

DEFENSINA DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris* L.:
SUPEREXPRESSÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
DO MECANISMO DE AÇÃO

ÉRICA DE OLIVEIRA MELLO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL 2014

DEFENSINA DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris* L.:
SUPEREXPRESSÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
DO MECANISMO DE AÇÃO

ÉRICA DE OLIVEIRA MELLO

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL 2014

DEFENSINA DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris* L.:
SUPEREXPRESSÃO E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
DO MECANISMO DE AÇÃO

ÉRICA DE OLIVEIRA MELLO

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 Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de abril de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof^o. José Roberto da Silva (Dr. em Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes (Dr^a em Ciências) – UENF

Prof^a. Maura Da Cunha (Dr^a em Ciências) – UENF

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes (Dr^a. em Ciências) – UENF
(Orientadora)

*Aos meus pais José Aurélio e Nádia, e aos
meus irmãos Rômulo, Milla e Thaís que
sempre apoiaram minhas decisões,
acreditaram nos meus sonhos e
acompanharam cada etapa da minha vida,
sempre na torcida pra que tudo desse certo!
Amo vocês!!*

AGRADECIMENTOS

À prof^a Valdirene Moreira Gomes pela orientação, pela amizade, por todos os ensinamentos durante todo esse tempo de convivência. Pelos conselhos não só na minha vida profissional, mas na minha vida pessoal também.

Ao prof^o André de Oliveira Carvalho por ter aceitado revisar essa tese, pela colaboração essencial nos experimentos de biologia molecular, pela amizade de sempre e por estar sempre disposto a ajudar com suas ideias e sugestões para um melhor desenvolvimento do meu trabalho.

Aos professores José Roberto, Maura da Cunha e Kátia Valevski por terem aceitado participar da banca.

À prof^a. Eleonora Kurtenbach, à Dr^a Eliana Barreto e ao Dr. Luciano Medeiros da UFRJ do Rio de Janeiro, por terem cedido a cepa selvagem e a cepa mutante da levedura *C. albicans* para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

Ao prof^o Edésio José Tenório de Melo e à mestrandia Laís Pessanha de Carvalho pela ajuda e colaboração para a realização dos testes com protozoários.

À prof^a. Olga Lima Tavares Machado pelo sequenciamento N-terminal do peptídeo.

A Dr^a Izabela Silva dos Santos pela colaboração nos experimentos de biologia molecular.

Ao Dr. Umberto Zottich pela colaboração nos testes usando o FITC.

A Dr^a Viviane Veiga do Nascimento pela ajuda e colaboração para realização dos testes com protozoários e também por toda ajuda na parte de caracterização e modelagem do peptídeo.

Ao prof^o Lev Okorokov e ao doutorando Renan Modesto por ter ajudado na obtenção dos esferoplastos para a detecção da apoptose.

Ao Luis e à Valéria pela dedicação e manutenção do nosso laboratório.

A todos os alunos, professores e funcionários do LFBM.

A todos os companheiros do grupo Val e do grupo André por toda a ajuda prestada durante todo esse tempo, pelas risadas e momentos de descontração.

À Suzanna, pela amizade que cresceu a cada dia durante esse tempo de convívio, pelas inúmeras conversas tanto do lado profissional, quanto do lado pessoal. Por toda ajuda, ensinamentos passados e colaboração com os ensaios de inibição da acidificação.

Aos meus grandes e sinceros amigos pelo apoio de sempre.

Ao meu grande amor Gabriel Taveira por ser um fiel companheiro com quem eu posso contar pra vida toda! Seus carinhos, sua dedicação e toda a sua ajuda foram essenciais nessa reta final. Obrigada por sempre me fazer sorrir e por me ensinar a viver a vida de um jeito mais leve, mesmo diante dos desafios. Obrigada também pela colaboração nos testes de apoptose e por toda ajuda com as imagens de microscopia. Você é sem dúvidas, minha maior surpresa!!

Aos meus cunhados Fábio, Carla e Reginaldo por todo o incentivo e torcida de sempre!! E às minhas sobrinhas Anita e Amelie, meus maiores tesouros, por todas as brincadeiras e momentos felizes que passamos juntas!!

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE.....	iii
ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS/ESQUEMAS/TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Peptídeos antimicrobianos de plantas.....	1
1.2.Defensinas de plantas.....	5
1.2.1.Aspectos estruturais.....	6
1.2.2.Localização e expressão das defensinas.....	8
1.2.3.Atividades descritas <i>in vitro</i> para as defensinas de plantas.....	10
1.2.4.Mecanismos de ação das defensinas de plantas.....	13
1.3.A defensina PvD ₁ de <i>Phaseolus vulgaris</i>	20
2.OBJETIVOS.....	21
2.1.Objetivo Geral.....	21
2.2.Objetivos específicos.....	21
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
PARTE I: PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL PvD ₁ DE SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
1.3.1. Materiais biológicos.....	22
1.3.1.1.Sementes.....	22
1.3.1.2.Microrganismos e manutenção.....	22
1.3.2. Purificação da defensina PvD ₁ de sementes de <i>P. vulgaris</i>	23

I.3.2.1. Extração proteica das sementes.....	23
I.3.2.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose.	23
I.3.2.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18.....	24
I.3.2.4. Quantificação de proteínas.....	25
I.3.2.5. Eletroforese em gel de tricina na presença de dodecil sulfato de sódio.....	25
I.3.2.5.1. Preparo das amostras e condições de corrida.....	25
I.3.2.5.2. Coramento e descoramento do gel.....	25
I.3.3. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD ₁ contra fungos.....	26
I.3.3.1. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido.....	26
I. 3.3.1.1. Obtenção de esporos de fungo filamentosos.....	26
I.3.3.1.2. Obtenção das células de leveduras.....	26
I.3.3.1.3. Análise da inibição do crescimento fúngico.....	26
I.3.3.2. Efeito da defensina natural PvD ₁ sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células do fungo filamentosos <i>F. oxysporum</i> e de <i>C. albicans</i>	27
I.3.3.3. Análise do efeito da defensina natural PvD ₁ sobre a inibição da acidificação do meio induzido por glicose por células de fungos filamentosos e leveduras.....	28
I.3.3.3.1. Manutenção e preparo das células.....	28
I.3.3.3.2. Ensaio de acidificação.....	28
I.3.3.4. Teste para a verificação de apoptose em células da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença da defensina natural PvD ₁	29
I.3.3.4.1. Preparo da levedura para a obtenção de esferoplastos.....	29
I.3.3.4.2. Detecção de apoptose.....	30
I.3.4. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD ₁ contra parasitas.....	31
I.3.4.1. Efeito da defensina natural PvD ₁ na proliferação de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	31
I.3.4.1.1. Cultivo de células de <i>Leishmania amazonensis</i>	31
I.3.4.1.2. Ensaio de inibição da proliferação do protozoário.....	31

I.3.4.2. Análise ultraestrutural de células <i>L. amazonensis</i> tratadas com a defensina PvD ₁	32
I.3.4.3. Efeito da defensina natural PvD ₁ sobre a permeabilização da membrana plasmática de <i>L. amazonensis</i>	32
I.3.4.4. Investigação de internalização da PvD ₁ acoplada a FITC.....	33
PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE PvD_{1r}.....	34
II.3.1. Materiais biológicos.....	34
II.3.1.1. Microrganismos.....	34
II.3.2. Clonagem molecular, expressão heteróloga e caracterização da defensina recombinante PvD _{1r}	34
II.3.2.1. Obtenção do cDNA de feijão comum <i>P. vulgaris</i>	35
II.3.2.2. Estratégia de clonagem no vetor de superexpressão pET-32 Ek/LIC.....	35
II.3.2.3. Desenho do iniciador para clonagem no vetor de superexpressão pET-32 Ek/LIC.....	38
II.3.2.4. Reação em cadeia da polimerase - Teste da temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores.....	38
II.3.2.5. Purificação dos fragmentos com o kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System.....	40
II.3.2.6. Clonagem do fragmento amplificado no vetor.....	41
II.3.2.7. Produção de células competentes de <i>E. coli</i> , linhagem JM109...	41
II.3.2.8. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem JM109) com a construção pET-PvD ₁	42
II.3.2.9. Análise dos clones positivos - extração e digestão dos vetores	42
II.3.2.10. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS) com a construção pET-PvD ₁	44
II.3.2.11. Indução da expressão heteróloga da defensina de <i>P. vulgaris</i> em bactérias <i>E. coli</i> (linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS).....	44
II.3.2.12. Lise celular e recuperação da fração solúvel.....	45

II.3.3. Isolamento e caracterização estrutural da defensina recombinante PvD₁r.....	45
II.3.3.1. Cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺- NTA agarose.....	45
II.3.3.2. Clivagem com enteroquinase.....	46
II.3.3.3. Cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 em HLPC.....	46
II.3.3.4. Sequenciamento N-terminal da defensina recombinante PvD₁r..	47
II.3.3.4.1. Preparo da amostra e condições de corrida.....	47
II.3.3.4.2. Eletrotransferência para membrana de polivinilidenodifluoreto.	47
II.3.3.4.3. Sequenciamento N-terminal.....	48
II.3.3.5. Estudos de modelagem por homologia.....	48
II.3.4. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina recombinante PvD₁r contra leveduras.....	49
II.3.4.1. Análise da inibição do crescimento de células de <i>C. albicans</i>, cepas selvagem e mutante (ΔGCS1) em meio líquido.....	49
II.3.4.1.1. Obtenção das células.....	49
II.3.4.1.2. Análise da inibição do desenvolvimento das células.....	50
II.3.4.2. Análise morfológica das células de <i>C. albicans</i>, cepa selvagem e mutante, tratadas com a defensina natural PvD₁ e a defensina recombinante PvD₁r.....	50
II.3.4.3. Efeito da defensina recombinante PvD₁r sobre a permeabilização de membranas de <i>C. albicans</i>, cepas selvagem e mutante (ΔGCS1).....	50
II.3.4.4. Efeito da defensina recombinante PvD₁r sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células de <i>C. albicans</i> cepas selvagem e mutante (ΔGCS1).....	51
II.3.4.5. Teste para a verificação de apoptose em células da levedura <i>S. cerevisiae</i> na presença da defensina recombinante PvD₁r.....	51
II.3.4.6. Investigação de internalização da PvD₁r acoplada a FITC.....	51
4. RESULTADOS.....	53

PARTE I :PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL PvD₁ DE SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i>.....	53
I.4.1. Purificação da defensina PvD₁ de sementes de <i>P. vulgaris</i>.....	53
I.4.2. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD₁ sobre fungos.....	55
I.4.2.1. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido.....	55
I.4.2.2. Efeitos da PvD₁ sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células do fungo filamentosso <i>F. oxysporum</i> e de <i>C. albicans</i>.....	57
I.4.2.3. Ensaio de acidificação do meio, induzido por glicose, em células do fungo filamentosso <i>F. oxysporum</i> e da levedura <i>C. albicans</i> cepa selvagem.....	60
I.4.2.4. Verificação do efeito apoptótico da PvD₁ sobre células da levedura <i>S. cerevisiae</i>.....	62
I.4.3. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD₁ sobre promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>.....	64
I.4.3.1. Ensaio de eliminação da proliferação celular com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....	64
I.4.3.2. Análise ultraestrutural das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com a defensina PvD₁.....	65
I.4.3.3. Efeito da PvD₁ sobre a permeabilização de membranas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>.....	67
I.4.3.4. Determinação da localização da PvD₁ em células de <i>L. amazonensis</i>.....	69
PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE PvD_{1r}.....	70
II.4.1. Clonagem molecular e expressão funcional da defensina PvD₁ de sementes de <i>P. vulgaris</i>.....	70

II.4.1.1.Reação em cadeia da polimerase - Teste da temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores.....	70
II.4.1.2.Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem JM109) com a construção pET-PvD ₁	71
II.4.1.2.1.Análise dos clones positivos - extração e digestão dos vetores.....	71
II.4.1.2.2. Transformação e indução de células competentes de <i>E. coli</i> (linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS) com a construção pET-PvD ₁	72
II.4.2. Isolamento e caracterização da defensina recombinante PvD _{1r}	74
II.4.2.1. Cromatografia de afinidade em coluna de Ni ⁺ - NTA agarose....	74
II.4.2.2. Cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 em HPLC.....	75
II.4.2.3. Caracterização estrutural da defensina recombinante PvD _{1r}	77
II.4.2.3.1.Sequenciamento N-terminal.....	77
II.4.2.3.2.Determinação da estrutura tridimensional da PvD _{1r} por modelagem.....	78
II.4.3. Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina recombinante PvD _{1r} sobre leveduras.....	81
II.4.3.1. Análise da inibição do crescimento de células de <i>C. albicans</i> , cepa selvagem, em meio líquido na presença das defensinas PvD _{1r} e PvD ₁	81
II.4.3.2.Análise morfológica das células de <i>C. albicans</i> , cepa selvagem, tratadas com as defensinas PvD _{1r} e PvD ₁	83
II.4.3.3. Análise da inibição do crescimento de células de <i>C. albicans</i> , cepa mutante (Δ GCS1) em meio líquido em presença da defensina PvD _{1r}	84
II.4.3.4. Análise morfológica das células de <i>C. albicans</i> , cepa mutante, tratadas com a defensina PvD _{1r}	85
II.4.3.5.Efeito da PvD _{1r} sobre a permeabilização de membranas de <i>C. albicans</i> , cepas selvagem e mutante (Δ GCS1).....	86

II.4.3.6.Efeito da <i>PvD_{1r}</i> sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio em células de <i>C. albicans</i> cepas selvagem e mutante (Δ GCS1).....	88
II.4.3.7.Efeito da <i>PvD_{1r}</i> sobre a indução da produção endógena de óxido nítrico em células de <i>C. albicans</i> cepas selvagem e mutante (Δ GCS1).....	90
II.4.3.8.Determinação da localização da <i>PvD_{1r}</i> em células de <i>C. albicans</i>	92
II.4.3.9. Verificação do efeito apoptótico da <i>PvD_{1r}</i> sobre células da levedura <i>S. cerevisiae</i>	94
5. DISCUSSÃO.....	96
PARTE I : PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL <i>PvD₁</i> DE SEMENTES DE <i>Phaseolus vulgaris</i>	96
PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE <i>PvD_{1r}</i>	100
6. CONCLUSÕES.....	110
7. REFERÊNCIAS.....	111

ABREVIATURAS

AMPs	do inglês, <i>antimicrobial peptides</i>
BDA	ágar batata dextrose
BSA	albumina bovina sérica
DAD	do inglês, <i>diode array detector</i>
DAF ₂ DA	3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato
DAPI	do inglês, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEAE	dietilaminoetil
DEFas	iniciador específico desenhado a partir da porção C-terminal da defensina de sementes <i>P. vulgaris</i>
DEFs	iniciador específico desenhado a partir da porção N-terminal da defensina de sementes <i>P. vulgaris</i>
DIC	do inglês, <i>differential interference contrast</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
D1	fração não retida em cromatografia DEAE-Sepharose durante processo de purificação da defensina
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
FITC	do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
F/0-70	fração precipitada com 70% de sulfato de amônio
GlcCer	glicosilceramida
HPLC	do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>
H ₂ DCFDA	2',7' diclorofluoresceína diacetato
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactosídeo
kDa	quilodaltons
LB	Luria-Bertani
LIC	do inglês, <i>ligation independent cloning</i>
LTP	proteína transportadora de lipídios
M(IP)2C	manosildiinositolfosforilceramida
NO	do inglês, <i>nitric oxide</i>
ORF	do inglês, <i>open reading frame</i>

Pb	pares de base
PCD	do inglês, <i>programmed cell death</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
PESAGRO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
PMSF	do inglês, <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
PS	fosfatidilserina
PVDF	Polivinilidenodifluoreto
PvD ₁	do inglês, <i>Phaseolus vulgaris defensin 1</i>
PvD ₁ r	do inglês, <i>Phaseolus vulgaris recombinant defensin 1</i>
RMSD	do inglês, <i>root mean square deviation</i>
ROS	do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
TEMED	N, N", N"', N''''-tetrametiletlenodiamino
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	Tris(hidroximetil) amino etano
U	unidades de atividade
YPD	do inglês, yeast peptone dextrose
ΔGCS1	mutante deficiente na enzima glucosilceramida sintase

LISTA DE FIGURAS/ ESQUEMAS/ TABELAS

Figura 1. Representação gráfica de estruturas terciárias elucidadas de diferentes defensinas de plantas e em destaque (delimitadas por círculo) estão as diferenças mais marcantes entre elas.....	8
Figura 2. Representação esquemática do primeiro modo de ação descrito para as defensinas de plantas em fungos.....	14
Figura 3. Representação esquemática da estrutura dos esfingolipídeos que são sítios de ligação das defensinas de plantas na membrana de fungos.....	16
Figura 4. Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (<i>Sd5</i> , <i>MsDef1</i> , <i>PsD1</i> , <i>RsAFP2</i> , <i>NaD1</i> e <i>HsAFP1</i>) em fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação.....	19
Figura 5. Mapa de restrição do vetor pET-32 Ek/LIC (retirada do manual do vetor, <i>User Protocol</i> TB163 Rev. G 1005, Novagen, Inc.) e em vermelho está destacada a posição e a sequência da região do cDNA que codifica <i>PvD₁</i>	37
Figura 6. Purificação da <i>PvD₁</i> de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão comum).....	54
Figura 7. Efeito da <i>PvD₁</i> no crescimento do fungo filamentoso <i>Fusarium oxysporum</i> e das leveduras <i>Candida albicans</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
Figura 8. Imagem por microscopia de fluorescência das células do fungo filamentoso <i>Fusarium oxysporum</i> tratadas com o corante para ROS, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, e NO, 3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD₁</i>	58
Figura 9. Imagem por microscopia de fluorescência das células da levedura <i>Candida albicans</i> tratadas com o corante para ROS, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, e NO, 3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle, mostrado para ROS) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD₁</i>	59

Figura 10. Porcentagem da acidificação do meio por esporos do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> na presença da PvD ₁	60
Figura 11. Porcentagem da acidificação do meio por células da levedura <i>Candida albicans</i> cepa selvagem na presença da PvD ₁	61
Figura 12. Imagem por microscopia de fluorescência de esferoplastos da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas por 2 h, com 50 µg.mL ⁻¹ da PvD ₁	63
Figura 13. Eliminação da proliferação de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença da PvD ₁	64
Figura 14. Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 300 µg.mL ⁻¹ da PvD ₁	66
Figura 15. Imagem por microscopia de fluorescência dos promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com o corante Sytox \square green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 300 µg.mL ⁻¹ da PvD ₁	68
Figura 16. Imagem por microscopia de fluorescência dos promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratados com 300 µg.mL ⁻¹ da PvD ₁ acoplada ao FITC, durante um período de 24 h de incubação.....	69
Figura 17. Visualização eletroforética das amostras obtidas da PCR utilizando diferentes concentrações de iniciadores DEFs e DEFas e temperaturas em gel de agarose 1%.....	71
Figura 18. Visualização eletroforética de amostras obtidas como produto da digestão do vetor pET-DEF extraído de células bacterianas da linhagem JM109 com as enzimas de restrição <i>Eco</i> RI e <i>Bgl</i> II em gel de agarose 1%.....	72
Figura 19. Visualização eletroforética de amostras obtidas da PCR feita diretamente de colônias bacterianas da linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS transformadas com a construção pET-PvD ₁ utilizando os iniciadores DEFs e DEFas em gel de agarose 1%.....	73
Figura 20. Visualização eletroforética da superexpressão da PvD ₁ r em bactéria Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS transformada com a construção pET-PvD ₁	74
Figura 21. Visualização eletroforética e cromatograma do último passo de purificação da PvD ₁ r.....	76
Figura 22. Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos N-terminais das defensinas PvD ₁ r e PvD ₁	77

Figura 23. Modelagem da <i>PvD_{1r}</i> por homologia a partir do molde da defensina VrD2 isolada de <i>Vigna radiata</i>	79
Figura 24. Mapa de Ramachandran da estrutura da defensina recombinante <i>PvD_{1r}</i>	80
Figura 25. Efeitos das defensinas <i>PvD₁</i> e <i>PvD_{1r}</i> no crescimento da cepa selvagem da levedura <i>Candida albicans</i>	82
Figura 26. Imagem por microscopia óptica das células de <i>Candida albicans</i> (cepa selvagem), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ das defensinas <i>PvD₁</i> e <i>PvD_{1r}</i>	83
Figura 27. Efeitos da <i>PvD_{1r}</i> no crescimento da cepa mutante da levedura <i>Candida albicans</i> , (Δ GCS1, cuja mutação não lhe permite a síntese do esfingolípido glicosilceramida).....	84
Figura 28. Imagem por microscopia óptica de células de <i>Candida albicans</i> (cepa mutante (Δ GCS1, cuja mutação não lhe permite a síntese do esfingolípido glicosilceramida), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD_{1r}</i>	85
Figura 29. Imagem por microscopia de fluorescência da levedura <i>Candida albicans</i> , cepas selvagem e mutante (Δ GCS1, cuja mutação não lhe permite a síntese do esfingolípido glicosilceramida), tratadas com o corante Sytox green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD_{1r}</i>	87
Figura 30. Imagem por microscopia de fluorescência da levedura <i>Candida albicans</i> , cepas selvagem e mutante (Δ GCS1, cuja mutação não lhe permite a síntese do esfingolípido glicosilceramida) tratadas com o corante para ROS, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD_{1r}</i>	89
Figura 31. Imagem por microscopia de fluorescência da levedura <i>Candida albicans</i> , cepas selvagem e mutante (Δ GCS1, cuja mutação não lhe permite a síntese do esfingolípido glicosilceramida), tratadas com o corante para NO, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de 100 µg.mL ⁻¹ da <i>PvD_{1r}</i>	91

Figura 32. Imagem por microscopia de fluorescência das células de <i>Candida albicans</i> com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da <i>PvD_{1r}</i> acoplada a FITC durante um período de 24 h.....	93
Figura 33. Imagem por microscopia de fluorescência das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratadas por 2 h, com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da <i>PvD_{1r}</i>	95
Figura 34. Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (<i>PvD₁</i> ; <i>Sd5</i> , <i>MsDef1</i> , <i>PsD1</i> , <i>RsAFP2</i> , <i>NaD1</i> e <i>HsAFP1</i>) em fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação.....	109

ESQUEMAS

Esquema 1. Estratégia de clonagem no vetor pET-32 Ek/LIC destacando o sistema de clonagem independente de ligação (LIC) (retirado do manual do vetor, User Protocol TB163 Rev. G 1005, Novagen, Inc.).....	36
--	----

TABELAS

Tabela 1. Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto.....	4
Tabela 2. Atividade antifúngica de defensinas sobre fungos e levedura.....	12
Tabela 3. Mapa estatístico da análise estrutural da defensina recombinante <i>PvD_{1r}</i>	80

RESUMO

Defensinas de plantas são peptídeos pequenos, básicos, ricos em cisteína e a sua atividade melhor caracterizada é a capacidade para inibir o crescimento fúngico. A primeira parte deste trabalho mostra a purificação, atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação da *PvD₁*, a defensina natural de sementes de *Phaseolus vulgaris*. *PvD₁* foi purificada de acordo com a metodologia descrita por Games *et al.* (2008). *PvD₁* mostrou-se capaz de inibir o crescimento fúngico, provocando um aumento na produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) nas células de *Fusarium oxysporum* e *Candida albicans* e um aumento na produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), apenas nas células de *C. albicans*. *PvD₁* também foi capaz de inibir a acidificação do meio por células fúngicas e causou efeito apoptótico em células de *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação a sua atividade sobre parasitas, vimos que a *PvD₁* foi capaz de inibir a proliferação das promastigotas de *Leishmania amazonensis*, causando permeabilização da membrana e alterações no conteúdo citoplasmático dessas células. *PvD₁* foi internalizada nessas células, o que sugere um possível alvo intracelular. Na segunda parte deste trabalho, relatamos a clonagem molecular, expressão heteróloga, caracterização, atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina recombinante de *P. vulgaris* (*PvD_{1r}*). O fragmento que codifica *PvD₁* foi clonado no vetor de expressão pET-32 Ek/LIC, o qual foi usado para transformação bacteriana. *PvD_{1r}* foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺ NTA-agarose e cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 por HPLC. O sequenciamento N-terminal de *PvD_{1r}* mostrou que este possui a sequência similar à sequência da defensina *PvD₁* isolada a partir das sementes. A estrutura tridimensional da *PvD_{1r}* foi modelada e a estrutura resultante é composta por uma α -hélice e três folhas β antiparalelas, conectadas por quatro pontes dissulfeto, mostrando-se similar às estruturas de outras defensinas de plantas já caracterizadas. *PvD₁*, bem como seu homólogo recombinante, *PvD_{1r}*, foram capazes de inibir o crescimento da cepa selvagem de *C. albicans*. Adicionalmente, *PvD_{1r}* não inibiu o crescimento da cepa mutante de *C. albicans*, deficiente em glicosilceramida. Além de inibir o crescimento de células da cepa selvagem de *C. albicans*, *PvD_{1r}* foi também capaz de provocar, nestas células, permeabilização na membrana, aumentar a produção endógena de ROS e mostrou também que pode ser

internalizada. Como nenhum destes efeitos foi observado na cepa mutante, nós sugerimos que glicosilceramida é o alvo de ligação na membrana da defensina de *P. vulgaris* na levedura *C. albicans*.

ABSTRACT

Plant defensins are small, basic, cysteine-rich peptides and their better characterized activity is the capability to inhibit fungal growth. The first part of this work shows the purification, antimicrobial activity and mechanism of action of *PvD*₁, the natural defensin from *Phaseolus vulgaris* seeds. *PvD*₁ was purified according to the method described by Games *et al.* (2008). *PvD*₁ was capable of inhibiting fungal growth, causing an increase in the endogenous production of reactive oxygen species (ROS) by the cells of *Fusarium oxysporum* and *Candida albicans* and an increase in nitric oxide (NO) production only by *C. albicans* cells. *PvD*₁ was also able to inhibit the acidification of the medium by the fungal cells and triggered apoptotic effects on *Saccharomyces cerevisiae* cells. In regard to its activity on parasites, we found that *PvD*₁ was able to inhibit the proliferation of *Leishmania amazonensis* promastigotes, causing cell membrane permeabilization and alterations in the cytoplasmic contents of these cells. *PvD*₁ was internalized in these cells, what suggests a possible intracellular target. In the second part of this work, we report the molecular cloning, heterologous expression, characterization, antimicrobial activity and mechanism of action of recombinant defensin from *P. vulgaris* (*PvD*_{1r}). The fragment encoding *PvD*₁ was cloned into the pET-32 Ek/LIC expression vector, which was used for bacterial transformation. *PvD*_{1r} was purified by affinity chromatography on Ni⁺-NTA agarose column and reversed-phase chromatography on C2/C18 HPLC column. The N-terminal sequencing of the *PvD*_{1r} showed that it has a similar sequence to that of *PvD*₁ isolated from the seeds. The three-dimensional structure of *PvD*_{1r} was modeled and the resulting structure is composed by one α -helix and three anti-parallel β -sheets, connected by four disulfide bonds, proving to be similar to other structures of plant defensins already characterized. *PvD*₁ as well as its recombinant homologous *PvD*_{1r}, were able to inhibit the growth of the wild strain of *C. albicans*. Additionally, *PvD*_{1r} did not inhibit the growth of a *C. albicans* mutant strain, which is deficient in glucosylceramide. Besides inhibiting the growth of *C. albicans* wild type strain cells, *PvD*_{1r} was also able to cause, in these cells, permeabilization of the membrane, to increase ROS endogenous production and also showed that it can be internalized. As none of these effects were observed with the mutant strain, we suggest that glucosylceramide is the membrane binding target of the *P. vulgaris* defensin in *C. albicans* yeast.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Peptídeos antimicrobianos de plantas

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) são moléculas de defesa de baixa massa molecular, expressas de forma constitutiva ou induzida e que protegem todos os organismos de uma infecção causada pelo ataque de patógenos (Hegedüs e Marx, 2013). Apresentam uma vasta atividade inibitória contra microrganismos como vírus, bactérias Gram positivas e negativas, fungos e parasitas (Guaní-Guerra *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2012).

Estes são caracterizados pela presença de um grande número de cisteínas (4, 6 e 8), as quais conectam-se em pares, formando pontes dissulfeto, que conferem alta estabilidade para esses peptídeos (Broekaert *et al.*, 1997; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Astafieva *et al.*, 2013). Embora eles compartilhem propriedades físicas semelhantes tais como pequeno tamanho (<10 kDa), carga líquida positiva em pH fisiológico e anfifilicidade, eles mostram uma limitada homologia de sequência e diferem na sua estrutura tridimensional e atividades biológicas (Guaní-Guerra *et al.*, 2010).

Os AMPs são considerados componentes essenciais do sistema imune inato das plantas, animais e humanos, uma vez que geralmente atuam como a primeira linha de defesa contra patógenos (Thevissen *et al.*, 2003; Mihajlovic e Lazaridis, 2010a; Hegedüs e Marx, 2013). Pertencem a um grupo diverso e abundante de moléculas que são produzidas por diversas células tanto em plantas quanto em animais e, que são agrupados de acordo com a sua atividade antimicrobiana intrínseca (Mihajlovic e Lazaridis, 2010a; Li *et al.*, 2012).

Embora seja geralmente aceito que os AMPs exerçam sua atividade antimicrobiana através de interações diretas com paredes e/ou membranas celulares de fungos fitopatogênicos e bactérias, seguido pela perturbação da integridade da membrana, os detalhes dos processos envolvidos não são completamente compreendidos (Mihajlovic e Lazaridis, 2010b; Astafieva *et al.*, 2013). Evidências indicam que, além da permeabilidade da membrana em microrganismos patogênicos, alguns AMPs possuem alvos intracelulares, podendo inibir a síntese de

ácidos nucleicos, de proteínas, e de componentes da parede celular. Além disso, estes peptídeos são também capazes de inibir atividades enzimáticas essenciais (Nguyen *et al.*, 2011). Devido à capacidade que os AMPs possuem de interagir com determinadas membranas celulares, o que lhes confere uma eficiente atividade antimicrobiana contra determinados agentes patogênicos, é que se têm observado nos últimos anos, um grande interesse biológico em estudar esse grupo de proteínas (Teixeira *et al.*, 2012).

Muitos AMPs têm sido isolados de plantas, especialmente de sementes, local em que podemos encontrá-los em nível elevado se compararmos às folhas, flores e demais órgãos da planta (Broekaert *et al.*, 1997; Benko-Iseppon *et al.*, 2010). Nos últimos anos, nosso grupo vem isolando e caracterizando diferentes proteínas e AMPs presentes em sementes, os quais estão envolvidos nos mecanismos de defesa de plantas. Até o momento foram purificadas e caracterizadas uma defensina e uma proteína transportadora de lipídeos (LTP) de sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) (Carvalho *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2004), uma albumina 2S de sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (maracujá amarelo) (Agizzio *et al.*, 2003), uma LTP exsudada de sementes de *V. unguiculata* (Diz *et al.*, 2003), um peptídeo com alta homologia à LTP isolado de sementes de *Capsicum annuum* (pimenta) (Diz *et al.*, 2006), uma defensina de sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) (Games *et al.*, 2008), um inibidor de proteinase isolado de sementes de *C. annuum* (Ribeiro *et al.*, 2007); uma LTP isolada de sementes de *Coffea canephora* (café) (Zottich *et al.*, 2011) e uma tionina isolada do fruto de *C. annuum* (Taveira *et al.*, 2014).





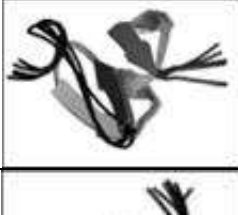
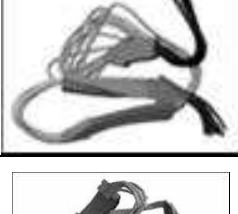

Egorov *et al.* (2005) também demonstraram pela primeira vez a presença e a diversidade, simultaneamente, de diferentes classes de AMPs em sementes de *Triticum kiharae* (trigo). Ao total foram isolados 49 AMPs, dos quais 30 foram identificados e agrupados em sete classes as quais incluem defensinas, peptídeos ricos em glicina, tioninas, LTPs, peptídeos similares à knotinas, peptídeos similares à heveína e peptídeos com quatro cisteínas (MBP-1), entre outros que ainda são desconhecidos. Esses dados demonstram o potencial, ainda desconhecido, que as plantas e principalmente as sementes ocultam e que a ciência começa a revelar.

Os AMPs de plantas podem ser divididos levando-se em consideração, especialmente, suas características estruturais (tabela 1). Geralmente, esses AMPs presentes em plantas possuem estrutura tridimensional globular, estabilizada pela

presença das pontes dissulfeto. Dentre estes se encontram: as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), as quais inicialmente se acreditavam participar do transporte de lipídeos entre organelas; as snakinas, que foram inicialmente isoladas de *Solanum tuberosum* (batata); as defensinas, inicialmente isoladas de sementes de *Hordeum vulgare* (cevada); as tioninas, sendo a purotionina isolada de *Triticum aestivum* (trigo), a primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; os peptídeos similares à heveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira); os peptídeos similares à knotinas, isolados inicialmente de sementes de *Mirabilis jalapa* (maravilha); peptídeos MBP-1, isolados de *Zea mays* (milho); peptídeos denominados Ib-AMPs isolados de sementes de *Impatiens balsamina* (balsamina); os peptídeos circulares, conhecidos como ciclotídeos encontrados nas famílias Rubiaceae e Violaceae; e os inibidores de proteinases isolados de sementes de *C. annuum* (Benko-Iseppon *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

Dentre os principais AMPs de plantas estudados estão as defensinas (Broekaert *et al.*, 1997; Carvalho e Gomes, 2011).

Tabela 1: Famílias de peptídeos antimicrobianos de plantas incluindo: classificação, características estruturais, banco de dados e número de pontes dissulfeto. PDB¹ refere-se ao *Protein Database* e DB², ao número de pontes dissulfeto (Adaptada de Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

FAMÍLIA	NOME	ESTRUTURA PROTEICA	PDB ¹	DB ²	REFERÊNCIA
Defensina de planta	<i>Rs-AFP2</i>		1AYJ	4	Terras <i>et al.</i> , 1992 Aerts <i>et al.</i> , 2007 Tavares <i>et al.</i> , 2008
α - e β -tioninas	α -1 purotionina		1BHP	4	Ohtani <i>et al.</i> , 1977
Tioninas	Crambina		1AB1	3	Schrader-Fischer e Apel, 1994
Proteína transportadora de lipídeos	<i>Ace-AMP1</i>		1T12	4	Cammue <i>et al.</i> , 1995 Carvalho <i>et al.</i> , 2001 Diz <i>et al.</i> , 2006 Zottich <i>et al.</i> , 2011
Proteína do tipo heveína	<i>Ace-AMP2</i>		1HEV	4	Broekaert <i>et al.</i> , 1992 Lipkin <i>et al.</i> , 2005
Knotina	<i>Mj-AMP1</i>		1DKC	3	Cammue <i>et al.</i> , 1992 García-Olmedo <i>et al.</i> , 2001
Macadamia	<i>MiAMP1</i>		1C01	3	Marcus <i>et al.</i> , 1997 McManus <i>et al.</i> , 1999 Stephens <i>et al.</i> , 2006

Continuação...

Impatiens	<i>ib</i>-AMP1	-	-	-	Taylor <i>et al.</i>, 1997 Patel <i>et al.</i>, 1998 Thevissen <i>et al.</i>, 2005 Wang <i>et al.</i>, 2009
Milho-AMP	MBP-1	-	-	-	Duvick <i>et al.</i>, 1992
Puroindolinas	Puroindolina A	-	-	-	Bloch <i>et al.</i>, 1993 Gautier <i>et al.</i>, 1994 Dhatwalia <i>et al.</i>, 2009
Snakinas	SN1	-	-	-	Segura <i>et al.</i>, 1999 Berrocal-Lobo <i>et al.</i>, 2002
Ciclotídeos	Kalata B1	-	-	-	Jennings <i>et al.</i>, 2001 Kamimori <i>et al.</i>, 2005
Inibidores de proteinase	CaTi	-	-	-	Ribeiro <i>et al.</i>, 2007

1.2 – Defensinas de plantas

As defensinas de plantas são peptídeos pequenos, com estrutura primária de 45 a 54 resíduos de aminoácidos e altamente básicos, o que lhes confere uma carga positiva em pH neutro. Apresentam massa molecular de aproximadamente 6 kDa e são ricos em cisteínas (oito resíduos). As sequências de aminoácidos das defensinas de plantas variam muito, com exceção de oito resíduos de cisteínas, estritamente conservados entre eles (Carvalho e Gomes, 2011; Wong *et al.*, 2012). Sua atividade antimicrobiana *in vitro* e sua semelhança estrutural com defensinas de

humanos e de insetos, indica um importante papel para as defensinas de plantas no sistema imune inato das plantas (De Coninck *et al.*, 2013).

Possuem atividade antifúngica e/ ou antimicrobiana em concentrações micromolares contra uma variedade de patógenos de plantas e também de humanos e estão amplamente distribuídos em praticamente todos os organismos (vertebrados, invertebrados e plantas) (Thevissen *et al.*, 2003; Aerts *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009; Jarczak *et al.*, 2013).

As defensinas de plantas foram inicialmente isoladas a partir de sementes de *Triticum turgidum* (trigo) e *Hordeum vulgare* (cevada) em 1990 (Collilla *et al.*, 1990; Kido *et al.*, 2010; De Coninck *et al.*, 2013) e foram caracterizadas como um novo membro da família das tioninas, as γ -tioninas. Esta caracterização foi feita com base na sua similaridade de peso molecular, na sequência de aminoácidos e no número de resíduos de cisteínas, uma vez que as mesmas não possuíam o mesmo padrão de formação de pontes dissulfeto das duas classes já existentes, as α - e β -tioninas (Terras *et al.*, 1995; Kido *et al.*, 2010). Estudos adicionais revelaram a existência de diferenças no padrão de pontes dissulfeto demonstrando que estas duas famílias de peptídeos não estavam relacionadas. Alguns anos depois, através da análise da estrutura tridimensional e constatação de sua similaridade estrutural e funcional com as defensinas de insetos e mamíferos, as γ -tioninas foram renomeadas como defensinas de plantas (Terras *et al.*, 1995; Carvalho e Gomes, 2011).

1.2.1 - Aspectos estruturais

A estrutura terciária das defensinas de plantas, de um modo geral, é definida pela presença de uma α -hélice e três folhas β antiparalelas estabilizadas por quatro pontes dissulfeto que são formadas por oito resíduos de cisteína conservados na estrutura (Slavokhotova *et al.*, 2011) (figura 1). Duas dessas pontes são formadas entre as Cys21 da α -hélice e Cys45 da última folha β e entre a Cys25 da α -hélice e Cys47 da última folha β formando um arranjo estrutural denominado de domínio $\alpha\beta$ estabilizado por cisteínas, característico de peptídeos com atividade antimicrobiana (Cornet *et al.*, 1995; Thomma *et al.*, 2002; Carvalho e Gomes, 2011).

Em adição a este arranjo estrutural $\alpha\beta$ (CS $\alpha\beta$) estabilizado pelos resíduos de cisteínas, as defensinas são caracterizadas também pela ocorrência de um arranjo estrutural conservado chamado de *gama core* (GXC(X₃₋₉)C, onde X pode ser

qualquer aminoácido e os números indicam o espaçamento em aminoácidos) entre os AMPs que contêm pontes dissulfeto e que são caracterizados pela presença de duas folhas β antiparalelas com uma pequena região de volta interposta (De Coninck *et al.*, 2013).

Apesar da grande similaridade entre as estruturas terciárias das defensinas de plantas, existem algumas exceções conhecidas em relação à elas. Estas incluem: uma ponte dissulfeto adicional na defensina *PhD1* (defensina 1 de *Petunia hybrida*), resultando no total em cinco pontes dissulfeto (Janssen *et al.*, 2003); uma hélice 3_{10} formada entre os resíduos Glu8 e Gly11 localizados entre a primeira folha β e a primeira α -hélice da defensina *VrD1* (defensina 1 de *Vigna radiata*) (Liu *et al.*, 2006); e uma extensão C-terminal não-estruturada na defensina *Sd5* (defensina 5 de cana-de-açúcar) (de Paula *et al.*, 2011). A figura 1 mostra os quatro tipos de estrutura descritos para as defensinas de plantas.

