

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DO TEGUMENTO E EVENTOS DE MORTE  
CELULAR PROGRAMADA, ENVOLVENDO CASPASES-SÍMILE, METACASPASES  
E CISTATINAS DE SEMENTES DE *Vigna unguiculata*

**NATHÁLIA BASTOS LIMA DE ANDRADE**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ**

**SETEMBRO DE 2014**



**NATHÁLIA BASTOS LIMA DE ANDRADE**

**ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DO TEGUMENTO E EVENTOS DE MORTE  
CELULAR PROGRAMADA, ENVOLVENDO CASPASES-SÍMILE, METACASPASES  
E CISTATINAS DE SEMENTES DE *Vigna unguiculata*:**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Kátia Valevski Sales Fernandes**

**Campos dos Goytacazes - RJ  
Setembro de 2014**

ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO DO TEGUMENTO E EVENTOS DE MORTE  
CELULAR PROGRAMADA, ENVOLVENDO CASPASES-SÍMILE, METACASPASES  
E CISTATINAS DE SEMENTES DE *Vigna unguiculata*:

**NATHÁLIA BASTOS LIMA DE ANDRADE**

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

Aprovada em: 04 / 09 / 2014

Aprovada por:

---

Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira (UFRJ)

---

Dra. Elena Lassounskaia (UENF)

---

Dra. Valdirene Moreira Gomes (UENF)

---

Dra. Kátia Valevski Sales Fernandes (orientadora)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sob orientação da Dr<sup>a</sup> Kátia Valevski Sales Fernandes e no The Integrative Cell Biology Laboratory (School of Biological and Biomedical Sciences), na Universidade de Durham, Inglaterra, co-orientado pelo Professor Dr. Keith Lindsey, financiado pela CAPES, CNPq e UENF.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me conceder a chance de subir mais um degrau em minha vida profissional e por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha orientadora e amiga Dr<sup>a</sup>. Kátia Valevski Sales Fernandes por confiar em mim e sempre me estimular a ir mais longe, pela sua dedicação em me orientar e ensinar e pela sua preciosa amizade.

Ao Dr. Keith Lindsey e à Dra. Jen Topping, que me co-orientaram durante o tempo em que realizei o estágio sanduíche, na Universidade de Durham (Inglaterra).

Aos amigos Anna Mudge e James Rowe, que me auxiliaram diversas vezes com os experimentos de biologia molecular.

À professora Sara Maldonado (UBA - Argentina), pela sua amizade e pela oportunidade que me deu de participar do curso de embriologia vegetal na Universidade de Buenos Aires e pela ajuda na descrição das estruturas dos tegumentos, objeto de meu estudo.

À Dr<sup>a</sup>. Antônia Elenir Amâncio Oliveira, por aceitar revisar a Tese e por me auxiliar diversas vezes em meus experimentos.

À Dr<sup>a</sup>. Maura Da Cunha e aos seus estudantes (Germana, Fernanda, Cris e Jonas), por sempre estarem dispostos a colaborar com nosso grupo de pesquisa.

Aos professores, alunos e técnicos do LQFPP, que prontamente me auxiliaram quando precisei utilizar algum equipamento ou tirar alguma dúvida.

Aos amigos Lucilene Oliveira, Gustavo Rocha e Dayanni Padua pelo carinho, amizade e pela ajuda em meus experimentos.

Aos meus pais Sérgio e Valéria, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e em meus estudos, me instruíram para que eu escolhesse sempre o caminho correto e batalham para que eu possa sempre ir mais longe.

Ao meu esposo Caio Andrade, por sempre apoiar as minhas escolhas, me ajudar em todos os momentos, por ter paciência quando tive que trabalhar nos fins de semana e pelos meses que tivemos que ficar longe um do outro.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Morte celular programada em plantas.....	1
1.1.1 - Classificação da MCP em plantas.....	3
1.2 - Proteinases cisteínicas e atividades caspase-símile envolvidas na MCP..	5
1.3 - Metacaspases .....	8
1.4 - Proteases subtilisina-símile .....	12
1.5 - A MCP em sementes em desenvolvimento e germinação.....	14
1.6 - Morte celular programada em tegumentos de sementes.....	16
1.7 - O papel da mitocôndria na morte celular programada.....	19
1.8 - Atividade biológica de cistatinas e suas funções em plantas.....	20
1.9 – Justificativa do estudo.....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 – Objetivo geral.....	23
2.2 – Objetivos específicos.....	23
<b>3. MATERIAIS E METODOLOGIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 - Parte I: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL</b>	
<b>DO EVENTO DE MCP.....</b>	<b>24</b>
3.1.1 – Obtenção do material botânico.....	24
3.1.2 - Análise do processo de formação de tegumentos de sementes de	
feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ).....	24

