entre *ApDef₁* e as células de *S. cerevisiae*.

Em outra parte do trabalho, foram investigados o possível mecanismo de ação que leva a morte celular da *S. cerevisiae*. Há cada vez mais evidências indicando que AMPs têm alvos intracelulares, incluindo as defensinas de plantas (Lobo et al., 2007) e, além disso, para alguns deles foi demonstrado a sua

entrada no citoplasma de fungos (van der Weerden et al., 2010, 2008). Uma vez no citoplasma, AMPs podem induzir danos celulares, tais como a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, inibição da síntese da parede celular, inibição da atividade enzimática e inibição da formação de septos na membrana citoplasmática (Brogden, 2005; Cudic e Otvos, 2002). Além disso, a morte celular pode ocorrer a partir de eventos independentes que ocorrem individualmente ou complementares a outros mecanismos de ação (Straus e Hancock, 2006). Evidências sugerem que AMPs exercem a sua ação antimicrobiana por induzir excessivamente a acumulação de ROS intracelular, o que causa danos moleculares levando à morte celular. As defensinas de planta *NdD1* (van der Weerden et al., 2008), *Rs-AFP2* (Aerts et al., 2007), *PvD1* (de sementes de *Phaseolus vulgaris*) (Mello et al., 2011) e *Hs-AFP1* (de sementes de *Heuchera sanguinea*) (Aerts et al., 2011) apresentaram capacidade de induzir ROS nos organismos alvos e alguns destes trabalhos têm mostrado uma ligação direta entre a geração de ROS e os efeitos antifúngicos dessas defensinas de planta. ROS, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), são moléculas reativas que são geradas comumente durante o metabolismo celular (Kowaltowski et al., 2009), e a falha na detoxificação de ROS leva direto ou indiretamente a danos no DNA, oxidação de proteínas, carboidratos e lipídeos (Shackelford et al., 2000). Baseado nestas observações foi especulado que o mecanismo envolvido na morte de *S. cerevisiae* poderia ser a indução da produção descontrolada de ROS. Assim, um teste foi feito para verificar se as células de *S. cerevisiae* tratadas com a *ApDef1* apresentariam um aumento na produção de H_2O_2 . Este teste foi realizado por meio da análise da polimerização do DAB, que é absorvido pelas células e reage com H_2O_2 intracelular quando a atividade de peroxidase está presente, e por oxidação o DAB imediatamente forma um polímero insolúvel de coloração marrom avermelhada. As células de *S. cerevisiae* após tratamento com a *ApDef1* apresentaram coloração marrom avermelhada no interior das células similar à observada nas células tratadas com ácido acético (Fig. 13), indicando assim que houve um aumento da produção endógena de H_2O_2 pelas células. O mesmo não aconteceu nas células controle, sugerindo assim que a produção de H_2O_2 é especificamente causada pela *ApDef1*.

Visto que *ApDef₁* induz a produção de H₂O₂ em células de *S. cerevisiae*, foi analisado se o estresse oxidativo resultante é de fato relevante para a morte celular induzida pela *ApDef₁*. Esta análise foi feita utilizando o ácido ascórbico, um composto antioxidante amplamente conhecido, que elimina ROS. Na presença do antioxidante, as células de *S. cerevisiae* não têm o seu crescimento afetado pela *ApDef₁* durante as 18 h de tratamento (Fig. 14). Portanto, o ácido ascórbico foi capaz de evitar a morte celular induzida pela *ApDef₁* indicando que o efeito tóxico provocado pela defensina na célula ocorre através de estresse oxidativo.

Outro mecanismo que leva a morte celular é a permeabilização de membranas. No ensaio realizado foi observado que a *ApDef₁* é capaz de permeabilizar a membrana das células de *S. cerevisiae*, mostrando já nos primeiros 5 min de incubação 19,4% de células permeabilizadas e atingindo 76,8% depois de 1 h (Fig. 15A e B). Este resultado mostrou que a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* interfere com a membrana plasmática permeabilizando-a. Estes resultados são semelhantes aos relatos de Thevissen et al. (2007) que mostraram que as defensinas de plantas são capazes de permeabilizar a membrana de levedura e o fungo filamentoso (Thevissen et al., 1999). Recentemente Mello et al. (2011) também mostraram que a defensina *PvD1* é capaz de permeabilizar a membrana dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium laterithium* e das leveduras *Candida parapsilosis*, *Pichia membranifaciens*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae* na presença de 100 µg/mL.

Esse evento de permeabilização corrobora com os fatores envolvidos interação AMP-microrganismo (já expostos anteriormente) e com o estudo onde mostra que a *PsD1* pode interagir com membranas (Medeiros et al., 2010). Contraditoriamente, foi visto que a defensina *Rs-AFP2*, em concentrações variando de 20 a 50 µg/ml, não interage com pequenas vesículas unilamelares compostas de lipídeo contendo diferentes moléculas, como colesterol, fosfatidilserina e fosfatídico e até mesmo glicosilceramida (GlcCer), alvo conhecido de ligação desta defensina na membrana plasmática de *C. albicans* (Aerts et al., 2007). Estes resultados sugerem que a permeabilização da membrana pode ser um evento indireto da interação *Rs-AFP2*-fungo. Tomando essas duas diferentes situações e somado ao resultado obtido sobre o efeito

preventivo do ácido ascórbico para a morte celular *S. cerevisiae* pela *ApDef*₁ e os conhecidos efeitos tóxicos de ROS para os componentes celulares (Shackelford et al., 2000), foi levantada a hipótese de que a permeabilização de membranas das células de *S. cerevisiae* poderia ser indiretamente causada pela *ApDef*₁. A adição do ácido ascórbico no ensaio de permeabilização de membranas fez com que surpreendentemente as células não fossem permeabilizadas (Fig. 16 A e B), sendo capaz de reverter completamente a via que leva a morte celular induzida pela *ApDef*₁. Este resultado fortemente sugere que a permeabilização de membranas é um evento indireto da interação *ApDef*₁-*S. cerevisiae* e que o efeito tóxico causado pela *ApDef*₁ nas células ocorre via estresse oxidativo, devido ao acúmulo de ROS no interior da célula.

Sabe-se que quase 90% do ROS produzido na célula vem da mitocôndria (Batandier et al., 2002), e no ensaio para a detecção de ROS, as células de *S. cerevisiae* foram somente tratadas com a *ApDef*₁ e incubadas com o DAB. Dessa forma, pode-se afirmar que o H₂O₂, o qual estava em uma concentração forte o suficiente para permitir a polimerização do DAB, foi produzido endogenamente. Esse resultado permite deduzir que peroxidases ativas estão presentes nas células, uma vez que para que haja a polimerização do DAB a atividade destas enzimas é necessária (Thordal-Christensen et al., 1997). Dessa forma, os sistemas de limpeza de ROS nas células de *S. cerevisiae*, ao menos aqueles que se baseiam em reações enzimáticas, estariam funcionando. Este sistema de limpeza remove ROS produzido durante condições normais de crescimento e mantêm um ambiente redutor e é baseado em reações enzimáticas e substâncias antioxidantes que agem em conjunto. Entre essas enzimas estão as superóxido dismutases, catalases, GPXs e TRX peroxidases/peroxirredoxinas, glutarredoxinas e peroxidases (Barzilai et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009). Durante a respiração, os elétrons são transportados pela cadeia transportadora de elétrons e, eventualmente, alguns deles podem escapar desse sistema de transporte e reagir de forma inadequada com o oxigênio, resultando na formação de O₂^{•-}. A partir do O₂^{•-} uma cascata de anti-oxidante gera H₂O₂ e OH[•] (Kowaltowski et al., 2009). Assim, a produção de ROS pode estar ligada a uma disfunção mitocondrial (Mattiuzzi, 2004). O resultado da MET mostrou danos estruturais nas mitocôndrias das células de *S. cerevisiae* tratados com a *ApDef*₁ (Fig. 17), o que poderia ser uma provável fonte de ROS.