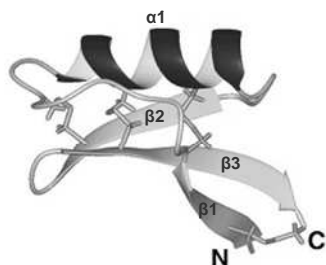
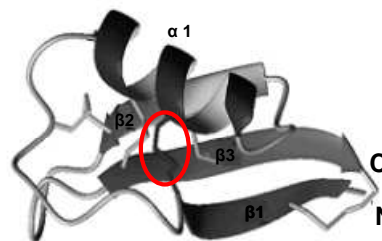
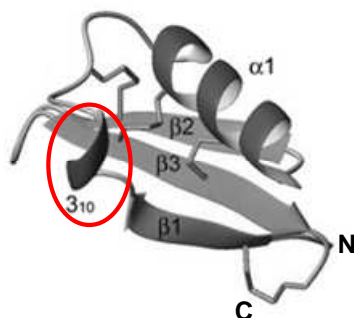
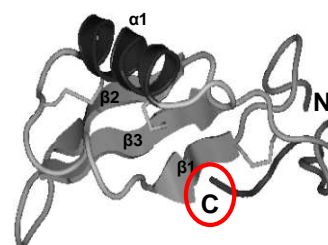
PsD1 de *Pisum sativum***PhD1 de *Petunia hybrida*****VrD1 de *Vigna radiata*****Sd5 de *Saccharum officinarum***

Figura 1: Representação gráfica de estruturas terciárias elucidadas de diferentes defensinas de plantas e em destaque (delimitadas por círculo) estão as diferenças mais marcantes entre elas. Estrutura da defensina *PsD1* de *Pisum sativum* (ervilha) (Almeida *et al.*, 2002); Estrutura da defensina *PhD1* de *Petunia hybrida* com a quinta ponte dissulfeto (Janssen *et al.*, 2003); Estrutura da defensina *VrD1* de *Vigna radiata* (feijão) com uma hélice 3_{10} (Liu *et al.*, 2006); Estrutura da defensina *Sd5* de *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) com uma extensão C-terminal não-estruturada (de Paula *et al.*, 2011). (N) região N-terminal; (C) região C-terminal; ($\alpha 1$) α -hélice; ($\beta 1$) folha β 1; ($\beta 2$) folha β 2; ($\beta 3$) folha β 3; (3_{10}) α -hélice 3_{10} .

1.2.2 - Localização e expressão das defensinas

As defensinas são expressas por vários órgãos e tecidos e estão principalmente localizadas na parede celular, no espaço extracelular de sementes e também nas camadas periféricas das células de frutos e órgãos florais de diferentes

plantas como *Arabidopsis* (Penninckx *et al.*, 1996; Thomma *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (ervilha) (Almeida *et al.*, 2000), *Spinacia oleracea* (espinafre) (Segura *et al.*, 1998), *Nicotiana glauca* (tabaco) (Lay *et al.*, 2003a; 2003b) e *Raphanus sativus* (rabanete) (Terras *et al.*, 1992). Esta localização extracelular foi confirmada por estudos de imunolocalização de várias defensinas de plantas provenientes de sementes, incluindo Rs-AFP2 isolada de *R. sativus* e MsDef1 de *Medicago sativa*, respectivamente (Terras *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2000) e é consistente com o papel defensivo para estes peptídeos, porque acredita-se que nestes locais ocorram o primeiro contato com um patógeno em potencial.

A localização periférica das defensinas de plantas em diferentes tecidos reflete seu papel de defesa contra a invasão microbiana, seja como agente antimicrobiano induzido dentro do tecido vegetativo ou como parte da barreira de defesa constitutiva, esta importante especialmente em órgãos reprodutivos e de armazenamento (Thevissen *et al.*, 2003; De Coninck *et al.*, 2013).

Algumas defensinas de planta são constitutivamente expressas em uma ampla variedade de tecidos. Por exemplo, a AtPDF2.2 de *Arabidopsis thaliana* é expressa em folhas, flores, raízes e caules (Siddique *et al.*, 2011). Outras defensinas são sistemicamente induzidas sob infecção fúngica ou ferimentos de tecidos vegetativos em diferentes espécies de plantas, como por exemplo, *P. sativum*, *S. tuberosum*, *R. sativus*, *A. thaliana*, etc (Thevissen *et al.*, 2003; Kovaleva *et al.*, 2009).

Em estudos para dar maior suporte a participação das defensinas na defesa de plantas, foi introduzido o gene que codifica a defensina Rs-AFP2 em plantas de tabaco. Por comparação do número e da área das lesões causadas pelo fungo *Alternaria longipes*, verificou-se que nas plantas transformadas, as áreas de lesão foram de sete a oito vezes menores que nas plantas controles (Terras *et al.*, 1995). Stotz *et al.* (2009) demonstraram que a defensina de tomate DEF2 tem um papel na defesa e no desenvolvimento de plantas, já que a superexpressão dessa proteína aumenta a resistência da planta ao fungo *Botrytis cinerea*, enquanto tanto a superexpressão quanto o silenciamento do gene endógeno têm efeitos severos sobre a produção de sementes e viabilidade do pólen. Estes estudos, além de confirmarem a participação das defensinas na defesa de plantas, forneceram indícios do possível potencial biotecnológico destas moléculas (Kido *et al.*, 2010).

1.2.3 - Atividades descritas *in vitro* para as defensinas de plantas

As defensinas de plantas são bastante diversificadas em sua estrutura primária, com exceção dos oito resíduos de cisteínas responsáveis pela estabilização da sua estrutura, sempre conservados. Refletindo essa diversidade estrutural, as defensinas de plantas são capazes de apresentar diferentes atividades biológicas *in vitro* (Thevissen *et al.*, 2003; Carvalho e Gomes, 2011; Hegedüs e Marx, 2013). Estas incluem atividade antibacteriana (Osborn *et al.*, 1995; Koike *et al.*, 2002; Carvalho e Gomes, 2009, 2011), inibição de amilases de intestino de insetos (Bloch e Richardson, 1991; Pelegriani *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010), inibição de tripsina (Wijaya *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2002); inibição de síntese de proteínas (Colilla *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006), bloqueio de canais de sódio (Spelbrink *et al.*, 2004; van der Weerden e Anderson, 2013), bem como papéis na tolerância aos metais pesados (Mirouze *et al.*, 2006; Oomen *et al.*, 2011) e desenvolvimento das plantas (Wilson *et al.*, 2005; Oomen *et al.*, 2011). Várias defensinas de plantas também já mostraram-se capazes de reduzir *in vitro* a atividade de transcriptase reversa do HIV1 e foram capazes de exibir uma atividade antiproliferativa para vários tipos de células de câncer de mama (Wong e Ng, 2005), assim como uma defensina isolada de *Phaseolus limensis* que também já apresentou atividade sobre células cancerígenas (Wang *et al.*, 2009; Hegedüs e Marx, 2013).

Além das atividades descritas, também já foi visto que alguns peptídeos de plantas possuem ação inibitória em protozoários (McGwire e Kulkarni, 2010). A primeira evidência de atividade leishmanicida relacionada aos peptídeos de plantas foi vista por Berrocal-Lobo *et al.* (2009). Neste estudo eles testaram a atividade de quatro AMPs de plantas sobre promastigotas de *Leishmania donovani*. Entre eles, apenas uma tionina e a defensina PTH1 foram capazes de inibir este protozoário. A defensina PTH1 na concentração de 27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, inibiu aproximadamente 50% da proliferação do protozoário com o tempo de incubação de 48 h. De forma semelhante, a atividade da defensina natural de *V. unguiculata* Vu-Def e seu recombinante, Vu-Defr, foram testadas sobre promastigotas de *L. amazonensis*. A defensina natural Vu-Def eliminou 54,3% e 46,9% do crescimento de protozoários com 24 e 48 h de crescimento, respectivamente, e a defensina recombinante Vu-

Defr eliminou 50% e 54,8% do crescimento de protozoários em 24 e 48 h, respectivamente, ambas as defensinas, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Souza *et al.*, 2013). No entanto, apesar da ampla atividade inibitória que as defensinas de plantas apresentam contra diferentes microrganismos, pouco se sabe sobre sua atividade contra os protozoários.

Dentre as atividades descritas acima, a atividade melhor caracterizada para as defensinas de plantas, é a sua capacidade para inibir o crescimento de uma grande variedade de fungos filamentosos e leveduras (Broekaert *et al.*, 1997; Games *et al.*, 2008; Carvalho e Gomes, 2009, 2011; Mello *et al.*, 2011; Thevissen *et al.*, 2012). A atividade antifúngica das defensinas de plantas, bem como as concentrações necessárias para as suas funções inibitórias dependem do fungo testado e da defensina de planta em questão. Por exemplo, o fungo filamentoso *Fusarium culmorum* foi inibido pela defensina *Ah-AMP*₁, isolada de *Aesculus hippocastanum* (castanheiro-da-Índia), com 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC₅₀) e por *Rs-AFP*2 com 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC₅₀) Terras *et al.* (1992) (tabela 2). Do mesmo modo, Terras *et al.* (1993) mostraram que a concentração de proteína necessária para obter 50% de inibição de crescimento (IC₅₀) do fungo filamentoso *Verticillium dahliae* pelas defensinas *Rs-AFP*1, *Rs-AFP*2, *Br-AFP*1 e *Br-AFP*2 foi de 5, 1,5, 0,8 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Já para a inibição de 50% do crescimento (IC₅₀) do fungo *Botrytis cinerea*, foram necessários 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da defensina *Dm-AMP*1 (isolada de *Dhalia merckii* (dália)), enquanto que esse mesmo resultado foi obtido usando apenas 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da defensina *Hs-AFP*₁, (isolada de *Heuchera sanguinea* (planta coral)). van der Weerden *et al.* (2008) viram que uma defensina isolada de *Nicotiana glauca* (fumo de jardim), denominada *NaD*1, na concentração de 1 μM , foi capaz de inibir 50% do crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *Leptosphaeria maculans* e 65% dos fungos *V. dahliae*, *Thielaviopsis basicola* e *Aspergillus nidulans* e na concentração de 5 μM , o crescimento de todos os fungos filamentosos testados sofreu mais do que 90% de inibição.

As primeiras defensinas de plantas para as quais a atividade antimicrobiana foi descrita foram *Rs-AFP*1 e *Rs-AFP*2, isoladas a partir de sementes de *R. sativus* e foi visto que eram capazes de inibir o crescimento de patógenos fúngicos através de hiper-ramificação e redução do crescimento da hifa (Terras *et al.*, 1992). Diversos estudos realizados posteriormente ampliaram a lista de espécies fúngicas que

tinham seu crescimento inibido, quando incubados na presença destes AMPs (Carvalho e Gomes, 2011).

Com base nas informações sobre o modo aparente da inibição de fungos por defensinas de plantas, estas foram assim divididas em dois grupos: as que apresentam atividade antifúngica acompanhada por alterações na morfologia, como ramificação das hifas e as que apresentam atividade antifúngica sem que ocorram alterações morfológicas (Thomma *et al.*, 2002). Muitas defensinas de plantas já foram descritas como ativas sobre vários fungos fitopatogênicos, como por exemplo, *Fusarium graminearum* (Sagaram *et al.*, 2011), *Botrytis cinerea* (Stotz *et al.*, 2009) e *Alternaria brassicicola* (de Zelicourt *et al.*, 2007). Algumas defensinas de plantas também inibem o crescimento de leveduras e fungos patogênicos oportunistas de humanos, tais como a levedura *C. albicans* (Thevissen *et al.*, 2004; de Zelicourt *et al.*, 2007; Games *et al.*, 2008; Mello *et al.*, 2011)

Tabela 2: Atividade antifúngica de defensinas sobre fungos e levedura. Os valores são mostrados em concentrações expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ necessárias para se obter 50% da inibição do crescimento do fungo (IC_{50}). (-), atividade não determinada; sa, atividade inibitória acima de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; >*1, atividade acima de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; >*2, atividade acima de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; Ah, *Aesculus hippocastanum*; At, *Arabidopsis thaliana*; Bn, *Brassica napus*; Br, *Brassica rapa*; Ct, *Clitorea ternatea*; Dm, *Dahlia merckii*; Hs, *Heuchera sanguinea*; Rs, *Raphanus sativus*; +, dados obtidos de Terras *et al.* (1992); #, de Terras *et al.* (1993); *, de Osborn *et al.* (1995) (Adaptado de Carvalho, 2005).

MICROORGANISMOS	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (IC_{50})											
	AMP				DEFENSINAS							
Fungos	Ah ₁ 25	Ct ₁ 20	Dm ₁ 12	Dm ₂ 10	Hs ₁ 6	Rs ₁ 8 [#]	Rs ₂ 10	Br ₁ 1,5 [#]	Br ₂ >*1 [#]	At ₁ 3,9 [#]	Bn ₁ 2 [#]	Bn ₂ 2 [#]
<i>Botrytis cinerea</i>												
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0,5 [*]	6 [*]	3 [*]	3 [*]	1 [*]	-	3 [*]	-	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i>	12 [*]	10 [*]	5 [*]	3 [*]	1 [*]	5 [#]	1,5 [*]	1,2 [#]	38 [#]	3 [#]	2,8 [#]	2,1 [#]
<i>Leptosphaeria maculans</i>	0,5 [*]	6 [*]	1,5 [*]	1 [*]	25 [*]	-	12 [*]	-	-	-	-	-
<i>Penicillium digitatum</i>	6 [*]	20 [*]	2 [*]	2 [*]	1 [*]	-	1,5 [*]	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma viride</i>	>*1	>*1 [*]	>*1 [*]	>*1 [*]	15 [*]	-	30 [*]	-	-	-	-	-
<i>Septoria tritici</i>	0,5 [*]	2 [*]	1 [*]	1 [*]	0,5 [*]	-	1,5 [*]	-	-	-	-	-
<i>Verticillium albo-atrum</i>	6 [*]	2 [*]	4 [*]	2 [*]	12 [*]	-	12 [*]	-	-	-	-	-
<i>Alternaria brassicicola</i>	-	-	-	-	-	15 [#]	2 [#]	3 [#]	75 [#]	10 [#]	0,6 [#]	1,2 [#]
<i>Fusarium oxysporum lycopersici</i>	-	-	-	-	-	30 [#]	2 [#]	1,8 [#]	42 [#]	3 [#]	1,3 [#]	1,5 [#]
<i>Pericularia oryzae</i>	-	-	-	-	-	0,3 [#]	0,4 [#]	0,25 [#]	3 [#]	0,25 [#]	0,35 [#]	0,25 [#]
<i>Verticillium dahliae</i>	-	-	-	-	-	5 [#]	1,5 [#]	0,8 [#]	15 [#]	1,5 [#]	1,2 [#]	1 [#]
<i>Phytophthora infestans</i>	-	-	-	-	-	3 ⁺	25 ⁺	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	sa [#]	sa [#]	sa [#]	sa [#]	sa [#]	sa [#]	sa [#]

1.2.4 - Mecanismos de ação das defensas de plantas

O mecanismo de ação na inibição do crescimento fúngico pelas defensas de plantas tem sido investigado por diversos autores, e evidências demonstram vários passos envolvendo um mecanismo extracelular atuando na parede celular e/ou na membrana plasmática e também atuando em alvos intracelulares (Carvalho e Gomes, 2011).

Thevissen *et al.* (1996) demonstraram que as defensas *Dm*-AMP1 e *Rs*-AFP2 causavam um influxo de Ca^{+2} , um efluxo de K^{+} , mudanças no potencial de membrana e a concomitante alcalinização do meio de incubação na interação com o fungo *Neurospora crassa* (figura 2). Thevissen *et al.* (1999) mostraram que a defesa *Dm*-AMP1 foi capaz de permeabilizar a membrana do fungo filamentoso *N. crassa*. Mello *et al.* (2011) mostraram que a defesa *PvD*₁ isolada de sementes de *P. vulgaris* foi capaz de causar a permeabilização da membrana de diversas leveduras, dentre elas, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Picchia membranifaciens* e também foi capaz de permeabilizar a membrana dos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *F. laterithium*.

Existem evidências crescentes que excluem uma interação direta das defensas catiônicas com os fosfolípidos carregados negativamente da membrana plasmática de fungos bem como com a formação de poros (Thevissen *et al.*, 1996; Hegedüs e Marx, 2013). Em vez disso, os primeiros estudos sobre o modo de ação das defensas de plantas realizados há mais de uma década atrás, destacam a existência de domínios específicos de ligação na membrana plasmática de fungos, os chamados domínios lipídicos, os quais são especificamente enriquecidos em esfingolípidos e esteróis tais como esfingolípidos contendo manosildiinositolfosforilceramida (M(IP)2C) e glicosilceramida (GlcCer), que permitem uma elevada concentração local de defensas ligadas na membrana (figura 2) (Thevissen *et al.*, 1997; 2000; 2003; 2004).

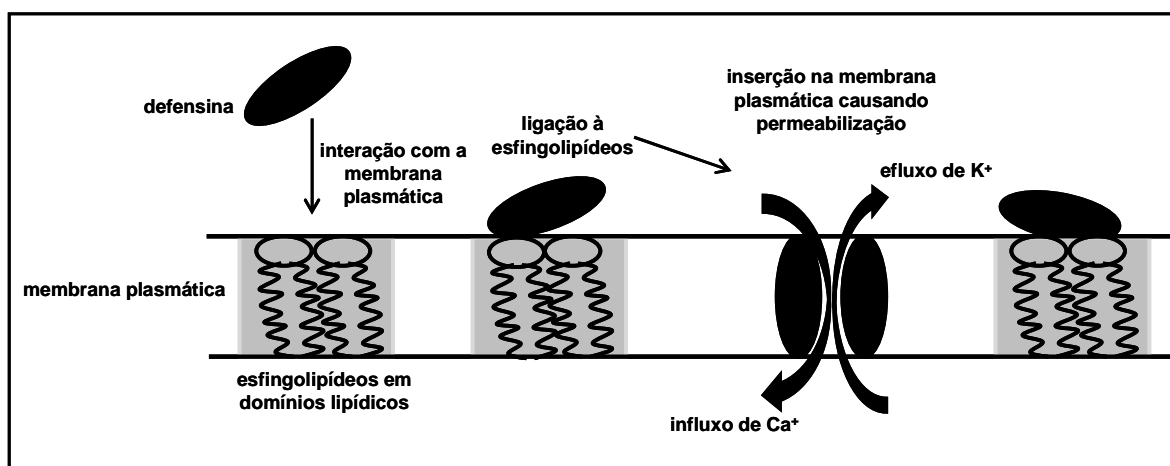


Figura 2: Representação esquemática do primeiro modo de ação descrito para as defensinas de plantas em fungos (Adaptado de Thevissen *et al.*, 2003).

Os esfingolípídeos não são apenas importantes componentes estruturais de membranas eucarióticas, mas também cumprem um papel importante como mensageiros secundários, regulando o delicado equilíbrio entre a morte e a sobrevivência celular (Thevissen *et al.*, 2006). A distribuição de GlcCer não se limita às membranas fúngicas, uma vez que grande quantidade deste glicosfingolípídeo foram também encontrados na parede celular de fungos (Nimrichter e Rodrigues, 2011; Thevissen *et al.*, 2012), ressaltando o importante papel da parede celular no processo de morte causado pelas defensinas de planta. O esfingolípídeo GlcCer é produzido por muitos fungos patogênicos (Barreto-Bergter *et al.*, 2004), e foi recentemente mostrado ser necessário para a virulência em *C. albicans* (Noble *et al.*, 2010).

Estudando mais especificamente os sítios de ligação das defensinas de plantas *Dm*-AMP1 e *Rs*-AFP2 na membrana de fungos, Thevissen *et al.* (2003; 2004, respectivamente) identificaram e caracterizaram certos grupos de esfingolípídeos. O alvo da defensina *Dm*-AMP1 na membrana foi identificado usando cepas mutantes de *S. cerevisiae* que eram resistentes à esta defensina. O gene IPT1 foi identificado como o provável fator de susceptibilidade da cepa do tipo selvagem. Este gene codifica a enzima inositol fosfotransferase que participa da última etapa da síntese do M(IP)₂C, um esfingolípídeo complexo e altamente

abundante na membrana de *S. cerevisiae*. Eles descobriram que a sensibilidade antifúngica à *Dm*-AMP1 está relacionada ao nível de M(IP)2C, mostrando o papel do complexo de esfingolípídeos/defensina na atividade antifúngica de *Dm*-AMP1 (Thevissen *et al.*, 2003). Usando uma cepa de *S. cerevisiae* defectiva em IPT1, mas capaz de sintetizar M(IP)2C por uma via alternativa, Im *et al.* (2003) confirmaram que M(IP)2C é o verdadeiro alvo de ligação e sua ausência confere à levedura resistência a *Dm*-AMP1. Aerts *et al.* (2006) também confirmaram estes resultados, associando níveis de M(IP)2C na membrana com susceptibilidade a *Dm*-AMP1.

Thevissen *et al.* (2004) demonstraram que o esfingolípídeo GlcCer, um esfingolípídeo neutro presente na membrana das leveduras *C. albicans* e *Picchia pastoris*, era o sítio de ligação da defensina *Rs*-AFP2 e que a atividade desta defensina estava relacionada com o nível de GlcCer presente na membrana. Foi visto também que esta defensina não é capaz de se ligar às glicosilceramidas presentes nas células de humanos e soja. Segundo estes autores isto acontece devido ao fato de os lipídeos encontrados nestas células serem estruturalmente diferentes. Os dados acima relatados nos dão indícios de que as defensinas de plantas podem atuar sobre microrganismos também de uma maneira específica. Além da estrutura dos lipídeos que constituem a membrana, a composição lipídica da mesma parece determinar a susceptibilidade e/ou resistência às defensinas de plantas (Jha e Chattoo *et al.*, 2010).

O esfingolípídeo M(IP)2C presente na membrana de *S. cerevisiae* e o esfingolípídeo GlcCer presente na membrana de *C. albicans*, foram então, os primeiros sítios de ligação descritos para defensinas, nas membranas plasmática de leveduras (figura 3) (Thevissen *et al.*, 2003; 2004).

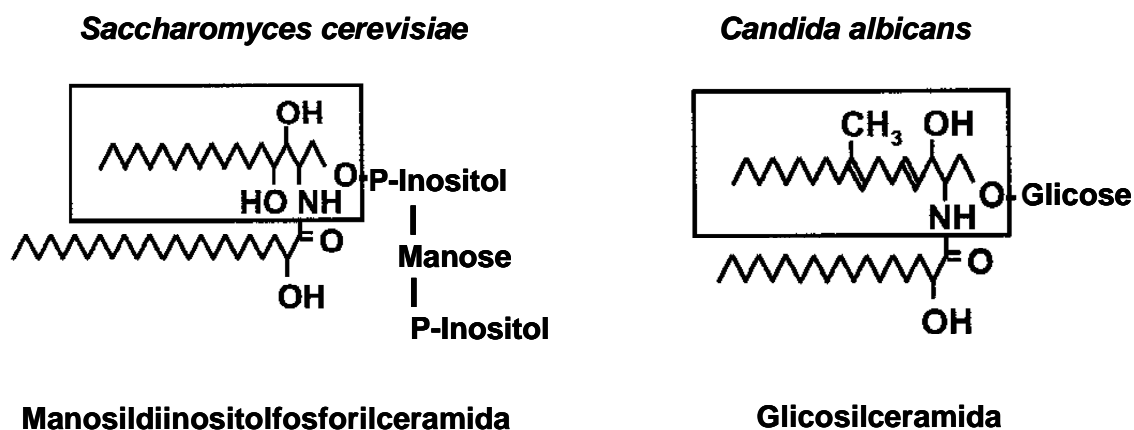


Figura 3: Representação esquemática da estrutura dos esfingolipídeos que são sítios de ligação das defensas de plantas na membrana de fungos (Adaptado de Thevissen *et al.*, 2004).

Ramamoorthy *et al.* (2007) usando uma cepa do fungo *F. graminearum* mutante ($\Delta Fggcs1$) relataram que a defensina *MsDef1* também requer o esfingolipídeo *GlcCer* na membrana fúngica para exercer seu efeito antifúngico. Thevissen *et al.* (2007) mostraram que as defensas *Hs-AFP1* e *Rs-AFP2* eram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, mas não de *C. glabrata* e atribuem estes dados ao fato de que *C. glabrata* não sintetiza glicosilceramidas (possível alvo para *Rs-AFP2*). Da mesma forma, Medeiros *et al.* (2010) mostraram que cepas de *C. albicans* mutantes ($\Delta GCS1$), que também eram incapazes de sintetizar glicosilceramidas, eram mais resistentes à defensina *Psd1* isolada de *P. sativum*. Adicionalmente, van der Weerden *et al.* (2010) também mostraram que *NaD1* requer a presença de componentes da parede celular de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, especificamente a camada de glicoproteína exterior, para exercer seus efeitos tóxicos.

Até agora, o importante papel dos esfingolipídeos no processo de inibição do crescimento de fungos por defensas de plantas foi estabelecido para cinco diferentes defensas: *Dm-AMP1* de *D. merckii* (Thevissen *et al.*, 2000), *Rs-AFP2* de *R. sativus* (Thevissen *et al.*, 2004), *MsDef1* de *M. sativa* (Ramamoorthy *et al.*, 2007), *Sd5* de *S. officinarum* (de Paula *et al.*, 2008), e *Psd1* de *P. sativum* (Medeiros *et al.*, 2010).

Para obter uma melhor visão molecular da interação entre as defensas de plantas e esfingolipídeos, a dinâmica estrutural das defensas *Psd1* e *Sd5* e suas interações com vesículas de membranas contendo fosfatidilcolina ou

dodecilfosfolina com GlcCer fúngica foram investigadas (Medeiros *et al.*, 2010; de Paula *et al.*, 2011). Estes dados indicaram que as propriedades dinâmicas da defensina Sd5 eram completamente diferentes das propriedades de Psd1, demonstrando que, embora essas defensinas tenham estruturas similares, sua dinâmica pode ser extremamente diversificada. Por conseguinte, estes estudos sugerem que regiões específicas das defensinas de plantas são responsáveis pela sua capacidade de interagir com GlcCer, assegurando sua ancoragem na membranas de fungos. Sagaram *et al.* (2011) recentemente demonstraram que os principais determinantes da atividade antifúngica das defensinas MsDef1 e MtDef4 de *M. truncatula* residem no seu motivo γ -core. Curiosamente, foi mostrado que a interação de Psd1 na membrana é mediada, em parte, por este motivo γ -core (De Coninck *et al.*, 2013).

Dados existentes sugerem que mecanismos mais complexos do que a permeabilização da membrana estão envolvidos na indução da morte celular. O acúmulo intracelular desse peptídeo foi demonstrado para a defensina Psd1 de *P. sativum*. Um sistema duplo híbrido foi usado para identificar interações proteína-proteína entre o peptídeo Psd1 e as proteínas fúngicas. Proteínas alvo foram analisadas dentro do cDNA do fungo *Neurospora crassa* (Lobo *et al.*, 2007). Um clone apresentou sequência similar à da ciclina F, que é uma proteína que está envolvida no ciclo celular. Análises por microscopia de fluorescência de Psd1 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e do coramento do fungo com 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI, do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*) mostraram a colocalização, *in vivo*, do peptídeo de planta Psd1 no núcleo. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da defensina de planta Psd1 pode envolver também alvos nucleares.

Recentemente, foi demonstrado que a defensina Rs-AFP2 de *R. sativus*, interage com o GlcCer presente na parede celular da levedura *C. albicans*, mas não é internalizada na célula (Thevissen *et al.*, 2012). Este fato contrasta com a localização intracelular das defensinas de plantas NaD1 e Psd1. Tem sido demonstrado que NaD1 é internalizada e está localizada no citoplasma dos fungos susceptíveis, resultando em granulação do citoplasma e morte da célula (van der Weerden *et al.*, 2008). Aparentemente, NaD1 permeabiliza as células fúngicas através de um novo mecanismo, que requer a presença da parede celular fúngica (van der Weerden *et al.*, 2010). Neste último estudo, os autores sugeriram a

hipótese de que um receptor para NaD1, ainda não identificado, pode estar localizado na camada protéica da parede celular.

Além de todo esse processo de permeabilização de membranas envolvendo as defensinas de plantas, nos últimos anos tem sido mostrada para algumas defensinas a propriedade de induzir apoptose ou morte celular programada em espécies de leveduras e fungos susceptíveis. A defensina *Rs-AFP2* induz o acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e apoptose nas células da levedura patogênica humana *C. albicans* (Aerts *et al.*, 2007; 2009). Esta morte das células da levedura *C. albicans* induzida por *Rs-AFP2* requer caspases ou proteases semelhantes a caspases, mas é independente da metacaspase 1. Em outros estudos, van der Weerden *et al.* (2008; 2010) mostraram que o tratamento do fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* com NaD1 provocou um aumento do acúmulo de ROS. Se NaD1 concomitantemente induz apoptose ainda não foi investigado. Além disso, Thevissen *et al.* (2012) recentemente demonstraram que *Rs-AFP2* induz a localização da septina e acúmulo de moléculas indutoras de apoptose, como por exemplo, ceramidas, em membranas de *C. albicans*. Da mesma forma, o tratamento das células de *C. albicans* com a defensina *Hs-AFP1* de *H. sanguinea* resultou no acúmulo de ROS e na indução de apoptose (Aerts *et al.*, 2011).

Um resumo do modo de ação de defensinas de plantas em fungos, assim como a indicação de seus alvos, é mostrado na figura 4.

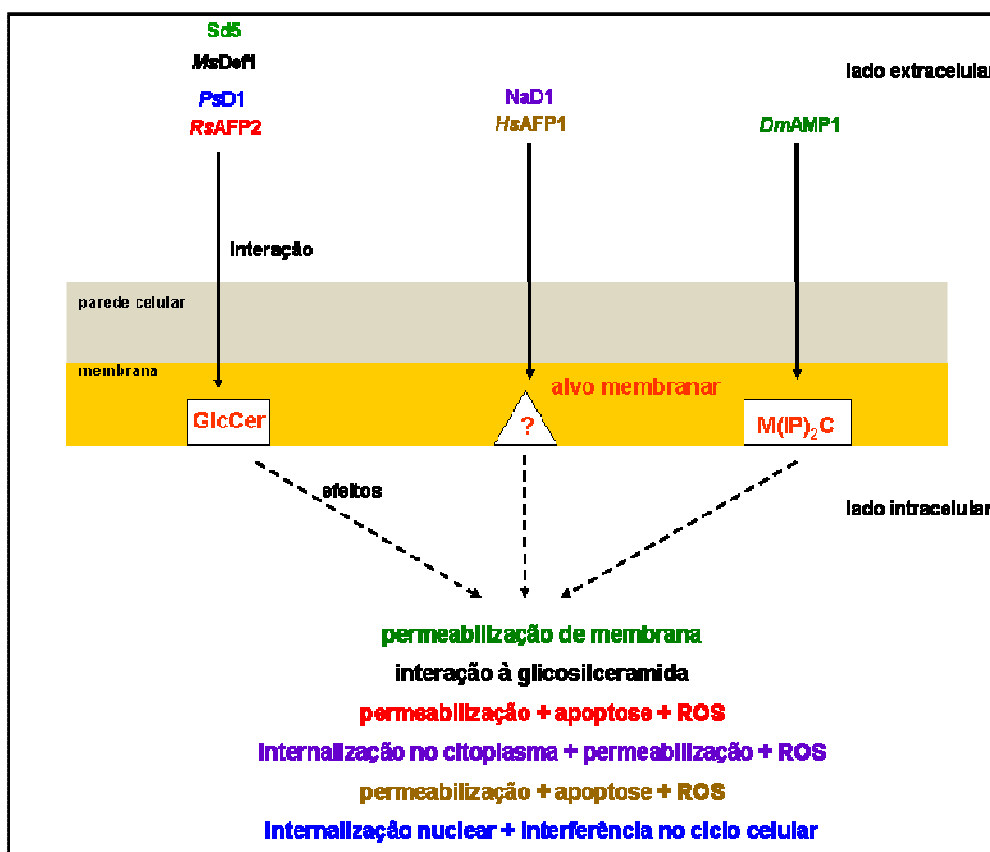


Figura 4: Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (Sd5, MsDef1, PsD1, RsAFP2, NaD1 e HsAFP1) em fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação. As cores correlacionam as defensinas com seus efeitos (Adaptado de De Coninck *et al.*, 2013).

Corroborando com as informações acerca do mecanismo de ação das defensinas sobre fungos, o mecanismo de ação utilizado para levar a morte de protozoários como *Leishmania* consiste na ruptura da membrana plasmática, interação com alvos intracelulares depois da interação com o parasita, indução de apoptose e/ ou através da imunomodulação do hospedeiro infectado (Marr *et al.*, 2012). Porém, muito pouco foi feito sobre o estudo desses mecanismos sobre protozoários.

1.3 - A defensina PvD₁ de *Phaseolus vulgaris*

Em um trabalho prévio realizado pelo nosso grupo, Games *et al.* (2008) isolaram um peptídeo de semente de *P. vulgaris* (feijão comum) e em seguida obtiveram sua sequência N-terminal, constatando ser este peptídeo pertencente à família das defensinas de plantas, a qual foi chamada de PvD₁ (do inglês, *Phaseolus vulgaris defensin 1*). Esta defensina apresentou atividade antimicrobiana sobre uma série de leveduras testadas, como por exemplo, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae* provocando alterações morfológicas e ultraestruturais nas células das mesmas. Além da atividade contra leveduras, foi visto também que a defensina PvD₁ quando utilizada numa concentração de 100 µg.mL⁻¹, foi capaz de inibir o crescimento de fungos filamentosos como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. lateritium* e *Rhizoctonia solani*.

Além da atividade antimicrobiana descrita, a defensina PvD₁ foi submetida a uma clonagem molecular. A sequência do N-terminal parcial da defensina PvD₁ foi utilizada para produzir um iniciador degenerado. Este iniciador permitiu a amplificação do cDNA da defensina por RT-PCR a partir do mRNA de sementes de *P. vulgaris*. A análise da sequência do cDNA clonado, nomeado PvD1, demonstrou um fragmento de 314 bp que codifica um polipeptídeo de 47 resíduos de aminoácidos. A sequência deduzida do peptídeo apresentou grande similaridade com defensinas de *Cicer arietinum* (95%), *Vigna radiata* (93%) e *Pachyrhizus erosus* (87%).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral superexpressar de forma heteróloga, purificar, caracterizar e avaliar a atividade e o mecanismo de ação das defensinas natural (PvD_1) e recombinante (PvD_{1r}) de *Phaseolus vulgaris* sobre fungos e sobre o protozoário *Leishmania amazonensis*.

2.2. Objetivos específicos

1. Purificar a PvD_1 de *P. vulgaris*;
2. Analisar a atividade inibitória da PvD_1 sobre fungos;
3. Verificar o efeito da PvD_1 sobre a produção endógena de ROS e NO em células fúngicas;
4. Verificar o efeito da PvD_1 sobre a inibição da acidificação do meio induzido em células fúngicas;
5. Analisar a atividade da PvD_1 sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis* através de curvas de proliferação celular e microscopia eletrônica de transmissão;
6. Verificar o efeito da PvD_1 sobre a permeabilização de membranas de promastigotas de *L. amazonensis*;
7. Superexpressar, purificar e caracterizar a PvD_{1r} ;
8. Analisar o efeito da atividade inibitória da PvD_{1r} sobre as cepas selvagem e mutante ($\Delta GCS1$) de *C. albicans*;
9. Analisar o efeito da PvD_{1r} sobre a permeabilização de membrana de cepas selvagem e mutante ($\Delta GCS1$) de *C. albicans*;
10. Analisar o efeito da PvD_{1r} sobre a produção endógena de ROS e NO em células de cepas selvagem e mutante ($\Delta GCS1$) de *C. albicans*;
11. Verificar se PvD_{1r} é internalizada em células de cepas selvagem e mutante ($\Delta GCS1$) de *C. albicans*;
12. Analisar o efeito apoptótico da PvD_1 e PvD_{1r} sobre células de *S. cerevisiae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

PARTE I: PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL PvD_1 DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris*

I.3.1 - Materiais biológicos

I.3.1.1 - Sementes

Sementes de feijão *Phaseolus vulgaris*, cultivar Pérola, foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro - PESAGRO, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

I.3.1.2 – Microrganismos e manutenção

As leveduras *Candida albicans* (CE022) e *Saccharomyces cerevisiae* (1038) e o fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* foram cultivados em meio Sabouraud (peptona 10g/L, D(+) glicose 20g/L, ágar-ágar 17g/L) (Merck S/A), mantidos a 23 °C e conservados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

A cepa selvagem da levedura *Candida albicans* foi gentilmente cedida pela Dr^a Eleonora Kurtenbach do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Dr^a Eliana Barreto Bergter do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes (IMPPG) e pelo Dr. Luciano Neves Medeiros do Centro de Ciências da Saúde (CCS), todos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. Esta cepa foi cultivada em meio BDA (infusão de batata 4g/L, dextrose 20g/L, ágar 15g/L) (Acumedia) e mantida em cultura a 23 °C no LFBM, do CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

A cepa Josefa de *Leishmania amazonensis*, no estágio de promastigota, foi fornecida pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) vinculado ao CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, em colaboração com o Prof. Edésio José Tenório de Melo.

I.3.2 - Purificação da defensina PvD₁ de sementes de *P. vulgaris*

I.3.2.1 - Extração proteica das sementes

As sementes de *P. vulgaris* foram descascadas e trituradas com um processador de alimentos até a formação de uma farinha bem fina. A farinha obtida foi extraída em tampão fosfato (Na_2HPO_4 10 mM, NaH_2PO_4 15 mM, KCl 100 mM, EDTA 1,5%) pH 5,4 na proporção de 1:5 (farinha:tampão de extração) sob agitação constante por 2 h a 4 °C. Após homogeneização, o extrato bruto foi submetido à centrifugação a 15.000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação e deixado a 4 °C por 16 h. O precipitado resultante, obtido após nova centrifugação a 15.000 x g por 20 min a 4 °C, foi ressuspenso em 10 mL de água destilada e aquecido a 80 °C por 15 min e em seguida centrifugado a 10.000 x g por 8 min a 4 °C. O precipitado resultante desta última centrifugação foi descartado e o sobrenadante dialisado durante três dias, contra água destilada e em seguida liofilizado para posterior purificação dos peptídeos. Esta amostra, chamada ao final do processo de fração 0-70 (F/0-70), foi liofilizada (Liofilizador K105, Liotop) e armazenada a -20 °C e usada posteriormente para a purificação dos peptídeos (Games *et al.*, 2008).

I.3.2.2 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose

Uma coluna (3 x 7 cm) foi preparada com 100 mL de resina de troca iônica DEAE-Sepharose e montada sob a ação da gravidade. Depois de a resina estar devidamente empacotada, ela foi sequencialmente lavada com 350 mL de água, com aproximadamente 2,5 X o volume da resina de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, novos 350 mL de água e 2,5 X o volume da resina de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. Com a resina devidamente ativada, após tais procedimentos, a mesma foi equilibrada com tampão de equilíbrio, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ficando preparada para o uso.

A amostra aplicada na coluna foi preparada da seguinte forma: 50 mg da F/0-70 foram pesados e dissolvidos em 5 mL de tampão de equilíbrio e depois centrifugado a 16.000 x g por 3 min à temperatura ambiente e o sobrenadante

aplicado sobre a resina. A amostra foi eluída primeiramente no tampão de equilíbrio e em seguida em um tampão Tris-HCl adicionado de NaCl na concentração de 1 M. Foram coletadas frações de 3 mL em aproximadamente 60 tubos em um fluxo de 60 mL/h (LKB pump P-1, Pharmacia). As absorvâncias das frações foram lidas em um espectrofotômetro a 280 nm e separados os picos de acordo com essas absorvâncias. Após a cromatografia, o pico D1 (não retido), foi concentrado por liofilização. Em um trabalho anterior, vimos que nesse pico está presente a defensina PvD₁ de *P. vulgaris* (Games *et al.*, 2008).