3.1.3 – Análise subcelular dos eventos de MCP de tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25
3.1.4 – Testes de viabilidade celular de tecidos de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	25
3.1.5 – Análise <i>in situ</i> (TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) da fragmentação do DNA em tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	26
<b>3.2 - Parte II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO EVENTO DE MCP.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 - Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos durante o desenvolvimento.....	26
3.2.2 – Isolamento das frações citosólicas e mitocondriais dos tegumentos em desenvolvimento.....	27
3.2.3 - Análise da liberação do citocromo C pelas mitocôndrias.....	28
3.2.4 – Extração de pigmentos de tegumentos quiescentes e em diferentes estágios de desenvolvimento.....	28
3.2.5 – Extração de proteínas de tegumentos quiescentes e em diferentes estágios de desenvolvimento.....	28
3.2.6 – Visualização por SDS-PAGE do perfil protéico de extratos de tegumentos ao longo do desenvolvimento.....	29
3.2.7 – Visualização da atividade de proteases cisteínicas em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento por zimografia.....	30
3.2.8 – Detecção das atividades de proteinases cisteínicas caspase-símile em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento de <i>V. unguiculata</i> , na presença e ausência de inibidores específicos.....	30
<b>3.3 - PARTE III: CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES ENVOLVIDOS NA MCP.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 - Desenho de iniciadores para actina, metacaspase e VPE.....	31
3.3.2 - Extração do DNA de folhas de soja e <i>Vigna unguiculata</i> .....	33

3.3.3 – RT-PCR de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda e soja para teste dos iniciadores para actina, metacaspase e $\beta$ -VPE de feijão-de-corda.....	33
3.3.4 - Extração de RNA de folhas de feijão-de-corda e soja e síntese de cDNAs.....	34
3.3.5 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e soja utilizando-se os iniciadores para actina de <i>Vigna unguiculata</i> .....	35
3.3.6 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja, utilizando-se iniciadores para actina e $\beta$ -VPE, e em gradientes de temperaturas de anelamento.....	35
3.3.7 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se todos os iniciadores para metacaspase.....	36
3.3.8 – Sequenciamento dos produtos do PCR referentes à amplificação da metacaspase.....	36
3.3.9 - Extração de RNA de tegumentos liofilizados, síntese de cDNA e PCR para verificar a expressão de genes de metacaspases, VPE e actina.....	36
3.3.10 – Sequenciamento do produto de amplificação referente à expressão da metacaspase em tegumentos de 20DAP.....	37
3.3.11 - Desenho de iniciadores para cistatina.....	37
3.3.12 – PCR de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda para teste de todos os iniciadores para cistatinas.....	37
3.3.13 - Clonagem do produto do PCR para cistatina utilizando-se os pares de iniciadores específicos F3R3.....	38
3.3.14 - Preparo das amostras que serão submetidas aos cortes histológicos no criostato.....	39
3.3.15 - Obtenção de cortes histológicos e coleta das camadas celulares a partir dos cortes histológicos de tegumentos de 8 DAP, 12 DAP e 18 DAP por microdissecção a laser.....	40
3.3.16 – Extração de RNA e RT-PCR das camadas paliçádica e subepidérmica de tegumentos microdissecados de 8, 12 e 18 DAP.....	41
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1 - Parte I: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DO EVENTO DE MCP.....</b>	<b>42</b>

4.1.1 – Análise do processo de formação de tegumentos de sementes de feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ).....	42
4.1.2 – Análise subcelular dos eventos de MCP de tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	45
4.1.3 – Testes de integridade de membranas de tegumentos de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	51
4.1.4 – Análise <i>in situ</i> (TUNEL) da fragmentação do DNA nos tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento .....	53