ROS podem agir como gatilhos primários da apoptose em leveduras (Greenlund et al., 1995; Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993; Slater et al., 1995) e alguns estudos ligaram o acúmulo de ROS à indução de apoptose. Madeo (1999) mostrou que indução da morte por apoptose através de vários estímulos gera a acumulação de ROS em células de levedura e mostrou que isso é necessário e suficiente para induzir um fenótipo apoptótico em levedura. Além disso, em organismos superiores, a condensação e a fragmentação do DNA cromossômico frequentemente estão envolvidos na apoptose (Ribeiro, 2006). Neste estudo, além da demonstração da acumulação de ROS, a *ApDef1* induz outro marcador de células apoptóticas. Após tratamento com *ApDef1*, o núcleo das células apresentava uma intensa e concentrada fluorescência, indicando condensação da cromatina (Fig. 18), que também foi confirmado por MET (Fig. 17). Fragmentação de DNA e condensação da cromatina são considerados os dois fenômenos mais representativos em células em apoptose em estágio tardio (Madeo et al., 1997).

A apoptose é um tipo de morte celular programada regulada por uma rede complexa de proteínas e vias metabólicas. A parte central deste processo é regulada por uma família de proteínas denominadas caspases (Madeo et al., 2009). Para se ter uma ideia mais clara sobre as características da morte celular induzida pela *ApDef1*, foi avaliado o envolvimento das caspases neste processo usando o marcador FITC-VAD-FMK. A exposição das células de *S. cerevisiae* à *ApDef1* resultou na ativação de caspases (Fig. 19). Vários estudos recentes têm sugerido que os AMPs, como as defensinas de planta *Rs-AFP2* (Aerts et al., 2009) e *Hs-AFP1* (Aerts et al., 2011), a lactoferrina humana (Andrés et al., 2008), melitina (do veneno da abelha *Apis mellifera*) (Park e Lee, 2010) e papiliocina (de larvas da borboleta *Papilio xuthus*) (Hwang et al., 2011) exercem a sua atividade antimicrobiana através da indução de apoptose em *C. albicans*. Além disso, foi avaliado se a indução de apoptose tinha um papel na morte celular de *S. cerevisiae* ou não. Os resultados indicam que o uso do inibidor de caspases Z-VAD-FMK evitou a perda da viabilidade das células de *S. cerevisiae* induzida pela *ApDef1* corroborando com evidência de ativação de caspases e seu requerimento para a morte celular induzida pela *ApDef1* (Fig. 20). Estes resultados mostram que caspases ativas ou proteases semelhantes à caspase desempenham um papel importante no modo de ação antifúngica da *ApDef1*. Os

dados coletivos apresentados neste estudo indicam que a *ApDef*₁ causou apoptose nas células de *S. cerevisiae* revelando alguns marcadores chaves da apoptose em levedura, como o aumento na geração de ROS, condensação da cromatina e presença de caspases ativas.

Neste trabalho são lançadas algumas evidências sobre o mecanismo de ação acerca da morte celular de *S. cerevisiae* induzida pela *ApDef*₁ e é proposto um modelo que resume os dados obtidos (Fig. 21). Tomado juntos os resultados e espelhando-os aos mecanismos de ação conhecidos das interações AMP-microrganismos é sugerido que a interação *ApDef*₁-*S. cerevisiae* ocorre de fora para dentro das células, inicialmente pela interação da *ApDef*₁ com algum componente da parede celular de *S. cerevisiae* (Fig. 21). Este local inicial da interação na parede celular parece ser necessário para a atividade de AMPs (Dielbandhosing et al., 1998; Edgerton et al., 1998; Yeaman e Yount, 2003). A partir deste sítio inicial de ligação na parede celular dos AMPs (que é ainda desconhecido para a *ApDef*₁), eles alcançam a membrana plasmática, onde os seus efeitos tóxicos iniciais são exercidos. Peschel (2002) afirma que o potencial de membrana pode participar na migração de AMPs da parede celular para a membrana plasmática, concentrando-os neste local. Esta argumentação é corroborada com alguns relatos mostrando que o potencial de membrana reduzido protege algumas células do efeito tóxico de AMPs (Falla et al., 1996; Gyurko et al., 2000). Este efeito também pode regular a migração da *ApDef*₁, uma vez que o CCCP bloqueia a morte celular de *S. cerevisiae*. Uma vez na membrana, AMPs carregados positivamente interagem com a superfície externa dos fosfolípidos com carga negativa ou outras moléculas. Tem sido identificado na membrana plasmática fúngica alguns alvos para defensinas de plantas, como os esfingolípídeos de membranas (Thevissen et al., 2003a). *Dm*-AMP1 (defensina da planta *Dhalia merckii*) (Thevissen et al., 2003b), *Ah*-AMP1 (defensina da planta de *Aesculus hippocastanum*) e *Ct*-AMP1 (defensina da planta *Clitoria ternatea*) (Osborn et al., 1995; Thevissen et al., 2003a; Thomma et al., 2002) interage com mannosildiinositolfosforilceramida (M(IP)2C) na membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Além disso, *Rs*-PAF2 interage com GlcCer na membrana de *C. albicans* (Thevissen, 2003). Dessa forma, especula-se que a atividade fungicida da *ApDef*₁ pode depender de uma interação secundária na membrana da célula de levedura, o que ainda é desconhecido no caso da *ApDef*₁

(Fig. 21). Para alguns AMPs, alvos citoplasmáticos foram demonstrados (Kragol et al., 2001; Lobo et al., 2007; Park et al., 2000), o que indica que estes AMPs entram nas células. A atividade antimicrobiana da histatina-5 em células de *C. albicans* foi associada com a entrada do AMP na célula através dos transportadores de poliaminas, Dur3p e Dur31p (Maurya et al., 2011). Um regulador de absorção de poliamina também foi associado com a atividade antifúngica da defensina de planta NaD1 (Bleackley et al., 2014). Há evidências de que o potencial de membrana pode governar a taxa de captação dos transportadores de poliaminas e que o CCCP fortemente diminui a absorção de poliaminas (Igarashi e Kashiwagi, 1999; Poulin et al., 1998, 1995). Estes resultados corroboram com o efeito protetor do CCCP na interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* e indica que um transportador pode estar envolvido na entrada da *ApDef₁* (Fig. 11). Se a *ApDef₁* entra nas células de *S. cerevisiae* ainda não foi determinado, no entanto, a interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae* provoca a morte celular, um processo que foi provado ser dependente do ciclo celular e dependente de um potencial de membrana preservado. Depois da interação, as células da levedura sofrem um aumento descontrolado na produção e acumulação de ROS (associado com alterações ultraestruturais nas mitocôndrias) que leva a permeabilização da membrana plasmática e a condensação da cromatina e, em última análise, a morte celular através de um processo apoptótico dependente de caspase.