I.3.2.3 - Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18

Uma coluna de fase reversa C2C18 (μ RPC C2C18, GE-Healthcare) equilibrada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), foi empregada na próxima etapa de isolamento da defensina de sementes de *P. vulgaris*. O pico D1, oriundo da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, foi solubilizado em TFA 0,1% e 500 μ L desta mistura foram injetados na coluna de fase reversa. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, a temperatura de 32 °C em sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (Prominence, Shimadzu). Para a eluição das proteínas da coluna foi utilizado um gradiente de acetonitrila (ACN) começando com 100% de solvente A (0,1% de TFA) durante 10 min, seguido por uma mistura de solvente A e o solvente B (80% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA), de 0 a 100% durante 30 min. A coluna foi, em seguida, lavada com 100% de solvente B durante 5 min. A concentração do solvente A aumentou para 100% durante o tempo restante. O tempo total da cromatografia foi de 60 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector de arranjo de diodo (DAD, do inglês *diode array detector*), sendo as absorvâncias lidas a 220 nm. Após ser coletado, o pico de interesse foi concentrado por liofilização (Games *et al.*, 2008).

O processo de purificação foi acompanhado por eletroforese em gel de poli(acrilamida).

I.3.2.4 - Quantificação de proteínas

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas pelo método do ácido bicinconínico segundo Smith *et al.* (1985), sendo a ovalbumina (Sigma) utilizada como padrão.

I.3.2.5 - Eletroforese em gel de tricina na presença de dodecil sulfato de sódio

Os picos provenientes das diferentes cromatografias foram visualizados em gel de tricina segundo método descrito 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.

O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9%. Os géis foram montados no Mini Protean Tetra System, Biorad.

I.3.2.5.1 - Preparo das amostras e condições de corrida

Os picos obtidos na cromatografia de troca iônica, DEAE-Sepharose e na cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 foram concentrados por liofilização e, em seguida, pesados e ressuspensos em tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5%, azul de bromofenol 0,25%, β -mercaptoetanol 5% e sacarose 15%). As amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min. Após este tratamento, 20 μ L das amostras foram aplicadas no gel de concentração. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente 16 h.

I.3.2.5.2 - Coramento e descoramento do gel

Após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas e colocado na solução corante (Comassie Blue R 0,05%, ácido acético 70% e metanol 40%) por 1 h e após esse período, o gel foi transferido para uma solução descorante (metanol 40% e ácido acético 7%) e mantido até a visualização das bandas de proteínas.

I.3.3 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD₁ contra fungos

I.3.3.1 - Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido

I. 3.3.1.1 - Obtenção de esporos de fungo filamentoso

O fungo *F. oxysporum* foi transferido do estoque e colocado para crescer em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud por aproximadamente 15 dias a 30 °C. Após esse período, 10 mL de caldo Sabouraud foram vertidos sobre a placa contendo os fungos e os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gase para evitar a passagem de restos miceliais que pudessem estar em solução juntamente com os esporos. Esses esporos foram então quantificados em câmara de Neubauer (Optik Labor) na presença de um microscópio óptico.

I.3.3.1.2- Obtenção das células de leveduras

Inóculos das células das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram mantidas por um período de dois dias a 30 °C. Após este período, as células foram utilizadas no ensaio no qual, com o auxílio de uma alça de semeadura, colônias foram retiradas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura (caldo Sabouraud), para que se fizesse a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer através do uso de um microscópio óptico (Axiovision 4, Zeiss).

I.3.3.1.3 - Análise da inibição do crescimento fúngico

Após quantificação, as células do fungo filamentoso *F. oxysporum* e das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* (1×10^4 células.mL⁻¹) foram incubadas em 200 µL de caldo Sabouraud contendo 100 µg.mL⁻¹ da defensina natural PvD₁. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), incubadas a 30 °C por um período de 60 h para o fungo filamentoso e 24 h para as leveduras. Para a

observação da inibição do crescimento dos fungos, foi determinada a densidade óptica calculada a partir de leituras em um leitor de microplacas (EZ Read 400, Biochrom), a 620 nm a cada 6 h. Todo o ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

I.3.3.2 - Efeito da defensina natural PvD₁ sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células do fungo filamentosso *F. oxysporum* e de *C. albicans*

Para avaliar se o mecanismo de ação da PvD₁ envolvia a indução do estresse oxidativo, as sondas fluorescentes 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) (Calbiochem - EMD) e 3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato (DAF₂DA) (Calbiochem - EMD) foram utilizadas para medir o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) intracelular, respectivamente, segundo metodologia descrita por Aerts *et al.* (2007), com modificações. Após ensaio de inibição do crescimento (descrito no item I.3.3.1), 50 µL das células de *F. oxysporum* e *C. albicans*, crescidas na ausência e na presença de 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁, foram incubadas com as sondas específicas para ROS (H₂DCFDA, 20 µM, diluído em DMSO) e NO (DAF₂DA, 20 µM, diluído em DMSO) que são capazes de se difundirem através da membrana plasmática das células e serem hidrolisados por esterases intracelulares formando uma molécula não fluorescente. Esta molécula então irá reagir com o ROS e NO intracelular formando uma molécula fluorescente. Após 2 h de incubação, ao abrigo da luz e com constante agitação, as células foram analisadas em microscópio de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm). Os resultados representam experimentos em triplicata.

I.3.3.3 - Análise do efeito da defensina natural PvD_1 sobre a inibição da acidificação do meio induzido por glicose por células de fungos filamentosos e leveduras

I.3.3.3.1 - Manutenção e preparo das células

O fungo filamentoso *F. oxysporum* foi transferido do estoque e colocado para crescer em uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud por aproximadamente 15 dias a 30 °C. Após esse período, 4 mL do tampão usado na acidificação (tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,0) foram vertidos sobre a placa contendo o fungo, os esporos foram liberados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Essa suspensão foi devidamente filtrada em gase, para evitar a passagem de restos miceliais, e deixada na estufa por 12 h.

Células de cepas selvagens da levedura *C. albicans* foram transferidas do meio BDA inclinado (estoque) para placas de Petri contendo BDA, onde cresceram por três dias a 30 °C. Após este período, 4 mL de meio de cultura líquido foram vertidos sobre as colônias e as células ressuspensas e homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, 5 µL dessa suspensão celular foram adicionados em 200 mL de meio de cultura (caldo batata dextrose) e mantidas sob intensa agitação a 30 °C por aproximadamente 16 h. Após este período de crescimento, o material foi centrifugado a 3.000 x g por 5 min a 4 °C. As células precipitadas foram lavadas com água ultrapura e centrifugadas a 3.000 x g por 5 min a 4 °C, sendo este procedimento repetido três vezes, para que todo o meio de cultura fosse retirado. Ao final das lavagens, as células precipitadas foram ressuspensas em 3 mL de água ultra pura e utilizadas no ensaio de inibição da acidificação do meio por células de leveduras (Gomes *et al.*, 1998).

I.3.3.3.2 - Ensaio de acidificação

Após as 12 h de incubação no tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,0, os esporos do fungo *F. oxysporum* (10^7 células.mL⁻¹) foram pré-incubados por 30 min em meio contendo tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,0 na presença e na ausência da PvD_1 , na concentração de 200 µg.mL⁻¹. Após os períodos de pré-incubação, foram

adicionados 200 μL de glicose 0,5 M e em seguida foram feitas leituras do pH a cada minuto por um tempo de 30 min.

Células de *C. albicans* cepa selvagem (10^7 células.mL⁻¹) foram pré-incubadas em diferentes tempos (10 min, 30 min e 1 h) em meio contendo tampão Tris-HCl 10 mM pH 6,0 na presença e na ausência da Pvd₁ na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após os períodos de pré-incubação, foram adicionados 200 μL de glicose 0,5 M e em seguida foram feitas leituras do pH a cada minuto por um tempo de 30 min.

Estes ensaios foram feitos em triplicata e os cálculos de ΔpH ($\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$) foram feitos para determinar a porcentagem de inibição obtida com o experimento. O volume final dos ensaios foi de 1 mL. Todos os ensaios foram feitos segundo metodologia adaptada de Gomes *et al.* (1998).

Os gráficos são mostrados em função da porcentagem de acidificação em função da concentração e/ou do tempo. Os dados foram avaliados usando ANOVA. As diferenças médias não foram consideradas significativas quando $P > 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows).

I.3.3.4 - Teste para a verificação de apoptose em células da levedura *S. cerevisiae* na presença da defensina natural Pvd₁

I.3.3.4.1- Preparo da levedura para a obtenção de esferoplastos

A obtenção de esferoplastos foi feita de acordo com o método descrito por Okorokov & Lehle (1998) com modificações. Inicialmente o volume do pré-inóculo adicionado em 200 mL ou 400 mL do meio YPD (do inglês, *yeast peptone dextrose*) (peptona 2g/L, extrato de levedura 1g/L, glicose 2g/L) (Sigma) foi calculado considerando o tempo de geração da cepa utilizada, de acordo com sua curva de crescimento previamente determinada. Dessa forma, após aproximadamente 15 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm, as células foram crescidas até o meio da fase logarítmica.

As células foram inoculadas em meio YPD e colocadas para crescer sob agitação até o meio da fase logarítmica. A cultura de suspensão celular foi centrifugada a 3.000 x g por 7 min a 4 °C, e em seguida, foi feito o descarte do meio e a determinação do peso úmido das células.

Para cada 1 g de peso úmido de células foram adicionados 5 mL de tampão de esferoplastos (1,2 mol sorbitol, 50 mM Tris pH 7,2), 0,9 mg do complexo enzimático lítico (liticase) e 12 µL de β-mercaptoetanol (concentração final de 30 mM). Esta suspensão celular em tampão para esferoplastos foi incubada a 37 °C sob fraca agitação manual.

O monitoramento cinético da hidrólise da parede celular foi realizado com o espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, misturando 10 µL da suspensão celular em 990 µL de água. Este monitoramento foi feito a cada 5 ou 10 min a partir do tempo 0 (zero) de incubação até o tempo máximo de 50 min ou até que a absorbância atingisse 20% do valor inicial.

O tubo com a suspensão de esferoplastos foi transferido para o gelo e a reação de hidrólise da parede celular foi finalizada pela adição do tampão de parada, “*stop solution*” (1,2 mol sorbitol, 20 mM Tris, 20 mM EDTA pH 7,4), e uma concentração final de 0,2 M de benzamidina e 0,2 M de PMSF. A suspensão de esferoplastos foi adicionada ao tubo da centrífuga sobre uma solução colchão (1,4 mol sorbitol, 50 mM Tris pH 7,4). Isso foi feito com auxílio de uma pipeta, de forma lenta, evitando a mistura entre a suspensão e a solução colchão. Este material foi então centrifugado a 3. 500 x g por 5 min a 4 °C, para que fosse possível eliminar os resíduos de enzimas líticas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as paredes dos tubos foram secas com papel para evitar que possíveis enzimas hidrolíticas atuassem nos esferoplastos.

I.3.3.4.2 - Detecção de apoptose

Os esferoplastos (1×10^8 cel.mL⁻¹) foram incubados em tampão de esferoplastos contendo 50 µg.mL⁻¹ da Pvd₁. O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) com o volume final de ensaio ajustado para 200 µL, a 30 °C por um período de 2 h de incubação. Após as 2 h, os esferoplastos foram lavados em tampão de esferoplastos e centrifugados a 200 x g por 5 min. O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL do kit de marcação Annexin-V-Fluos (Roche), seguindo as recomendações do fabricante, e incubado sob agitação, protegido da luz por 15 min. Em seguida, os esferoplastos foram analisados por contraste interferencial diferencial (DIC, do inglês *differentia linterference contrast*) e por

microscopia de fluorescência em microscópio óptico (Axiovision 4, Zeiss) equipado com um conjunto de filtros fluorescentes para detecção de fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 – 490 nm e emissão de 500 nm). Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio 2,5 mM nas mesmas condições da *PvD*₁. O Kit Annexin-V-Fluos (Roche) contém Anexina V (que se liga a fosfolípídeos de carga negativa com alta especificidade para fosfatidilserina, que durante os estágios iniciais da apoptose é translocada para o folheto externo da membrana plasmática) e iodeto de propídio para a diferenciação de células necróticas.

I.3.4 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural *PvD*₁ contra parasitas

I.3.4.1 - Efeito da defensina natural *PvD*₁ na proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis*

I.3.4.1.1 - Cultivo de células de *Leishmania amazonensis*

Promastigotas de *L. amazonensis* (cepa Josefa) foram crescidas em meio Warren's (90% Brain heart broth) (Fluka), contendo 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor), enriquecido com 0,01% de ácido fólico e 0,4% de hemina a 28 °C com transferência para o novo meio a cada três dias.

I.3.4.1.2 - Ensaio de inibição da proliferação do protozoário

Em placas de cultura de células (96 poços), *PvD*₁ nas concentrações de 300 e 600 µg.mL⁻¹, foi incubada com 1,5% de dimetilsulfóxido (DMSO, do inglês *dimethyl sulfoxide*) e meio Warren's num volume final de 100 µL, juntamente com 100 µL de meio Warren's contendo promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 1,5 x 10⁶ parasitas.mL⁻¹. Para o controle da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* repetimos o mesmo procedimento, sem adição da *PvD*₁. A placa foi incubada a 28 °C.

A proliferação do parasita foi acompanhada em 24 e 48 h através da contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Todo o ensaio foi feito em triplicata e os resultados representam a média do número de células de cada amostra em relação ao tempo de cada tratamento.

I.3.4.2 - Análise ultraestrutural de células de *L. amazonensis* tratadas com a defensina PvD₁

Foi feito um ensaio de inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, como descrito no item I.3.4.1., porém utilizando promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de $3,7 \times 10^6$ parasitas/mL. Em seguida, as células após tratamento com PvD₁, por 24 h, foram submetidas aos seguintes tratamentos: lavagem por três vezes (10 min cada lavagem) com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3; fixação em 1% de glutaraldeído (GA) e 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, cloreto de cálcio 100 mM e sacarose 5%, por um período de 1,5 h a 4 °C; lavagem por duas vezes (30 min cada lavagem) com tampão fosfato 0,1 M pH 7,3; pós-fixação com 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão fosfato 0,1 M, por 30 min, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente; desidratação em uma série crescente de acetona (50%, 70%, 90%, 100%, novamente 100% e por fim acetona 100% super seca (SS), tendo cada etapa a duração de 1 h); uma série de infiltrações em resina Epon na seguinte sequência (3 partes de acetona 100% SS para 1 de Epon; 2 partes de acetona 100% SS, para 1 de Epon; 1 parte de acetona 100% SS, para 1 de Epon; 1 parte de acetona 100% SS, para 2 de Epon; 1 parte de acetona 100% SS, para 3 de Epon; apenas Epon (cada etapa com duração de 8 h); emblocamento e polimerização por 48 h a 60 °C. Seções ultrafinas (0,1 µm) foram feitas e colocadas em grades de cobre, coradas com acetato de uranila por 10 min, seguido por citrato de chumbo por 5 min e então analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900) operado em 80 kV.

I.3.4.3 - Efeito da defensina natural PvD₁ sobre a permeabilização da membrana plasmática de *L. amazonensis*

A permeabilização da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green, segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999) com algumas modificações. Sytox green é um corante que possui alta afinidade para ácidos nucléicos e penetra em células apenas quando sua membrana está comprometida.

Após o ensaio de inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* (descrito no item I.3.4.1.) no tempo de incubação de 24 h, uma alíquota de 120 μL de parasitas crescidos na presença e na ausência da *PvD*₁, foi retirada da placa e em seguida incubada por 30 min com 0,2 μM do corante fluorescente Sytox green (Molecular Probes, Invitrogen), diluído em DMSO, sob abrigo da luz e agitação. Depois do tempo de incubação, os parasitas foram fixados com paraformaldeído 2%. As células foram observadas no microscópio óptico Axioplan Zeiss com câmera Olympus DP72 equipado com um conjunto de filtros para detecção de fluorescência (excitação: 450-490 nm; emissão: 500 nm). Para visualizar as imagens foi utilizado o programa Soft Imaging System Cell. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

I.3.4.4 – Investigação de internalização da *PvD*₁ acoplada a FITC

Inicialmente, a *PvD*₁, numa concentração de 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ juntamente com 150 μL de tampão bicarbonato-carbonato de sódio 750 mM em pH 9,5 e com 11,5 μL de isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) (Sigma) solubilizado em DMSO na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram incubados sob agitação, ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 1 h. Após este período, essa amostra foi liofilizada e submetida à cromatografia de exclusão molecular, utilizando resina Sephadex G-50, (Sigma) (coluna de 25 x 1,5 cm), num fluxo de 200 $\mu\text{L.min}^{-1}$ para a eliminação do FITC livre, sendo em seguida liofilizada para a posterior incubação com células de *L. amazonensis*.

Com *PvD*₁ agora acoplada ao FITC, foi feito um ensaio como descrito no item I.3.4.1. A placa foi incubada em BOD a 28 °C por 48 h. No tempo de 24 h retiramos uma alíquota de 10 μL , adicionamos 90 μL de fixador e fizemos a contagem do número de parasitas viáveis em câmara de Neubauer. As células foram observadas no microscópio óptico Axioplan Zeiss com câmera Olympus DP72 equipado com um conjunto de filtros para detecção de fluorescência (excitação: 450-490 nm; emissão: 500 nm). Para visualizar as imagens foi utilizado o programa Soft Imaging System Cell. Todas as imagens de fluorescência foram captadas com o mesmo tempo de exposição.

PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE Pvd_{1r}

II.3.1 - Materiais biológicos

II.3.1.1 - Microrganismos

Células de *Escherichia coli*, linhagem JM 109 [genótipo: *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, (*r_k⁻*, *m_k⁺*), *relA1*, *supE44*, λ^- , $\Delta(lac-proAB)$, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZΔM15*]] e linhagem BL21 (DE₃) pLysS [genótipo: *F⁻*, *ompT*, *hsdS_B* (*r_B⁻*, *m_B⁻*), *dcm*, *gal*, (DE₃), pLysS, Cm^r] foram adquiridas da Promega Corporation, USA. Células de *Escherichia coli*, linhagem Rosetta gami 2 (DE₃) pLysS [genótipo: $\Delta(ara-leu)7697$ $\Delta lacX74$ $\Delta phoA$ *Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* (DE₃) *F'*[*lac⁺ lacI^q pro*] *gor522::Tn10 trxB* pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)] foram adquiridas da Novagen, Inc. Estas bactérias foram mantidas em *stab* de glicerol (750 μ L da cultura celular + 250 μ L de glicerol 50%).

A cepa selvagem de *C. albicans* foi cedida e mantida conforme descrito no item I.3.1.2.

A cepa de *C. albicans* mutante (Δ GCS1 - deficiente na enzima glicosilceramida sintase (GCS, do inglês *glucosyl ceramide synthase*), e por isso não apresenta o esfingolípido glicosilceramida (GlcCer) em sua membrana), foi originada pelo Dr. Dirk Warnecke do Institut für Allgemeine Botanik, da Universidade de Hamburgo, Alemanha e gentilmente cedida pela Prof^a. Eleonora Kurtenbach do (IBCCF), pela Dr^a Eliana Barreto Bergter do (IMPPG) e pelo Dr. Luciano Neves Medeiros do (CCS), todos da (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, cultivada em meio BDA (infusão de batata 4g/L, dextrose 20g/L, ágar 15g/L) (Acumedia), e mantida em cultura a 23 °C no LFBM, do CBB da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

II.3.2 - Clonagem molecular, expressão heteróloga e caracterização estrutural da defensina recombinante Pvd_{1r}

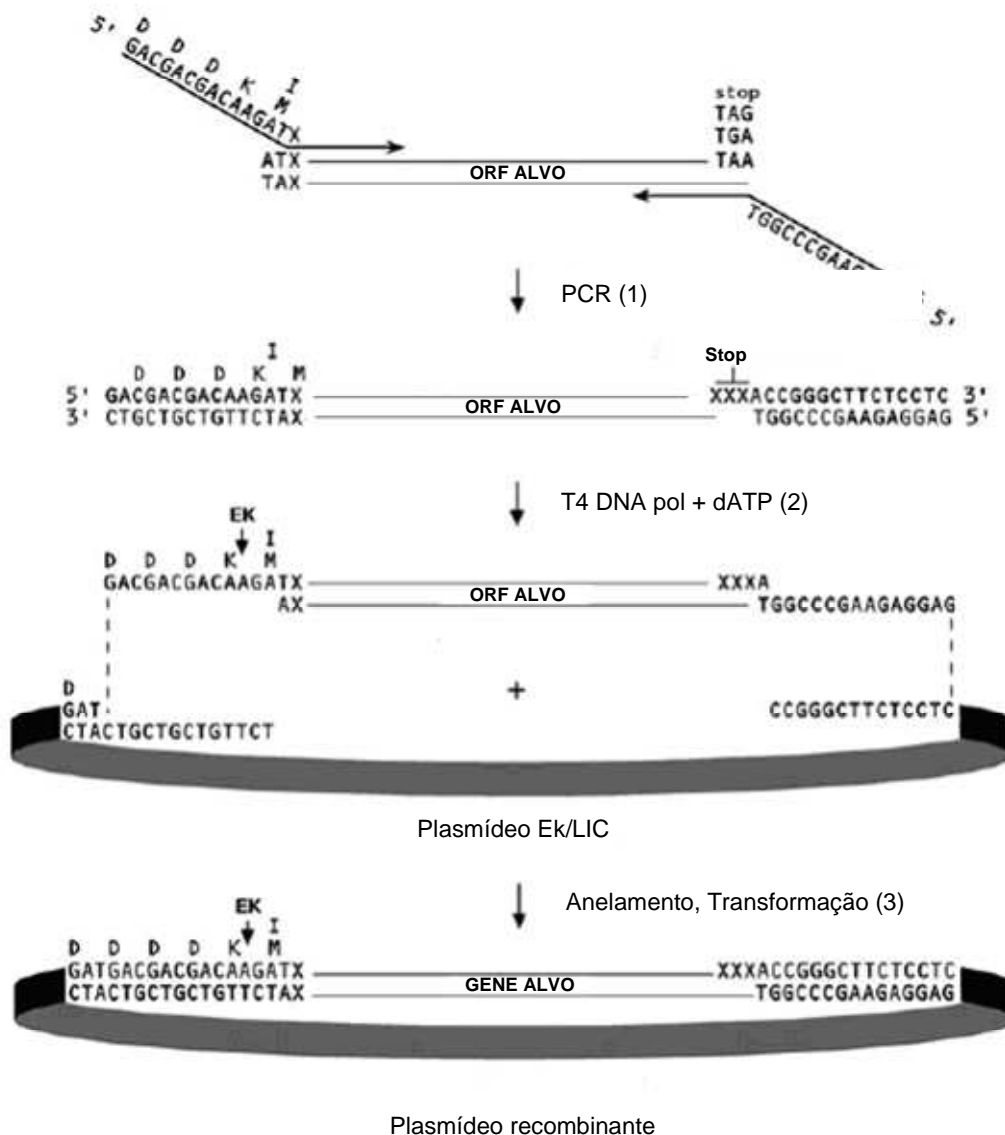
Todos os procedimentos de biologia molecular utilizados neste trabalho foram baseados em Sambrook e Russel (2001).

II.3.2.1 - Obtenção do cDNA de feijão comum *P. vulgaris*

O cDNA que codifica para a defensina *PvD₁* de *P. vulgaris* foi obtido como descrito por Games *et al.* (2008).

II.3.2.2 - Estratégia de clonagem no vetor de superexpressão pET-32 Ek/LIC

O vetor pET-32 Ek/LIC (Novagen, Inc.) é parte de um sistema de expressão e purificação de proteínas baseado em um sistema de clonagem independente de ligação (LIC, do inglês *ligation independent cloning*), ou seja, permite a clonagem direcional de produtos de PCR sem a necessidade de digestão com enzimas de restrição. O sistema LIC explora a atividade exonucleásica 3'→5' da enzima T₄ DNA polimerase para criar uma região de aproximadamente 13 a 14 pares de bases (pb) em uma fita única no vetor. Produtos de PCR com uma região complementar são criados com uma extensão apropriada 5' nos iniciadores. Assim, após tratamento com a T₄ DNA polimerase, na presença de ATP, são geradas regiões específicas, também de fita simples, compatíveis com as do vetor (esquema 1). Este vetor foi desenhado especialmente para expressão de proteínas recombinantes fusionadas, dentre outras moléculas, à tireoredoxina e à cauda de histidinas. A tireoredoxina ajuda na solubilidade da proteína expressa e a cauda de His é útil para a purificação e identificação da proteína. Após a purificação, estas moléculas podem ser completamente removidas pela clivagem proteolítica com enteroquinase cujo sítio de clivagem é provido pelo desenho do vetor (figura 5).



Esquema 1: Estratégia de clonagem no vetor pET-32 Ek/LIC destacando o sistema de clonagem independente de ligação (LIC) (retirado do manual do vetor, User Protocol TB163 Rev. G 1005, Novagen, Inc.). (1) amplificação do fragmento alvo com os iniciadores desenhados especificamente para a clonagem no vetor pET-32 Ek/LIC; (2) tratamento do fragmento com a T₄ DNA polimerase; (3) ligação do fragmento amplificado ao vetor pET-32 Ek/LIC.

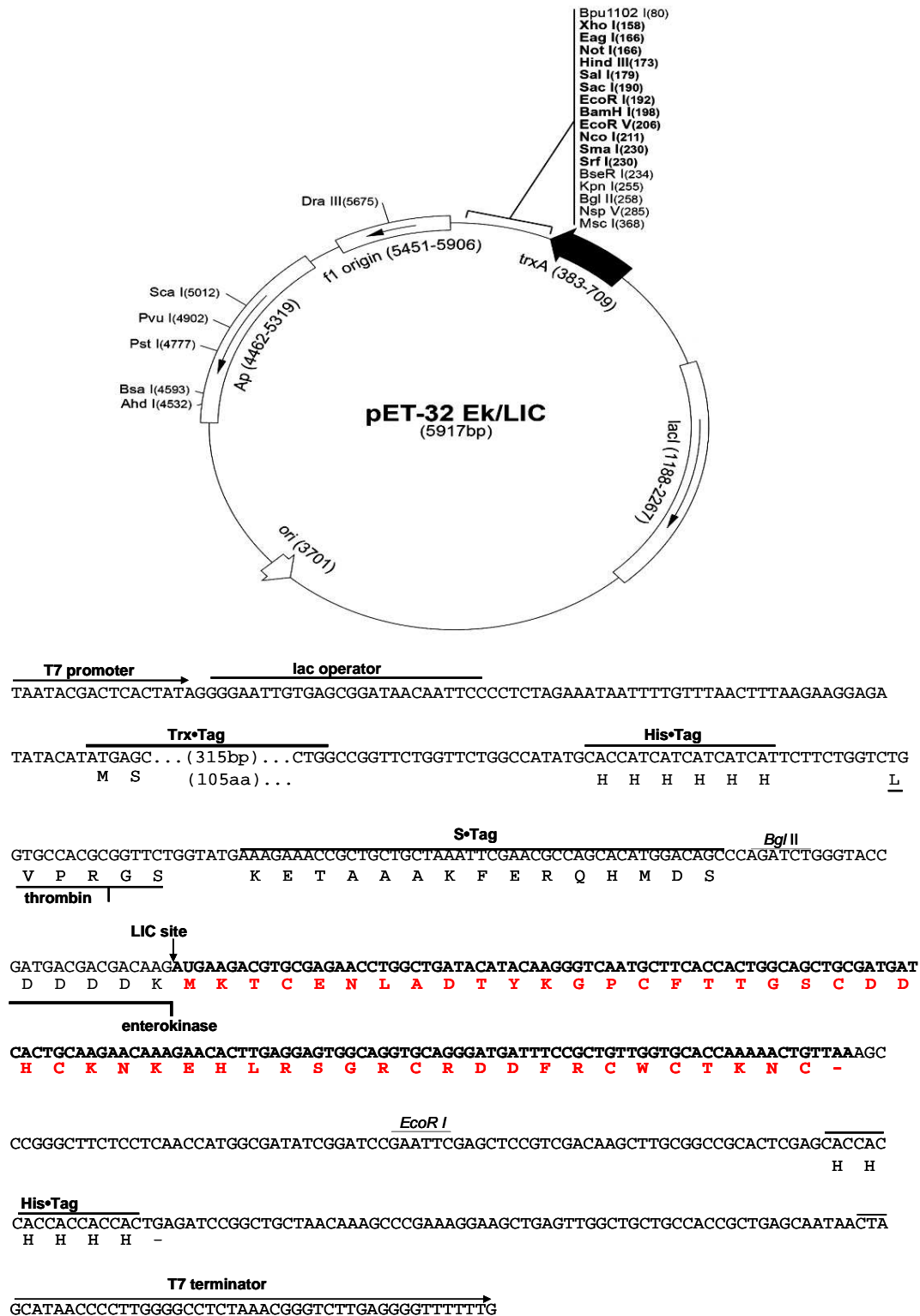


Figura 5: Mapa de restrição do vetor pET-32 Ek/LIC (retirada do manual do vetor, *User Protocol TB163 Rev. G 1005*, Novagen, Inc.) e em vermelho está destacada a posição e a sequência da região do cDNA que codifica PVD₁. TrxTag – tireoredoxina fusionada; HisTag – histidina fusionada; STag – glutationa fusionada. Todas as proteínas fusionadas podem ser eliminadas com o corte da enzima proteolítica enteroquinase.

II.3.2.3 - Desenho do iniciador para clonagem no vetor de superexpressão pET-32 Ek/LIC

A partir da sequência de nucleotídeos do fragmento de interesse (obtida por Games *et al.*, 2008) foram desenhados iniciadores para a clonagem no vetor pET-32 Ek/LIC. Estes foram construídos seguindo instruções do fabricante do kit do vetor (Novagen, Inc.) e denominados DEFs (sense) e DEFas (antisense).

Assim, os iniciadores foram construídos da seguinte forma:

- Iniciador “sense”: 5' GAC GAC GAC AAG ATG **AAG ACG TGC GAG AAC CTG**- 3' (DEFs)
- Iniciador “antisense”: 5' GAG GAG AAG CCC GGT **TTA ACA GTT TTT GGT**- 3' (DEFas)

As letras em negrito correspondem à sequência do iniciador que anela com o fragmento e as letras sublinhadas correspondem à sequência que se anela ao vetor e foram introduzidas para gerar regiões específicas que podem se anelar ao vetor pET após tratamento com T4 DNA polimerase. As ondas duplas destacam o códon da metionina, inserida no iniciador de acordo com as instruções do fabricante (a sequência que codifica para a defensina de sementes de *P. vulgaris* não possui este códon naturalmente). Os iniciadores foram sintetizados por Invitrogen, EUA/ Life Technologies, Brasil.

II.3.2.4 - Reação em cadeia da polimerase - Teste da temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) foi feita inicialmente em cinco temperaturas diferentes, que variaram em torno da temperatura de anelamento dos iniciadores fornecida pelo fabricante, e utilizando três concentrações diferentes dos iniciadores (DEFs e DEFas) e Taq DNA polimerase de alta fidelidade (FideliTaq DNA Polymerase, GE Healthcare). A reação foi feita no termociclador Mastercycler Gradient 22331 (Eppendorf) que permite a formação de um gradiente de temperatura.

As misturas foram montadas do seguinte modo:

- Mistura 1 (Mix 1): 61,2 μL de água, 10 μL do tampão da FidelityTaq 10x [Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, e KCl 500 mM], 6 μL MgCl_2 25 mM, 2 μL de dNTPs 10 mM, 10 μL de iniciador sense 10 pmol, 5 μL do iniciador anti-sense 10 pmol, 5 μL do cDNA e 0,8 μL da FidelityTaq DNA polimerase (5 u/ μL);

- Mistura 2 (Mix 2): 61,2 μL de água, 10 μL do tampão da FidelityTaq 10x, 6 μL MgCl_2 25 mM, 2 μL de dNTP 10 mM, 5 μL de iniciador sense 10 pmol, 10 μL de iniciador anti-sense 10 pmol, 5 μL do cDNA e 0,8 μL da FidelityTaq DNA polimerase (5 u/ μL);

- Mistura 3 (Mix 3): 56,2 μL de água, 10 μL do tampão da FidelityTaq 10x, 6 μL MgCl_2 25 mM, 2 μL de dNTP 10 mM, 10 μL de iniciador sense 10 pmol, 10 μL de iniciador anti-sense 10 pmol, 5 μL do cDNA e 0,8 μL da FidelityTaq DNA polimerase (5 u/ μL).

Para cada reação foi feito um branco que consistia de todos os reagentes com exceção do DNA molde. Cada mistura foi então aliquoteada (20 μL) em tubos para PCR e estes numerados do seguinte modo: Mix 1 de 1 a 5, Mix 2 de 6 a 10 e Mix 3 de 11 a 15. Os tubos numerados foram posicionados na placa do termociclador, onde cada coluna corresponde a uma temperatura diferente, do seguinte modo:

					(DEFs:DEFas)
1	2	3	4	5	Mix 1 (2:1)
6	7	8	9	10	Mix 2 (1:2)
11	12	13	14	15	Mix 3 (1:1)
58,7	60,8	62,1	63,5	64,9	Gradiente em $^{\circ}\text{C}$

A PCR foi programada para 40 ciclos com as seguintes etapas sequenciais:

1) 95 °C por 3 min; 2) 45,3 °C por 45 s; 3) 72 °C por 1 min e 30 s; 4) 95 °C por 45 s; 5) gradiente de temperatura por 45 s; 6) 72 °C por 1 min e 30 s; 7) volta para passo 4 por 40 vezes; 8) 72 °C por 5 min; 9) 8 °C por 1h para as amostras resfriarem ainda no termociclador.

Depois da PCR, as amostras foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com Sambrook e Russel (2001) para confirmar se houve amplificação e qual a melhor condição para que a mesma ocorra. Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) composto dos seguintes marcadores (em pb): 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.200, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 100.

II.3.2.5 - Purificação dos fragmentos com o kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System

Uma vez confirmada a amplificação dos fragmentos, uma nova PCR em maior quantidade foi feita nas mesmas condições ótimas pré-determinadas e as amostras foram purificadas utilizando o Kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, as amostras foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta. As bandas referentes ao fragmento de interesse foram identificadas, recortadas do gel, transferidas para tubos de microcentrifuga e solubilizadas na "membrane binding solution" (acetato de potássio 0,5 M, pH 5,0 e isotiocianato de guanidina 4,5 M) (proporção 1:1, m:v; a 60 °C até completa dissolução do gel). Posteriormente, a mistura foi transferida para uma minicoluna pré-fabricada e deixada em contato com a mesma por 1 min a temperatura ambiente. A coluna foi então centrifugada (10.000 x g por 1 min a temperatura ambiente) e o volume que passou por ela foi descartado. Setecentos microlitros da solução "membrane wash solution" (acetato de potássio 10 mM, pH 5,0, etanol 80% e EDTA 16,7 µM, pH 8,0) foram adicionados à coluna e esta foi novamente centrifugada (10.000 x g por 1 min a temperatura ambiente). Mais uma vez, o

volume que passou pela coluna foi descartado e foram adicionados mais 500 μL da solução “membrane wash solution”. Desta vez a coluna foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 5 min e ao final da centrifugação a coluna foi transferida para um novo tubo (tubo coletor). À coluna foram adicionados 50 μL de água ultrapura (fornecida com o Kit) que foi deixada em contato com a coluna por 1 min a temperatura ambiente. Após esse período, a coluna foi centrifugada ($10.000 \times g$ por 1 min) e o material coletado foi armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

II.3.2.6 - Clonagem do fragmento amplificado no vetor

A clonagem dos fragmentos purificados no vetor pET-32 Ek/LIC foi feita segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para que se ligassem corretamente ao vetor, antes de se fazer a ligação, os fragmentos foram tratados com a T_4 DNA polimerase. Em um tubo de microcentrífuga foram reunidos 5 μL do produto da reação de PCR (~ 300 ng do fragmento purificado), 2 μL de tampão da T_4 10x (Tris-acetato 33 mM pH 7,0 acetato de sódio 66 mM, acetato de magnésio 10 mM, DTT 1 mM), 2 μL de dATP 25 mM, 1 μL de DTT 100 mM, 0,2 μL da T_4 DNA polimerase (25 u/ μL), e 9,8 μL de água ultrapura. A solução foi incubada a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min e, posteriormente, inativou-se a T_4 , a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

Para o anelamento dos fragmentos ao vetor, 2 μL da solução preparada conforme citado acima, foram misturados a 1 μL (50 ng) do vetor e 1 μL de EDTA 25 mM. Essa mistura foi incubada a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. A construção de DNA resultante foi nomeada pET-*PvD*₁ e foi utilizada para a transformação das células bacterianas de *E. coli*, linhagem JM 109.

II.3.2.7 - Produção de células competentes de *E. coli*, linhagem JM109

Uma colônia bacteriana de uma cultura fresca de *E. coli*, linhagem JM109, foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de meio LB (Luria-Bertani) (Sigma) (5g/L extrato de levedura, 1 g/L triptona, 1 g/L NaCl) e este incubado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 h a 2500 rpm (pré-inóculo). Desse pré-inóculo foram retiradas alíquotas de 0,2, 0,4 e 0,8 mL que foram transferidas para 50 mL de meio (LB) e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h a 250 rpm. Após esse período, foram feitas leituras no espectrofotômetro a 600 nm. A

cultura que apresentou densidade óptica em torno de 0,55 foi usada para o preparo das células competentes, sendo transferida para banho de gelo por 10 min e centrifugada a 3.500 x *g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensão em 10 mL de solução salina (PIPES 10 mM, pH 6,7, MgCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM e KCl 250 mM) e centrifugado 3.500 x *g* por 10 min a 4 °C). O sobrenadante foi mais uma vez descartado e o sedimento de células foi suspenso em 5 mL da solução salina, acrescida de 187,5 µL de DMSO 100%. As células foram homogeneizadas gentilmente e incubadas por 10 min em banho de gelo. Após essa incubação, mais 187,5 µL de DMSO 100% foram adicionados; a suspensão de células foi novamente homogeneizada e alíquotas de 200 µL foram transferidas para tubos de microcentrífuga estéreis e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, antes de serem armazenados a -70 °C (Inoue *et al.*, 1990).

II.3.2.8 - Transformação de células competentes de *E. coli* (linhagem JM109) com a construção pET-PvD₁

Tubos contendo 200 µL de células competentes, armazenados a -70 °C foram descongelados em banho de gelo e às células foram adicionados 5 e 10 µL da construção pET-PvD₁. Feito isto, os tubos foram incubados por 10 min em banho de gelo e, após esse período, os tubos contendo as células com a construção pET-PvD₁ foram transferidos do banho de gelo para o banho de água a 42 °C por 90 s e em seguida novamente para banho de gelo por mais 10 min. Após o choque térmico, foram adicionados 784 µL de meio LB e 16 µL de glicose 1 M às células e, então, essas foram incubadas a 37 °C por 1 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 10.000 x *g*, por 1 min, à temperatura ambiente. Retirou-se o excesso de meio e as células foram plaqueadas em diferentes placas de Petri contendo meio LB acrescido de ampicilina (100 µg.mL⁻¹) (GE Healthcare) e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

II.3.2.9 - Análise dos clones positivos - extração e digestão dos vetores

Para confirmar se os clones positivos realmente possuíam o fragmento de interesse, o vetor foi extraído das células bacterianas, linhagem JM 109, e submetido a uma digestão com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Bgl* II

Colônias foram transferidas para 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 16 h, a 250 rpm. Após esse período de crescimento, $1.500 \mu\text{L}$ de cada cultura foram transferidos, separadamente, para tubos de microcentrífuga e centrifugados a $9.000 \times g$ por 1 min. Os sobrenadantes foram descartados e aos sedimentos foram adicionados $300 \mu\text{L}$ de TENS (Tris-HCl $0,01 \text{ M}$, pH 8,0, EDTA 1 mM , NaOH $0,1 \text{ M}$ e SDS 25 mM) e as amostras foram agitadas por 10 s para a lise celular. Após a lise das células bacterianas, $150 \mu\text{L}$ de acetato de sódio 3 M pH 5,2 foram adicionados e novamente as amostras foram agitadas por 10 s, antes de serem centrifugadas a $13.200 \times g$ por 3 min. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e a eles foi adicionado 1 mL de etanol 100% gelado. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e incubadas por 1 min a temperatura ambiente e novamente centrifugadas nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, lavados com 1 mL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados, secos em banho-seco a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 10 min. Após a secagem, os precipitados foram ressuspensos em $40 \mu\text{L}$ de TE contendo RNase A (Tris-HCl $0,01 \text{ M}$, pH 8,0, EDTA 1 mM e RNase A $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubados nesse tampão por 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao final desse procedimento, os vetores extraídos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bgl*II.

O vetor pET-32 Ek/LIC possui sítios de restrição para as enzimas *Eco*R I e *Bgl* II flanqueando a região em que o fragmento é inserido (figura 5), portanto a digestão com estas enzimas, abre o vetor e ao mesmo tempo libera o fragmento inserido. A reação de digestão foi feita da seguinte forma: $5 \mu\text{L}$ da extração plasmidial, $2 \mu\text{L}$ de tampão das enzimas 10x [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl_2 5 mM , KCl 100 mM , Triton X-100 $0,02\%$, β -mercaptoetanol 1 mM e BSA $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$], $0,1 \mu\text{L}$ de *Bgl* II ($10 \text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), $0,06 \mu\text{L}$ de *Eco*RI ($20 \text{ u}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e $12,84 \mu\text{L}$ de água ultrapura. As amostras foram homogeneizadas e então incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h. Ao final da incubação, os vetores digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar se houve a transformação bacteriana.

II.3.2.10 - Transformação de células competentes de *E. coli* (linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS) com a construção pET-PvD₁

A construção pET-PvD₁, extraída conforme metodologia descrita no item II.3.2.9, foi utilizada para a transformação de linhagem de *E. coli* apropriada para a expressão de proteínas (linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS). A metodologia utilizada para a transformação foi a mesma citada no item II.3.2.8. A confirmação da transformação bacteriana foi feita através de PCR diretamente das colônias (PCR montada seguindo metodologia descrita no item II.3.2.4), seguida por visualização eletroforética em gel de agarose 1%. A confirmação da transformação foi feita também por indução como descrito no item II.3.2.11. Vale ressaltar que as células da linhagem Rosetta gami (DE3) pLysS crescem em meio LB acrescido de ampicilina (50 µg.mL⁻¹) e cloranfenicol (34 µg.mL⁻¹) (GE Healthcare). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

II.3.2.11 - Indução da expressão heteróloga da defensina de *P. vulgaris* em bactérias *E. coli* (linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS)

Uma vez confirmada a transformação das células bacterianas de expressão, a indução da expressão da PvD_{1r} foi feita seguindo a metodologia indicada pelo fabricante do kit do vetor (Novagen, Inc.).

Uma colônia bacteriana de uma cultura fresca de *E. coli*, linhagem Rosetta gami 2 (DE₃) pLysS transformada com a construção pET-PvD₁, foi inoculada em 30 mL de meio LB contendo 34 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol e 50 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubada a 37 °C por 16 h a 250 rpm (pré-inóculo). Desse pré-inóculo foi retirada uma alíquota de 10 mL e transferida para 400 mL de meio LB fresco (inóculo). O inóculo foi, então, incubado a 37 °C por 3 h a 250 rpm até atingir a densidade óptica entre 0,5 e 1 nm, medida em espectrofotômetro a 600 nm. Após esse período, adicionou-se à cultura 1 mM de isopropil B-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG, do inglês *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e esta foi novamente incubada a 37 °C por 3 h e a 250 rpm. Uma alíquota foi retirada imediatamente antes da adição do IPTG (tempo 0 h) e esta foi considerada o controle da indução. Estas amostras

foram ressuspensas em tampão de amostra (extrato bruto bacteriano), como descrito no item I.3.2.5.1 e aplicadas em gel de tricina, como descrito no item I.3.2.5.

Para a purificação da *PvD_{1r}*, posteriormente, as células induzidas foram recuperadas por centrifugação (15.400 x *g* por 10 min a 4 °C), ressuspensas em 25 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo 500 mM de cloreto de sódio e 40 mM de imidazol e armazenadas a -20 °C. Todo o processo de indução foi monitorado por eletroforese em gel de tricina de acordo com Schägger and von Jagow (1987) como descrito no item I.3.2.5.

II.3.2.12 - Lise celular e recuperação da fração solúvel

As células induzidas, até então armazenadas a -20 °C, foram descongeladas e a elas acrescentado 1 mM de fluoreto de fenilmetilasulfonila (PMSF, do inglês *phenylmethanesulfonyl fluoride*) e 1% de coquetel de inibidores (Sigma, USA). Posteriormente, as células foram rompidas por sonicação (10 pulsos de 30 s, na potência de 8 watts) (R2D91109, Unique). Após sonicação, a solução celular foi centrifugada a 15.400 x *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi aquecido por 30 min a 90 °C e centrifugado a 15.400 x *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi recuperado (extrato solúvel bacteriano) e armazenado a -20 °C.

II.3.3 - Isolamento e caracterização estrutural da defensina recombinante *PvD_{1r}*

II.3.3.1 - Cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺- NTA agarose

Para a purificação da *PvD_{1r}* expressa em bactéria *E. coli*, linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS, inicialmente foi empregada uma cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺- NTA agarose (Qiagen).

A coluna de afinidade foi preparada com 10 mL da resina empacotada sob a ação da gravidade e equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e imidazol 40 mM. Cinco mililitros do sobrenadante obtido conforme descrito no item II.3.2.12 foram centrifugados a 16.000 x *g* por 3 min e aplicados na coluna. A amostra foi eluída com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 500 mM e imidazol 500 mM. Foram coletadas frações de 3 mL.

Os picos foram recuperados, dialisados contra água destilada (membrana com poros de 1.000 Da), com 3 trocas diárias, por 3 dias a 4 °C e liofilizados.

II.3.3.2 - Clivagem com enteroquinase

Como citado anteriormente, as proteínas clonadas no vetor de superexpressão pET-32 Ek/LIC são expressas fusionadas à outras moléculas que são removidas pela clivagem com a enteroquinase. Assim, esta enzima foi utilizada para separar a defensina recombinante das moléculas a ela fusionadas.

Neste trabalho foi utilizada uma enteroquinase bovina recombinante expressa em *E. coli* (Sigma). A reação de clivagem foi montada seguindo a metodologia indicada pelo fabricante. A 8 mg de pó do pico retido da cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺-NTA agarose (8 mg de proteína total, aproximadamente, 6 mg da proteína de interesse) foram adicionados 4 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 50 mM, cloreto de cálcio 1 mM e de Tween 20 0,1%, água ultrapura e 0,12 unidades da enteroquinase. Após homogeneização, a solução foi incubada a 25 °C por 16 h. Em um passo seguinte de purificação, esta fração resultante da clivagem foi novamente submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺-NTA agarose, descrita no item II.3.3.1. Os picos foram recuperados, dialisados contra água destilada (membrana com poros de 1.000 Da), com 3 trocas diárias, por 3 dias a 4 °C e liofilizados.

II.3.3.3 - Cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 em HLPC

Uma coluna de fase reversa C2/C18 equilibrada com 0,1% de TFA também foi empregada no processo de isolamento da PvD_{1r}. O pico N1, obtido na segunda cromatografia de afinidade, foi solubilizado em TFA 0,1% e 500 µL desta amostra foram injetados na coluna de fase reversa. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item I.3.2.3. Após ser coletado, o pico de interesse foi reunido e seco em “speedvac”.

Todo o processo de purificação da PvD_{1r} foi monitorado através de eletroforese em gel de tricina na presença de SDS, segundo método de Schägger e von Jagow (1987) como descrito no item I.3.2.5.

II.3.3.4 - Sequenciamento N-terminal da defensina recombinante Pvd₁r

II.3.3.4.1 - Preparo da amostra e condições de corrida

O preparo das amostras, bem como as condições de corrida, teve como base a metodologia descrita por Hunkapiller e Hood (1983), com modificações. A defensina recombinante purificada a partir de cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 foi ressuspensa em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 8,0; SDS 0,2%; sacarose 10% e azul de bromofenol 0,25%) contendo 5% de β -mercaptoetanol e 5% vinil piridina, incubada, por 30 min a 37 °C e em seguida por 15 min a 60 °C; centrifugada a 16.000 x g por 3 min; e submetida à eletroforese descontínua em gel de tricina na presença de SDS (item I.3.2.5). O gel foi montado 24 h antes do uso. Antes que a amostra fosse aplicada no gel foi feita uma pré-corrída, de 45 min a 8 mA, na qual o tampão catodo continha 5 μ M de glutathiona reduzida. Após a pré-corrída trocou-se o tampão catodo por um novo, desta vez contendo 5 μ M de glutathiona reduzida e 0,1 mM de tioglicolato de sódio; e aplicou-se a amostra.

II.3.3.4.2 - Eletrotransferência para membrana de polivinilidenodifluoreto

Ao término da corrida, o gel foi retirado das placas e imerso em tampão de transferência (glicina 182 mM, Tris 25 mM e metanol 20%) por 20 min. De forma semelhante, a membrana de polivinilidenodifluoreto (PVDF, do inglês *polyvinylidene fluoride*) (Immobilon-PSQ, Millipore) (cortada nas mesmas dimensões do gel) foi imersa por 3 segundos em metanol 100%, imersa em água para retirar o excesso de metanol e, então, imersa no tampão de transferência por 20 min. Passado este tempo, as proteínas do gel foram eletrotransferidas para a membrana de PVDF utilizando uma célula comercial de transferência semi-seca (Trans-blot SD, Biorad). Para a eletrotransferência foi utilizada a seguinte metodologia: sobre a célula de transferência foi montado um “sanduíche” composto respectivamente de quatro folhas de papel de filtro (previamente embebidas em tampão de transferência), a membrana, o gel e mais uma camada de quatro folhas do papel de filtro, embebidas em tampão de transferência. Toda esta montagem foi feita evitando a formação de bolhas entre as camadas. Uma vez montado o “sanduíche”, a célula de transferência

foi fechada, e sobre ela aplicada uma corrente constante de $1\text{mA}/\text{cm}^2$ de membrana por 1 h e 30 min, no sentido gel-membrana. Após a transferência, o “sanduíche” foi cuidadosamente desfeito, a membrana submetida à coloração reversível com Ponceau S (0,1%), para determinação do sucesso da transferência descrito por Towbin *et al.* (1979) (com modificações) e a banda de interesse recortada da membrana. Em seguida, esta foi lavada em água destilada (para que fosse retirado o excesso de corante), seca a temperatura ambiente e submetida ao sequenciamento.

II.3.3.4.3 - Sequenciamento N-terminal

Para a determinação da sequência de aminoácidos foi empregada a metodologia introduzida e desenvolvida por Edman (1950), utilizando-se para tal um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-10). Este é um processo cíclico de três etapas, onde resíduos de aminoácidos são clivados um a um, a cada ciclo, a partir do N-terminal da proteína e são identificados como derivados feniltioidantoína. A primeira etapa do ciclo é o acoplamento do fenilisotiocianato com resíduos N-terminal; a segunda, a clivagem do resíduo N-terminal via ciclização em meio ácido; a terceira, a conversão do derivativo tiazolinona) formado para um derivativo mais estável, a tioidantoína (PTH), o qual pode ser identificado por cromatografia (Allen, 1989).

Ácidos de PTH-aminoácidos foram detectados a 269 nm após separação numa coluna C4 de fase inversa (4,6 x 2,5 mm) em condições isocráticas, de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram comparadas com sequências em bancos de dados relatados de aminoácidos e foram apresentados para o alinhamento automático utilizando o sistema de busca *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando o algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

II.3.3.5 - Estudos de modelagem por homologia

Para encontrar o molde para PvD_{1r} , inicialmente foi feita uma pesquisa no banco de dados entre as sequências de proteínas que apresentassem alguma identidade com a sequência da defensina recombinante, usando o algoritmo do

BLAST, a ferramenta BlastP (Altschul *et al.*, 1997). Assim, a estrutura tridimensional da PvD_{1r} foi modelada utilizando como molde a estrutura da defensina de *Vigna radiata* VrD₂. Para a modelagem foi utilizado o programa Modeller (Sali e Blundell, 1993) que, com base na sobreposição de regiões conservadas estruturalmente, identificadas por alinhamento, entre a PvD_{1r} e o molde VrD₂, gera um conjunto de restrições espaciais e constrói o modelo. O modelo da PvD_{1r} foi gerado e a energia de minimização (aproximadamente 10) foi usada para otimizar os parâmetros geométricos do modelo. A minimização do modelo foi realizada utilizando como ferramenta o programa Visualizador Gromos96 Swiss-PDB.

A qualidade estereoquímica do modelo foi validada utilizando as representações gráficas do tipo Ramachandran através dos programas PROCHECK e Perfil 3D, disponíveis via PARMODEL web server (Laskowski *et al.*, 1993; Uchôa *et al.*, 2004), que analisam diversos parâmetros incluindo ligações peptídicas, planaridade dos anéis das cadeias laterais e torção dos ângulos ϕ e ψ da cadeia principal.

II.3.4 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina recombinante PvD_{1r} contra leveduras

II.3.4.1 - Análise da inibição do crescimento de células de *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1) em meio líquido

II.3.4.1.1 - Obtenção das células

Células da levedura *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), foram colocadas para crescer em placas de Petri contendo BDA, por um período de 48 h a 30 °C, para que possibilitasse um crescimento celular homogêneo. Após este período, as células foram utilizadas no ensaio no qual, com o auxílio de uma alça de semeadura, colônias foram retiradas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura (caldo batata dextrose), para que se fizesse a quantificação das mesmas em câmara de Neubauer através do uso de um microscópio óptico (Axiovison 4, Zeiss).

II.3.4.1.2 - Análise da inibição do desenvolvimento das células

Em placas de cultura de 96 poços, *PvD*₁ e *PvD*_{1r} foram adicionadas à concentração de 100 µg.mL⁻¹ junto a 1 x 10⁻⁴ células.mL⁻¹ das cepas selvagem e mutante (Δ GCS1) da levedura *C. albicans*, para um volume final de ensaio de 200 µL. Para a observação da inibição do crescimento celular, a placa foi lida a cada 6 h, num período total de 24 h, em leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm.

Todo ensaio foi feito em triplicata e sob condições de assepsia em capela de fluxo laminar, segundo metodologia adaptada de Broekaert *et al.* (1990).

Os gráficos são mostrados em função da porcentagem de inibição do crescimento em função do tempo de incubação com a *PvD*_{1r}. Os dados foram avaliados usando ANOVA. As diferenças médias não foram consideradas significativas quando P<0.05. Todas as análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows).

II.3.4.2 - Análise morfológica das células de *C. albicans*, cepa selvagem e mutante, tratadas com a defensina natural *PvD*₁ e a defensina recombinante *PvD*_{1r}

Após o ensaio de inibição do desenvolvimento das células de *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), alíquotas foram retiradas das placas de culturas de células e, com a ajuda de pipeta, colocados sobre uma lâmina de vidro, cobertos com lamínula e observadas em microscópio óptico (Axiovison 4, Zeiss).

II.3.4.3 - Efeito da defensina recombinante *PvD*_{1r} sobre a permeabilização de membranas de *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1)

A permeabilização da membrana das células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1) tratadas com *PvD*_{1r} foi avaliada através da utilização do corante fluorescente Sytox green (Invitrogen), segundo metodologia descrita por Thevissen *et al.* (1999), com algumas modificações. Ao final do ensaio de inibição do crescimento (descrito no item II.3.4.1), as células da levedura *C. albicans* cepas

selvagem e mutante (Δ GCS1), crescidas na ausência e na presença da *PvD_{1r}*, foram incubadas com o Sytox green numa concentração final de 0,2 μ M (dissolvido em DMSO) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após 2 h de incubação com o corante, ao abrigo da luz e sob constante agitação, as células foram observadas por DIC e por microscopia de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss), utilizando um conjunto de filtros fluorescentes para detecção da fluoresceína (excitação com comprimento de onda entre 450 - 490 nm e emissão de 500 nm). Os resultados derivam-se de experimentos em triplicata.

II.3.4.4 - Efeito da defensina recombinante *PvD_{1r}* sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1)

O efeito sobre a indução da produção endógena de ROS e NO em células de *C. albicans* foi analisado como descrito no item I.3.3.2. As células foram observadas por DIC e por microscopia de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss).

II.3.4.5 - Teste para a verificação de apoptose em células da levedura *S. cerevisiae* na presença da defensina recombinante *PvD_{1r}*

A verificação de apoptose em células de *S. cerevisiae* foi feita de acordo com a metodologia descrita no item I.3.3.4. As células foram observadas por DIC e por microscopia de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss).

II.3.4.6 - Investigação de internalização da *PvD_{1r}* acoplada a FITC

Este procedimento foi feito essencialmente como descrito no item I.3.4.4 exceto no fato de que: *PvD_{1r}* foi usada numa concentração de 50 μ g.mL⁻¹ e ressuspendida em 50 μ L tampão bicarbonato de sódio 750 mM, pH 9,5.

Com a *PvD_{1r}* agora acoplada ao FITC, foi feito um ensaio como descrito no item II.3.4.1 Após a incubação, por 24 h, das células da levedura *C. albicans* cepa selvagem e mutante (Δ GCS1) com a *PvD_{1r}* acoplada ao FITC, o corante de núcleo, 4', 6'-diamino-2-fenilindol (DAPI, do inglês *4',6-diamidino-2-phenylindole*), foi adicionado a essas 20 min antes da visualização, e em seguida essas células foram

lavadas com PBS, e então analisadas por microscopia de fluorescência usando um microscópio de fluorescência (Axiovision 4, Zeiss) (Lobo *et al.*, 2007).

4. RESULTADOS

PARTE I: PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL *PvD*₁ DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris*

I.4.1 - Purificação da defensina *PvD*₁ de sementes de *P. vulgaris*

A cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose da F/0-70 obtida por extração protéica das sementes de *P. vulgaris*, apresentou dois diferentes picos denominados D1 (pico não retido), que foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna, e D2 (pico retido), que foi eluído com o tampão de equilíbrio da coluna acrescido de 1 M de NaCl (figura 6A). No pico D1, encontra-se presente a defensina *PvD*₁ previamente isolada de sementes de feijão *P. vulgaris*, como descrita por Games *et al.* (2008). A homogeneidade do pico D1 foi confirmada através de cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em sistema de HPLC, onde foi observado um único pico retido e eluído com um gradiente de acetonitrila, denominado H1 (figura 6B).

A figura 6C mostra o perfil eletroforético das frações obtidas durante o processo de purificação da defensina de sementes de feijão *P. vulgaris*. Na fração F-0/70, assim como na fração D2, é possível se observar a presença de diferentes bandas proteicas. No entanto, como pode ser observado nesta figura, a fração D1, bem como o pico H1, são compostos por um única banda protéica de peso molecular de aproximadamente 6 kDa.

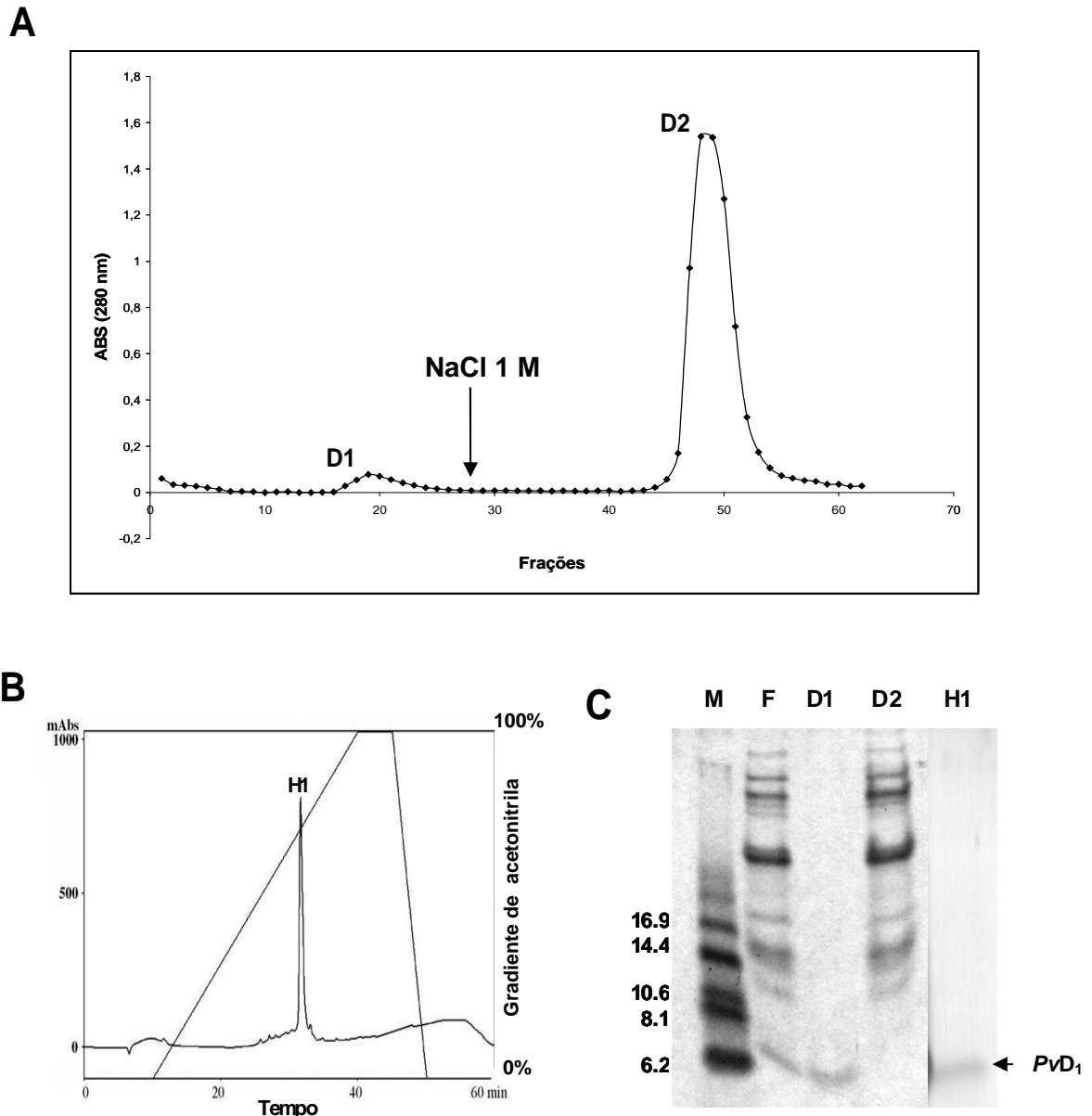


Figura 6: Purificação da PvD_1 de sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão comum). (A) Cromatograma da fração F/0-70 de sementes de *P. vulgaris* em coluna de troca iônica em resina de DEAE-Sepharose; (D1) pico não retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna; (D2) pico retido e eluído com o tampão de equilíbrio da coluna acrescido de 1 M de NaCl. Seta: início da eluição com o tampão contendo NaCl 1 M. (B) Cromatograma da fração D1 em coluna C2/C18 de fase reversa em HPLC; (H1) pico retido e eluído com um gradiente de acetonitrila. (C) Visualização eletroforética em gel de tricina na presença de SDS das frações obtidas durante a purificação da defensina de *P. vulgaris*. (F), fração F-0/70 oriunda do fracionamento com sulfato de amônio (0-70% de saturação); (D1), (D2) e (H1) o mesmo descrito anteriormente. (M) marcador de massa molecular (kDa). Seta: defensina natural PvD_1 isolada de *P. vulgaris*.

I.4.2 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD₁ sobre fungos

I.4.2.1 - Ensaio de inibição do crescimento fúngico em meio líquido

Na figura 7, foi observado o efeito da PvD₁ sobre o crescimento do fungo filamentosso *F. oxysporum*. Notou-se que a PvD₁ apresentou um efeito inibitório de 41% sobre o crescimento deste fungo na concentração de 100 µg.mL⁻¹.

O efeito inibitório da PvD₁ sobre o desenvolvimento de leveduras foi testado através da avaliação do seu crescimento em meio contendo 100 µg.mL⁻¹ desta defensina. Como pode ser observado na figura 7, uma acentuada redução do crescimento das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* foi observada na presença de 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁ (85 e 82%, respectivamente).

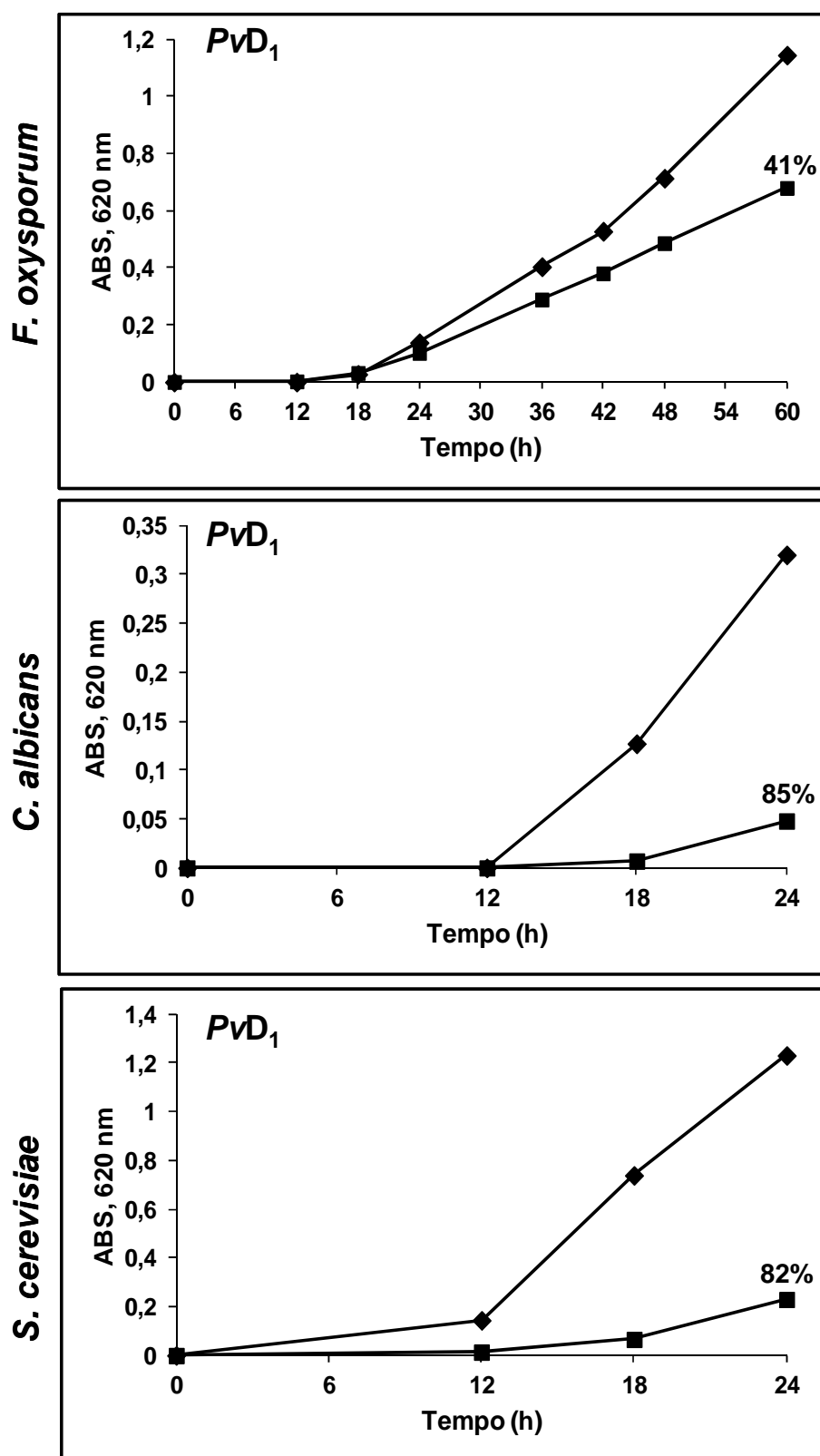


Figura 7: Efeito da PvD₁ no crescimento do fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* e das leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. (♦) Controle; (■) 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁. Sobre o ponto de 24 h do teste é mostrada a porcentagem de inibição em relação ao seu respectivo controle. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

I.4.2.2 - Efeitos da PvD₁ sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em células do fungo filamentoso *F. oxysporum* e de *C. albicans*

Na figura 8, observamos o resultado obtido sobre a indução da produção endógena de ROS e NO no fungo filamentoso *F. oxysporum*, quando incubado na presença e na ausência da PvD₁ durante o período de 24 h. Após a incubação com o corante fluorescente específico para ROS, nenhuma fluorescência pode ser observada no controle. Diferentemente, quando o fungo *F. oxysporum* foi tratado com 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁, foi observada uma intensa marcação nas células, indicando assim que a defensina provocou a indução do aumento da produção de ROS e a marcação pelo corante utilizado. Quando as células foram incubadas com o corante específico para NO, nenhuma marcação foi notada tanto nas células do controle, quanto nas células do teste.

Na figura 9 foi observado o resultado obtido sobre a indução da produção endógena de ROS e NO em células de *C. albicans* quando incubadas na presença e na ausência da PvD₁. Em relação à produção de ROS, nenhuma fluorescência pode ser observada no controle. Diferentemente, para as células tratadas com 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁, foi observada uma intensa marcação nas células de *C. albicans*, indicando assim, que o tratamento com a defensina promoveu o aumento da produção de ROS e a marcação pelo corante utilizado. Em relação ao NO produzido nessas células, podemos notar a marcação de algumas células da levedura *C. albicans* pelo corante, quando estas foram incubadas na presença de 100 µg.mL⁻¹ da PvD₁. Já no controle, onde as células foram crescidas na ausência da PvD₁, não observamos nenhuma marcação.

Através das imagens obtidas por microscopia de campo claro, notamos também que, na presença da PvD₁, existe uma agregação dessas células, ao contrário das células do controle que se apresentaram bem separadas e dispersas (figura 9).

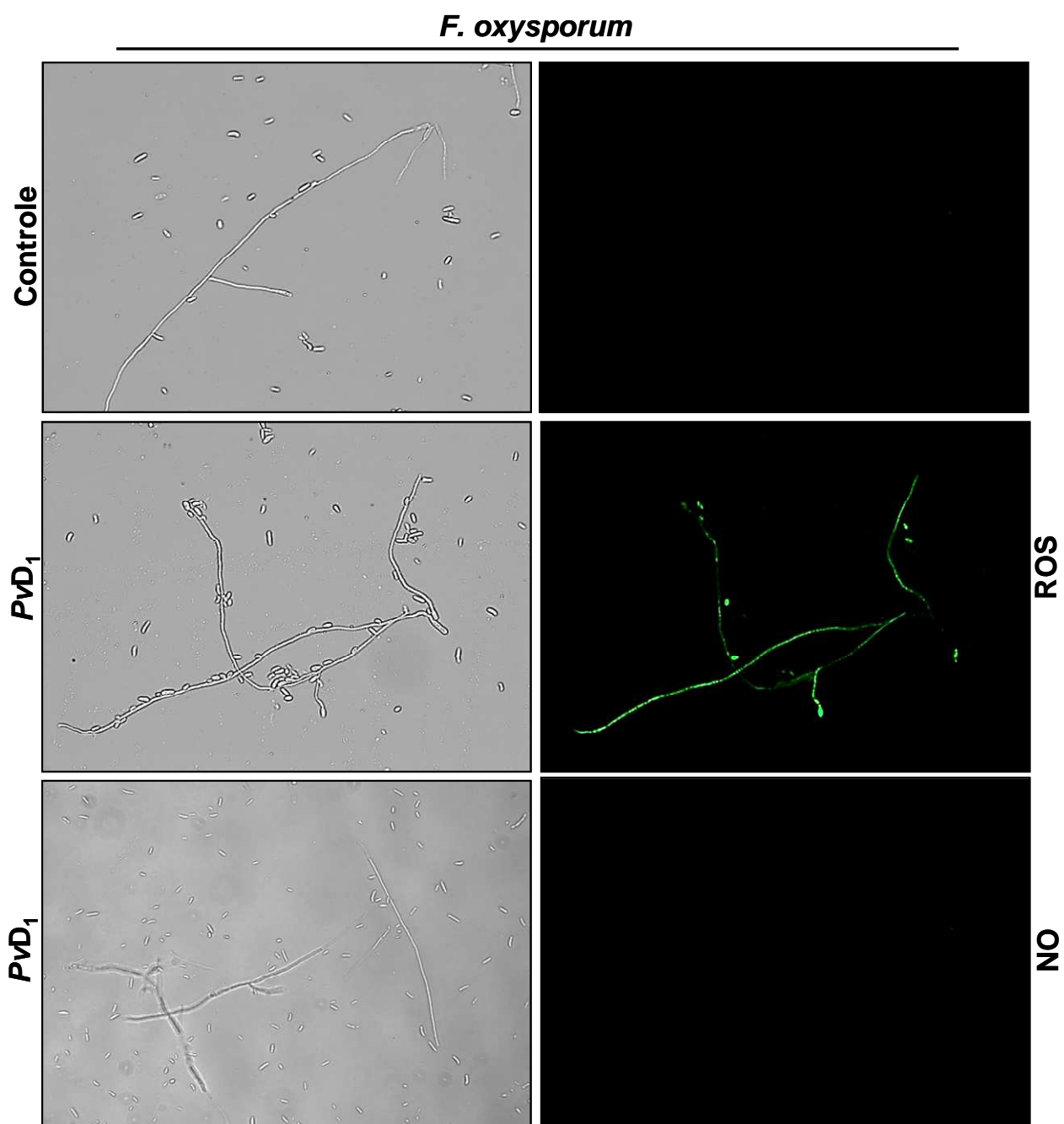


Figura 8: Imagem por microscopia de fluorescência das células do fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* tratadas com o corante para ROS, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, e NO, 3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD*₁. As células foram visualizadas por microscopia óptica de campo claro e fluorescência. Aumento de 400x.

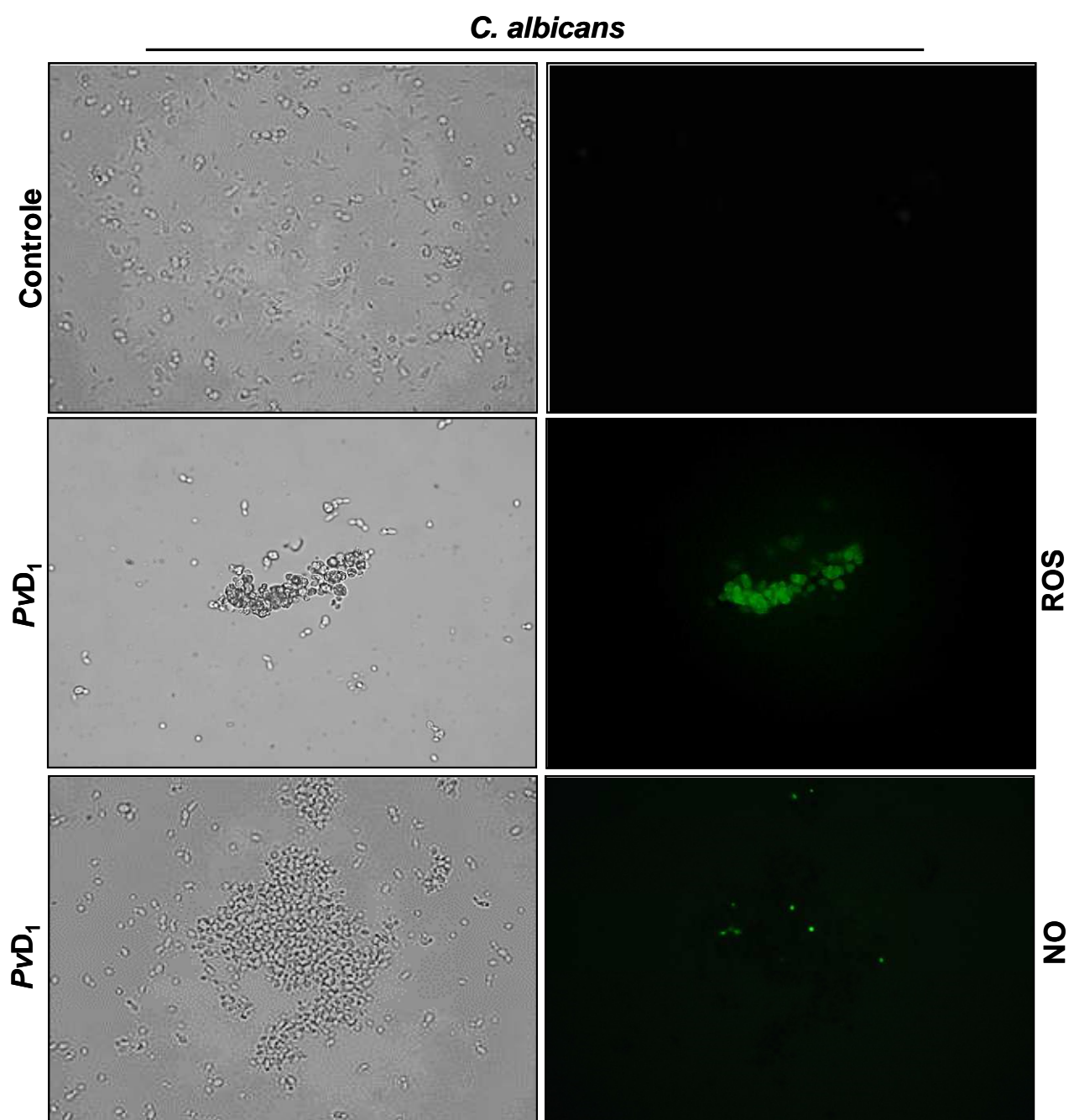


Figura 9: Imagem por microscopia de fluorescência das células da levedura *Candida albicans* tratadas com o corante para ROS, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, e NO, 3,4-diaminometil-2',7'-difluoresceína diacetato, após terem sido crescidas na ausência (controle, mostrado para ROS) e na presença de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da PVD₁. As células foram visualizadas por microscopia óptica de campo claro e fluorescência. Aumento de 400x.

I.4.2.3 - Ensaio de acidificação do meio, induzido por glicose, em células do fungo filamentoso *F. oxysporum* e da levedura *C. albicans* cepa selvagem

Na figura 10, verificamos a inibição, causada por PvD_1 , da acidificação do meio por esporos do fungo filamentoso *F. oxysporum*. Com um tempo de pré-incubação de 30 min e usando uma concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD_1 foi possível observarmos 100% de inibição da acidificação.

Na figura 11, observamos a inibição, causada por PvD_1 , da acidificação do meio por células de *C. albicans* cepa selvagem, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com tempos de pré-incubação de 10 min, 30 min e 1 h. Com 10 min de pré-incubação na presença da PvD_1 , foi observado 99,7% de inibição da acidificação. Nas células que foram pré-incubadas por 30 min com a PvD_1 , podemos notar uma inibição de 99,5% da acidificação e no tempo de pré-incubação de 1 h com a PvD_1 , notamos 98% de inibição da acidificação. Contudo, a pequena diferença na inibição da acidificação entre os testes com diferentes tempos de pré-incubação não foi significativa.