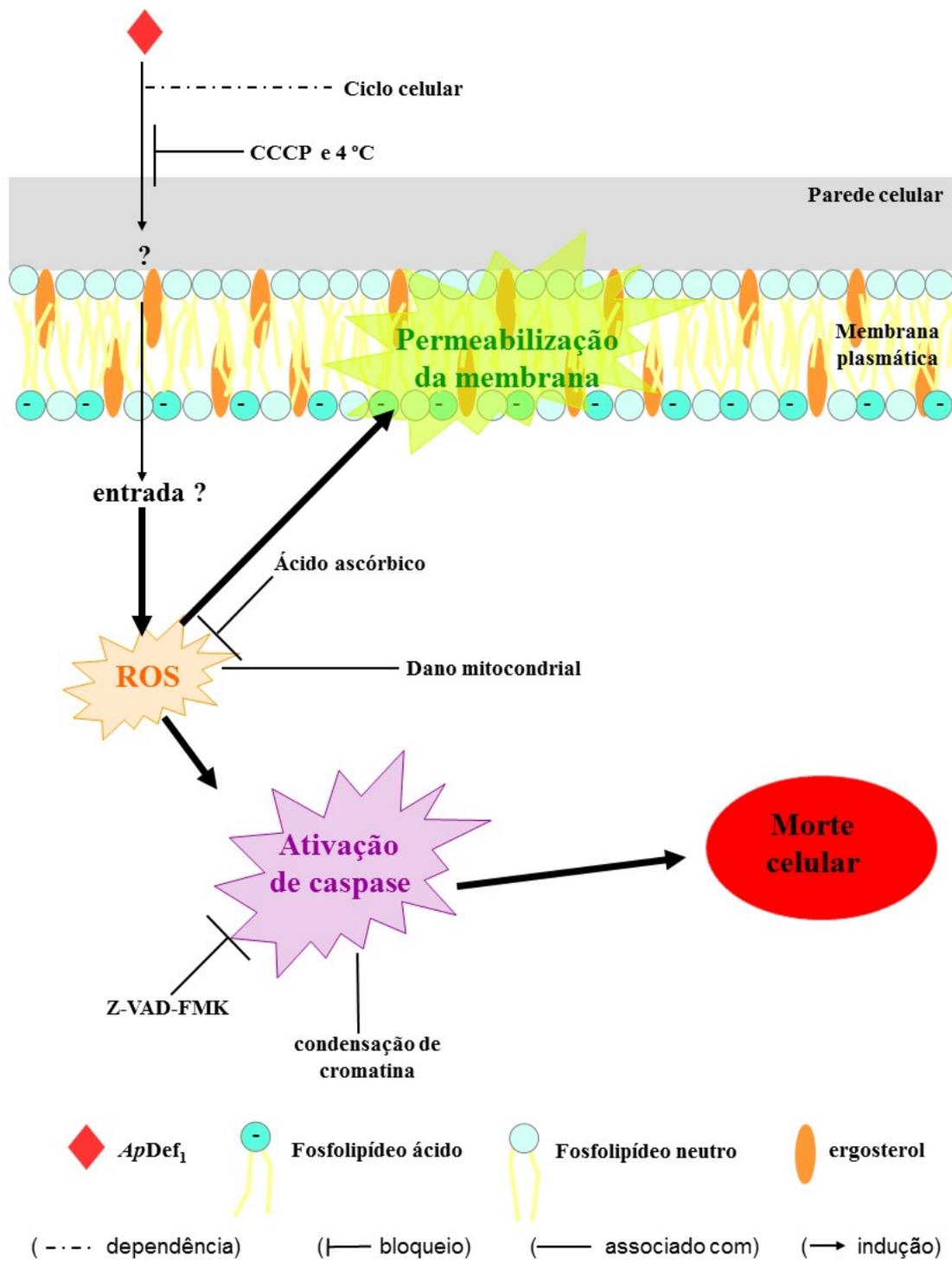


Figura 21: Modelo sugerido da interação *ApDef1-Saccharomyces cerevisiae* e mecanismos de ação baseados nos resultados apresentados neste trabalho.

6 CONCLUSÕES

As análises realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho permitem concluir que:

- A atividade fungicida da defensina *ApDef₁* sobre células de *S. cerevisiae* é dependente do ciclo celular;
- A *ApDef₁* não possui capacidade de se ligar diretamente ao DNA de *S. cerevisiae*;
- A ruptura do potencial de membrana influencia a atividade fungicida da *ApDef₁*;
- A atividade fungicida da *ApDef₁* sobre células de *S. cerevisiae* é bloqueada à temperatura de 4 °C;
- O tratamento com a *ApDef₁* induz o aumento da produção endógena de H₂O₂ pelas células de *S. cerevisiae*;
- O estresse oxidativo está envolvido na atividade fungicida da *ApDef₁* sobre células de *S. cerevisiae*;
- A atividade fungicida da *ApDef₁* tem como parte do mecanismo de ação a permeabilização da membrana plasmática de *S. cerevisiae*;
- A permeabilização da membrana plasmática é um evento indireto da interação *ApDef₁*-*S. cerevisiae*;
- A *ApDef₁* induz alterações ultraestruturais no núcleo e nas mitocôndrias das células de *S. cerevisiae*;
- A *ApDef₁* induz a condensação de cromatina nas células de *S. cerevisiae*;
- A exposição das células de *S. cerevisiae* à *ApDef₁* resulta na ativação de caspases;
- As caspases ativas estão envolvidas no processo de morte das células de *S. cerevisiae* induzido pela *ApDef₁*;
- A *ApDef₁* causa a morte por apoptose nas células de *S. cerevisiae*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adedapo, A.D. a, Osude, Y.O., Adedapo, A. a, Moody, J.O., Adeagbo, A.S., Olajide, O. a, Makinde, J.M., 2009. Blood Pressure Lowering Effect of *Adenanthera pavonina* Seed Extract on Normotensive Rats. *Rec. Nat. Prod.* 3, 82–89.
- Aerts, A.M., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B.P. a., Thevissen, K., 2011. The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera Sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida Albicans*. *Front. Microbiol.* 2, 47: 1–9.
- Aerts, A.M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., François, I.E.J. a., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B.P. a., Thevissen, K., 2009. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 583, 2513–2516.
- Aerts, A.M., Francois, I.E.J.A., Meert, E.M.K., Li, Q.-T., Cammue, B.P.A., Thevissen, K., 2007. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from raphanus sativus, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 243–247.
- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L., Valente, A.P., 2002. Solution Structure of *Pisum sativum* Defensin 1 by High Resolution NMR: Plant Defensins , Identical Backbone with Different Mechanisms of Action. *J. Mol. Biol.* 315, 749–757
- Anaya-López, J.L., López-Meza, J.E., Baizabal-Aguirre, V.M., Cano-Camacho, H., Ochoa-Zarzosa, A., 2006. Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol. Lett.* 28, 1101–1108.
- Andrés, M.T., Viejo-Díaz, M., Fierro, J.F., 2008. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K⁺-channel-mediated K⁺ efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4081–8.
- Antimicrobial peptide database. http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic_structure.php. Acessado em 28 de abril de 2016.
- Ara, A., Arifuzzaman, M., Ghosh, C.K., Hashem, M.A., Ahmad, M.U., Bachar, S.C., Nahar, L., Sarker, S.D., 2010a. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., Fabaceae, in experimental animals. *Rev. Bras.*

- Farmacogn. 20, 929–932.
- Ara, A., Saleh-e-in, M., Ahmed, N.U., 2013. Anti-diarrheal activity and acute toxicity of methanolic bark extract of *Adenanthera pavonina* L (Fabaceae) and its elemental composition 10, 263–271.
- Ara, A., Saleh-e-in, M., Ahmed, N.U., Ahmed, M., 2010b. Phytochemical screening , analgesic , antimicrobial and anti-oxidant activities of bark extracts of *Adenanthera pavonina* L. (Fabaceae). Adv. Nat. Sci. 4, 352–360.
- Ardiani, A., Higgins, J.P., Hodge, J.W., 2010. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. FEMS Yeast Res. 10, 1060–1069.
- Balls, A. K., Hale, W. S., Harris, T. H., 1942a. Cereal Chem. 19,279–288.
- Balls, A. K., Hale, W. S., Harris, T. H., 1942b. Cereal Chem. 19,840–844.
- Barr, M.M., 2003. Super models. Physiol. Genomics 13, 15–24.
- Barzilai, A., Rotman, G., Shiloh, Y., 2002. ATM deficiency and oxidative stress: A new dimension of defective response to DNA damage. DNA Repair (Amst). 1, 3–25. 6
- Batandier, C., Fontaine, E., Kériel, C., Lerverve, X.M., 2002. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. J. Cell. Mol. Med. 6, 175–187.
- Bauer, F., Schweimer, K., Klüver, E., Conejo-Garcia, J.-R., Forssmann, W.-G., Rösch, P., Adermann, K., Sticht, H., 2001. Structure determination of human and murine β -defensins reveals structural conservation in the absence of significant sequence similarity. Protein Sci. 10, 2470–2479.
- Belarmino, L.C., Benko-Iseppon, A.M., 2010. Databank based mining on the track of antimicrobial weapons in plant genomes. Curr Protein Pept Sci 11, 195–198.
- Benko-Iseppon, A.M., Crovella, S., 2010. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and perspectives. Curr. Protein Pept. Sci. 11, 189–194.
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R., Vaidya, T., 2003. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. Mol. Biochem. Parasitol. 127, 23–35.
- Berman, J., Sudbery, P.E., 2002. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. Nature 3, 918–930.

- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F., Molina, A., 2002. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol.* 128, 951–961.
- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I., Fridkin, M., 1990. All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Lett.* 274, 151–155.
- Bharadwaj, P., Martins, R., Macreadie, I., 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.* 10, 961–969.
- Bidou, L., Rousset, J.P., Namy, O., 2010. Translational errors: From yeast to new therapeutic targets. *FEMS Yeast Res.* 10, 1070–1082.
- Bierbaum, G., Sahl, H.G., 1985. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch. Microbiol.* 141, 249–54.
- Bleackley, M.R., Wiltshire, J.L., Perrine-Walker, F., Vasa, S., Burns, R.L., van der Weerden, N.L., Anderson, M.A., 2014. Agp2p, the Plasma Membrane Transregulator of Polyamine Uptake, Regulates the Antifungal Activities of the Plant Defensin NaD1 and Other Cationic Peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2688–2698.
- Bloch, C., Patel, S.U., Baud, F., Zvelebil, M.J., Carr, M.D., Sadler, P.J., Thornton, J.M., 1998. ¹H NMR structure of an antifungal gamma-thionin protein Slalpha1: similarity to scorpion toxins. *Proteins* 32, 334–49.
- Bloch, C., Richardson, M., 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS Lett.* 279, 101–104.
- Bohlmann, H., Broekaert, W., 1994. The Role of Thionins in Plant Protection. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 1–16.
- Bolotin-Fukuhara, M., Dumas, B., Gaillardin, C., 2010. Yeasts as a model for human diseases. *FEMS Yeast Res.* 10, 959–960.
- Boman, H.G., 2003. Antibacterial peptides : basic facts and emerging concepts. *J. Inter. Med.* 254: 197–215
- Boman, H.G., Agerberth, B., Boman, A., 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from

- pig intestine. *Infect. Immun.* 61, 2978–84.
- Brazas, M.D., Hancock, R.E.W, 2005. Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic resistance. *Drug Discov. Today* 10, 1245–1252.
- Broekaert, I., Lee, H.I., Kush, A., Chua, N.H., Raikhel, N., 1990. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7633–7.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P. A, De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W., Osborn, R.W., Nielson, K., 1997. Antimicrobial Peptides from Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 297–323.
- Broekaert, W.F., Leuven, K.U., Croylaan, W. De, 1995. Plant Defensins : Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host Defense System. *Plant Physiol.* 108: 1353-1 358.
- Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H., Peumans, W.J., 1989. A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. *Science* 245, 1100–1102.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
- Bruix, M., Jimenez, M.A., Santoro, J., Gonzalez, C., Colilla, F.J., Mendez, E., Rico, M., 1993. Solution structure of .gamma.1-H and .gamma.1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by proton NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochem.* 32, 715–724.
- Burkil, H.M., 1994. The useful plants of west tropical Africa. 2nd Edition. Vol. 2, Royal botanical gardens, Kew Richmond, United Kingdom 636p.
- Cammue, B.P., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R.W., Guerbet, F., Kader, J.C., 1995. A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* 109, 445–455.
- Carvalho, A.O., Teodoro, C.E.D., Da Cunha, M., Okorokova-Facanha, A.L., Okorokov, L.A, Fernandes, K.V.S., Gomes, V.M., 2004. Intracellular Localization of a Lipid Transfer Protein in *Vigna Unguiculata* Seeds. *Physiol. Plant.* 122, 328–336.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M., 2009. Plant defensins- Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30, 1007–1020.

- Carvalho, A.O., Gomes, V.M., 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-A concise review. *Peptides* 28, 1144–1153.
- Carvalho, A.O., Gomes, V.M., 2011. Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Curr. Pharm. Des.* 17, 4270–4293.
- Carvalho, A.O., Machado, O.L.T., Cunha, M. Da, Santos, I.S., Gomes, V.M., 2001. Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 137–146.
- Castro, M.S., Fontes, W., 2005. Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept. Lett.* 12, 11–16.
- Chandra, S., Verma, M., Saxena, H., 1982. Triterpenoids of *Adenantha pavonina* Root. *Int. J. Crude Drug Res.* 20, 165–167.
- Cho, Y., Turner, J.S., Dinh, N.N., Lehrer, R.I., 1998. Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 66, 2486–2493.
- Choi, Y., Choi, Y.D., Lee, J.S., 2008. Antimicrobial activity of gamma-thionin-like soybean SE60 in *E. coli* and tobacco plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 230–234.
- Colilla, F.J., Rocher, A., Mendez, E., 1990. γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 270, 191–194.
- Conlon, J.M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., 2004. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1696, 1–14.
- Craik, D.J., Fairlie, D.P., Liras, S., Price, D., 2013. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 81, 136–147.
- Cudic, M., Otvos, L., 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets* 3, 101–6.
- Delneri, D., 2010. Barcode technology in yeast: Application to pharmacogenomics. *FEMS Yeast Res.* 10, 1083–1089.
- Diamond, G., Russell, J.P., Bevins, C.L., 1996. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5156–60.
- Dielbandhoesing, S.K., Zhang, H., Caro, L.H., van der Vaart, J.M., Klis, F.M.,

- Verrips, C.T., Brul, S., 1998. Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4047–52.
- Dirick, L., Böhm, T., Nasmyth, K., 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4803–13.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A., Heredia, A., 2015. Plant cutin genesis: Unanswered questions. *Trends Plant Sci.* 20, 551–558.
- Duvick, J.P., Rood, T., Rao, a G., Marshak, D.R., 1992. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* 267, 18814–18820.
- Edgerton, M., Koshlukova, S.E., Lo, T.E., Chrzan, B.G., Straubinger, R.M., Raj, P. a., 1998. Candidacidal activity of salivary histatins: Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273, 20438–20447.
- Elford, H.L., 1968. Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 129–135.
- Epand, R.M., Vogel, H.J., 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1462, 11–28.
- Epple, P., 1997. Overexpression of an Endogenous Thionin Enhances Resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509–520.
- Falla, T.J., Nedra Karunaratne, D., Hancock, R.E.W., 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* 271, 19298–19303.
- Fant, F., Vranken, W., Broekaert, W., Borremans, F., 1998. Determination of the Three-dimensional Solution Structure of *Raphanus sativus* Antifungal Protein 1 by H NMR. *J. Mol. Biol.* 279, 257–270.
- Fisher, N., Redman, D., Elton, G.A., 1968. Fractionation and Characterization of purothionin. *Cereal Chem.* 45, 48–57.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W.A., Belanger, P.H., Edwards, J.E., Filler, S.G., 1998. Expression of the *Candida albicans* gene ALS1 in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 66, 1783–1786.
- Gallo, R.L., Murakami, M., Ohtake, T., Zaiou, M., 2002. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *J. Allergy Clin.*

Immunol. 110, 823–831

- Ganz, T., Lehrer, R.I., 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: Biology and applications. *Mol. Med. Today* 5, 292–297.
- Gao, B., Rodriguez, M.D.C., Lanz-Mendoza, H., Zhu, S., 2009. AdDLP, a bacterial defensin-like peptide, exhibits anti-*Plasmodium* activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 393–398.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J.M., López-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M., Poza-Carrión, C., 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defence. *FEBS Lett.* 498, 219–222.
- Gaur, N.K., Klotz, S.A., 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, ALA1, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* 65, 5289–5294.
- Gennaro, R., Zanetti, M., Benincasa, M., Podda, E., Miani, M., 2002. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr. Pharm. Des.* 8, 763–78.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S., 2007. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sci.* 2, 1–33.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 Genes conveniently among the different interna- Old Questions and New Answers The genome . At the beginning of the se- of its more complex relatives in the eukary- cerevisiae has been completely sequenced Schizosaccharomyces pombe indicate. *Science* 274, 546–567.
- Golshani, F., Fakheri, B.A., Behshad, E., Vashvaei, R.M., 2015. PRs proteins and their mechanism in plants. *Biol Forum Int J.* 7, 477–495.
- Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L., Johnson, E.M., 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14, 303–15.
- Gyrko, C., Lendenmann, U., Troxler, R.F., Oppenheim, F.G., 2000. *Candida albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44,

348–54.