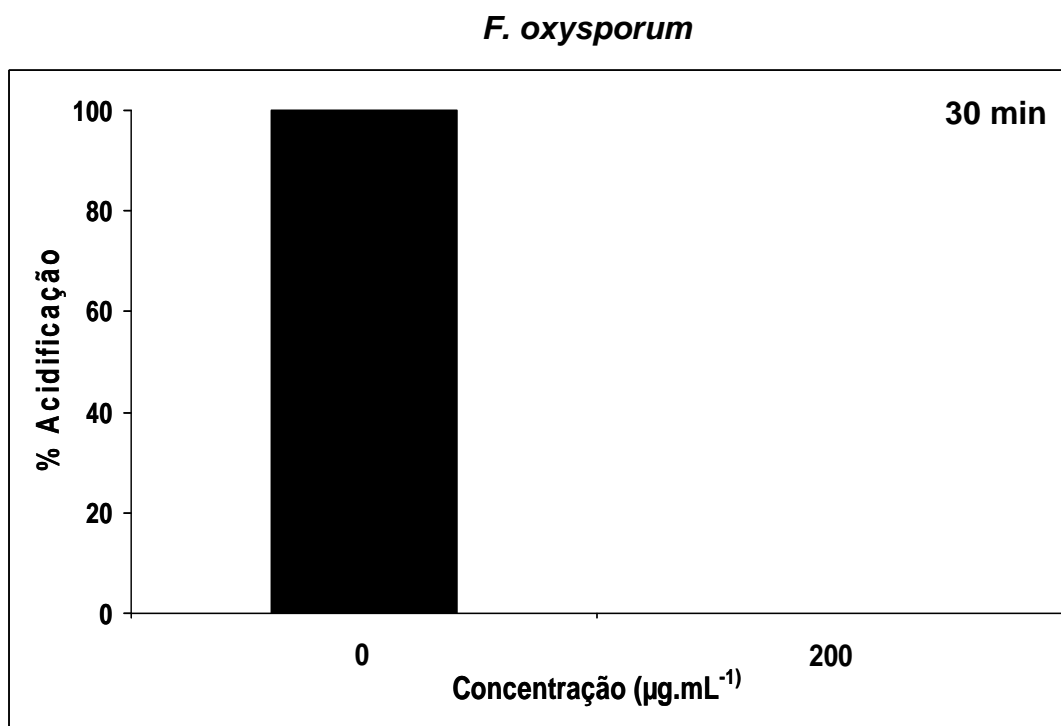


Figura 10: Porcentagem da acidificação do meio por esporos do fungo *Fusarium oxysporum* na presença da PvD_1 . Os experimentos foram realizados em triplicata.

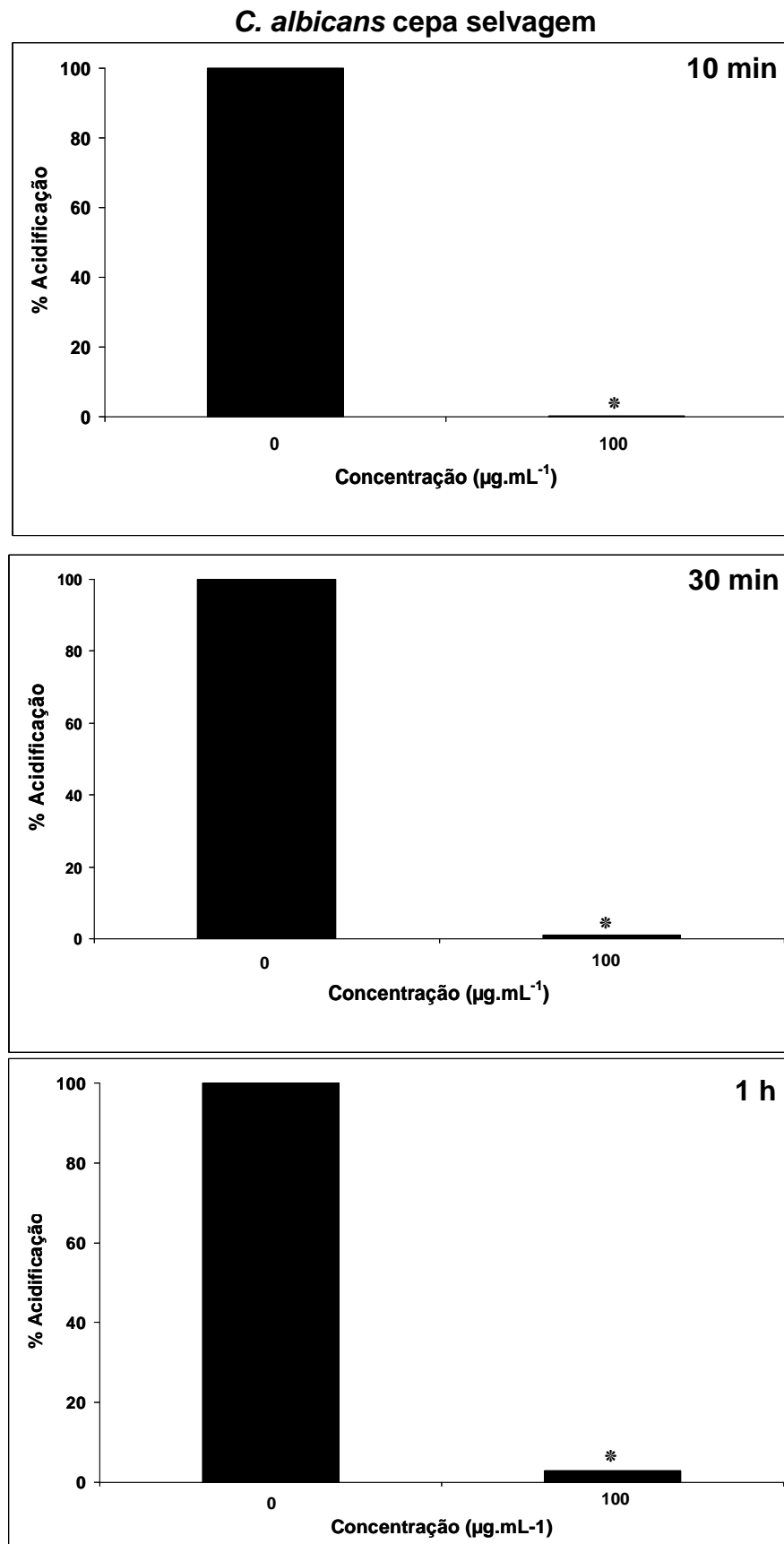


Figura 11: Porcentagem da acidificação do meio por células da levedura *Candida albicans* cepa selvagem na presença da *PvD1*. Os experimentos foram realizados em triplicata. (*) indica não significativo pelo teste ANOVA. $P > 0,05$ entre os diferentes tempos de incubação.

I.4.2.4 - Verificação do efeito apoptótico da PvD₁ sobre células da levedura *S. cerevisiae*

O translocamento de fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidyl serine*) da monocamada interna para a externa da membrana plasmática ocorre durante os estágios iniciais da apoptose, e essa externalização da PS pode ser detectada por marcação com anexina V que se liga a fosfolípidos com carga negativa, mas com alta especificidade para a PS. A exposição de PS em células de *S. cerevisiae* tratadas com 50 µg.mL⁻¹ da PvD₁ por 2 h foi avaliada através de análise da marcação com anexina V em microscópio de fluorescência. Observamos que as células incubadas com PvD₁ apresentaram uma marcação em verde indicando a exposição de PS e que PvD₁ pode causar um efeito apoptótico nas células de *S. cerevisiae* (figura 12). Efeito semelhante foi verificado no controle positivo onde as células foram incubadas com peróxido de hidrogênio, e nenhuma marcação foi observada no controle negativo, onde as células foram incubadas apenas no tampão osmótico.

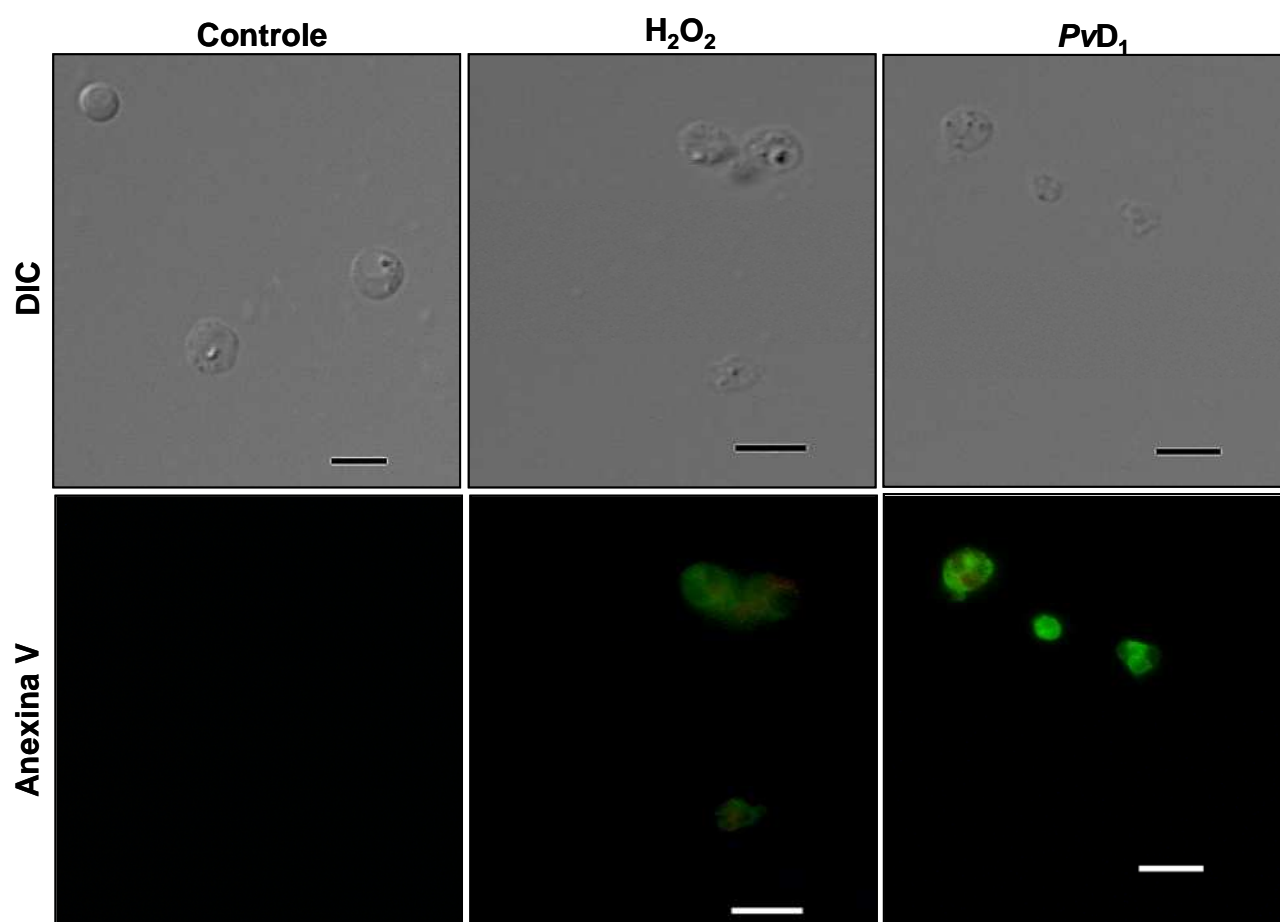


Figura 12: Imagem por microscopia de fluorescência de esferoplastos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas por 2 h, com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD₁*. Como controle positivo foi usado peróxido de hidrogênio 2,5 mM. Note-se a fluorescência nas células tratadas indicando a exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana. As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência. Barras = 5 μm .

I.4.3 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina natural PvD₁ sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*

I.4.3.1 - Ensaio de eliminação da proliferação celular com promastigotas de *L. amazonensis*

PvD₁ foi também testada sobre promastigotas de *L. amazonensis*. A figura 13 mostra o efeito inibitório da PvD₁ nas concentrações de 300 e 600 µg.mL⁻¹ na proliferação de parasitas, durante o período de 24 e 48 h. Um notável efeito inibitório foi observado na proliferação dos parasitas na concentração de 300 µg.mL⁻¹ demonstrando 70% de inibição em 24 h e 89% de inibição em 48 h, e na concentração de 600 µg.mL⁻¹, demonstrando 87% de inibição em 24 h e 96,5% de inibição em 48 h quando comparado com os parasitas do controle, crescidos na ausência da PvD₁.

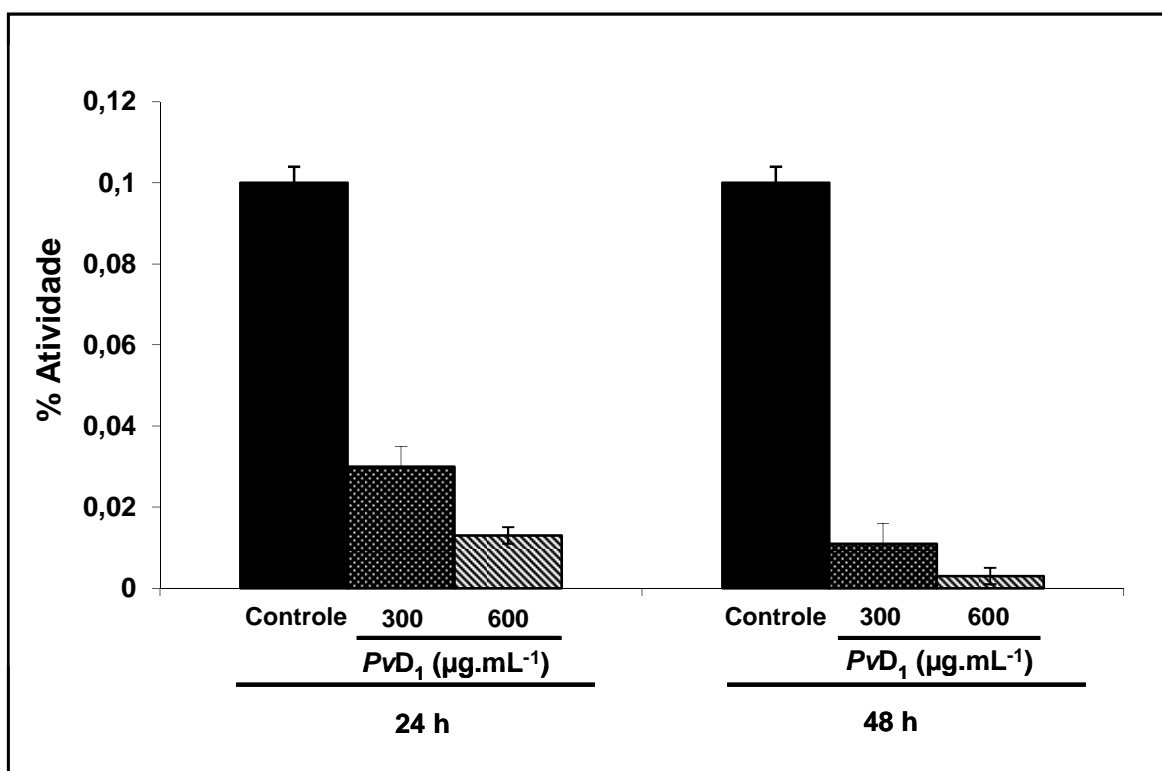


Figura 13: Eliminação da proliferação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença da PvD₁. Experimentos foram feitos em triplicata e os erros padrão foram calculados.

I.4.3.2 - Análise ultraestrutural das promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a PvD₁

A análise da ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD₁ através de microscopia eletrônica de transmissão revelou que esta defensina foi capaz de causar uma desintegração na membrana plasmática das promastigotas levando à perda do material citoplasmático. Também provocou uma fragmentação e vacuolização do citoplasma. Diferentemente, a célula controle apresentou uma integridade da membrana e organização intracelular (figura 14).

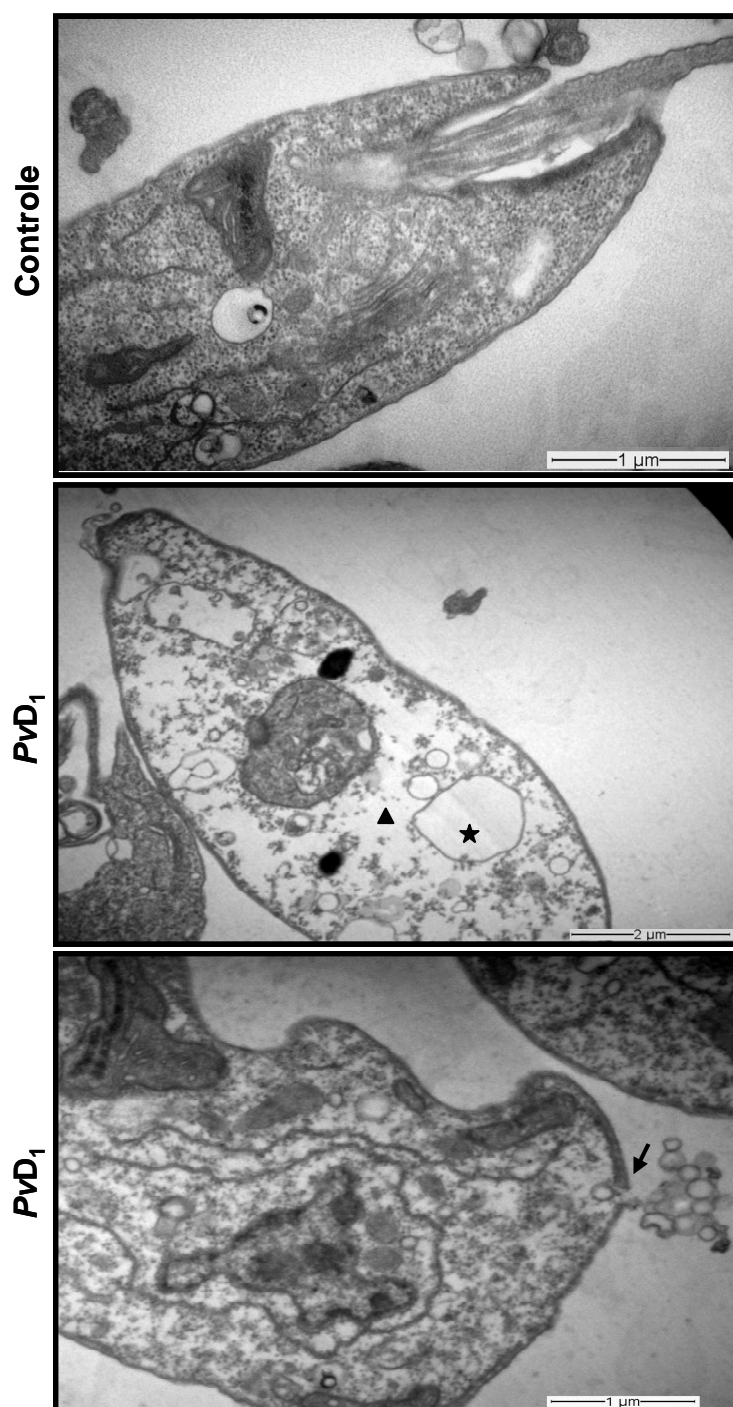


Figura 14: Imagem por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD₁. (▲) fragmentação no citoplasma; (★) vacuolização no citoplasma. (➔) ruptura na membrana plasmática das promastigotas levando à perda do material citoplasmático. Barras = 1 µm e 2 µm.

I.4.3.3 - Efeito da *PvD*₁ sobre a permeabilização de membranas de promastigotas de *L. amazonensis*

A habilidade da *PvD*₁ em permeabilizar a membrana de promastigotas de *L. amazonensis* foi analisada através do uso do corante Sytox green, que só é capaz de atravessar a membrana quando a mesma está comprometida. A análise dessas células por microscopia de fluorescência revelou que os promastigotas de *L. amazonensis* foram marcados pelo corante, quando tratados com 300 µg.mL⁻¹ da *PvD*₁ (figura 15). Já no controle, nenhuma fluorescência foi observada. Na análise feita em campo claro, podemos notar também que as células se mostraram aglomeradas na presença da *PvD*₁, enquanto que no controle, as células estavam dispersas.

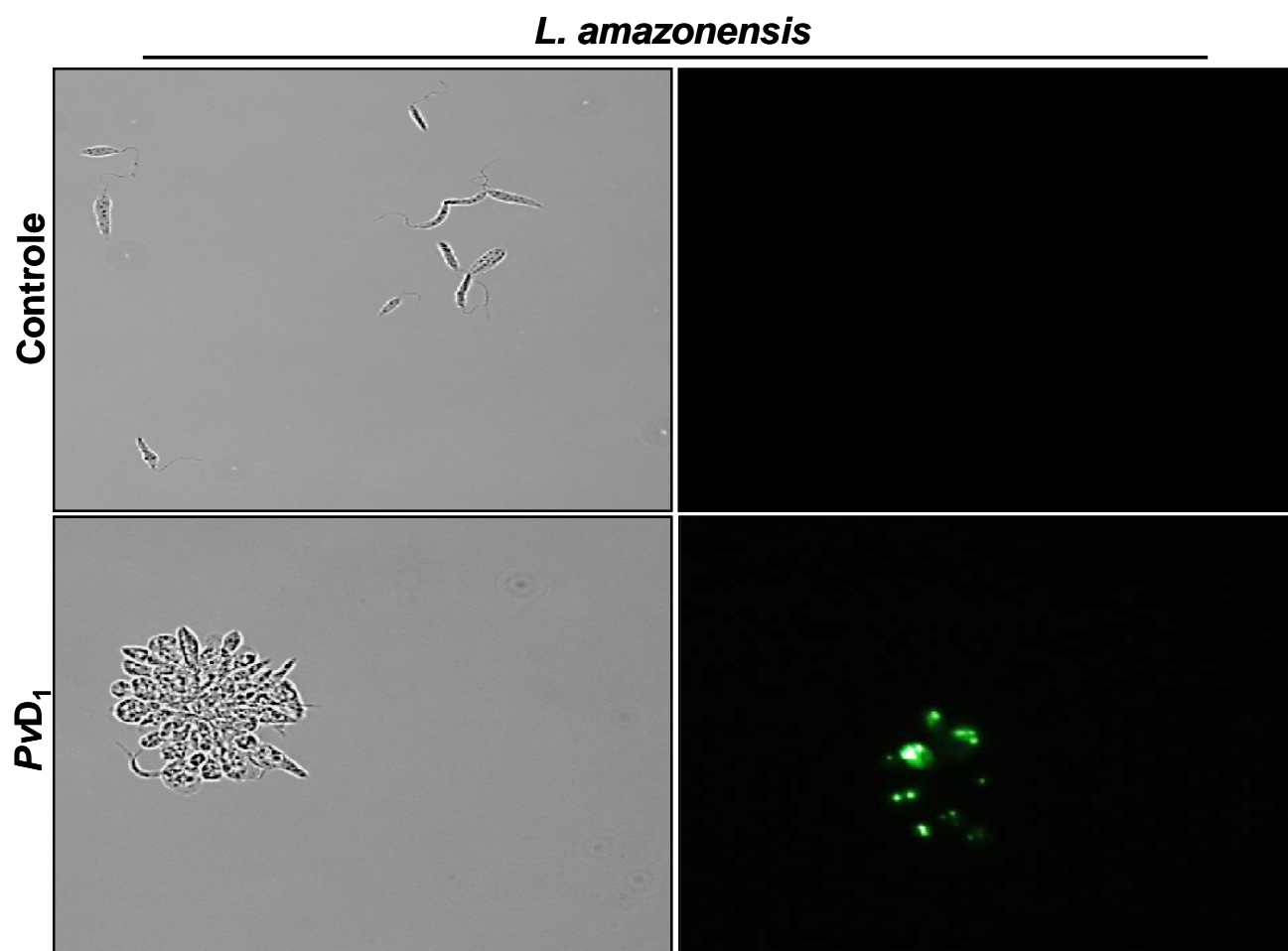


Figura 15: Imagem por microscopia de fluorescência dos promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratados com o corante Sytox green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD₁, durante um período de 24 h. As células foram visualizadas por microscopia óptica de campo claro e fluorescência. Aumento de 400x.

I.4.3.4 - Determinação da localização da *PvD*₁ em células de *L. amazonensis*

A habilidade da *PvD*₁ de penetrar e se acumular dentro da célula foi avaliada através do acoplamento da *PvD*₁ com o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após o ensaio de inibição da proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* utilizando 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD*₁ acoplada ao FITC, observamos a presença da *PvD*₁-FITC nos espaços intracelulares dessas células (figura 16).

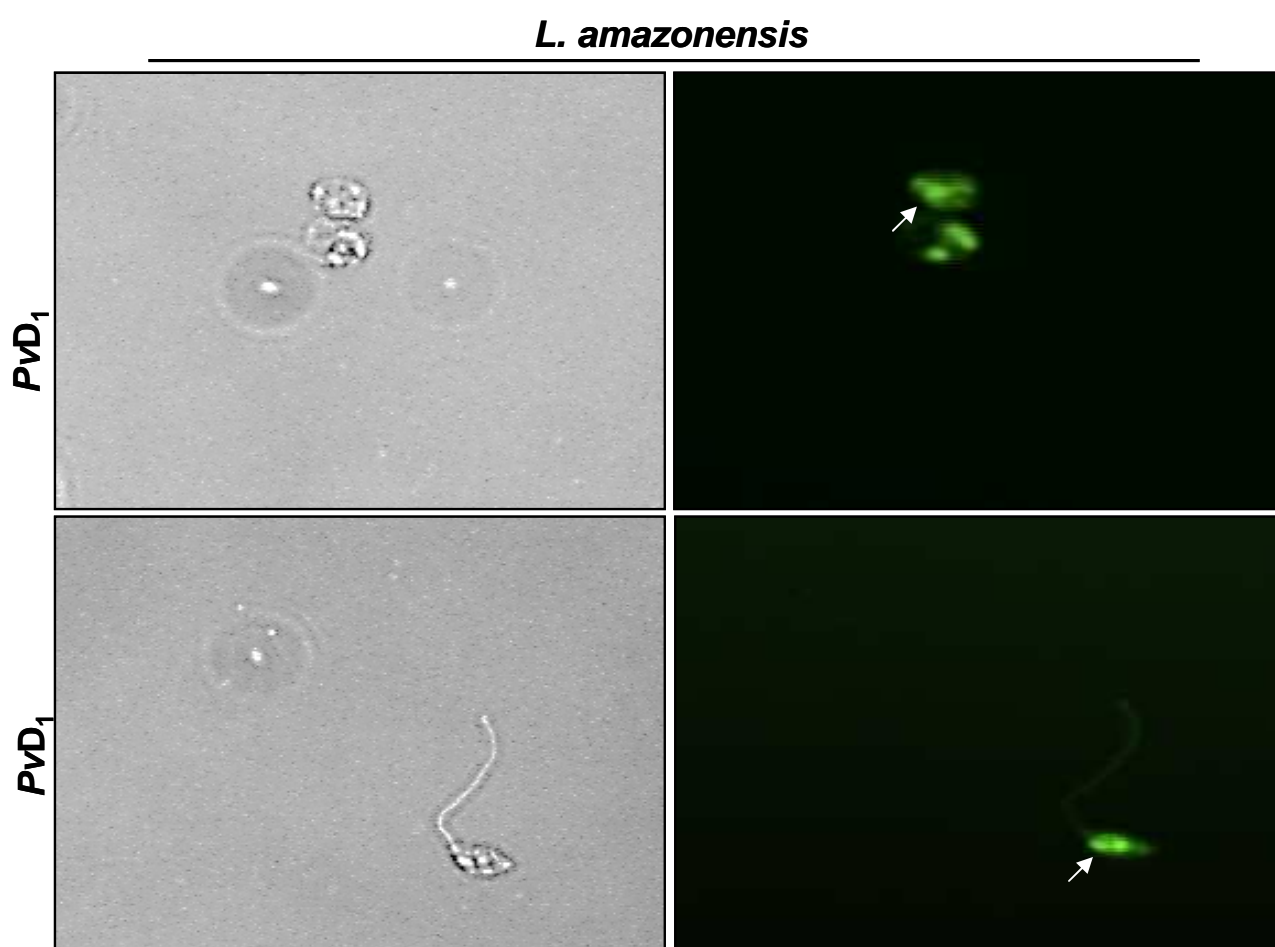


Figura 16: Imagem por microscopia de fluorescência dos promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratados com 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD*₁ acoplada ao FITC, durante um período de 24 h de incubação. Note a fluorescência no interior das células, indicando que *PvD*₁ é internalizada. As células foram visualizadas por microscopia óptica de campo claro e fluorescência. Aumento de 630x.

PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE PvD_{1r}

II.4.1 - Clonagem molecular e expressão funcional da defensina PvD₁ de sementes de *P. vulgaris*

II.4.1.1 - Reação em cadeia da polimerase - Teste da temperatura de anelamento e concentração dos iniciadores

A expressão funcional da defensina de sementes de *P. vulgaris* PvD₁ foi iniciada com a amplificação de um fragmento que codificava para este peptídeo utilizando os iniciadores DEFs e DEFas. Para avaliar quais eram as condições ideais para esta amplificação, foram montadas PCRs usando diferentes concentrações de iniciadores e diferentes temperaturas.

A análise eletroforética do gel de agarose carregado com as amostras oriundas destas PCR revelou a amplificação de um fragmento de aproximadamente 250 pb. Como pode ser observado na figura 17, o mix 3 (2:2 DEFs:DEFas), na temperatura de 58,7 °C , apresentou o melhor resultado.

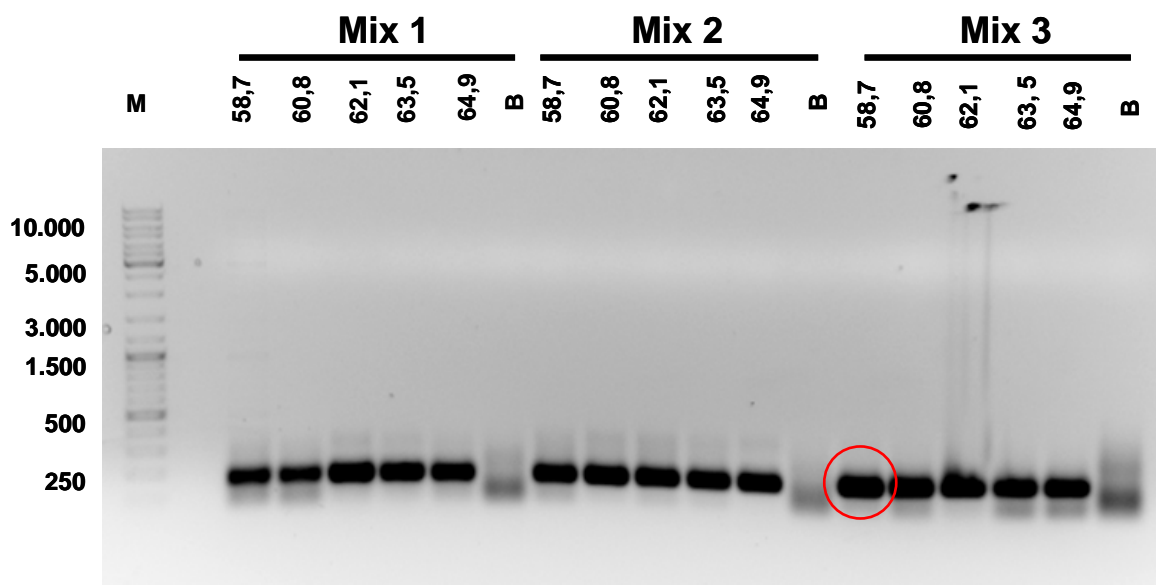


Figura 17: Visualização eletroforética das amostras obtidas da PCR utilizando diferentes concentrações de iniciadores DEFs e DEFas e temperaturas em gel de agarose 1%. Mix 1, mistura de reação contendo iniciadores DEFs e DEFas na proporção de 2:1; Mix 2, mistura de reação contendo iniciadores DEFs e DEFas na proporção de 1:2; Mix 3, mistura de reação contendo iniciadores DEFs e DEFas na proporção de 2:2; Note-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 250 pb em todas as condições; B, branco da reação da qual foi excluído o DNA molde; M, padrão de peso molecular (em pb). Figura negativa do gel corado com brometo de etídeo.

II.4.1.2 - Transformação de células competentes de *E. coli* (linhagem JM109) com a construção pET-PvD₁

II.4.1.2.1 - Análise dos clones positivos - extração e digestão dos vetores

Uma vez padronizadas as condições da amplificação, uma nova PCR foi montada com um volume de reação maior e os fragmentos delas oriundos foram ligados ao vetor pET-32 Ek/LIC. A construção pET-PvD₁ foi então utilizada para a transformação de células bacterianas *E. coli* (linhagem JM109). Posteriormente foi feita a extração e digestão dos vetores e estas revelaram a clonagem do fragmento de interesse, porém não conseguimos visualizar a liberação do fragmento de aproximadamente 250 pb, talvez devido à concentração da amostra aplicada no gel

ou uma das enzimas não estava ativa (figura 18). Mesmo assim, decidimos seguir com os experimentos, devido à especificidade do anelamento entre as extremidades coesivas geradas pela atividade da T4 DNA polimerase no fragmento a ser clonado e as fornecidas com o vetor pET-32 EK/LIC.

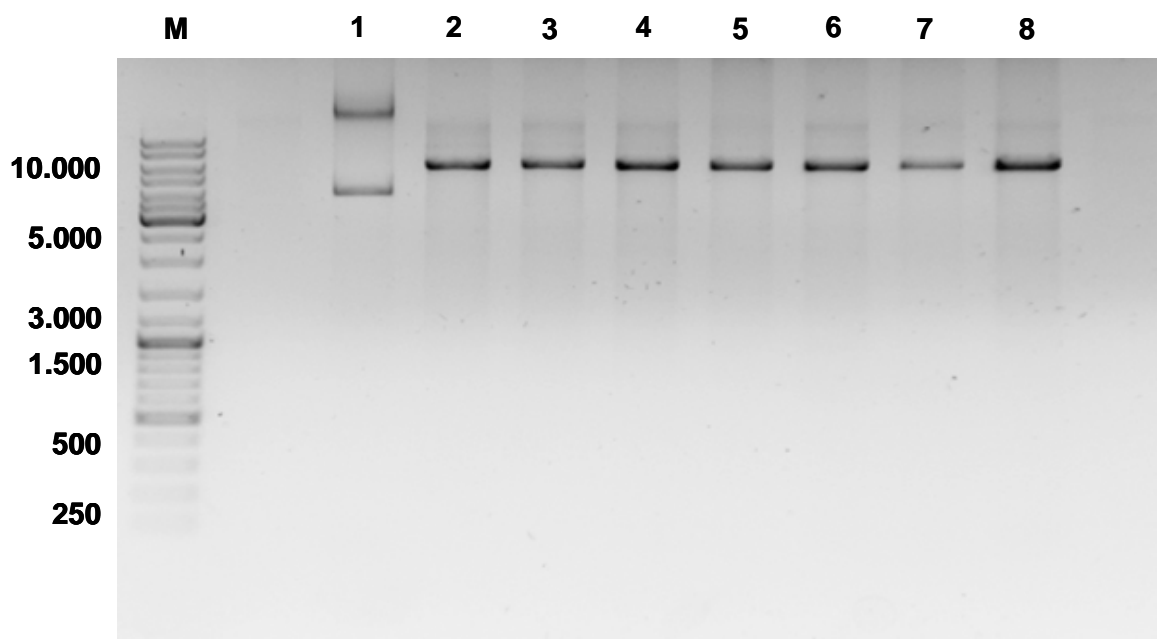


Figura 18: Visualização eletroforética de amostras obtidas como produto da digestão do vetor pET-DEF extraído de células bacterianas da linhagem JM109 com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Bgl* II em gel de agarose 1%. Note que não foi possível observar a liberação do fragmento clonado de aproximadamente 250 pb. (M) padrão de massa molecular em pb. (1) colônia não digerida (2-8) colônias digeridas. Figura negativa do gel corado com brometo de etídeo.

II.4.1.2.2 - Transformação e indução de células competentes de *E. coli* (linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS) com a construção pET-PvD₁

Células da linhagem JM109 não são células próprias para a expressão de proteínas. Assim, com o objetivo de superexpressar a PvD₁r, a construção pET-PvD₁ extraída de células da linhagem JM109 foi então utilizada para a transformação de células bacterianas da linhagem Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS. Na figura 19,

podemos observar as colônias positivas resultantes desta transformação, obtidas após PCR.

As células transformadas com a construção pET-*PvD*₁, foram submetidas à indução da expressão da defensina heteróloga através da adição de IPTG no meio de cultivo. Após o procedimento de indução, as amostras obtidas foram analisadas através de eletroforese em gel de tricina (figura 20).

Notamos a presença de uma proteína de fusão com massa molecular acima de marcador de massa molecular de 16,9 kDa, que corresponde à defensina *PvD*₁r fusionada com a tioredoxina e a cauda de histidina, chamada (Trx-His-*PvD*₁r) (figura 20).

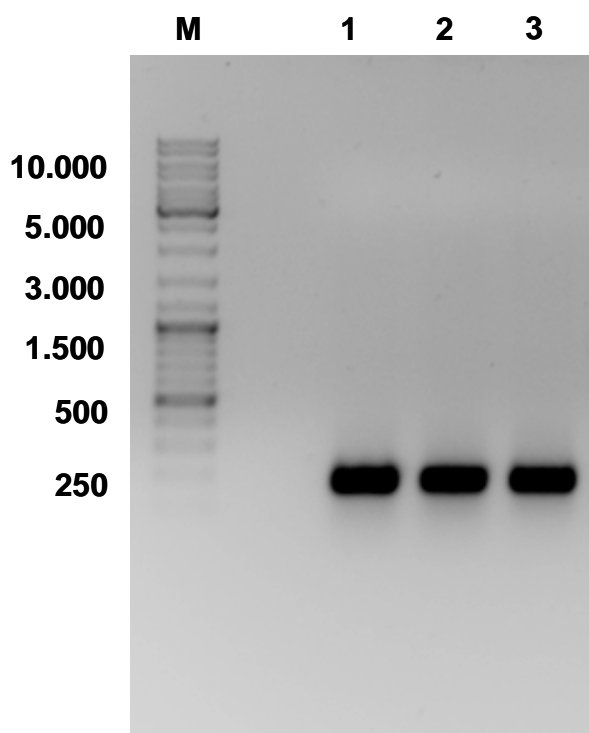


Figura 19: Visualização eletroforética de amostras obtidas da PCR feita diretamente de colônias bacterianas da linhagem Rosetta gami 2 (DE3) pLysS transformadas com a construção pET-*PvD*₁ utilizando os iniciadores DEFs e DEFas em gel de agarose 1%. Note a amplificação de um fragmento de aproximadamente 250 pb; (1 a 3) vetores extraídos das colônias 1 a 3; (M) padrão de massa molecular em pb. Figura negativa do gel corado com brometo de etídeo.

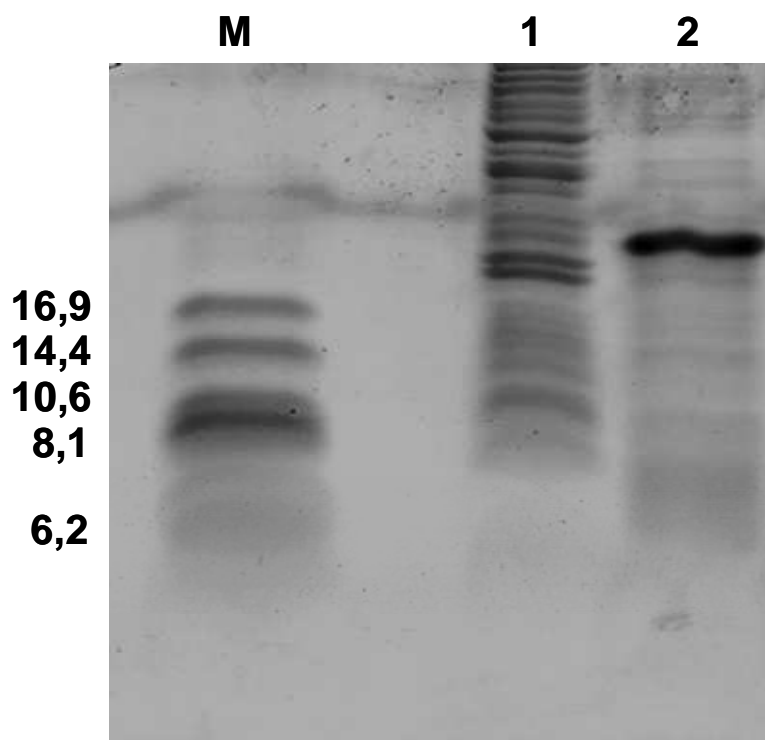


Figura 20: Visualização eletroforética da superexpressão da *PvD_{1r}* em bactéria Rosetta-gami 2 (DE3) pLysS transformada com a construção pET-*PvD_{1r}*. (1) extrato bacteriano bruto não induzido; (2) extrato bacteriano bruto induzido, note o aparecimento de uma banda acima do marcador de massa molecular de 16,9 kDa correspondente à proteína recombinante Trx-His-*PvD_{1r}*. (M) marcador de massa molecular em kDa.

II.4.2 - Isolamento e caracterização da defensina recombinante *PvD_{1r}*

II.4.2.1 - Cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺- NTA agarose

Depois da indução, o extrato bacteriano solúvel contendo a Trx-His-*PvD_{1r}* foi submetido à uma cromatografia de afinidade em coluna Ni⁺- NTA agarose e dois diferentes picos foram obtidos: o primeiro (fração não retida) que corresponde a frações que não tem afinidade ao níquel, chamado pico N1, e o segundo pico (fração retida) que apresenta proteínas que tem afinidade ao níquel, chamado N2.

Em análise feita através de eletroforese em gel de tricina, vimos que na fração retida obtida da Ni⁺- NTA agarose estava a PvD_{1r}, uma vez que ela estava fusionada à uma cauda de histidina, a qual apresenta alta afinidade ao Ni⁺ (figura 21A, raia 2). Esse pico N2, contendo PvD_{1r} fusionada à cauda de histidina, foi submetido à clivagem com a enzima enteroquinase recombinante bovina para remover a tioredoxina e a cauda de histidina fusionadas à PvD_{1r}. Análise por eletroforese em gel de tricina mostrou que, depois que o pico N2 foi tratado com a enzima enteroquinase recombinante bovina, a banda de proteína acima do marcador de massa molecular de 16.9 kDa desapareceu e surgiu uma nova banda de proteína de aproximadamente 6 kDa (figura 21A, raia 3). Esta é a massa molecular da defensina PvD₁ de sementes de *P. vulgaris*.

II.4.2.2 - Cromatografia de fase reversa em coluna C2C18 em HPLC

Em um passo seguinte de purificação, esta fração resultante da clivagem foi novamente submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺- NTA agarose. Esta segunda cromatografia de afinidade também apresentou dois picos. O pico N1 foi submetido a um passo final de purificação da PvD_{1r} através de cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC utilizando coluna C2C18. O cromatograma apresentou dois picos e o pico correspondente ao tempo de retenção da PvD_{1r} foi coletado, concentrado e analisado por eletroforese em gel de tricina (o tempo de retenção da PvD_{1r} foi baseado no tempo de retenção da defensina natural PvD₁) (figura 21B). O pico coletado, marcado por um asterisco, mostrou a presença de uma única banda de aproximadamente 6 kDa (marcado também por um asterisco no gel da figura 21A, raia 4).

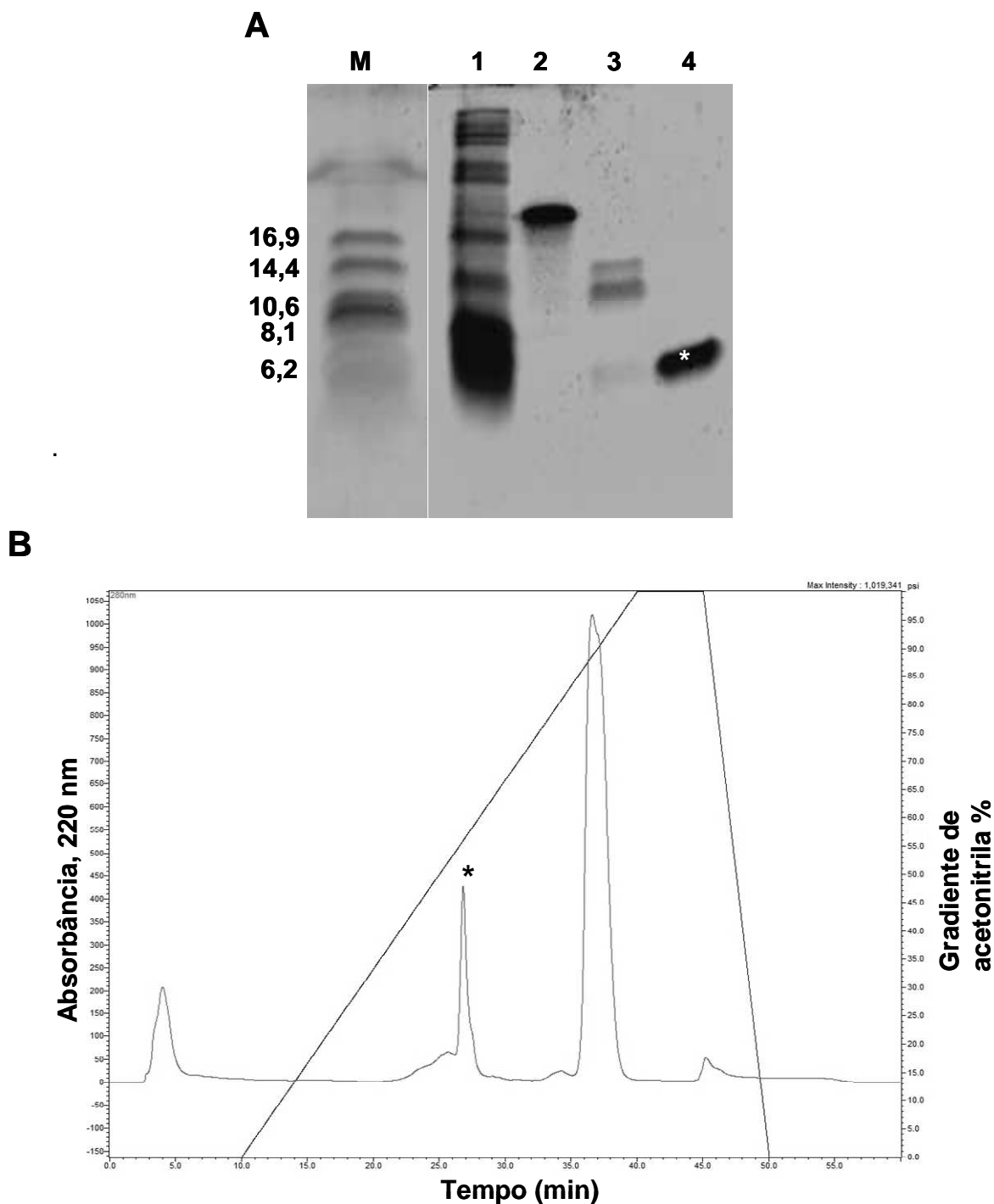


Figura 21: Visualização eletroforética e cromatograma do último passo de purificação da *PvD₁r*. A: (M) marcador de baixa massa molecular (kDa); (1) pico N1 obtido da cromatografia de afinidade a Ni⁺; (2) pico N2 obtido da cromatografia de afinidade a Ni⁺; (3) pico N2 depois da clivagem com enteroquinase; (4) *PvD₁r* purificada obtida da cromatografia em coluna de fase reversa C2C18, cujo pico está indicado por um asterisco; B: Cromatograma da amostra obtida após clivagem, em coluna C2C18 de fase reversa em HPLC. A coluna foi equilibrada com uma solução de TFA 0,1% e a amostra foi eluída utilizando-se um gradiente de acetonitrila 80%-TFA 0,1% de 0 a 100%, a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. O padrão de eluição dos peptídeos foi monitorado a 220 nm.

II.4.2.3 - Caracterização estrutural da defensina recombinante *PvD_{1r}*

II.4.2.3.1 - Sequenciamento N-terminal

Após visualizarmos a presença do peptídeo de aproximadamente 6 kDa no gel de poliacrilamida, foi feita uma eletrotransferência para membrana de PVDF. Após a marcação da banda de interesse na membrana, o peptídeo de 6 kDa foi submetido ao sequenciamento N-terminal parcial por degradação de Edman e a análise de oito aminoácidos do N-terminal, contados após a primeira metionina, correspondeu exatamente com a sequência dos oito primeiros aminoácidos do N-terminal da defensina natural *PvD₁* isolada de sementes *P. vulgaris*, anteriormente descrita por Games *et al.* (2008) (figura 22). A sequência N-terminal parcial obtida e os oito primeiros aminoácidos da sequência N-terminal da *PvD_{1r}*, diferem em apenas um resíduo de aminoácido, uma metionina inicial, a qual foi adicionada intencionalmente como um requisito para a expressão de proteína através do sistema pET-32 EK/LIC. A sequência N-terminal parcial obtida do peptídeo de 6 kDa demonstrou claramente que o processo global de produção recombinante da *PvD_{1r}*, incluindo a clivagem com enteroquinase, foi bem sucedido.

<i>PvD_{1r}</i>	1	<u>M</u>	K	T	C	E	N	L	A	D	09
<i>PvD₁</i>	1	-	K	T	C	E	N	L	A	D	08

Figura 22: Alinhamento das sequências parciais de aminoácidos N-terminais das defensinas *PvD_{1r}* e *PvD₁* (purificada de sementes de *Phaseolus vulgaris* (Games *et al.*, 2008). Resíduos idênticos são mostrados em negrito; **M**: metionina inicial na região N-terminal *PvD_{1r}* adicionada como um requerimento para a clonagem no vetor pET-32 EK/LIC. Os números flanqueando as sequências indicam o tamanho das sequências em números de aminoácidos. Note-se que as sequências são idênticas com exceção da metionina inicial em *PvD_{1r}*.

II.4.2.3.2 - Determinação da estrutura tridimensional da *PvD_{1r}* por modelagem

A modelagem da estrutura da *PvD_{1r}* foi feita a partir dos resíduos de aminoácidos obtidos. Na figura 23 mostramos o modelo obtido da estrutura da defensina recombinante *PvD_{1r}*. Na figura 23A, está o alinhamento da sequência de aminoácidos entre a *PvD_{1r}* e a defensina de *Vigna radiata* (VrD2 ; cód.pdb.2GL1) que foi o modelo selecionado para a comparação das estruturas. A sequência de ambas as defensinas apresentam 98% de identidade e diferem em apenas três resíduos de aminoácidos, que estão indicados por asteriscos na figura 23A. A figura 23B mostra que a estrutura da *PvD_{1r}* é composta por três folhas β e uma α -hélice ligadas por quatro pontes dissulfeto. A sobreposição das estruturas das defensinas *PvD_{1r}* e VrD2 , que foi utilizada como modelo, é mostrada na figura 23C. Esta sobreposição mostra que não existem diferenças significativas entre estas estruturas e as principais diferenças observadas estão na região de voltas não estruturadas. As figuras 23D e E mostram os resíduos positivos de arginina e lisina (em azul), que estão expostos na superfície da *PvD_{1r}* e os resíduos negativos (em vermelho).

A avaliação da qualidade do modelo foi feita por meio da análise de Ramachandran, que revelou uma boa estereoquímica para o modelo, visto que 95,2% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões favoráveis, 4,8% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões permitidas e nenhum dos resíduos se encontra em regiões menos favoráveis (figura 24 e tabela 3). Em adição, o índice RMSD (do inglês, *root-mean-square deviation*) encontrado para este modelo foi 0,25 Å.

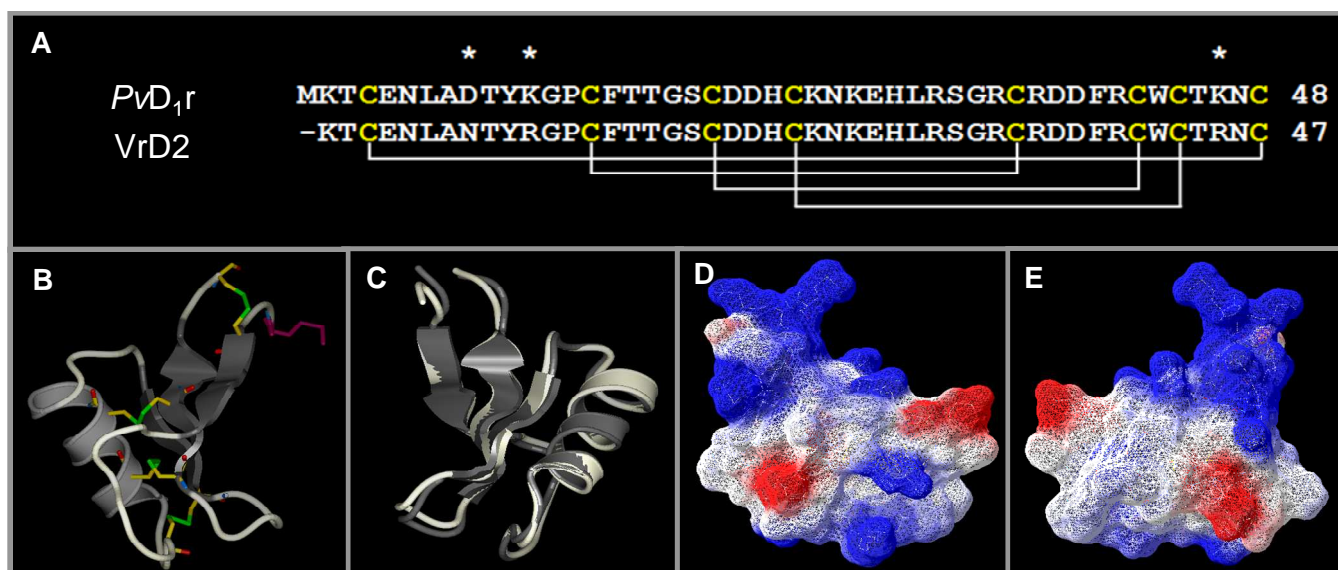


Figura 23: Modelagem da *PvD_{1r}* por homologia a partir do molde da defensina *VrD2* isolada de *Vigna radiata*. (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos de *PvD_{1r}* e de *VrD2*. As linhas abaixo das cisteínas de *VrD2* indicam a formação das pontes dissulfeto e a ligação entre os resíduos de cisteínas. Os três resíduos de aminoácidos diferentes entre as duas sequências estão indicados por asteriscos; (B) Estrutura tridimensional da *PvD_{1r}*, modelada com o programa Modeller e baseada na estrutura da defensina *VrD2* de *V. radiata* (cód.pdb.2GL1). Cinza escuro representa as folhas β ; cinza representa a α -hélice; linhas cinza claro representam os elementos não estruturados. Em púrpura é mostrado o resíduo de metionina adicionado como uma exigência para clonagem de proteínas no vetor pET-32 EK/LIC. As quatro pontes dissulfeto são mostradas pela interligação dos resíduos de cisteínas mostrados em amarelo. Em verde é mostrado o enxofre, em azul é mostrado o nitrogênio e em vermelho é mostrado o oxigênio; (C) Sobreposição das estruturas tridimensionais da *PvD_{1r}* (cinza claro) e *VrD2* (cód.pdb.2GL1) (cinza escuro); (D e E) estrutura tridimensional de *PvD_{1r}*, com cargas de superfície, em vermelho são mostradas as cargas negativas de superfície e em azul são mostradas as cargas positivas de superfície; em E está a estrutura rotacionada à 180°, referente à estrutura na letra D.

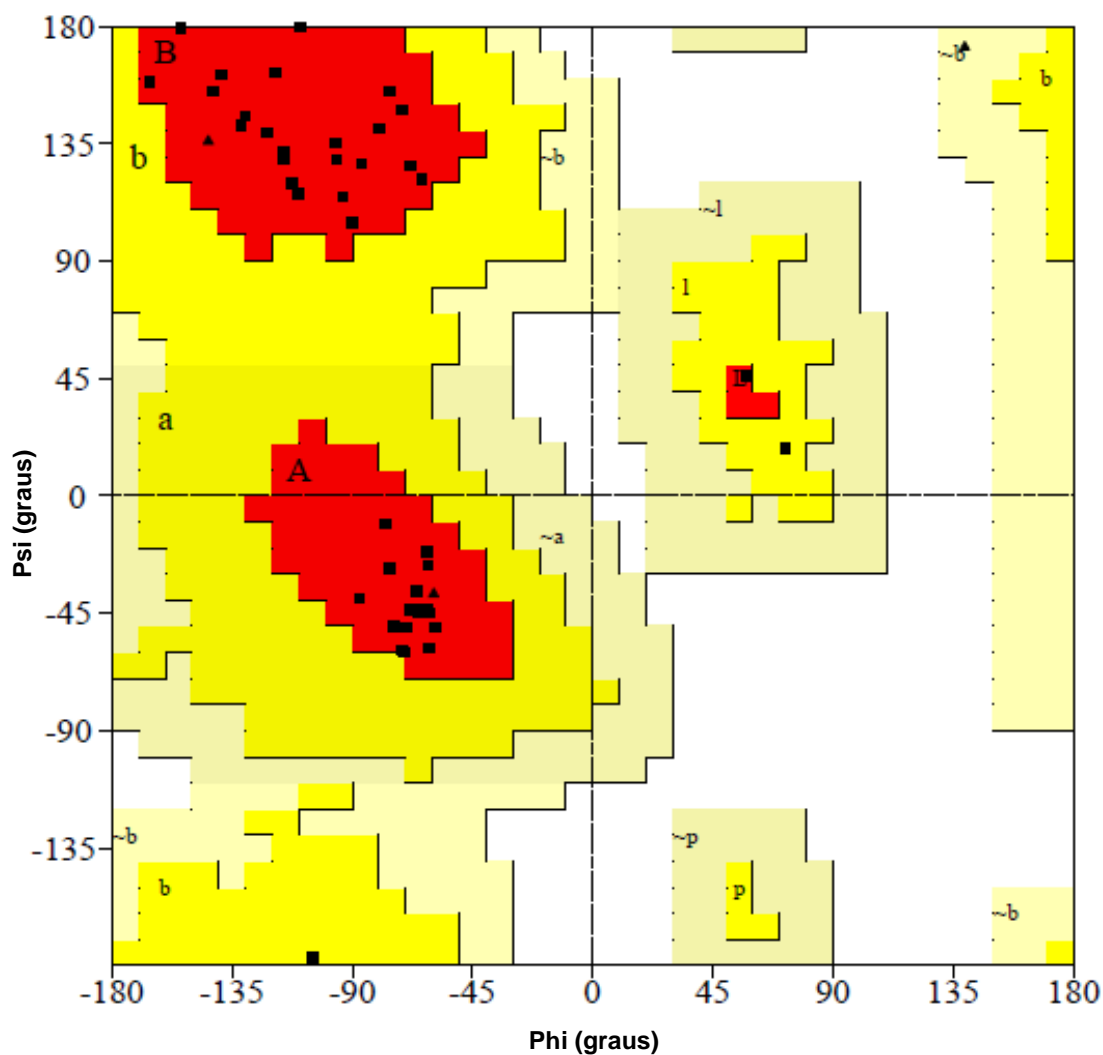


Figura 24: Mapa de Ramachandran da estrutura da defensina recombinante PvD_{1r}. Em vermelho, estão representadas as regiões favoráveis; em amarelo, as regiões permitidas; em bege, as regiões menos favoráveis.

Tabela 3: Mapa estatístico da análise estrutural da defensina recombinante PvD_{1r}.

	Defensina recombinante PvD _{1r}
Resíduos em regiões favoráveis [Vermelho - A,B,L]	95,2 %
Resíduos em regiões permitidas [Amarelo - a, b, l, p]	4,8 %
Resíduos em regiões menos favoráveis [Bege - ~a, ~b, ~l, ~p]	0,0 %

II.4.3 - Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da defensina recombinante *PvD_{1r}* sobre leveduras

II.4.3.1 - Análise da inibição do crescimento de células de *C. albicans*, cepa selvagem, em meio líquido na presença das defensinas *PvD_{1r}* e *PvD₁*

Inicialmente neste ensaio, nós comparamos a atividade da defensina recombinante *PvD_{1r}* com a defensina natural *PvD₁* e foi visto que ambas as defensinas, usadas a uma concentração de 100 µg.mL⁻¹, foram capazes de inibir o crescimento da cepa selvagem da levedura *C. albicans* em 89,7% e 75,9% respectivamente, no tempo de 24 horas (figura 25). Estes resultados indicam que a produção recombinante da *PvD_{1r}* preservou a sua atividade antimicrobiana. Como mostramos que a *PvD_{1r}* era biologicamente ativa, todos os resultados desta parte em diante foram feitos apenas com a *PvD_{1r}*.

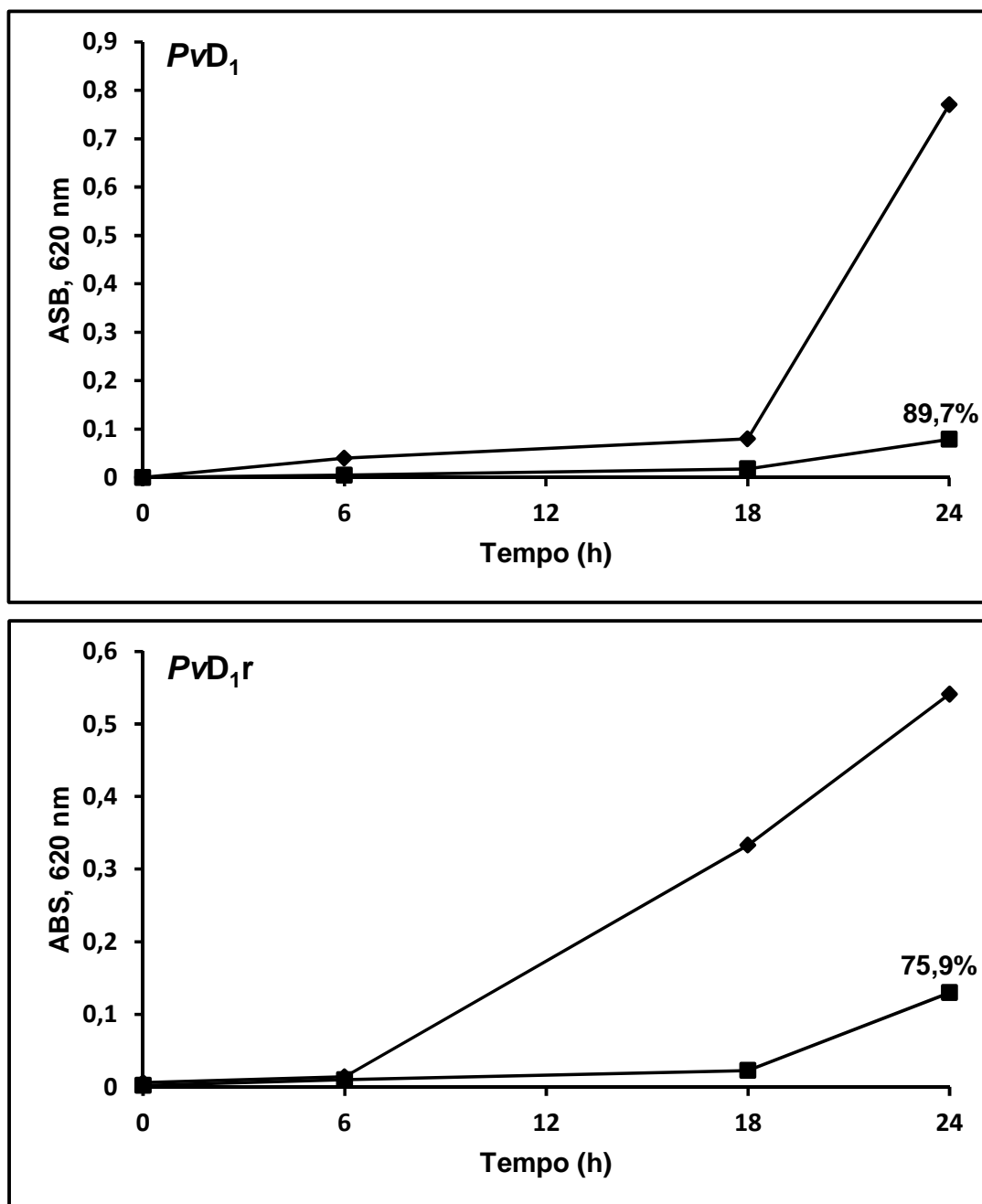
***C. albicans* selvagem**

Figura 25: Efeitos das defensinas *PvD₁* e *PvD_{1r}* no crescimento da cepa selvagem da levedura *Candida albicans*. (♦) Controle; (■) 100 µg.mL⁻¹ da *PvD₁* e *PvD_{1r}*. Sobre o ponto de 24 h do teste é mostrada a porcentagem de inibição em relação ao seu respectivo controle. Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%).

II.4.3.2 - Análise morfológica das células de *C. albicans*, cepa selvagem, tratadas com as defensinas *PvD₁r* e *PvD₁*

Após o ensaio de inibição do crescimento, as células de *C. albicans* cepa selvagem, foram analisadas por meio de microscopia óptica.

Alterações na morfologia das células de *C. albicans* foram observadas para ambas as defensinas. Observamos que as células da cepa selvagem crescem como células ovóides individuais e também apresentam algumas pseudohifas longas (controle). No que diz respeito ao efeito das defensinas sobre estas células, nós notamos que, na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD₁*, as células do tipo selvagem mostraram-se aglomeradas, em número reduzido e também apresentaram redução no tamanho das hifas. Após tratamento com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD₁r*, as células de *C. albicans* do tipo selvagem apresentaram grande redução no número de células e no tamanho das hifas, bem como suas células mostraram-se aglomeradas. Em comparação, o efeito da *PvD₁* e *PvD₁r* nas células do tipo selvagem é visualmente o mesmo (figura 26).

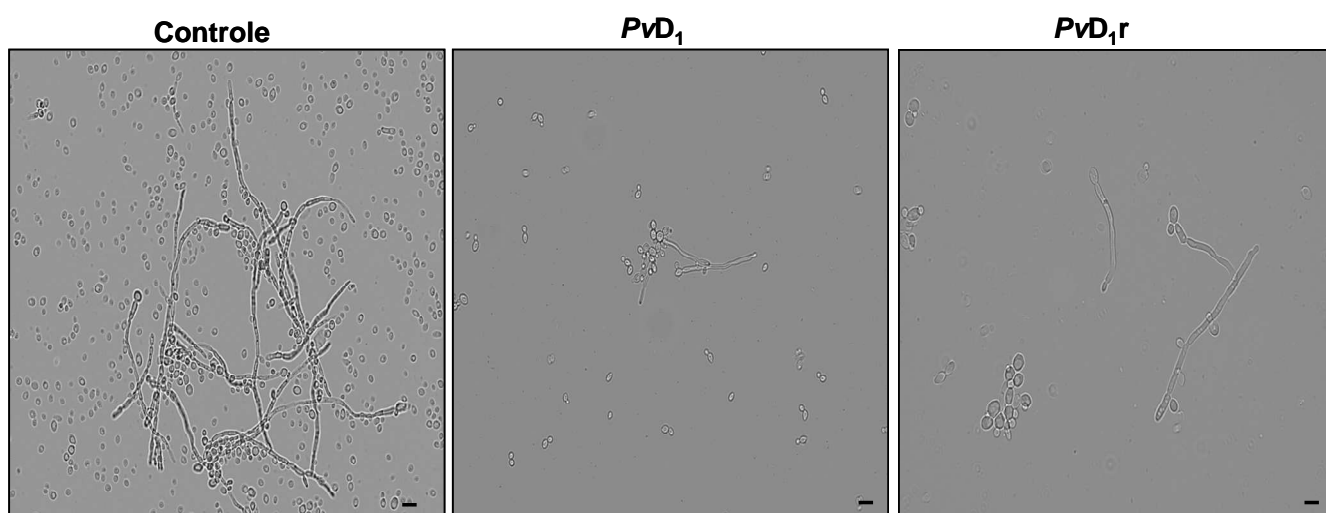


Figura 26: Imagem por microscopia óptica das células de *Candida albicans* (cepa selvagem), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das defensinas *PvD₁* e *PvD₁r*. Note-se uma redução no número de células e tamanho das hifas na presença das defensinas. As células foram visualizadas por microscopia de campo claro. Barras = $10 \mu\text{m}$.

II.4.3.3 - Análise da inibição do crescimento de células de *C. albicans*, cepa mutante (Δ GCS1) em meio líquido em presença da defensina PvD_{1r}

O efeito da PvD_{1r} no crescimento da cepa mutante (Δ GCS1) da levedura *C. albicans* foi também analisado. Esta cepa mutante não apresenta o esfingolípido glicosilceramida. Neste resultado podemos observar que após 24 h de incubação, a PvD_{1r} não foi capaz de inibir o crescimento da cepa mutante (figura 27).

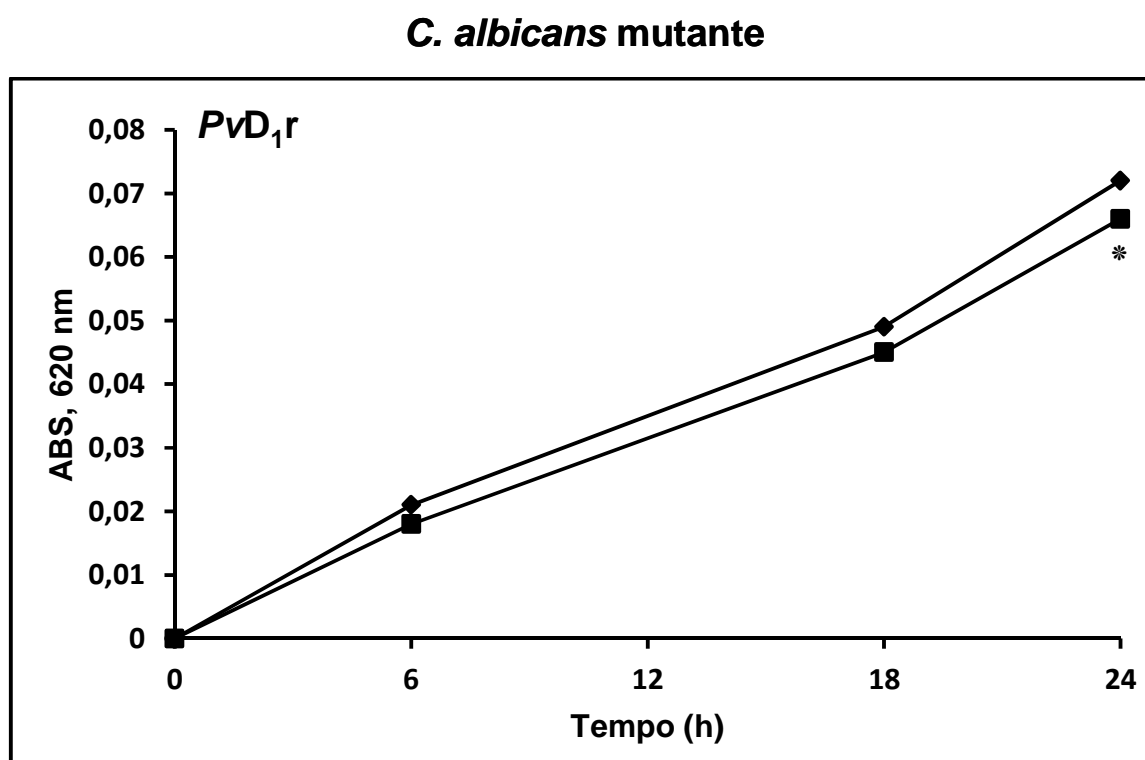


Figura 27: Efeito da defensina PvD_{1r} no crescimento da cepa mutante da levedura *Candida albicans*, (Δ GCS1). (♦) Controle; (■) 100 μ g.mL⁻¹ da PvD_{1r} . Todos os experimentos foram feitos em triplicata (coeficientes de variação foram inferiores a 20%). (*) indica não significativo pelo teste ANOVA. $P > 0,05$ entre o controle e o teste.

II.4.3.4 - Análise morfológica das células de *C. albicans*, cepa mutante, tratadas com a defensina PvD_{1r}

Após o ensaio de inibição do crescimento, as células de *C. albicans* cepa mutante, foram analisadas por meio de microscopia óptica. Podemos observar que as células da cepa mutante, tratadas com PvD_{1r}, apresentaram uma morfologia e padrões de crescimento muito semelhantes aos padrões das células mutantes do controle, indicando que PvD_{1r} parece não ter efeito tóxico sobre esta cepa mutante. Observamos também que existe uma diferença no crescimento das células da cepa mutante (figura 28) quando comparada as células da cepa selvagem (figura 26). A cepa mutante cresce como células agregadas com a presença de um maior número de pseudohifas e ocasionalmente células esparsas (figura 28).

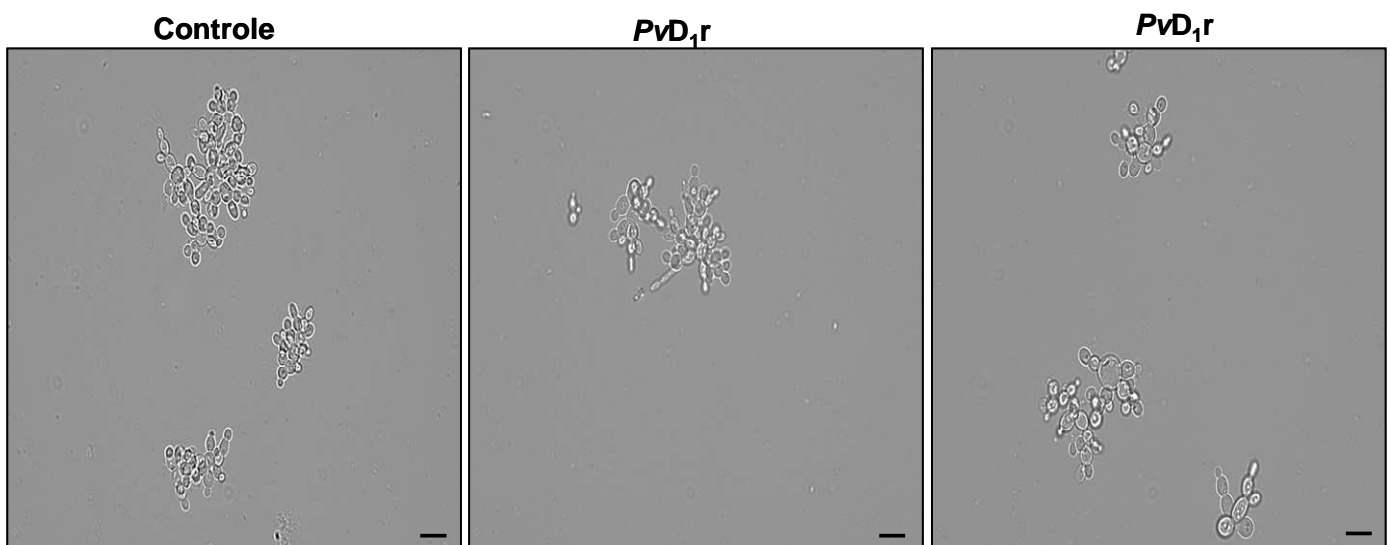


Figura 28: Imagem por microscopia óptica de células de *Candida albicans* cepa mutante (Δ GCS1), após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD_{1r}. Note-se que não houve alteração entre os tratamentos e o controle. As células foram visualizadas por DIC. Barras = $10 \mu\text{m}$.

II.4.3.5 - Efeito da *PvD_{1r}* sobre a permeabilização de membranas de *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1)

Na figura 29, mostramos o resultado obtido sobre a permeabilização de membranas da levedura *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), quando incubadas na presença e na ausência da *PvD_{1r}*. Observamos que nas células do controle das duas cepas da levedura, crescidas na ausência da *PvD_{1r}*, não houve marcação pelo corante fluorescente Sytox green. Quando as células da cepa selvagem foram incubadas com $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ da *PvD_{1r}*, foi possível observar a marcação das células pelo corante, indicando, assim, que esta provocou permeabilização nas células. Já nas células da cepa mutante, mesmo na presença de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ da *PvD_{1r}*, não foi visualizada a marcação. Esse resultado está de acordo com o que esperávamos, uma vez que a cepa mutante não apresenta o esfingolípido que é o alvo de ligação da defensina, em sua membrana.

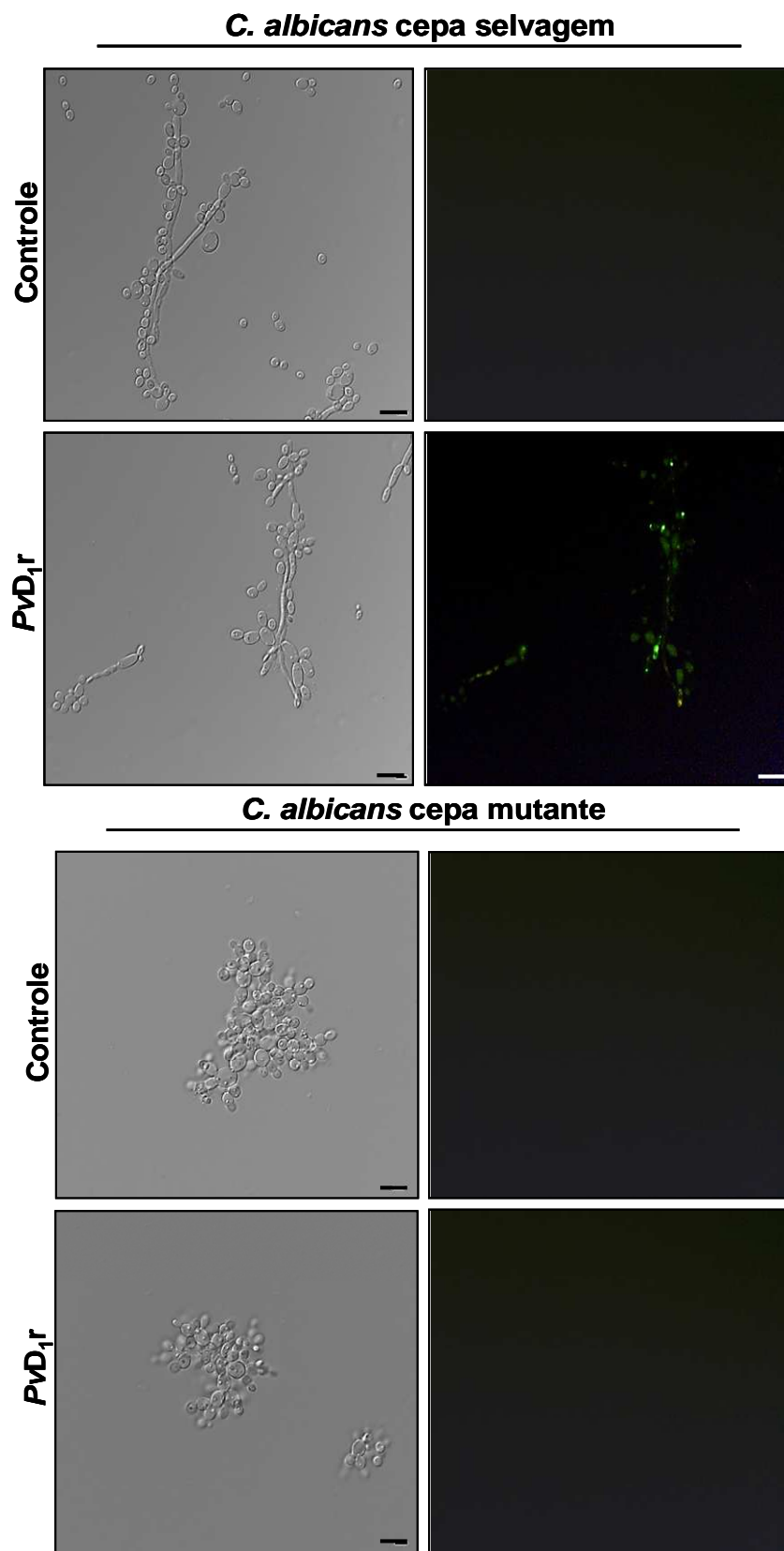


Figura 29: Imagem por microscopia de fluorescência da levedura *Candida albicans*, cepas selvagem e mutante ($\Delta GCS1$), tratadas com o corante Sytox green, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *Pvd*_{1,r}. As células foram visualizadas por DIC e microscopia de fluorescência. Barras = $5 \mu\text{m}$.

II.4.3.6 - Efeito da *PvD*_{1r} sobre a indução da produção endógena de espécies reativas de oxigênio em células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1)

Após ensaio de inibição do crescimento, as células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1) foram incubadas com o corante H₂DCFDA para detecção da produção endógena de ROS. Quando incubadas na presença de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD*_{1r}, observamos que algumas células da cepa selvagem apresentaram marcação para ROS. O mesmo não pode ser visto no controle. As células da cepa mutante não apresentaram marcação tanto na presença, quanto na ausência da *PvD*_{1r} (figura 30).