- Hancock, R. E. Chapple, D.S., 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317–1323.
- Hancock, R.E., Scott, M.G., 2000. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8856–61.
- Hancock, R.E.W., 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect. Dis.* 5, 209–218.
- Hancock, R.E.W., Rozek, A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 143–149.
- Hancock, R.E.W., Sahl, H.G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551–7.
- Henson, M. A., 2003a. Dynamic modeling and control of yeast cell populations in continuous biochemical reactors. *Comput. Chem. Eng.* 27, 1185–1199.
- Henson, M. A., 2003b. Dynamic modeling of microbial cell populations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 460–467.
- Hieter, P., 2008. The yeast genome and clinical genetics. *Clin. Genet.* 54, 113–116.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J., 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241–251.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr., C.A., Ezekowitz, R. A. B., 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284, 1313.
- Holm, T., Netzereab, S., Hansen, M., Langel, Ü., Hällbrink, M., 2005. Uptake of cell-penetrating peptides in yeasts. *FEBS Lett.* 579, 5217–5222.
- Huang, G.J., Lai, H.C., Chang, Y.S., Sheu, M.J., Lu, T.L., Huang, S.S., Lin, Y.H., 2008. Antimicrobial, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase activities of defensin from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. “Tainong 57”) storage roots. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2989–2995.
- Huang, H.W., 2006. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1292–1302.
- Huang, H.W., 2000. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry* 39, 8347–8352.
- Hughes, P., Dennis, E., Whitecross, M., Llewellyn, D., Gage, P., 2000. The

- cytotoxic plant protein, beta-purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 823–7.
- Hultmark, D., Engström, A., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H., Boman, H.G., 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2, 571–6.
- Hwang, B., Hwang, J.S., Lee, J., Kim, J.K., Kim, S.R., Kim, Y., Lee, D.G., 2011. Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 89–93.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K., 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* 344 Pt 3, 633–642.
- Iwai, T., Kaku, H., Honkura, R., Nakamura, S., Ochiai, H., Sasaki, T., Ohashi, Y., 2002. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15, 515–521.
- Janssen, B.J.C., Schirra, H.J., Lay, F.T., Anderson, M. a., Craik, D.J., 2003. Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. *Biochemistry* 42, 8214–8222.
- Jarczak, J., Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Strzałkowska, N., Józwick, A., Horbańczuk, J., Krzyzewski, J., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., 2013. Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum. Immunol.* 74, 1069–1079.
- Jayasinghe, P.K.I.D.E., Bandara, B.M.R., Ekanayaka, E.W.M.A., Theyanesam, V., 2006. Screening for antimicrobial activity *Ofacronychia pedlinculata* (ankenda) and *Adenantha pavonina* (madatiya) against bacteria causing skin and wound infections in humans. *Proc. of the Perad. Univ. Res. Sess.* 11, 105.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491–511.
- Kaas, Q., Westermann, J.C., Henriques, S.T. Craik, D.J., 2010. Antimicrobial peptides in plants. In Wang, G., 2010 (Ed). *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies*, AMCM 40-71.
- Kader, J., 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:627–54.
- Kader, J.C., 1975. Proteins and the intracellular exchange of lipids. *Biochim.*

- Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab. 380, 31–44.
- Kader, J.C., Julienne, M., Vergnolle, C., 1984. Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 139, 411–416.
- Kane, D.J., Sarafian, T. a, Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T., Bredesen, D.E., 1993. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262, 1274–1277.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D., 1981. Indian medicinal plants. India: International book distributors. Vol. 1, 852p.
- Kohn, H., Widger, W., 2005. The molecular basis for the mode of action of bicyclomycin. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 5, 273–295.
- Kong, M., Barnes, E. a, Ollendorff, V., Donoghue, D.J., 2000. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J.* 19, 1378–1388.
- Kourie, J.I., Shorthouse, A.A., 2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C1063–C1087.
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–43.
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R., Otvos, L., 2001. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40, 3016–3026.
- Kushmerick, C., Castro, M.D., Cruz, J.S., Bloch, C., Beirao, P.S.L., 1998. Functional and structural features of gamma-zeathionins, a new class of sodium channel blockers. *Febs Lett.* 440, 302–306.
- Lai, Y., Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131–141.
- Lay, F.T., Anderson, M.A, 2005. Defensins--components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6, 85–101.
- Lay, F.T., Schirra, H.J., Scanlon, M.J., Anderson, M.A., Craik, D.J., 2003. The Three-dimensional Solution Structure of NaD1, a New Floral Defensin from *Nicotiana glauca* and its Application to a Homology Model of the Crop Defense Protein alfAFP. *J. Mol. Biol.* 325, 175–188.

- Letousey, P., de Zélicourt, A., dos Santos, C.V., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P., Delavault, P., 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathol.* 56, 536–546.
- Lew, D.J., Reed, S.I., 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* 120, 1305–20.
- Liang, J.F., Kim, S.C., 1999. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. *J. Pept. Res.* 53, 518–22.
- Lobo, D.S., Pereira, I.B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L.N., Cabral, L.M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R.C., Linden, R., Kurtenbach, E., 2007. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46, 987–996.
- Lohner, K., 2003. Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1321–1321.
- López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., Aguilar, J.A., Loeza-Lara, P.D., 2011. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application, in: Komorowska, M.A., Olsztynska-Janus, S. (Eds.), *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*. InTech, pp. 275–304.
- Madeo, F., 1999. Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J. Cell Biol.* 145, 757–767.
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Büttner, S., Eisenberg, T., Kroemer, G., 2009. Caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 227–31.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Fröhlich, K.U., 1997. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* 139, 729–734.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K., 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419, 399–403.
- Matsuzaki, K., 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1462, 1–10.
- Matsuzaki, K., Sugishita, K.I., Harada, M., Fujii, N., Miyajima, K., 1997. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1327, 119–

130.

- Mattiazzi, M., 2004. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum. Mol. Genet.* 13, 869–879
- Maurya, I.K., Pathak, S., Sharma, M., Sanwal, H., Chaudhary, P., Tupe, S., Deshpande, M., Chauhan, V.S., Prasad, R., 2011. Antifungal activity of novel synthetic peptides by accumulation of reactive oxygen species (ROS) and disruption of cell wall against *Candida albicans*. *Peptides* 32, 1732–1740.
- Medeiros, L.N., Angeli, R., Sarzedas, C.G., Barreto-Bergter, E., Valente, A.P., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L., 2010. Backbone dynamics of the antifungal Psd1 pea defensin and its correlation with membrane interaction by NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798, 105–113.
- Mello, E.O., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C., Gomes, V.M., 2011. Antifungal Activity of PvD1 Defensin Involves Plasma Membrane Permeabilization, Inhibition of Medium Acidification, and Induction of ROS in Fungi Cells. *Curr. Microbiol.* 62, 1209–1217.
- Melo, F.R., Rigden, D.J., Franco, O.L., Mello, L. V., Ary, M.B., Grossi De Sa, M.F., Bloch, C., 2002. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 48, 311–319.
- Méndez, E., Moreno, a, Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M., de Haro, C., 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194, 533–539.
- Méndez, E., Rocher, a, Calero, M., Girbés, T., Citores, L., Soriano, F., 1996. Primary structure of omega-hordothionin, a member of a novel family of thionins from barley endosperm, and its inhibition of protein synthesis in eukaryotic and prokaryotic cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* 239, 67–73.
- Molina, A., Segura, A., García-Olmedo, F., 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316, 119–122.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sönksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L.,

- Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S.G., Sørensen, M. V., Christensen, B.E., Kjærulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R.I., Zasloff, M., Kristensen, H.-H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437, 975–980.
- Nakatsuji, T., Gallo, R.L., 2012. Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *J. Invest. Dermatol.* 132, 887–895.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F., Vogel, H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29, 464–472.
- Nicolas, P., Vanhoye, D., Amiche, M., 2003. Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides. *Peptides* 24, 1669–1680.
- Odintsova, T., Egorov, T., 2012. Plant Antimicrobial Peptides, in: Irving, H.R., Gehring, C. (Eds.), *Signaling and Communication in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 107–133.
- Osborn, R.W., De Samblanx, G.W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S., Van Leuven, F., Attenborough, S., Rees, S.B., Broekaert, W.F., 1995. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.* 368, 257–262.
- Palermo, E.F., Kuroda, K., 2010. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1605–1615.
- Papo, N., Shai, Y., 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 784–790.
- Parachin, N.S., Franco, O.L., 2014. New edge of antibiotic development: antimicrobial peptides and corresponding resistance, *Front. Microb.* 1-144.
- Park, C., Lee, D.G., 2010. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 170–172.
- Park, C.B., Kim, H.S., Kim, S.C., 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 253–257.
- Park, C.J., Park, C.B., Hong, S.S., Lee, H.S., Lee, S.Y., Kim, S.C., 2000. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-*

- pastoris*. Plant Mol. Biol. 44, 187–197.
- Pato, C., Le Borgne, M., Le Baut, G., Le Pape, P., Marion, D., Douliez, J.P., 2001. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. Biochem. Pharmacol. 62, 555–560.
- Pelegriani, P.B., Franco, O.L., 2005. Plant γ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2239–2253.
- Pelegriani, P.B., Lay, F.T., Murad, A.M., Anderson, M.A., Franco, O.L., 2008. Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. Proteins Struct. Funct. Genet. 73, 719–729.
- Peschel, A., 2002. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? Trends Microbiol. 10, 179–186.
- Picart, P., Pirtilaa, A.-M., Raventos, D., Kristensen, H.-H., Sahl, H.-G., 2012. Identification of defensin-encoding genes of *Picea glauca*: characterization of PgD5, a conserved spruce defensin with strong antifungal activity. BMC Plant Biol. 12, 180.
- Pitta, M.G. da R., Pitta, M.G. da R., Galdino, S.L., 2010. Development of Novel Therapeutic Drugs in Humans from Plant Antimicrobial Peptides. Curr. Protein Pept. Sci. 11, 236–247.
- Poulin, R., Lessard, M., Zhao, C., 1995. Inorganic cation dependence of putrescine and spermidine transport in human breast cancer cells. J. Biol. Chem. 270, 1695–704.
- Poulin, R., Zhao, C., Verma, S., Charest-Gaudreaut, R., Audette, M., 1998. Dependence of mammalian putrescine and spermidine transport on plasma-membrane potential: identification of an amiloride binding site on the putrescine carrier. Biochem. J. 330, 1283–1291.
- Powers, J.P.S., Hancock, R.E.W., 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides 24, 1681–91.
- Preet, S., Bharati, S., Shukla, G., Koul, A., Rishi, P., 2011. Evaluation of amoebicidal potential of Paneth cell cryptdin-2 against *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 5:12, e1386.
- Prenner, E.J., Lewis, R.N.A., McElhaney, R.N., 1999. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1462, 201–221.

- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., Rajendhran, J., 2013. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *Int. J. Pept.* 2013, 1–15.
- Resnick, M.A., Cox, B.S., 2000. Yeast as an honorary mammal. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 451, 1–11.
- Ribeiro, G.F., 2006. Characterization of DNA Damage in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid, and Hyperosmotic Shock. *Mol. Biol. Cell* 17, 4584–4591.
- Rocas, A.N., 2003. *Adenanthera pavonina* L. In: Vozzo, JA (Org). Tropical tree seed manual. United States: Department of agriculture Forest Service, p. 269-271.
- Rodrigo, K., Jayasingha, U.L.B., Bandara, B.M.R., 2007. Antifungal, antioxidant and cytotoxic activity of *Acronychia pedunculata* and *Adenanthera pavonina*. *P Peradeniya Univ Res Sessions-Sri Lanka* 12: 94-95.
- Rozek, A., Friedrich, C.L., Hancock, R.E.W., 2000. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39, 15765–15774.
- Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J., Norman, D.G., 1995. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* 34, 4147–4158.
- Safi, H., Saibi, W., Alaoui, M.M., Hmyene, A., Masmoudi, K., Hanin, M., Brini, F., 2015. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 89, 64–75.
- Sagaram, U.S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T.J., Shah, D.M., 2011. Structure-Activity Determinants in Antifungal Plant Defensins MsDef1 and MtDef4 with Different Modes of Action against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 6:4, e18550.
- Sakaki, T., Zähringer, U., Warnecke, D.C., Fahl, A., Knogge, W., Heinz, E., 2001. Sterol glycosides and cerebrosides accumulate in *Pichia pastoris*, *Rhynchosporium secalis* and other fungi under normal conditions or under heat shock and ethanol stress. *Yeast* 18, 679–695.
- Samblanx, G.W., Fernandez del Carmen, A., Sijtsma, L., Plasman, H.H., Schaaper, W.M., Posthuma, G.A., Fant, F., Meloen, R.H., Broekaert, W.F., van Amerongen, A., 1996. Antifungal activity of synthetic 15-mer peptides based on the Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* antifungal protein 2) sequence.

Pept. Res. 9, 262–268

- Samuel, D., Liu, Y.-J., Cheng, C.-S., Lyu, P.-C., 2002. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.* 277, 35267–35273.
- Santos, I.S., Carvalho, A.O., Souza-Filho, G.A., Nascimento, V. V., Machado, O.L.T., Gomes, V.M., 2010. Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect α -amylase inhibitory activity. *Protein Expr. Purif.* 71, 8–15.
- Schaaper, W.M.M., Posthuma, G.A., Meloen, R.H., Plasman, H.H., Sijtsma, L., van Amerongen, A., Fant, F., Borremans, F.A.M., Thevissen, K., Broekaert, W.F., 2001. Synthetic peptides derived from the beta2-beta3 loop of *Raphanus sativus* antifungal protein 2 that mimic the active site. *J. Pept. Res.* 57, 409–418.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A., García-olmedo, F., 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 16–23.
- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883–2894.
- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S., 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1387–404.
- Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1462, 55–70.
- Sherman, F., 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350, 3–41.
- Sinha, N.K., Snustad, D.P., 1972. Mechanism of inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by hydroxyurea. *J. Bacteriol.* 112, 1321–4.
- Slater, A.F.G., Stefan, C., Nobel, I., Van Den Dobbelen, D.J., Orrenius, S., 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.* 82-83, 149–153.

- Soares JR, (2012). Purificação e caracterização de uma defensina de sementes de *Adenantha pavonina* L. e avaliação de sua atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação -Campos dos Goytacazes, RJ, - Centro de Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, 63p.
- Soares, J.R., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Machado, O.L.T., Nascimento, V.V., Vasconcelos, I.M., Ferreira, A.T.S., Perales, J.E.A., Gomes, V.M., 2012. Antimicrobial Peptides from *Adenantha pavonina* L. Seeds: Characterization and Antifungal Activity. *Protein Pept. Lett.* 19, 520–529.
- Spelbrink, R.G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T.J., Shah, D.M., Hockerman, G.H., 2004. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.* 135, 2055–2067.
- Stec, B., 2006. Plant thionins - The structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1370–1385.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., Van Kammen, A., De Vries, S.C., 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907–921.
- Straus, S.K., Hancock, R.E.W., 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1215–1223.
- Subbalakshmi, C., 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 91–96.
- Suter, B., Auerbach, D., Stagljar, I., 2006. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond. *Biotechniques* 40, 625–644.
- Taylor, R., Acland, D., Attenborough, S., Broekaert, W., 1997. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272:39, 24480–24487.
- Tenreiro, S., Outeiro, T.F., 2010. Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res.* 10, 970–979.
- Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R.W., Kester,

- a, Rees, S.B., Torrekens, S., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7, 573–588.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H.M.E., De Bolle, M.F.C., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P. a, Broekaert, W.F., 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267, 15301–15309.
- Terras, F.R.G., Torrekens, S., Leuvenb, F. Van, Osborn, R.W., Vanderleyden, J., Cammuea, B.P.A., Broekaerta, W.F., 1993. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species 316, 233–240.
- The International Plant Names Index em <http://www.ipni.org>, consulta feita em 27 de março de 2016.
- Thevissen, K., 2003. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279, 3900–3905.
- Thevissen, K., Cammue, B.P., Lemaire, K., Winderickx, J., Dickson, R.C., Lester, R.L., Ferket, K.K., Van Even, F., Parret, A.H., Broekaert, W.F., 2000a. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9531–9536.
- Thevissen, K., Ferket, K.K.A., François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., 2003a. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides* 24, 1705–1712.
- Thevissen, K., François, I.E.J., Takemoto, J.Y., Ferket, K.K., Meert, E.M., Cammue, B.P., 2003b. DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 169–173.
- Thevissen, K., Kristensen, H.H., Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., François, I.E.J.A., 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today* 12, 966–971.
- Thevissen, K., Osborn, R.W., Acland, D.P., Broekaert, W.F., 2000b. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 54–61.