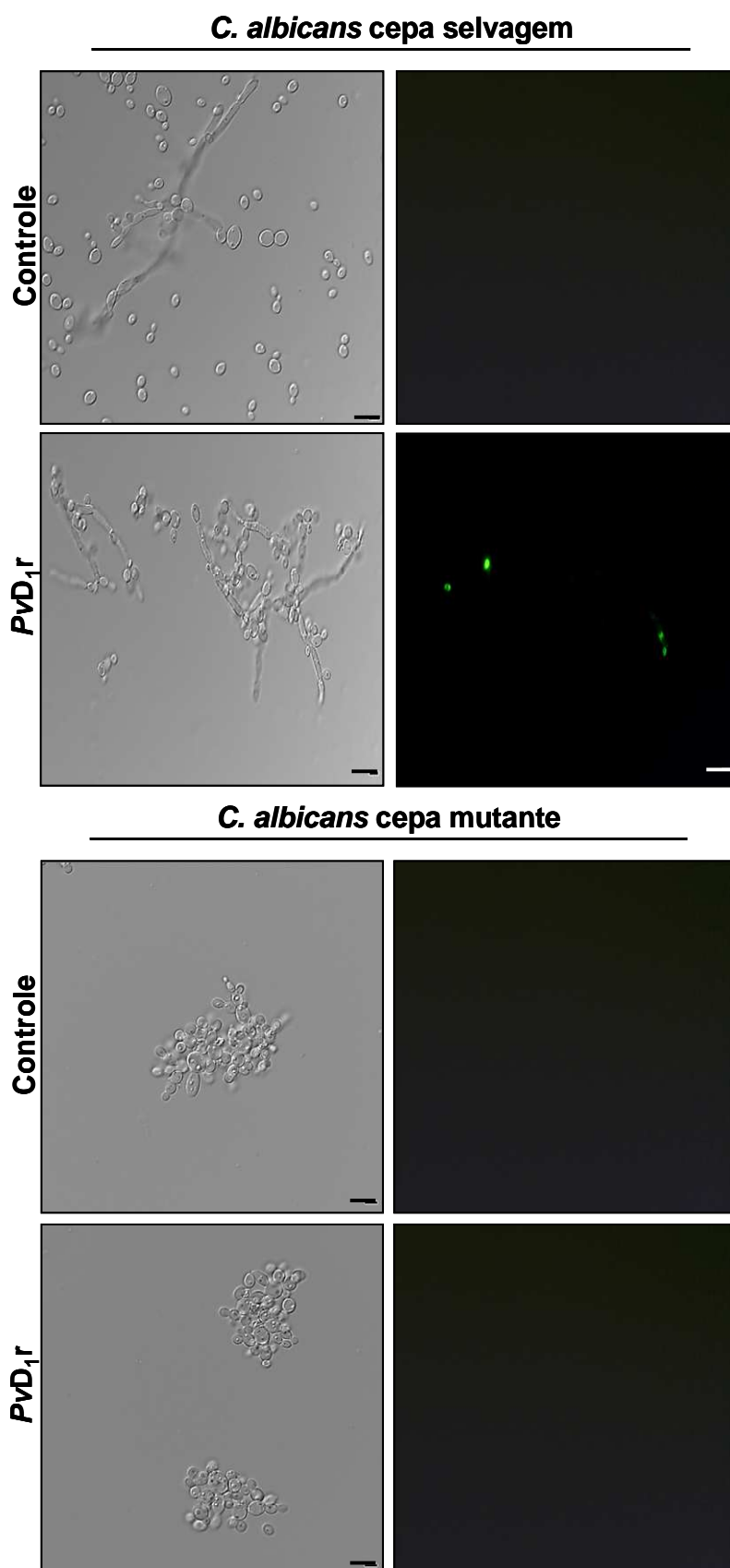


Figura 30: Imagem por microscopia de fluorescência da levedura *Candida albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), tratadas com o corante para ROS, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD_{1,r}*. As células foram visualizadas por DIC e microscopia de fluorescência. Barras = $5 \mu\text{m}$.

II.4.3.7 - Efeito da *PvD*_{1r} sobre a indução da produção endógena de óxido nítrico em células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1)

Após ensaio de inibição do crescimento, nós também analisamos a indução da produção endógena de NO nas células de *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), incubando-as com o corante DAF₂DA. Notamos que as células de *C. albicans* cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), crescidas tanto na ausência, quanto na presença de 100 μ g.mL⁻¹ da *PvD*_{1r}, não apresentaram marcação para NO (figura 31).

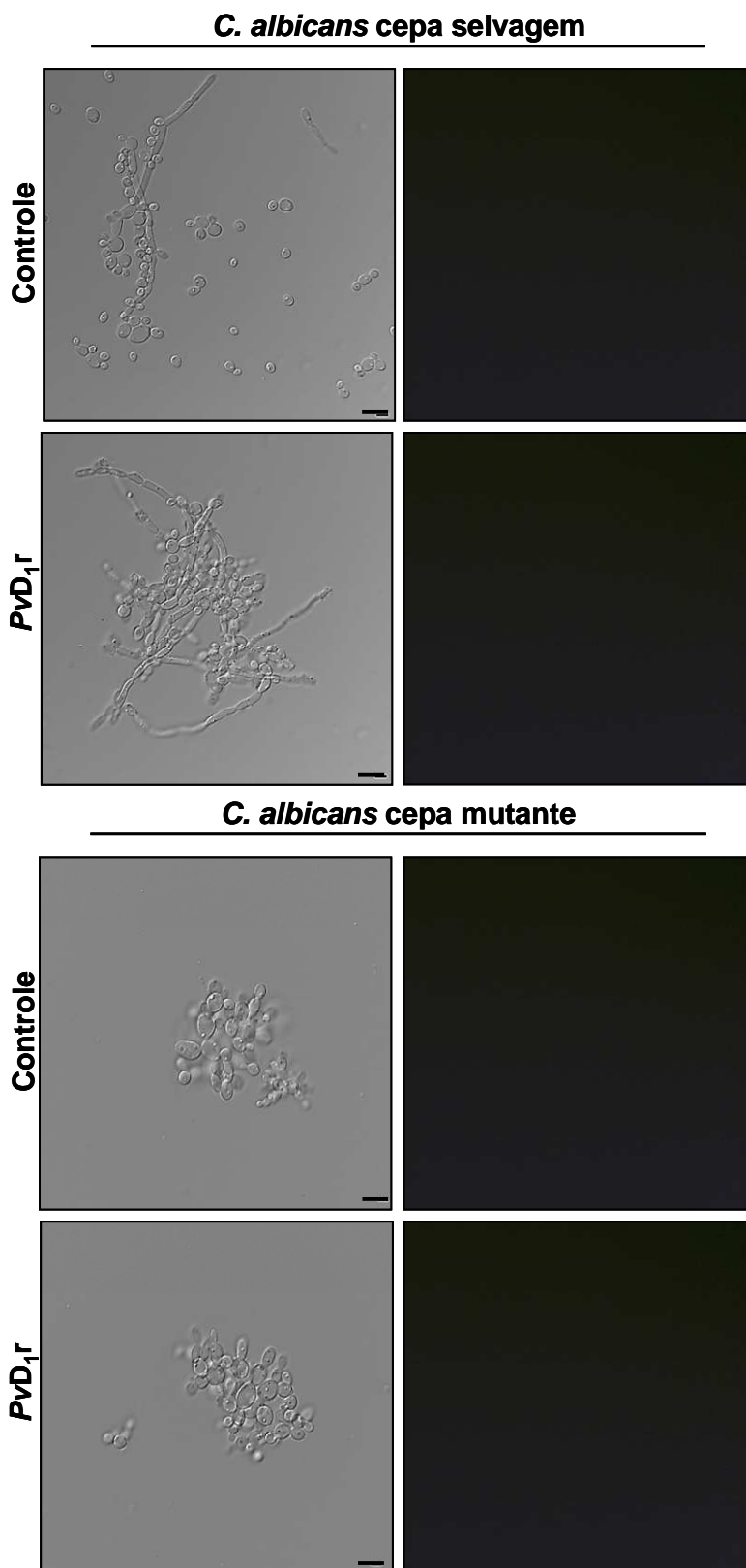


Figura 31: Imagem por microscopia de fluorescência da levedura *Candida albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1), tratadas com o corante para NO, após terem sido crescidas na ausência (controle) e na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da PvD_{1,r}. As células foram visualizadas por DIC e microscopia de fluorescência. Barras = $5 \mu\text{m}$.

II.4.3.8 - Determinação da localização da *PvD₁r* em células de *C. albicans*

Para determinar a localização da *PvD₁r* nas células, as cepas de *C. albicans* selvagem e mutante foram tratadas com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD₁r* acoplada a FITC e utilizadas no ensaio de inibição do crescimento. Subsequentemente, as células foram submetidas à marcação com DAPI (para marcação do núcleo das células). Neste ensaio, nós observamos que a *PvD₁r* acoplada ao FITC estava localizada extracelularmente na cepa mutante, enquanto que na cepa selvagem, como seria de se esperar, devido à presença do alvo para a defensina na membrana, a localização da *PvD₁r* foi intracelular. Além de detectarmos a presença da defensina recombinante *PvD₁r* nos espaços intracelulares das células de tipo selvagem, esta mostrou-se co-localizada com o núcleo, após marcação com DAPI (figura 32).

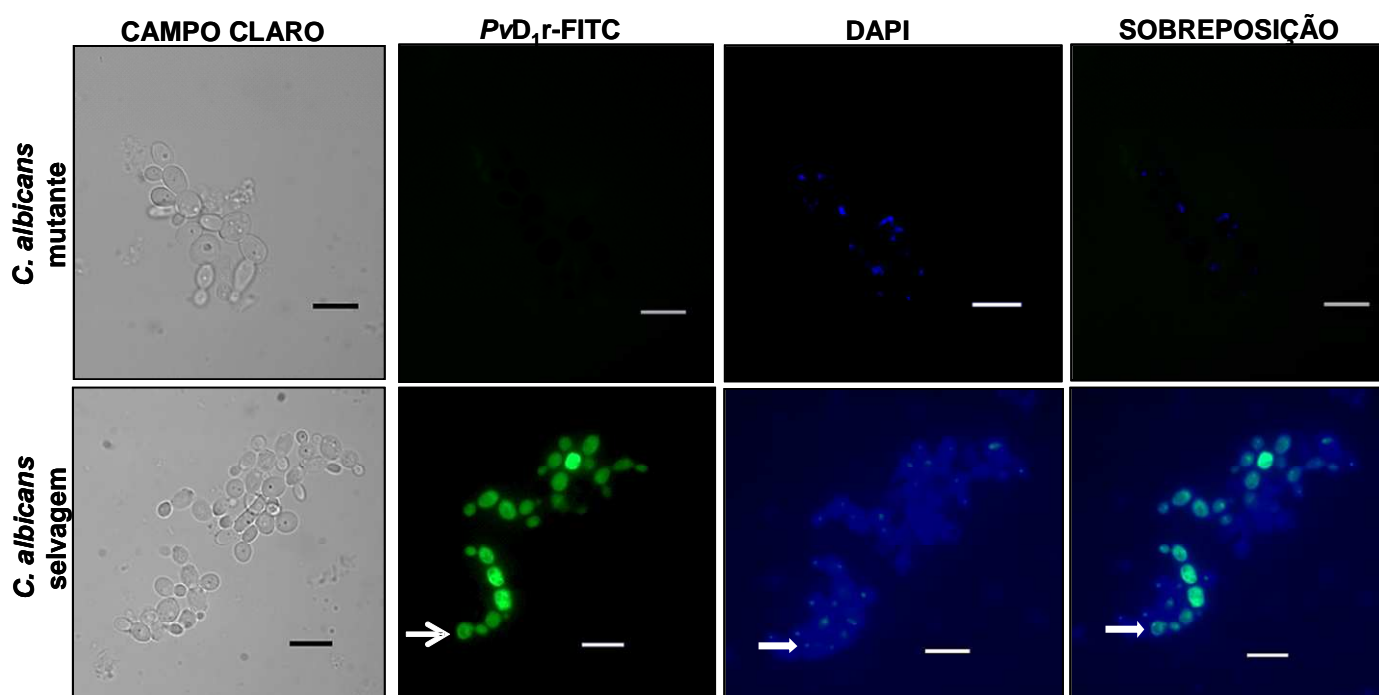


Figura 32: Imagem por microscopia de fluorescência das células de *Candida albicans* com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da *PvD*_{1r} acoplada a FITC durante um período de 24 h. O núcleo das células foi marcado pelo corante DAPI. Note-se a marcação citoplasmática do FITC indicando a entrada da *PvD*_{1r} na célula. A seta aberta mostra a marcação com FITC; a seta fechada mostra a marcação do núcleo com DAPI e a co-localização do FITC e do DAPI. Barras = $10 \mu\text{m}$.

II.4.3.9 - Verificação do efeito apoptótico da *PvD_{1r}* sobre células da levedura *S. cerevisiae*

Para verificar o efeito apoptótico da *PvD_{1r}*, esferoplastos de *S. cerevisiae* foram tratados com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da defensina *PvD_{1r}* por 2 h e posteriormente incubadas com Kit Annexin-V-Fluos, que também contém iodeto de propídio para a marcação de células necróticas. Como mostrado na figura 33, as células expostas a *PvD_{1r}* foram significativamente coradas com verde fluorescente (FITC-anexina V – positivo) na periferia da célula depois da digestão da parede celular, indicando a externalização de fosfatidilserina. Efeito semelhante foi verificado no controle positivo onde as células foram incubadas com peróxido de hidrogênio. Células coradas com FITC-anexina V não foram detectadas no controle realizado sem *PvD_{1r}*.

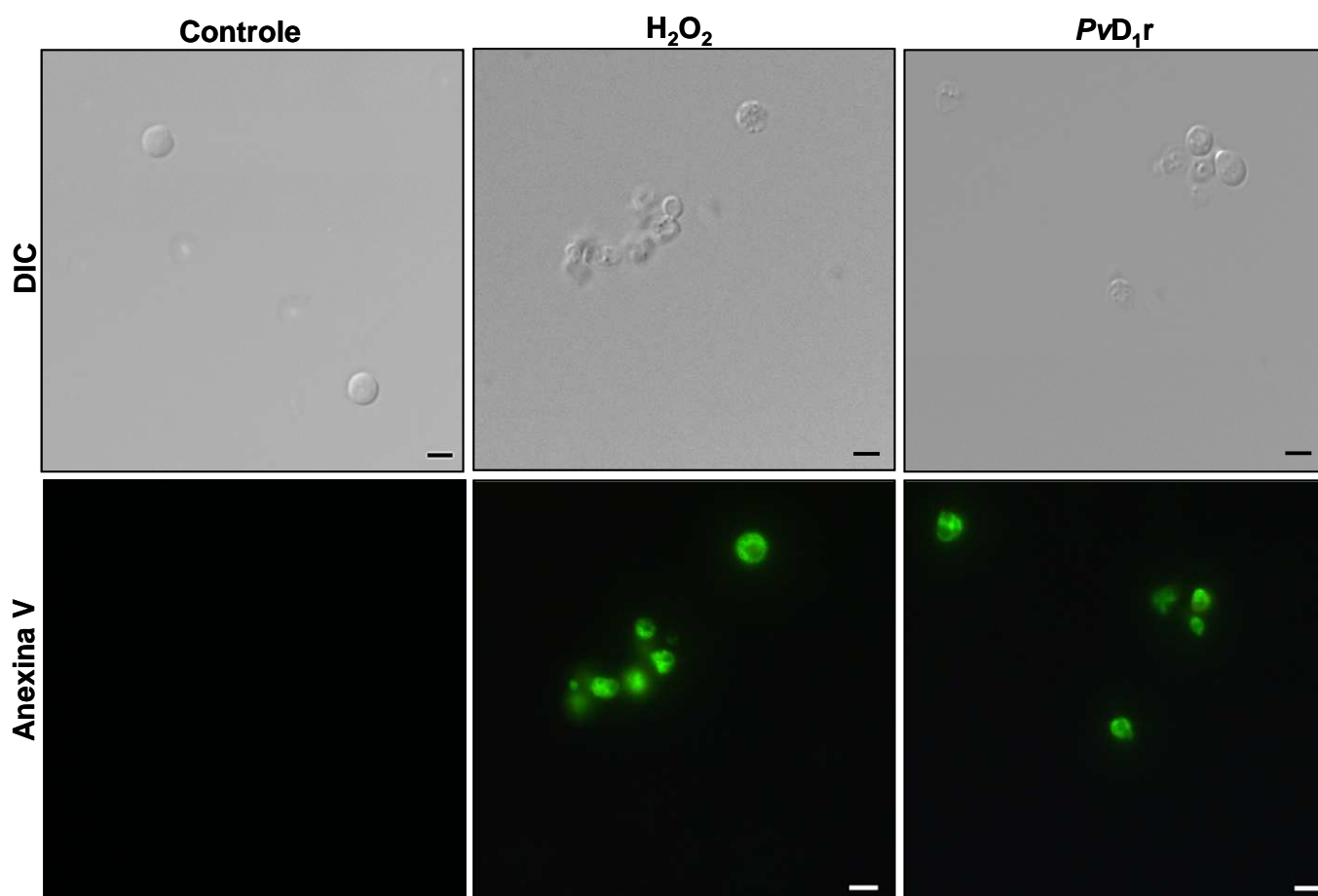


Figura 33: Imagem por microscopia de fluorescência das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas por 2 h, com $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da PvD₁r. A fluorescência verde indica a exposição de fosfatidilserina. As células foram visualizadas por DIC e por microscopia de fluorescência. Barras = $5\mu\text{m}$.

5. DISCUSSÃO

PARTE I: PURIFICAÇÃO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA NATURAL PvD₁ DE SEMENTES DE *Phaseolus vulgaris*

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são produzidos por diversas espécies, incluindo bactérias, insetos, plantas e animais vertebrados, sendo caracterizados a partir de praticamente todos os organismos, variando de procaríotos a seres humanos (Li *et al.*, 2012). Fazem parte da resposta imune inata, que é o principal sistema de defesa para a maioria dos organismos, onde desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções (Kido *et al.*, 2010).

Dentre os AMPs de plantas melhor caracterizados estão as defensinas, cuja atividade e mecanismo de ação são principalmente descritos contra uma ampla variedade de fungos filamentosos e leveduras. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado (Carvalho e Gomes, 2009; 2011).

Games *et al.* (2008) conseguiram isolar e caracterizar uma nova defensina antifúngica de sementes de *P. vulgaris* (feijão comum), denominada PvD₁ (do inglês, *Phaseolus vulgaris defensin 1*). Nesta parte do trabalho foi então estudada a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação da PvD₁ sobre microrganismos. A purificação da PvD₁ foi feita por apenas um passo cromatográfico, segundo metodologia descrita por Games *et al.* (2008). Inicialmente, foi feita uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose e esta purificação foi confirmada através de cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 em HPLC, como pode ser observado na figura 6. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Games *et al.* (2008). Outros trabalhos também já demonstraram a purificação de outras defensinas de plantas seguindo esses mesmos métodos (Terras *et al.*, 1993; Terras *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 2012).

Posteriormente, ao analisarmos a atividade antimicrobiana da PvD₁, os testes antifúngicos mostraram que este AMP apresentou um efeito inibitório no crescimento do fungo filamentoso *F. oxysporum* e das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae*, sendo que a inibição foi mais acentuada para as leveduras (figura 7). Outros estudos já demonstraram que a concentração inibitória das defensinas varia muito e é dependente do fungo testado. van der Weerden *et al.* (2008) mostraram que a defensina NaD1 isolada de *Nicotiana glauca* na concentração de 1 µM inibiu 50% do

crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *Leptosphaeria maculans* e 65% dos fungos *Thielaviopsis basicola*, *Verticillium dahliae* e *Aspergillus nidulans*. Já na concentração de 5 μ M de PvD₁, o crescimento de todos os fungos filamentosos testados sofreu mais do que 90% de inibição.

Na tentativa de descobrir a possível causa da inibição destes microrganismos e assim tentar elucidar um possível mecanismo de ação para a defensina PvD₁, nós verificamos se esta era capaz de induzir o aumento da produção endógena de ROS. Foi observado um aumento na produção de ROS para ambas as células fúngicas; no entanto, detectamos um aumento de NO apenas para as células de *C. albicans* (figuras 8 e 9). Dados na literatura sobre AMPs corroboram com os resultados por nós obtidos. Ribeiro *et al.* (2012) mostraram que um peptídeo inibidor de tripsina CaTI, isolado de sementes *C. annuum*, foi capaz de causar a indução de NO nas células das leveduras *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *Kluyveromyces marxianus*, no entanto, diferente do que já visto para a defensina PvD₁, nenhuma marcação nas células foi observada para os níveis de ROS. Em outro trabalho, foi visto que um peptídeo semelhante à tionina, isolado de besouro (*Psacotha hilaris*), também mostrou capacidade de aumentar o nível de ROS endógeno em células de *C. albicans* (Hwang *et al.*, 2011a). Já é conhecido que ROS são moléculas que aparecem nos momentos iniciais do processo apoptótico. Estudos têm demonstrado que o aumento de ROS no meio pode ser tóxico aos organismos, levando à destruição de vários tipos celulares através de vias apoptóticas (De Felice *et al.*, 2007; Maiese *et al.*, 2010), e mais recentemente foi mostrado que algumas defensinas de plantas induzem apoptose ou morte celular programada, em espécies de leveduras e fungos susceptíveis (De Coninck *et al.*, 2013)

Visto que PvD₁ foi capaz de induzir o aumento de ROS tanto nas células de fungo filamentoso quanto nas de levedura, nós realizamos um ensaio para marcação de células apoptóticas por anexina V. Quando as células foram analisadas por microscopia de fluorescência, observamos apenas a marcação por anexina V (figura 12), acusando então uma externalização de PS, o que nos sugere que a PvD₁ induz a morte celular programada nas células desta levedura. De modo similar, outros AMPs isolados de diferentes fontes, também são capazes de induzir apoptose em células de leveduras. Hwang *et al.* (2011b) viram que o peptídeo papiliocina, isolado de *Papilio xuthus* (borboleta), induzia o acúmulo de ROS e radicais livres que são importantes reguladores de apoptose em *C. albicans*. Essas células tratadas com a

papiliocina mostraram uma série de mudanças, normalmente vistas em células que estão sofrendo processo inicial de apoptose, como por exemplo, translocação da PS do lado interno para o lado externo da membrana plasmática, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e a presença de metacaspases ativas. Alguns eventos tardios de apoptose também foram observados, como a fragmentação e condensação do ácido desoxiribonucléico (DNA, do inglês *desoxyribonucleic acid*). Estes dados sugeriram que a papiliocina levou as células de *C. albicans* a sofrerem apoptose, através do acúmulo de ROS. Lee *et al.* (2012) viram, através de marcação com AnnexinV-FITC e ensaio TUNEL, que o peptídeo coprisina 43, semelhante à defensina, isolado de *Copris tripartitus* (besouro), estava envolvido tanto nos estágios iniciais quanto nos estágios finais da apoptose, aumentando o nível intracelular de ROS e de radicais hidroxila livres, em células de *C. albicans*.

A capacidade da *PvD*₁ em alterar o funcionamento da homeostase iônica da membrana de fungos também foi avaliada nesta primeira parte do trabalho. O fluxo de H⁺ através da membrana plasmática exerce funções essenciais na fisiologia da célula fúngica e normalmente é mediado pela bomba H⁺-ATPase. A interferência neste fluxo pode levar a morte celular. Thevissen *et al.* (1996) demonstraram um aumento no fluxo dos íons através da membrana, quando os fungos *Neurospora crassa* e *F. culmorum* foram tratados com defensinas de planta *Rs-AFP2* e *Dm-AMP1*, isoladas de *Raphanus sativus* e *Dahlia merckii*, respectivamente. Estes efeitos foram monitorados para a defensina *PvD*₁, medindo a acidificação do meio estimulada por glicose das células do fungo filamentoso *F. oxysporum* e da levedura *C. albicans* (figuras 10 e 11, respectivamente). Os resultados mostram que com um tempo de pré-incubação de 30 min com *PvD*₁, foi possível observar 99% de inibição da acidificação para o fungo *F. oxysporum* (figura 10). Acreditamos que este efeito é devido à soma da toxicidade do peptídeo e a baixa capacidade acidificante dos fungos filamentosos. A acidificação do meio, para as células da levedura *C. albicans* na presença da *PvD*₁, mostrou um resultado na inibição da acidificação de 100% e a variação do tempo de pré-incubação dessas células na presença da *PvD*₁ não apresentou uma alteração significativa (figura 11). Dados da literatura corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Taveira *et al.* (2014) demonstraram que uma tionina isolada do fruto de *Capsicum annuum* foi capaz de inibir a acidificação do meio por células de *S. cerevisiae* em 78% quando pré-incubadas por 30 min na concentração de 100 µg.mL⁻¹. Ribeiro *et al.* (2012) também observaram

um efeito inibitório na acidificação do meio, onde uma albumina 2S isolada de sementes de maracujá, denominada *Pf-Alb*, inibiu 100% a acidificação do meio por células de *S. cerevisiae* e para as células de *C. albicans* foi observada uma inibição de 96% da acidificação.

Neste trabalho, não nos limitamos apenas ao estudo da atividade antimicrobiana da defensina *PvD₁* sobre fungos, mas também utilizamos protozoários. Com o intuito de entendermos parte do mecanismo de ação utilizado por *PvD₁*, para inibir o crescimento dos protozoários, analisamos a atividade biológica da *PvD₁* sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*, visto que na literatura, poucos peptídeos já demonstraram ação sobre protozoários e poucos estudos foram feitos nessa área.

Vimos efeito inibitório na proliferação dos parasitas com 24 e 48 h, quando estes foram incubados com diferentes concentrações da defensina *PvD₁*, chegando a uma inibição de até 96,5% da proliferação (figura 13). Apoiando nossos resultados, outros autores descreveram a atividade microbicida de AMPs e outras defensinas sobre *Leishmania sp.* Berrocal-Lobo *et al.* (2009) observaram que uma defensina PTH1 de *S. tuberosum* (batata) e uma tionina de *T. aestivum* (trigo) apresentaram atividade sobre *L. donovani*. Mais recentemente, Souza *et al.* (2013) mostraram que a defensina natural de sementes de *Vigna unguiculata* (*Vu-Def*) e seu homólogo recombinante, (*Vu-Defr*), ambas na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, também foram capazes de inibir a proliferação do parasita *L. amazonensis* em aproximadamente 50%, durante o período de 48 h de incubação.

Após o tratamento com *PvD₁*, analisamos as células de *L. amazonensis* através de microscopia eletrônica de transmissão. Esta análise mostrou que as células dos protozoários tratadas com a defensina apresentavam uma fragmentação e vacuolização no citoplasma (figura 14B), bem como uma ruptura na membrana plasmática das promastigotas levando à perda do material citoplasmático (figura 14C). Para confirmarmos o efeito da *PvD₁* sobre a permeabilização de membrana das promastigotas de *L. amazonensis*, nós utilizamos o corante Sytox green e observamos que a *PvD₁* foi realmente capaz de provocar danos à membrana plasmática (figura 15). Souza *et al.* (2013) relataram que de forma semelhante à defensina *PvD₁*, *Vu-Defr* foi capaz de induzir a permeabilização de membrana de *L. amazonensis*. Bera *et al.* (2003), examinaram o efeito dos AMPs indolicidina (de neutrófilos bovinos) e outros dois peptídeos, SPFK e 27RP, derivados da

seminalplasma (do plasma seminal bovino) sobre *L. donovani*. Interessantemente, as células tratadas com esses peptídeos revelaram extensa degeneração da organização intracelular e a formação de múltiplos vacúolos citoplasmáticos. Em contraste com o efeito causado pelos AMPs, as células tratadas com anfotericina B não mostraram vacuolização citoplasmática, mas foi visto que esta causou uma ruptura significativa na membrana plasmática.

Com o objetivo de melhor investigar o mecanismo de ação da *PvD₁* em células de promastigotas de *L. amazonensis*, estas foram incubadas com *PvD₁* acoplada ao isotiocianato fluoresceína (FITC) por 24 h. Nós observamos a marcação da *PvD₁* acoplada ao FITC dentro das células de *L. amazonensis*, o que nos leva a sugerir que a *PvD₁* pode estar atuando em um alvo intracelular (figura 16).

Coletivamente, estes resultados sugerem que, em adição aos seus efeitos sobre a inibição da proliferação e a permeabilização da membrana de *Leishmania*, a *PvD₁* ao provocar a vacuolização citoplasmática pode induzir caminhos para a morte celular autofágica em *L. amazonensis*, como já foi descrito por Dunn *et al.* (1990a; 1990b) e Bera *et al.* (2003).

As doenças causadas por parasitas representam uma ameaça para a saúde humana. Embora muitos fármacos diferentes tenham sido desenvolvidos com o fim de erradicar essas doenças, um que seja totalmente eficaz ainda não foi descoberto. Entre os compostos mais ativos testados, os AMPs são particularmente atraentes devido ao seu amplo espectro de ação (Torrent *et al.*, 2012). No entanto, mais pesquisas precisam ser feitas, para que seja possível um melhor entendimento do mecanismo de ação desses peptídeos, bem como sobre quais são os seus alvos celulares.

PARTE II: CLONAGEM MOLECULAR, EXPRESSÃO HETERÓLOGA, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MECANISMO DE AÇÃO DA DEFENSINA RECOMBINANTE *PvD_{1r}*

Para melhor caracterizar um novo AMP, determinando seu mecanismo de ação, sua estrutura e função e seu potencial uso como um agente terapêutico, uma quantidade razoável de moléculas ativas e purificadas é necessária. Existem três formas de se obter determinadas quantidades de AMPs: o isolamento a partir de

fontes naturais, a síntese química e a expressão recombinante (Parachin *et al.*, 2012).

Os AMPs obtidos através de fontes naturais, no entanto, estão presentes em baixas concentrações nos tecidos de origem, o que requer uma grande quantidade de material biológico a ser processado e são também de difícil purificação, o que requer vários passos e/ou repetições, levando a um rendimento muito baixo no final do processo (Terras *et al.*, 1995; Tápia *et al.*, 2011). A síntese química de peptídeos permite tanto a produção de peptídeos sintéticos, quanto à produção de peptídeos naturais. No entanto, um custo elevado para a síntese de peptídeos em larga escala tem sido observado (Li, 2011). Os avanços na tecnologia do DNA recombinante têm fornecido uma oportunidade para produzir os AMPs em grandes quantidades. Esta tecnologia permite a clonagem de genes em vetores específicos para a expressão em células hospedeiras procarióticas e/ou eucarióticas. Este tem sido considerado o método mais eficaz em relação ao tempo e aos custos de produção (Xu *et al.*, 2007; Parachin *et al.*, 2012). Estudos têm mostrado que os principais organismos para a produção de AMPs heterólogos são bactérias e leveduras, representando 97,4% dos AMPs heterólogos expressos (Li *et al.*, 2008).

O número de AMPs recombinantes expressos aumentou consideravelmente nos últimos anos devido aos avanços na biologia molecular, permitindo o estabelecimento de estratégias para expressão, tais como o organismo escolhido, tipo de promotor e características apropriadas de modificação pós transcricional (Xu *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2012). De fato, muitos AMPs têm sido obtidos com sucesso através da produção recombinante em diversos organismos heterólogos (Ingham e Moore, 2007). Entre os sistemas disponíveis para a produção da proteína recombinante, a bactéria *Escherichia coli* tem sido a mais amplamente utilizada (Li *et al.*, 2010; Li, 2011).

No entanto, superexpressar uma proteína de origem eucariótica em um sistema procariótico é uma tarefa que requer cuidados e estratégias específicas. Embora os sistemas bacterianos pareçam ser úteis para a expressão da proteína eucariótica, algumas limitações devem ser superadas, tais como o enovelamento incorreto da proteína (podendo não haver a formação de suas pontes dissulfeto), o uso preferencial de códon (podendo a proteína nem chegar a ser produzida), a degradação de proteínas por protease a partir da célula hospedeira e a toxicidade

causada pela proteína heteróloga para o hospedeiro (Jana e Deb, 2011; Tavares *et al.*, 2012).

Nosso grupo isolou um peptídeo de semente de feijão comum *Phaseolus vulgaris* e em seguida sequenciou-o constatando ser este uma defensina. Esta defensina, nomeada PvD₁, apresentou atividade antimicrobiana sobre uma série de leveduras testadas, assim como provocou alterações morfológicas e ultraestruturais nas células das mesmas (Games *et al.*, 2008). No presente trabalho, é apresentada a expressão heteróloga e sua caracterização, a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação da defensina recombinante PvD_{1r}.

O homólogo recombinante da defensina de sementes de *P. vulgaris* foi expresso em *E. coli* (linhagem Rosetta-gami 2 (DE₃) pLysS) com sucesso. Após indução com 1 mM de IPTG, a bactéria transformada com a construção pET-PvD₁, expressou uma proteína de fusão com massa molecular acima de 16,9 kDa, que corresponde à PvD_{1r} fusionada com a tioredoxina e a cauda de histidina, chamada (Trx-His-PvD_{1r}) (figura 20). Santos *et al.* (2010) também obtiveram com sucesso a superexpressão de uma defensina de *V. unguiculata* (feijão-de-corda) utilizando esse mesmo sistema de superexpressão. Resultados similares foram obtidos por Lin *et al.* (2007) que mostraram a superexpressão da defensina VrD2, de sementes de *V. radiata*. A superexpressão de proteínas heterólogas em *E. coli* muitas vezes produz grandes quantidades de proteína insolúvel e a fusão da tioredoxina às proteínas que estão sendo superexpressas é capaz de aumentar a solubilidade da proteína e auxilia na formação de pontes dissulfeto precisas e corretas no enovelamento das proteínas no citoplasma de *E. coli* (Ohana *et al.*, 2009).

Outra estratégia muito utilizada na obtenção de uma proteína recombinante é o acoplamento dessa proteína a uma cauda de histidina, que irá auxiliar no processo de purificação da proteína superexpressa. Diversos trabalhos têm utilizado a técnica de cromatografia de afinidade a íons metálicos na purificação de proteínas fusionadas à cauda de histidina (Vijayan *et al.*, 2008). Yang *et al.* (2011) conseguiram purificar uma plectasina (um peptídeo semelhante à defensina isolada de fungo) recombinante, utilizando esta técnica. No entanto, outras técnicas cromatográficas podem ser necessárias, além da cromatografia de afinidade. Recentemente, Souza *et al.* (2013) mostraram que a defensina recombinante de *V. unguiculata* foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-NTA agarose e também por cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC em

coluna C2/C18. Do mesmo modo, neste trabalho utilizamos dois passos cromatográficos. Além da cromatografia de afinidade a níquel, também utilizamos uma cromatografia de fase reversa para a purificação do peptídeo recombinante (figura 21). Todo o processo de purificação foi monitorado por eletroforese em gel de tricina e como pode ser observado na figura 21A, raia 4, apenas uma banda de aproximadamente 6 kDa, a mesma massa molecular da defensina natural PvD₁, isolada a partir das sementes de *P. vulgaris*, foi visualizada.

Após visualizarmos a presença de um peptídeo de aproximadamente 6 kDa, demos continuidade ao processo de caracterização do peptídeo superexpresso. Este foi então submetido ao sequenciamento N-terminal por degradação de Edman e a análise dos seus oito aminoácidos do N-terminal, contados após a primeira metionina (adicionada à sequência do peptídeo a ser expresso como um requisito para a expressão de proteína através do sistema pET-32 EK/LIC), correspondeu exatamente com a sequência dos oito primeiros aminoácidos do N-terminal da defensina natural PvD₁ isolada de sementes *P. vulgaris*, descrita por Games *et al.* (2008) (figura 22). Assim, concluímos que a proteína expressa é o homólogo recombinante da defensina natural PvD₁ isolada de sementes. Adicionalmente este resultado mostrou que todo o processo de produção recombinante, incluindo o corte com a enzima enteroquinase, foi bem sucedido.

Existe uma grande similaridade entre as estruturas das defensinas de plantas. De um modo geral, sua estrutura é composta por uma α -hélice e três folhas β antiparalelas estabilizadas por quatro pontes dissulfeto que são formadas por oito resíduos de cisteína conservados (Carvalho e Gomes, 2011). Através da modelagem da PvD_{1r}, podemos constatar que sua estrutura era semelhante à de outras defensinas (figura 23B). Além disso, observamos resíduos positivos (arginina e lisina) que estão expostos na superfície da molécula, sendo estes importantes para a atividade antifúngica deste peptídeo (figura 23D e E). Como o nosso resultado, Santos *et al.* (2010), também usando como modelo de comparação a defensina de *V. radiata*, mostraram o quão similar é a estrutura dessa defensina com a defensina recombinante de *V. unguiculata*.

A fim de verificar a funcionalidade da PvD_{1r}, nós comparamos o seu efeito sobre o crescimento da cepa selvagem da levedura *C. albicans*, com o efeito da PvD₁ no crescimento destas células. Vimos que as células de *C. albicans* quando crescidas tanto na presença da PvD₁ quanto na presença da PvD_{1r}, sofreram uma

inibição no seu crescimento (figura 25). Estes resultados indicam que a produção recombinante da *PvD_{1r}* preservou a sua atividade antimicrobiana.

Estudos prévios mostraram que a defensina natural *PvD₁* foi capaz de inibir o crescimento de diversas leveduras, assim como o crescimento de outros fungos filamentosos (Games *et al.*, 2008). Diversas defensinas isoladas de diferentes plantas também demonstraram perfis de inibição semelhantes sobre o crescimento de microrganismos. Thevissen *et al.* (2007) avaliaram o efeito de diferentes defensinas sobre o crescimento de leveduras patogênicas do gênero *Candida*. As defensinas de plantas *Hs-AFP1* e *Rs-AFP2* foram capazes de inibir o crescimento das leveduras *C. albicans* e *C. krusei*. Mais recentemente, Wong *et al.* (2012), mostraram que uma defensina isolada de *P. vulgaris* cultivar “King Pole Bean” inibiu eficazmente o crescimento de *Mycosphaerella arachidicola*, *S. cerevisiae* e *C. albicans*, quando usada em pequenas concentrações. Em relação ao perfil de inibição da defensina recombinante, vários outros autores têm demonstrado que os homólogos recombinantes são tão ativos quanto à forma natural (Alves *et al.*, 1994; Vijayan *et al.*, 2008). No entanto, pequenas diferenças entre as atividades das defensinas naturais e das defensinas recombinantes em testes de atividade, foram relatadas com diferentes causas. Da mesma forma que vimos para a defensina *PvD_{1r}*, o recombinante AX2, de uma defensina isolada de folhas *Beta vulgaris* (beterraba), mostrou possuir atividade antimicrobiana menor que a proteína natural. Os autores atribuíram esta diferença na atividade, pela adição de um aminoácido extra na região N-terminal como uma exigência de clonagem (Kristensen *et al.*, 1999).

Análises feitas através de microscopia óptica mostraram alterações morfológicas nas células da cepa selvagem de *C. albicans* quando estas foram tratadas com 100 µg.mL⁻¹ de ambas as defensinas *PvD₁* e *PvD_{1r}* (figura 26). Já foi mostrado que várias defensinas de plantas são capazes de induzir alterações morfológicas em células fúngicas (Thevissen *et al.*, 2004; de Beer e Vivier, 2011). Em tais alterações estão incluídas aglomeração celular, alongamento celular, hiper-ramificação das hifas e, principalmente, a redução do número de células. Alguns autores também relataram que esses efeitos variam de acordo os fungos e os AMPs que estão sendo testados (Osborn *et al.*, 1995; Rogozhin *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

Após a confirmação de que *PvD_{1r}* era biologicamente ativa, nós avaliamos sua atividade sobre uma cepa mutante de *C. albicans* (Δ GCS1). Esta cepa mutante não tem o gene que codifica para a enzima glicosilceramida sintase, que é necessária para a formação do esfingolípídeo GlcCer na membrana de *C. albicans*. Já foi descrito na literatura que este esfingolípídeo é necessário para o ancoramento da defensina *Rs-AFP1*, isolada de sementes de rabanete, e esta interação *Rs-AFP1*-GlcCer na membrana fúngica é necessária para a inibição do crescimento fúngico (Thevissen *et al.*, 2004). Na intenção de descobrir se a *PvD_{1r}* necessita deste alvo na membrana plasmática da levedura, realizamos um ensaio de inibição de crescimento com a cepa mutante de *C. albicans* (Δ GCS1). A sobreposição das curvas de crescimento do controle e do teste indicou que a *PvD_{1r}* não apresentou efeito tóxico sobre a cepa mutante (figura 27). Este resultado sugere, que o alvo da *PvD_{1r}* na membrana é o esfingolípídeo GlcCer, uma vez que na presença desta mesma defensina, a cepa selvagem de *C. albicans* (que possui o GlcCer na membrana) tem uma inibição de 75,9% (figura 25). Podemos notar também, que a *PvD_{1r}* presente no meio onde a cepa mutante de *C. albicans* estava crescendo não foi capaz de causar nenhuma diferença morfológica em suas células, em comparação com o controle (figura 28). Acreditamos, então, que sem o seu suposto alvo, *PvD_{1r}* não pôde interagir com a membrana e, conseqüentemente, não provocou inibição no crescimento destas células. De forma semelhante, outras espécies de fungos que também apresentavam deleções genéticas de esfingolípídeos na membrana não mostraram inibição no seu crescimento, quando incubados com defensinas de plantas que utilizavam esfingolípídeos como alvos na membrana (Ramamoorthy *et al.*, 2007; Thevissen *et al.*, 2000).

Nesta parte do trabalho também analisamos o efeito da *PvD_{1r}* na permeabilização de células da levedura *C. albicans*, cepas selvagem e mutante (Δ GCS1). Vimos que quando as células da cepa selvagem foram incubadas com *PvD_{1r}*, foi possível observar a marcação das células pelo corante, indicando, assim, que esta foi capaz de causar danos às células. E como já era esperado, as células da cepa mutante não apresentaram marcação (figura 29). Como já dito anteriormente, a permeabilização da membrana pode ser vista através da marcação das células pelo corante fluorescente Sytox green que se liga a ácidos nucléicos. No entanto só consegue atravessar a membrana, quando esta está comprometida.

Diversos trabalhos corroboram com nossos resultados, mostrando a ação de defensinas na permeabilização de membranas. Em um estudo foi visto que a defensina *Rs-AFP2* causou a permeabilização da membrana do fungo *N. crassa* (Thevissen *et al.*, 1999). van der Weerden *et al.* (2010) também já demonstraram que a defensina *NaD1*, isolada de *Nicotiana glauca*, causava a permeabilização da membrana do fungo *F. oxysporum*.

Estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de ação demonstraram que algumas defensinas são capazes de causar um aumento na produção endógena de ROS. Aerts *et al.* (2007) demonstraram que a defensina *Rs-AFP2* induz a produção endógena de ROS em células de *C. albicans* e que tanto esta produção de ROS, quanto a atividade antifúngica, desaparecem na presença do antioxidante ácido ascórbico, o que sugere uma ligação causal entre a atividade antifúngica de *Rs-AFP2* e a produção de ROS por ela mediada. Estes autores sugerem, ainda, que a permeabilização da membrana é consequência de uma sinalização intracelular gerada pela ligação de *Rs-AFP2* com as glicosilceramidas da membrana e não simplesmente a ação direta deste peptídeo na membrana através de sua interação com este esfingolípídeo.

Neste trabalho, observamos que a defensina *PvD_{1r}* foi capaz de induzir um aumento na produção endógena de ROS somente nas células da cepa selvagem da levedura *C. albicans* e não na cepa mutante, uma vez que, estas não apresentam o esfingolípídeo de ligação da defensina na membrana (figura 30). Entretanto, a defensina *PvD_{1r}* não foi capaz de induzir a produção de NO em ambas as cepas (figura 31). ROS têm sido consideradas como reguladores primários de morte celular e estão ligadas a muitos pontos cruciais da via apoptótica em leveduras (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010).

A apoptose é uma das principais formas de morte celular programada (PCD, do inglês *programmed cell death*) que pode ocorrer em leveduras através de um processo de suicídio por numerosos estímulos, tais como o ácido acético, o estresse salino, AMPs e peróxido de hidrogênio (Madeo *et al.*, 2004). Portanto, para uma investigação mais aprofundada do mecanismo de ação da defensina *PvD_{1r}*, nós usamos marcadores apoptóticos na célula modelo *S. cerevisiae* para analisar o efeito apoptótico deste peptídeo.

Um marcador inicial morfológico de apoptose é a exposição de PS do interior para o exterior da membrana plasmática em células de leveduras (Weghuber *et al.*,

2010). Para que pudéssemos verificar esta alteração utilizamos a marcação com anexina V e vimos que as células de *S. cerevisiae*, quando tratadas com a *PvD_{1r}*, apresentaram marcação de anexina V indicando a exposição de PS. O mesmo resultado foi visto no controle positivo quando as células foram incubadas com peróxido de oxigênio. Na ausência da defensina não foi observada nenhuma marcação nas células (figura 33). Resultado semelhante foi observado para a *PvD₁*. Portanto, estes resultados sugerem que tanto *PvD₁* como a *PvD_{1r}* induzem uma apoptose em células de *S. cerevisiae*.

Outros trabalhos demonstraram que diferentes defensinas de plantas são capazes de induzir apoptose em leveduras. A defensina de rabanete *Rs-AFP2* foi capaz de induzir o acúmulo intracelular de ROS e causar apoptose em células da levedura patogênica humana, *C. albicans* (Aerts *et al.*, 2009). Esta morte induzida por *Rs-AFP2*, em células de *C. albicans*, requer caspases ou proteases semelhantes a caspases. Aerts *et al.* (2011) mostraram que a defensina *HsAFP1* foi capaz de causar o acúmulo de ROS e induzir a apoptose em células de *C. albicans*. Mais recentemente, Thevissen *et al.* (2012) demonstraram que a defensina *Rs-AFP2* induz o acúmulo de moléculas indutoras da apoptose, as ceramidas, em membranas de *C. albicans*.

Ainda em relação ao mecanismo de ação das defensinas, como já descrito anteriormente neste trabalho, vimos que a defensina *PvD₁* acoplada ao FITC estava presente no espaço intracelular das células de promastigotas de *L. amazonensis*. Já para as células de leveduras, nós mostramos que *PvD_{1r}* não interage com a cepa mutante (que não apresenta o esfingolípido GlcCer na membrana) e a marcação só pode ser vista do lado de fora das células. Em contraste, esta marcação pode ser vista dentro da célula do tipo selvagem, indicando que a *PvD_{1r}* pode estar interagindo com o alvo GlcCer na membrana e desta forma, consegue passar para o meio intracelular (figura 32).

A introdução das defensinas de plantas no citoplasma de células fúngicas como verificado por nós, foi observada em outros trabalhos. A defensina *NaD1* mostrou-se capaz de entrar nas hifas do fungo filamentoso *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, mas não foi observada sua presença nos núcleos (van der Weerden *et al.*, 2008). Em contraste, Lobo *et al.* (2007) trataram o fungo *N. crassa* com a defensina *Psd1*, isolada de *P. sativum*, conjugada com FITC e após tratamento deste fungo com DAPI mostraram a colocalização, *in vivo*, da defensina, no núcleo.

Este estudo e estudos relacionados sugerem que as atividades antifúngicas das defensinas de plantas não se restringem apenas à membrana plasmática dos fungos, mas sim podem entrar nas células e interagir com diferentes alvos intracelulares.

Durante quase duas décadas de estudos, foram produzidas consideráveis descobertas para os modos de ação antifúngico das defensinas de plantas. Vários aspectos têm sido investigados neste contexto: (i) a sua interação com componentes específicos da membrana plasmática de fungos, (ii) a identificação de alvos intracelulares para as defensinas de plantas, (iii) as vias de sinalização ativadas pelas defensinas de plantas, com destaque para a indução de apoptose, e (iv) os mecanismos de tolerância de espécies de leveduras e de fungos susceptíveis contra a atividade das defensinas de plantas (Aerts *et al.*, 2008; De Brucker *et al.*, 2011; Wilmes *et al.*, 2011).

Desta forma, o entendimento do mecanismo de ação pelo qual os peptídeos catiônicos, especialmente as defensinas, limitam o crescimento microbiano, passa a ser de extrema importância, não somente devido ao crucial papel que estes peptídeos representam na saúde humana, mas também devido à possibilidade do uso terapêutico de ocorrência natural destes (Vylkova *et al.*, 2007; Espinel-Ingroff, 2009).

Adicionalmente neste trabalho indicamos um modelo pelo qual a defensina de *P. vulgaris* é capaz de inibir o crescimento de microrganismos, especialmente fúngicos. Estes novos dados gerados para esta defensina foram incorporados à representação esquemática (figura 34), de modo a atualizá-lo, sobre o mecanismo de ação das defensinas de plantas já estudadas.

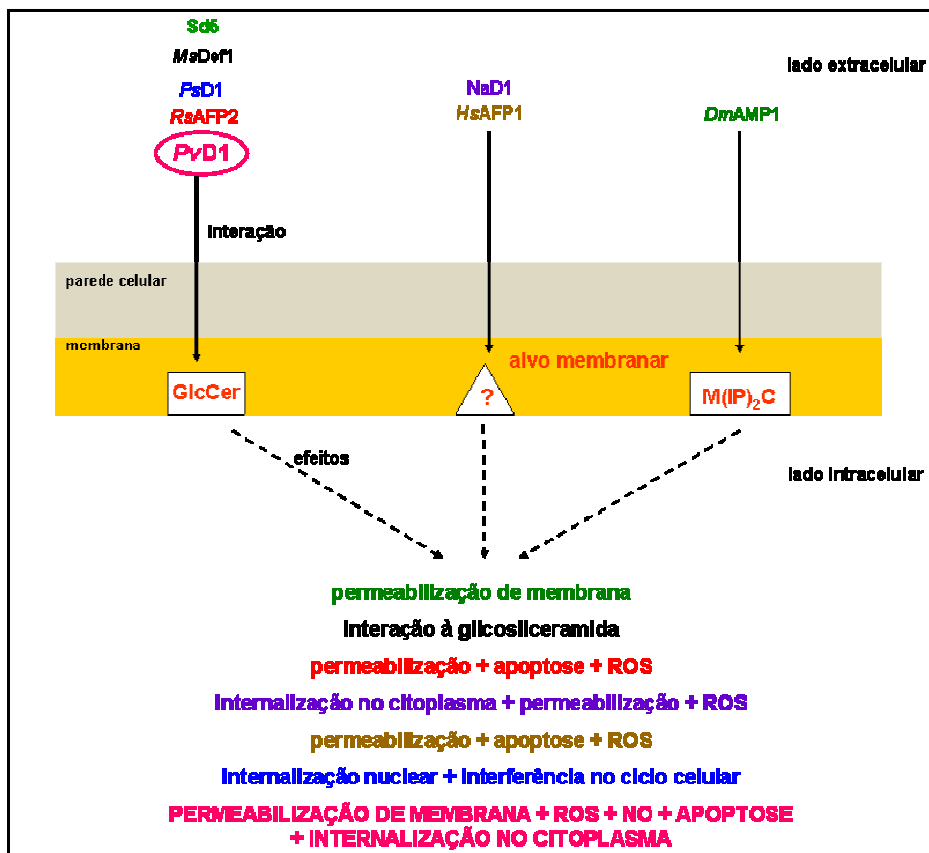


Figura 34: Representação esquemática do modo de ação mais complexo das defensinas de plantas (*PvD*₁; *Sd*₅, *MsDef*₁, *PsD*₁, *RsAFP*₂, *NaD*₁ e *HsAFP*₁) em fungos com indicação de seus alvos membranares e efeitos desencadeados pela interação. As cores correlacionam as defensinas com seus efeitos (Adaptado de De Coninck *et al.*, 2013).

6. CONCLUSÕES

- A defensina natural de *P. vulgaris*, PvD_1 , inibe o crescimento do fungo, filamentoso *Fusarium oxysporum*, dos leveduriformes *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, e do protozoário *Leishmania amazonensis*. O mecanismo de inibição destes microrganismos pela PvD_1 envolve a produção endógena de ROS e NO, a permeabilização de membrana, a inibição da acidificação do meio e alterações morfológicas e ultraestruturais;
- Os dados de acoplamento da PvD_1 a FITC indicam que, após a interação, a defensina foi localizada intracelularmente em *Candida albicans* e em *Leishmania amazonensis*, e concluímos que possivelmente há um alvo intracelular envolvido no processo de inibição destes microrganismos;
- A sequência parcial N-terminal de aminoácidos obtida para PvD_{1r} indica que todo o processo de produção recombinante e a clivagem com a enteroquinase foi bem sucedido;
- Por comparação da atividade biológica (inibição do crescimento da levedura *Candida albicans*) entre PvD_{1r} e PvD_1 concluímos que no processo de produção recombinante da PvD_{1r} sua atividade biológica foi preservada;
- Em relação à atividade da PvD_{1r} sobre a levedura *C. albicans* cepa mutante ($\Delta GCS1$), mostramos que PvD_{1r} não inibiu o crescimento, não causou permeabilização da membrana, não induziu a produção endógena de ROS assim como não foi internalizada nestas células. Todos estes efeitos foram observados para a cepa selvagem de *C. albicans* e por estes motivos concluímos que o esfingolípídeo glicosilceramida, ausente na membrana do mutante, é o alvo membranar da defensina de *P. vulgaris* nas células selvagens;
- Para células de *S. cerevisiae*, as interações com ambas as defensinas PvD_1 e PvD_{1r} resultaram em efeito apoptótico, o que ressalta novamente a preservação da funcionalidade biológica da PvD_{1r} .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Bammens, L., Cammue, B. P., Smets, B., Windrickx, J., Accardo, S., De Vos, D. E. e Thevissen, K., (2006). Level of M(IP)2C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. *FEBS Lett.*, 580:1903-1907.
- Aerts, A. M., François, I. E., Meert, E. M., Li, Q. T., Cammue, B. P. e 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.
- Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammue, B. P. A. e Thevissen, K., (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol. Life Sci.*, 65:2069-2079.
- Aerts, A. M., Carmona-Gutierrez, D., Lefevre, S., Govaert, G., Francois, I. E., Madeo, F., Santos, R., Cammue, B. P. e 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., Bammens, L., Govaert, G., Carmona-Gutierrez, D., Madeo, F., Cammue, B. P. e Thevissen, K., (2011). The antifungal plant defensin *HsAFP1* from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.*, 47(2):1-9.
- Agizzio, A. P., Carvalho, A. O., Ribeiro, S. F. F., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Okorokov, L. A., Samarão, S. S., Bloch Jr., C., Prates, M. V. e Gomes, V. M., (2003). A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 416:188-195.
- Allen, G., (1989). Determination of peptides sequences. In: Bufdon, R. H. e Knipberg, P. H. (editors), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Sequencing of proteins and peptides*. 2ª edição. Oxford, Elsevier, p.221-222.
- Almeida, M. S., Cabral, K. M. S., Kurtenbach, E., Almeida, F. C. L. e 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.*, 215:403-410.

- Almeida, M. S., Cabral, K. M., Zingali, R. B. e Kurtenbach, E., (2000). Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 378:278-286.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D. J., (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Alves, A. L. V., De Samblanx, G. W., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F., (1994). Expression of functional *Raphanus sativus* antifungal protein in yeast. *FEBS Lett.*, 348:228-232.
- Astafieva, A. A., Rogozhin, E. A., Andreev, Y. A., Odintsova, T. I., Kozlov, S. A., Grishin, E. V. e Egorov T. A., (2013). A novel cysteine-rich antifungal peptide ToAMP4 from *Taraxacum officinale* Wigg. flowers. *Plant Physiol. Biochem.*, 70:93-99.
- Barreto-Bergter, E., Pinto, M. R. e Rodrigues, M. L., (2004). Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 76:67-84.
- Benko-Iseppon, A. M., Galdino, S. L., Calsa, T. J., Kido, E. A., Tossi, A., Belarmino, L. C. e Crovella, S., (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr. Protein. Pep. Sci.*, 11:181-188.
- Bera, A., Singh, S., Nagaraj, R. e Vaidya, T., (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 127:23-35.
- Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F. e 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.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Rodríguez-Palenzuela, P., García-Olmedo, F. e Rivas, L., (2009). *Leishmania donovani*: thionins, plant antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *Exp. Parasitol.*, 122:247-249.
- Bloch, Jr. C. e Richardson, M., (1991). A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α -amilase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. *FEBS J.*, 279(1):101-104.

- Bloch, J. E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M. F., Joudrier, P., Pézolet, M. e Marion, D., (1993). Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.*, 329:336-340.
- Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A. e Vanderleyden, J., (1990). An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69:55-60.
- Broekaert, W. F., Mariën, W., Terras, F. R., De Bolle, M. F., Proost, P., Van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. e Cammue, B. P. A., (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, 31:4308-4314.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. e Osborn, R. W., (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16(3):297-323.
- Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S. B., Vanderleyden, J. e Broekaert, W. F., (1992). Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.*, 267:2228-2233.
- 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. e Broekaert, W. F., (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.*, 109:445-455.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G. e Madeo, F., (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ.*, 17:763-773.
- Carvalho, A. O., Machado, O. L. T., Da Cunha, M., Santos, I. S. e Gomes, V. M., (2001). Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:137-146.
- Carvalho, A. O. (2005). Localização intracelular, clonagem molecular e expressão de peptídeos antimicrobianos em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Tese (doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Campos dos

- Goytacazes, RJ, - Centro de Biociências e Biotecnologia - Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF. Texto completo.
- Carvalho, A. O., Teodoro, C. E. S., Da Cunha, M., Façanha, A. L. O., Okorokov, L. A., Fernandes, K. V. S. e Gomes, V. M., (2004). Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiol. Plantarum* 122:328-336.
- Carvalho, A. O. e Gomes, V. M., (2009). Plant defensins - prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30:1007-1020.
- Carvalho, A. O. e Gomes, V. M., (2011). Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr. Pharm. Des.*, 17(38):4270-4293.
- Chen, J. J., Chen, G. H., Hsu, H. C., Li, S. S. e Chen, C. S., (2004). Cloning and functional expression of a mungbean defensin VrD1 in *Pichia pastoris*. *J. Agric. Food Chem.*, 52:2256-2261.
- Colilla, F. J., Rocher, A. e Mendez, E., (1990). Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.*, 270:191-194.
- Cornet, B., Bonmatin, J.-M., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Ptak, M. e Vovelle, F., (1995). Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. *Structure*, 3:435-448.
- de Beer, A. e Vivier, M. A., (2001). Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Res. Notes*, 4:459.
- De Brucker, K., Cammue, B. P. e Thevissen, K., (2011). Apoptosis inducing antifungal peptides and proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 39:1527-1532.
- De Coninck, B., Cammue, B. P. A. e Thevissen, K., (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol. Rev.*, 26:109-120.
- De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T. e Klein, W. L., (2007). A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through a N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.*, 282:11590-11601.

- de Paula, V., Razzera, G., Medeiros, L., Miyamoto, C., Almeida, M., Kurtenbach, E., Almeida, F. e Valente, A., (2008). Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Mol. Biol.*, 68:321-335.
- de Paula, V. S, Razzera, G., Barreto-Bergter, E., Almeida, F. C. L. e Valente, A. P., (2011). Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensin 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. *Structure*, 19:26-36.
- de Zelicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P. e Delavault, P., (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in *Orobanche parasitic* plants. *Planta*, 226:591-600.
- Dhatwalia, V. K., Sati, O. P., Tripathi, M. K. e Kumar, A., (2009). Isolation, characterization and antimicrobial activity at diverse dilution of wheat puroindoline protein. *World J. Agric. Sci.*, 5:297-300.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O. e Gomes, V. M., (2003). Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. *Braz. J. Plant Physiol.*, 15:171-175.
- Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Da Cunha, M., Alves, E. W., Okorokova-Façanha, A. L., Oliveira, M. A., Perales, J., Machado, O. L. T. e Gomes, V. M., (2006). Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760:1323-1332.
- Dunn, Jr. W. A., (1990a). Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.*, 110:1923-1933.
- Dunn, Jr. W. A., (1990b). Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.*, 110:1935-1945.
- Duvick, J. P., Rood, T., Rao, A. G. e Marshak, D. R., (1992). Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Biol. Chem.*, 267:18814-18820.
- Edman, P., (1950). Method for determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scand.*, 28:283-293.

- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A. e Grishin, E. V., (2005). Diversity of wheat antimicrobial peptides. *Peptides*, 26:2064-2073.
- Espinel-Ingroff, A., (2009). Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Rev. Iberoam. Micol.*, 26(1):15-22.
- Games, P. D., Santos, I. S., Mello, E. O., Diz, M. S. S., Carvalho, A. O., Souza-Filho, G. A., Da Cunha, M., Vasconcelos, I. M., Ferreira, B. S. e Gomes, V. M., (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29:2090-2100.
- Gao, A. G., Hakimi, S. M., Mittanck, C. A., Wu, Y., Woerner, B. M., Stark, D. M., Shah, D. M., Liang, J. e Rommens, C. M., (2000). Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.*, 18:1307-1310.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., Lopez-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. e Poza-Carrion, C., (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. *FEBS Lett.*, 498:219-222.
- Gautier, M. F., Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D. e Joudrier, P., (1994). *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 25:43-57.
- Gomes, V. M., Okorokov, L. A., Rose, T. L., Fernandes, K. V. S. e Xavier-Filho, J., (1998). Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1379:207-216.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. e Terán, L. M., (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.*, 135:1-11.
- Hegedüs, N. e Marx, F., (2013). Antifungal proteins: more than antimicrobials? *Fungal Biol. Rev.*, 26:132-145.
- Hwang, B., Hwang, J-S., Lee, J. e Lee, D. G., (2011a). The antimicrobial peptide, psacothasin induces reactive oxygen species and triggers apoptosis in *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405:267-271.

- Hwang, B., Hwang, J-S., Lee, J., Kim, J-K., Kim, S. R., Kim, Y. e Lee, D. G., (2011b). Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, papiliocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 408:89-93.
- Hunkapiller, M. W. e Hood, L. E., (1983). Protein sequence analysis: automated microsequencing. *Science*, 219:650-659.
- Im, Y. J., Idkowiak-Baldys, J., Thevissen, K., Cammue, B. P. A. e Takemoto, J. Y., (2003). *IPT1*-independent sphingolipid biosynthesis and yeast inhibition by syringomycin E and plant defensin *DmAMP1*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223:199-203.
- Ingham, A. B. e Moore, R. J., (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 47:1-9.
- Inoue, H., Nojima, H. e Okayama, H., (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96:23-28.
- Jana, J. e Deb, J. K., (2011). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:289-298.
- Janssen, B. J. C, Schirra, H. J., Lay, F. T., Anderson, M. A. e 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., Żwik, A.J., Horbańczuk, J., Krzyżewski, J., Zwierzchowski, L. e Bagnicka, E., (2013). Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum. Immunol.*, 74(9):1069-1079.
- Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. e Anderson, M., (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:10614-10619.
- Jha, S. e Chattoo, B. B., (2010). Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic Res.*, 19:373-384.
- Kamimori, H., Halla, K., Craik, D. J. e Aguilar, M.-I., (2005). Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.*, 337:149-153.
- Kido, E. A., Pandolfi, V, Houllou-Kido, L. M., Andrade, P. P., Marcelino, F. C., Nepomuceno, A. L., Abdelnoor, R. V., Burnquist, W. L. e Benko-Iseppon, A. M.,

- (2010). Plant antimicrobial peptides: an overview of superSAGE transcriptional profile and a functional review. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 11:220-230.
- Koike, M., Okamoto, T., Tsuda, S. e Imai, R., (2002). A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 298:46-53.
- Kovaleva, V., Kiyamova, R., Cramer, R., Krynytskyy, H., Gout, I., Filonenko, V. e Gout, R., (2009). Purification and molecular cloning of antimicrobial peptides from *Scots pine* seedlings. *Peptides*, 30:2136-2143.
- Kristensen, A. K., Brunstedt, J., Nielsen, J. E., Mikkelsen, J. D., Roepstorff, P. e Nielsen, K. K., (1999). Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, 16:377-387.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. e Thornton, J. M., (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Crystallogr.*, 26:283-291.
- Lay, F. T., Brugliera, F. e Anderson, M. A., (2003a). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiol.*, 131:1283-1293.
- Lay, F. T., Schirra, H. J., Scanlon, M. J., Anderson, M. A. e Craik, D. J., (2003b). 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.
- Lee, J., Hwang, J. S., Hwang, I. S., Cho, J., Lee, E., Kim, Y. e Lee, D. G., (2012). Coprisin-induced antifungal effects in *Candida albicans* correlate with apoptotic mechanisms. *Free Radical Biol. Med.*, 52:2302-2311.
- Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jorgensen, T. O. e Stensvag, K., (2008). Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32:1430-1440.
- Li, C., Blencke, H. M., Paulsen, V., Haug, T. e Stensvag, K., (2010). Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng. Bugs*, 1:217-220.
- Li, Y., (2011). Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Express. Purif.*, 80:260-267.

- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. e Su, Z., (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37:207-215.
- Lin, K-F., Lee, T-R., Tsai, P-H., Hsu, M-P., Chen, C-S. e Lyu, P-C., (2007). Structure-based protein engineering for α -amylase inhibitory activity of plant defensin. *Proteins.*, 68:530-540.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E. e Egorov, T., (2005). An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 66:2426-2431.
- Liu, Y. J., Cheng, C. S., Lai, S. M, Hsu, M. P, Chen, C. S. e Lyu, P. C., (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins*, 63:777-786.
- Lobo, D. S., Pereira, I. B., Fragel-Madeira, L., Medeiros, L. N., Cabral, L. M., Faria, J., Bellio, M., Campos, R. C., Linden, R. e Kurtenbach, E., (2007). Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, 46:987-996.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T. e Fröhlich, K. U., (2004). Apoptosis in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7:655-660.
- Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J. e Shang, Y. C., (2010). Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp. Geront.*, 45:217-234.
- Marcus, J. P., Goulter, K. C., Green, J. L., Harrison, S. J. e Manners, J. M., (1997). Purification, characterization and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. *Eur. J. Biochem.*, 244:743-749.
- Marr, A. K., McGwire, B. S. e McMaster, W. R., (2012). Modes of action of leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future Microbiology*, 7(9): 1047-1059.
- McGwire, B. S. e Kulkarni, M. M., (2010). Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Exp. Parasitol.*, 126:397-405.
- McManus, A. M., Nielsen, K. J., Marcus, J. P., Harrison, S. J., Green, J. L., Manners, J. M. e Craik, D. J., (1999). MiAMP1, a novel protein from *Macadamia integrifolia* adopts a Greek key beta-barrel fold unique amongst plant antimicrobial proteins. *J. Mol. Biol.*, 293:629-638.

- Medeiros, L. N., Angeli, R., Sarzedas, C. G., Barreto-Bergter, E., Valente, A. P., Kurtenbach, E. 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*, 1798:105-113.
- Mello, E. O., Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Santos, I. S., Da Cunha, M., Santa-Catarina, C. e Gomes, V. M., (2011). The antifungal activity of PvD1, a plant seed defensin of *Phaseolus vulgaris*, involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification and induction of reactive oxygen species in yeast cells. *Curr. Microbiol.*, 62:1209-1217.
- Melo, F. R., Rigden, D. J., Franco, O. L., Mello, L. V., Ary, M. B., Grossi de Sa, M. F. e Bloch C. Jr., (2002). Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking. *Proteins*, 48(2):311-319.
- Mihajlovic, M. e Lazaridis, T., (2010a). Antimicrobial peptides bind more strongly to membrane pores. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798(8):1494-1502.
- Mihajlovic, M. e Lazaridis, T., (2010b). Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798:1485-1493.
- Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I. E., Cammue, B. P., Lebrun, M., Berthomieu, P. e Marques, L., (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J.*, 47(3): 329-342.
- Nimrichter, L. e Rodrigues, M. L., (2011). Fungal glucosylceramides: from structural components to biologically active targets of new antimicrobials. *Front. Microbiol.*, 212(2):1-7.
- Nguyen, L. T, Haney, E. F. e Vogel, H. J., (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.*, 29:464-472.
- Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V. e Johnson, A. D., (2010). Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat. Genet.*, 42: 590-598.
- Ohana, R. F., Encell, L. P., Zhao, K., Simpson, D., Slater, M. R., Urh, M., Wood, K. V., (2009). Halo Tag7: a genetically engineered tag that enhances bacterial

- expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expr. Purif.*, 68:110-120.
- Ohtani, S., Okada, T., Yoshizumi, H. e Kagamiyama, H., (1977). Complete primary structures of two subunits of purothionin A, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. *J. Biochem.*, 82:753-767.
- Okorokov, L. A. e Lehle, L., (1998). Ca(2+)-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. *FEMS Microbiol. Lett.*, 162(1):83-91.
- Oomen, R. J., Seveno-Carpentier, E., Ricodeau, N., Bournaud, C., Conejero, G., Paris, N., Berthomieu, P. e Marques, L., (2011). Plant defensin *AhPDF1.1* is not secreted in leaves but it accumulates in intracellular compartments. *New Phytol.*, 192:140-150.
- Osborn, R. W., De Samblanx, G. W., Thevissen, K., Goderis, I., Torrekens, S. e Van Leuven, F. V., (1995). Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Lett.*, 368:257-262.
- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C. e Franco, O. L., (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, 38:446-456.
- Patel, S. U., Osborn, R., Rees, S. e Thornton, J. M., (1998). Structural studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry*, 37:983-990.
- Pelegriani, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A. e Franco, O. L., (2008). Novel insights on the mechanism of action of α -amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins*, 73:719-29.
- Penninckx, I., Eggermont, K., Terras, F., Thomma, B., De Samblanx, G., Buchala, A., Metraux, J., Manners, J. e Broekaert, W., (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid independent pathway. *Plant Cell*, 8:2309-2323.
- Ramamoorthy, V., Cahoon, E. B., Li, J., Thokala, M., Minto, R. E. e Shah, D. M., (2007). Glucosylceramide synthase is essential for alfalfa defensin-mediated growth inhibition but not for pathogenicity of *Fusarium graminearum*. *Mol. Microbiol.*, 66:771-786.
- Ribeiro, S. F. F., Carvalho, A. O., Da Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, L. P., Melo, V. M. M., Vasconcelos, I. M., Melo, E. J. T. e Gomes, V. M., (2007). Isolation and

- characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 50:600-611.
- Ribeiro, S. F. F., Silva, M. S., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Rabelo, G., Mello, E. O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R. e Gomes, V. M., (2012). *Capsicum annuum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101:657-670.
- Rogozhin, E. A., Oshchepkova, Y. I., Odintsova, T. I., Khadeeva, N. V., Veshkurova, O. N., Egorov, T. A., Grishin, E. V. e Salikhov, S. I., (2011). Novel antifungal defensins from *Nigella sativa* L. seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, 49:131-137.
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., Shah e 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): 18440-18550.
- Sali, A. e Blundell, T. A., (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234:779-815.
- Sambrook, J. e Russel, D. W., (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3ª edição. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, texto completo.
- Santos, I. S., Carvalho, A. O., Souza-Filho, G. A., Nascimento, V. V., Machado, O. L. T. e 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.
- Schägger, H. e von Jagow, G., (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem*, 166:368-379.
- Schrader-Fischer, G. e Apel, K., (1994). Organ-specific expression of highly divergent thionin variants that are distinct from the seed-specific crambin in the crucifer *Crambe abyssinica*. *Mol. Gen. Genet.*, 245:380-389.
- Segura, A., Moreno, M., Molina, A. e Garcia-Olmedo, F., (1998). Novel defensina subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Lett.* 435:159-162.
- Segura, A., Moreno, M., Madueño, F., Molina, A. e García-Olmedo, F., (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12:16-23.

- Siddique, S., Wieczorek, K., Szakasits, D., Kreil, D. P. e Bohlmann, H., (2011). The promoter of a plant defensin gene directs specific expression in nematode-induced syncytia in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 49:1100-1110.
- Slavokhotova, A. A., Odintsova, T. I., Rogozhin, E. A., Musolyamov, A. K., Andreev, Y. A., Grishin, E. V. e Egorov, T. A., (2011). Isolation, molecular cloning and antimicrobial activity of novel defensins from common chickweed (*Stellaria media* L.) seeds. *Biochimie*, 93(3):450-456.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Maallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Osion, B. J. e Klenk, D. C., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.
- Souza, G. S., Nascimento, V. V., Carvalho, L. P., Melo, E. J. T., Fernandes, K. V., Machado, O. L. T., Retamal, C. A., Gomes, V. M. e Carvalho, A. O., (2013). Activity of recombinant and natural defensins from *Vigna unguiculata* seeds against *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.*, 35:116-125.
- Spelbrink, R. G., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T. J., Shah, D. M. e Hockerman, G. H., (2004). Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol.*, 135:2055-2067.
- Stephens, H., Reig, S., Wiedemann, I., Kalbacher, H., Deeg, M., Sahl, H. G., Peschel, A., Götz, F., Garbe, C. e Schitteck, B., (2006). Naturally processed dermicidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50: 2608–2620.
- Stotz, H. U., Spence, B. e Wang, Y., (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Mol. Biol.*, 71(1-2):131-143.
- Taylor, R. H., Acland, D. P., Attenborough, S., Cammue, B. P., Evans, I. J., Osborn, R. W., Ray, J. A., Rees, S. B. e Broekaert, W. F., (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.*, 272:24480-24487.
- Tapia, E., Montes, C., Rebufel, P., Paradela, A., Prieto, H. e Arenas, G., (2011). Expression of an optimized *Argopecten purpuratus* antimicrobial peptide in *E. coli* and evaluation of the purified recombinant protein by in vitro challenges against important plant fungi. *Peptides*, 32:1909-1916.

- Tavares, L. S., Santos, M. O., Viccini, L. F., Moreira, J. S., Miller, R. N. G. e Franco, O. L., (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*, 29:1842-1851.
- Tavares, L. S., Rettore, J. V., Freitas, R. M., Porto, W. F., Duque, A. P. N., Singulani, J. L., Silva, O. N., Detoni, M. L., Vasconcelos, E. G., Dias, S. C., Franco, O. e Santos, L. M. O., (2012). Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. *Peptides*, 37:294-300.
- Taveira, G. B.; Mathias, L. S.; Vieira-da-Motta, O.; Machado, O. L. T.; Rodrigues, R.; Carvalho, A. O.; Teixeira-Ferreira, A.; Perales, J.; Vasconcelos, I. M. e Gomes, V. M., (2014). Thionin-like peptides from *Capsicum annuum* fruits with high activity against human pathogenic bacteria and yeasts. *Biopolymers*, 102:30-39.
- Teixeira, V., Feio, M. J. e Bastos, M., (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.*, 51:149-177.
- Terras, F., Schoofs, H., De Bolle, M., Van Leuven, F., Rees, S., Vanderleyden, J., Cammue, B. e Broekaert, W., (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., Van Leuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. e Broekaert, W. F., (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.*, 316:233-240.
- Terras, F. R. G., Ergermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osbourn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuden, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. e Broekaert, W. F., (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, 7:573-588.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G. W., Brownleei, C., Osborn, R. W. e Broekaert, W. F., (1996). Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J. Biol. Chem.*, 271:15018-15025.
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P. e Broekaert, W. F., (1997). Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J. Biol. Chem.*, 272(51):32176-32181.

- Thevissen, K., Terras, F. R. G. e Broekaert, W. F., (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:5451-5458.
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P. e Broekaert, W. F., (2000). 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 (1):54-61.
- Thevissen, K., Ferket, K. K. A., François, I. E. J. A. e Cammue, B. P. A., (2003). Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, 24:1705-1712.
- Thevissen, K., Warnecke, D. C., Francois, I. E., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., Zahringer, U., Thomma, B. P., Ferket, K. K. e Cammue, B. P., (2004). Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, 279(6):3900-3905.
- Thevissen, K., François, I. E. J. A., Sijtsma, L., van Amerongen, A., Schaaper, W. M. M., Meloen, R., Posthuma-Trumpie, T., Broekaert, W. F. e Cammue, B. P. A., (2005). Antifungal activity of synthetic peptides derived from *Impatiens balsamina* antimicrobial peptides Ib-AMP1 and Ib-AMP4. *Peptides*. 26:1113-1119.
- Thevissen, K., Francois, I. E. J. A., Winderickx, J., Pannecouque, C. e Cammue, B. P. A., (2006). Ceramide involvement in apoptosis and apoptotic diseases. *Mini Rev. Med. Chem.*, 6:699-709.
- Thevissen, K., Kristensen, H-H., Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A. e François, I. E. J. A. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today*, 12(21-22):966-971.
- Thevissen, K., de Mello Tavares, P., Xu, D., Blankenship, J., Vandenbosch, D., Idkowiak-Baldys, J., Govaert, G., Bink, A., Rozental, S., de Groot, P. W., Davis, T. R., Kumamoto, C. A., Vargas, G., Nimrichter, L., Coenye, T., Mitchell, A., Roemer, T., Hannun, Y. A. e Cammue, B. P., (2012). The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, 84(1):166-180.
- Thomma B. P., Cammue B. P. e Thevissen K., (2002). Plant defensins. *Planta*, 216:193-202.

- Torrent, M., Pulido, D., Rivas, L. e Andreu, D., (2012). Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr. Drug Targets*, 13:1138-1147.
- Towbin, H., Staehelin, T. e Gordon, J., (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76(6):4350-4354.
- Uchôa, H. B, Da Silveira, N. J. F, Câmera, J. C. J, Canduri, F. e De Azevedo, W. F. J., (2004). Parmodel: a web server for automated comparative modeling of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325:1481-1486.
- van der Weerden, N. L., Lay, F. T. e Anderson, M. A., (2008). The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *J. Biol. Chem.*, 283:14445-14452.
- van der Weerden, N. L., Hancock, R. E. e 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. e Anderson, M. A., (2013). Plant defensins: Common fold, multiple functions. *Fungal Biol. Rev.*, 26:121-131.
- Vijayan, S., Guruprasad, L. e Kirti, P. B., (2008). Prokaryotic expression of a constitutively expressed *Tephrosia villosa* defensin and its potent antifungal activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:1023-1032.
- Vylkova, S., Sun, J, N. e 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.
- Wang, S., Rao, P. e Ye, X., (2009). Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82:79-86.
- Weghuber, J., Lipp, A. M., Stadlbauer, J., Aichinger, M. C., Ruprecht, V., Sonnleitner, A., Schütz, G. J. e Henics, T., (2010). Antimicrobial and immunostimulatory peptide, KLK, induces an increase in cytosolic Ca²⁺ concentration by mobilizing Ca²⁺ from intracellular stores. *Cell Biol. Int.*, 34: 1109-1112.
- Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B. e 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.

- Wilmes, M., Cammue, B. P. A., Sahl, H. G. e Thevissen, K., (2011). Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Nat. Prod. Rep.*, 28:1350-1358.
- Wilson, I. W., Kennedy, G. C., Peacock, J. W. e Dennis, E. S., (2005). Microarray analysis reveals vegetative molecular phenotypes of Arabidopsis flowering-time mutants. *Plant Cell Physiol.*, 46(8):1190-1201.
- Wong, J. H. e Ng, T. B., (2005). Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, 26:1120-1126.
- Wong, J. H., Zhang, X. Q., Wang, H. X. e Ng, T. B., (2006). A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). *Peptides*, 27:2075-2081.
- Wong, J. H., Ip, D. C. W., Ng, T. B., Chan, Y. S., Fang, F. e Pan, W. L., (2012). A defensin-like peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. 'King Pole Bean'. *Food Chem.*, 135:408-414.
- Wu, X., Sun, J., Zhang, G., Wang, H. e Ng, T. B., (2011). An antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* cv. 'Cloud Bean'. *Phytomedicine*, 18:104-109.
- Xu, X., Jin, F., Yu, X., Ji, S., Wang, J., Cheng, H., Wang, C. e Zhang, W., (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 53:293-301.
- Yang, Y., Teng, D., Zhang, J., Tian, Z., Wang, S. e Wang, J., (2011). Characterization of recombinant plectasin: solubility, antimicrobial activity and factors that affect its activity. *Proc. Biochem.*, 46:1050-1055.
- Zottich, U., Da Cunha, M., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Silva, N. C. M., Santos, I. S., Nascimento, V. V., Miguel, E. C., Machado, O. L. T. e Gomes, M. G., (2011). Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 810:375-383.