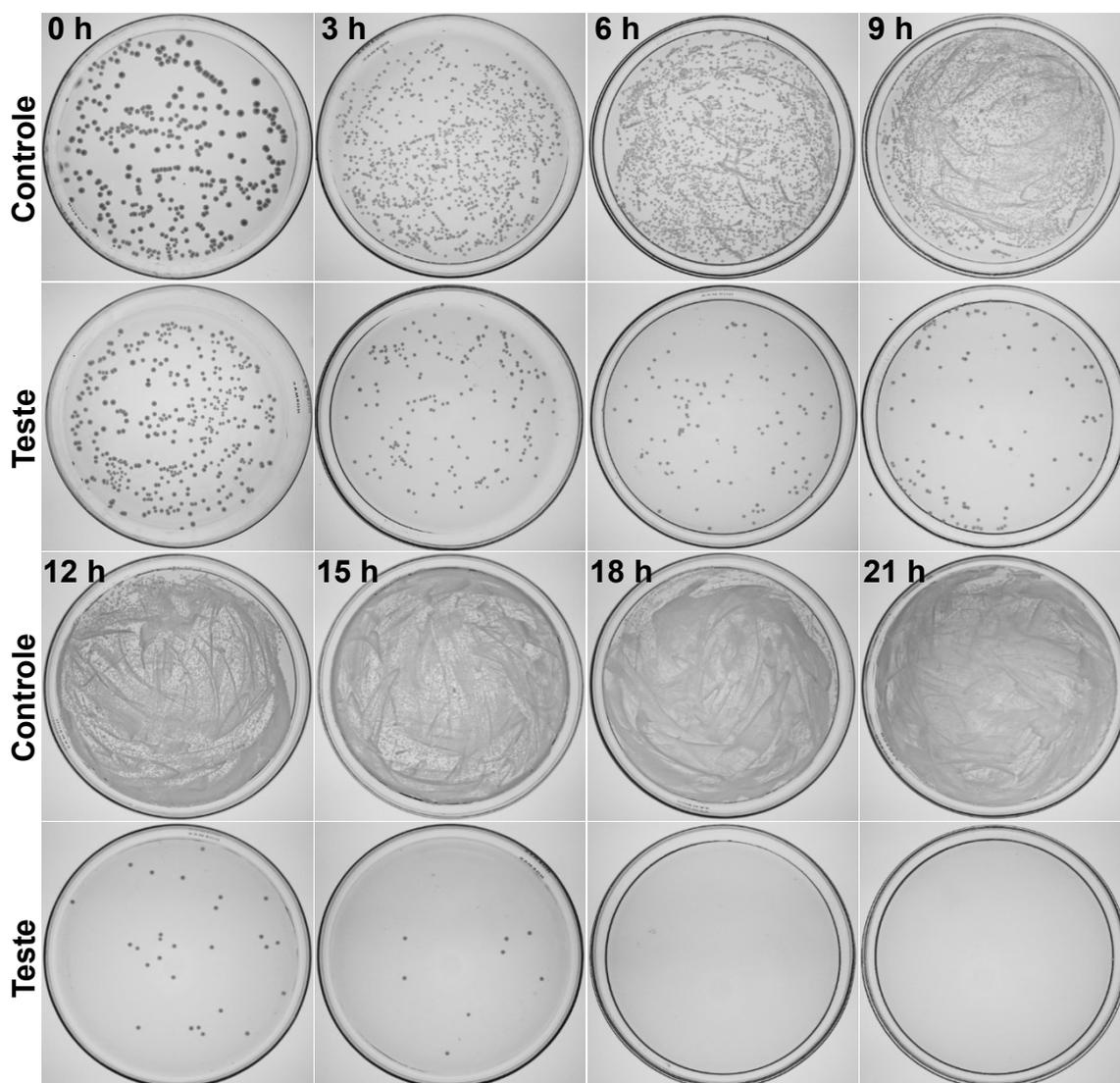
- Thevissen, K., Terras, F.R., Broekaert, W.F., 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5451–8.
- Thevissen, K., Warnecke, D.C., François, I.E.J.A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zähringer, U., Thomma, B.P.H.J., Ferket, K.K.A., Cammue, B.P.A., 2004. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *J. Biol. Chem.* 279, 3900–3905.
- Thoma, S., Kaneko, Y., Somerville, C., 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *Plant J.* 3, 427–436.
- Thomma, B., Cammue, B., Thevissen, K., 2002. Plant defensins. *Planta* 216, 193–202.
- Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P. a, Thevissen, K., 2003. Mode of action of plant defensins suggests therapeutic potential. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 3, 1–8.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:6, 1187–1194.
- Tropilab^R Inc. exporter. *Adenanthera pavonina* – Rede Sandalwood em www.tropilab.com. Consulta feita em 20 de março de 2016.
- Tsuboi, S., Osafune, T., Tsugeki, R., Nishimura, M., Yamada, M., 1992. Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J Biochem* 111, 500–508.
- van der Rest, M.E., Kamminga, a H., Nakano, a, Anraku, Y., Poolman, B., Konings, W.N., 1995. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59, 304–22.
- van der Weerden, N.L., Bleackley, M.R., Anderson, M.A., 2013. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3545–3570.
- van der Weerden, N.L., Hancock, R.E.W., Anderson, M.A., 2010. Permeabilization of Fungal Hyphae by the Plant Defensin NaD1 Occurs through a Cell Wall-dependent Process. *J. Biol. Chem.* 285, 37513–37520.
- van der Weerden, N.L., Lay, F.T., Anderson, M. a., 2008. The plant defensin,

- nad1, enters the cytoplasm of *fusarium oxysporum* hyphae. J. Biol. Chem. 283, 14445–14452.
- Vanhelmont, T., Vandebroek, T., De Vos, A., Terwel, D., Lemaire, K., Anandhakumar, J., Franssens, V., Swinnen, E., Van Leuven, F., Winderickx, J., 2010. Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. FEMS Yeast Res. 10, 992–1005.
- Vermelho, A.B., Pereira, A.F., Coelho, R.R.R., Souto-Pradrón, T., 2006. Práticas de Microbiologia, Editora Guanabara Koogan – 1ª edição – Rio de Janeiro.
- Vylkova, S., Sun, J.N., Edgerton, M., 2007. The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. Purinergic Signal. 3, 91–97.
- Wade, D., Boman, A., Wåhlin, B., Drain, C.M., Andreu, D., Boman, H.G., Merrifield, R.B., 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 4761–4765.
- Wang, G., 2008. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. J. Biol. Chem. 283, 32637–32643.
- Wang, G., Li, X., Wang, Z., 2016. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res. 44, D1087–D1093.
- Wang, G., Watson, K.M., Peterkofsky, A., Buckheit, R.W.Jr., 2010. Identification of novel human immunodeficiency virus type 1 inhibitory peptides based on the antimicrobial peptide database. Antimicrob Agents Chemother. 54:1343–1346.
- Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G., 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. London: E and S Livingstone Ltd, 1457p.
- Westerhoff, H. V, Hendler, R.W., Zasloff, M., Juretid, D., 1989. Interactions between a new class of eukaryotic antimicrobial agents and isolated rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 975, 361–369.
- Wickner, R.B., Shewmaker, F., Edskes, H., Kryndushkin, D., Nemecek, J., Bateman, D., Winchester, C., 2010. Prion amyloid structure explains templating: how proteins can be genes can be genes. FEMS Yeast Res. 10, 980–991.
- Wijaya, R., Neumann, G.M., Condrón, R., Hughes, A.B., Polya, G.M., 2000. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein

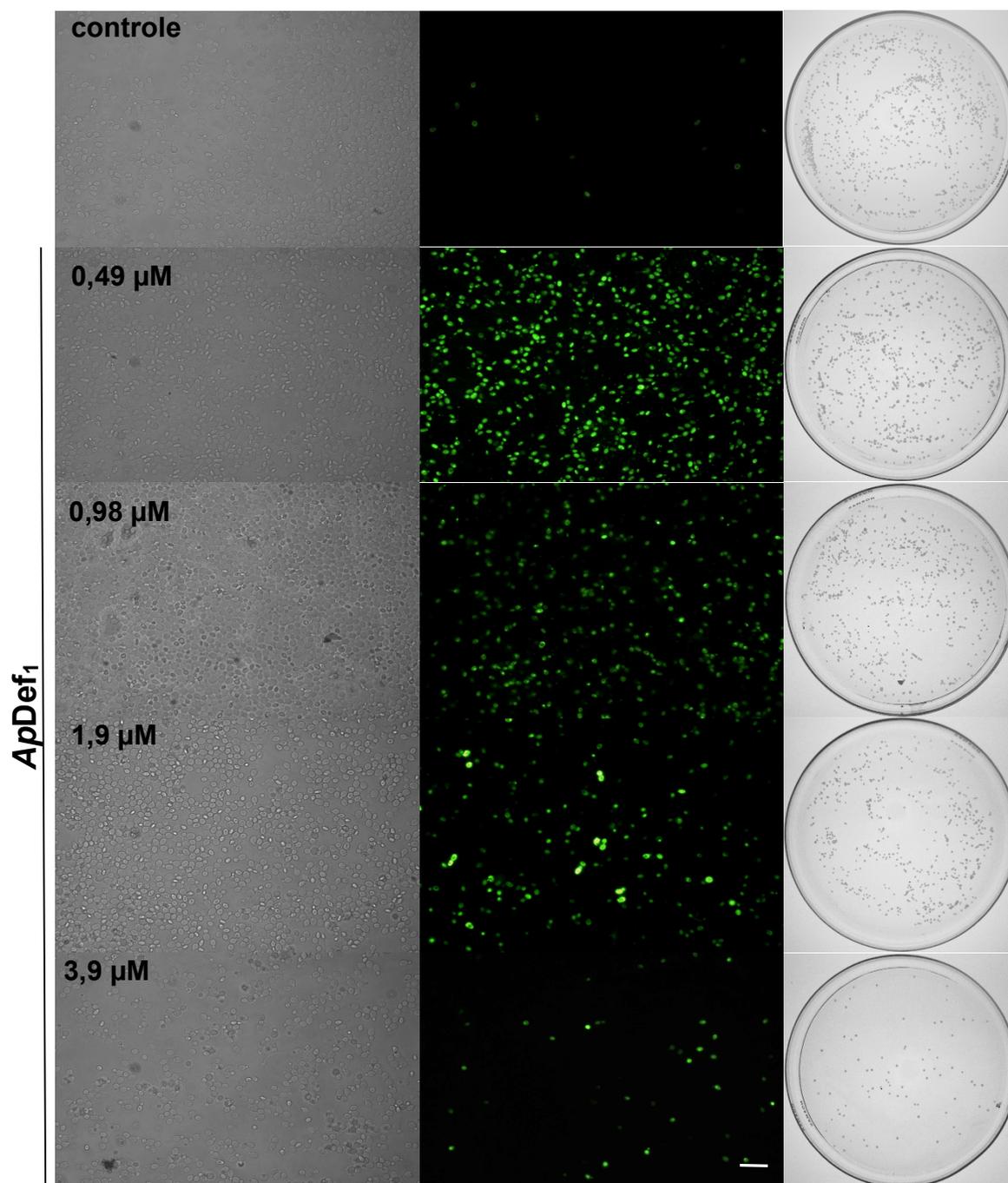
- homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci.* 159, 243–255.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R., Hancock, R.E.W., 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochem.* 38, 7235–7242.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N.Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M.Z., Oppenheim, J.J., 1999. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science* 286, 525–528.
- Yasin, B., Lehrer, R.I., Harwig, S.S.L., Wagar, E., 1996. Protegrins: structural requirements for inactivating elementary bodies in *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 64, 4863–4866.
- Yeaman, M.R., 2014. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 426–37.
- Yeaman, M.R., Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27–55.
- Yeoh, H.-H., Chin Wee, Y., Watson, L., 1984. Systematic variation in leaf amino acid compositions of leguminous plants. *Phytochem.* 23, 2227–2229.
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., Yu, X.-Q., 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5807–5822.
- Yount, N.Y., Yeaman, M.R., 2004. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7363–7368.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389–395.
- Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Champion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P., Delavault, P., 2007. Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche* parasitic plants. *Planta* 226, 591–600.
- Zhang, G., Sunkara, L.T., 2014. Avian antimicrobial host defense peptides: From biology to therapeutic applications. *Pharmaceuticals* 7, 220–247.
- Zhou, P., Huang, J., 2015. Computational peptidology. *Comput. Pept.* 1268, 1–333.
- Zhu, Y.J., Agbayani, R., Moore, P.H., 2007. Ectopic expression of *Dahlia merckii* defensin DmAMP1 improves papaya resistance to *Phytophthora palmivora*

by reducing pathogen vigor. *Planta* 226, 87–97.

8 ANEXOS



Anexo 1: Ensaio da cinética da morte celular de *Saccharomyces cerevisiae* incubada com a *ApDef₁*. Imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade das células de *S. cerevisiae* incubadas com 7,8 μM da *ApDef₁* (MIC) por até 21 h. Notar que nas placas de Petri que contém as células tratadas com a *ApDef₁*, o número de colônias diminui à medida que o tempo de incubação aumenta, perdendo todas as células a viabilidade com 18 h de incubação. Observar também que a população de células inicial não é homogeneamente afetada ao mesmo tempo. Resultado em Soares, 2012.



Anexo 2: Permeabilização das células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com a *ApDef*₁. Imagens das células tratadas com 3,9, 1,9, 0,98 e 0,49 μM da *ApDef*₁ por 36 h e incubadas com o corante fluorescente Sytox green para determinar a permeabilização da membrana plasmática por microscopia óptica. A fluorescência indica a presença de células permeabilizadas. Todas as imagens estão com o mesmo tempo de exposição. Na coluna da direita estão as imagens das placas de Petri mostrando a viabilidade das células de *S. cerevisiae* das concentrações correspondentes. Barra: 20 μm . Resultado em Soares, 2012.

*ApDef*₁ **KTCEKPSKFFSGGCVGTSGNKECDYLCRRGETLGDGAC-NFECVCHVGC**
PsD1 **KTCEHLADTYRGVCFT---NASCDDHCKNKAHLISGTCHNWKCFCTQNC**

Anexo 3: Comparação da sequência de aminoácidos entre *ApDef*₁ e *PsD1*. A similaridade entre as duas defensinas de planta é indicada pela presença de 17 aminoácidos idênticos (35 %) e 22 aminoácidos positivos (44 %). (**Negrito**) indica aminoácidos idênticos. (**Negrito e itálico**) indica aminoácidos positivos com características bioquímicas similares. (-) Gaps foram introduzidos para melhorar o alinhamento. A sequência da *ApDef*₁ foi obtida por Soares et al. (2012) e a sequência da *PsD1* foi obtida do UniProt (P81929-1). As sequências foram comparadas pelo BLAST suite-2sequences (em National Center for Biotechnology Information) com parâmetros predefinidos (Altschul et al., 1990). Resultado em Soares et al. (2012).

Referência

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.,1990. "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.