**4.2 - Parte II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO EVENTO DE MCP.....56**

4.2.1 - Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> durante o desenvolvimento.....	56
4.2.2 - Análise da liberação do citocromo C pelas mitocôndrias.....	57
4.2.3 – Quantificação protéica.....	59
4.2.4 – Acompanhamento por SDS-PAGE do perfil protéico de extratos de tegumentos ao longo do desenvolvimento.....	60
4.2.5 – Visualização da atividade de proteases cisteínicas em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento.....	61
4.2.6 – Detecção das atividades de proteinases cisteínicas caspase-símile em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento de <i>V. unguiculata</i> , na presença e ausência de inibidores específicos.....	63

**4.3 - PARTE III: CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES ENVOLVIDOS NA MCP.....67**

4.3.1 – PCR para testes de amplificação de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se os iniciadores para actina, para metacaspase e $\beta$ -VPE.....	67
4.3.2 – RT-PCR para testes de amplificação de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se os iniciadores para actina e $\beta$ -VPE, em gradientes de temperaturas de anelamento.....	69
4.3.3 – RT-PCR para testes de amplificação de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se todos os iniciadores para metacaspase.....	73

4.3.4 – Sequenciamento dos produtos do PCR referentes à amplificação da metacaspase.....	74
4.3.5 – Expressão de genes de metacaspases, VPE e actina em tegumentos liofilizados de sementes de <i>Vigna</i> .....	76
4.3.6 – Sequenciamento do produto de amplificação referente à expressão da metacaspase em 20DAP.....	76
4.3.7 – PCR de DNA genômico e de folhas de feijão-de-corda para teste de todos os iniciadores para cistatinas.....	78
4.3.8 – Clonagem do produto do PCR para cistatina utilizando-se os pares de iniciadores específicos F3R3.....	79
4.3.9 – RT-PCR de RNAs das camadas exotesta e mesotesta de tegumentos microdissecados de 8, 12 e 18 DAP.....	82
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Comparação entre metacaspases do tipo I e II e caspases animais iniciadoras/inflamatórias e executoras.....	9
<b>Figura 2</b> – Imagens de microdissecção por captura a laser de tegumentos de 12DAP (camada externa) de <i>V. unguiculata</i> .....	40
<b>Figura 3</b> – Desenvolvimento do tegumento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	44
<b>Figura 4</b> – Análise do desenvolvimento do tegumento de <i>Vigna unguiculata</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	47
<b>Figura 5</b> – Testes de integridade de membranas em tegumentos de <i>V. unguiculata</i> em desenvolvimento.....	52
<b>Figura 6</b> – Microscopia óptica e ensaio TUNEL para análise <i>in situ</i> da fragmentação do DNA em tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	54
<b>Figura 7</b> – Enriquecimento de DNA oligonucleosomal fragmentado em frações citoplasmáticas de tegumentos de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	56
<b>Figura 8</b> – Imunodeteção do citocromo C em frações citosólicas e mitocondriais de tegumentos de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> em desenvolvimento.....	58
<b>Figura 9</b> – Quantificação protéica (Bradford, 1976) de tegumentos de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> ao longo do seu desenvolvimento.....	59
<b>Figura 10</b> – Perfis protéicos visualizados por SDS-PAGE de extratos de tegumentos de <i>V. unguiculata</i> em desenvolvimento.....	60
<b>Figura 11</b> – Zimogramas de extratos tegumentos de <i>V. unguiculata</i> em desenvolvimento incubados em pH 5,6 e 7,4.....	62
<b>Figura 12</b> – Atividades do tipo caspase-símile durante o desenvolvimento do tegumento de <i>Vigna unguiculata</i> .....	65
<b>Figura 13</b> - Análise da amplificação de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda e de soja, utilizando-se iniciadores para actina, metacaspase e $\beta$ -VPE.....	68
<b>Figura 14</b> – RT-PCR em gradiente de temperatura de anelamento para análise da expressão gênica de $\beta$ -VPE e actina, utilizando-se cDNA de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	70
<b>Figura 15</b> – RT-PCR em gradiente de temperatura de anelamento para análise da expressão gênica de $\beta$ -VPE e actina, utilizando-se cDNAs de folhas de soja.....	71
<b>Figura 16</b> - RT-PCR de cDNAs de folhas de soja e <i>Vigna</i> utilizando-se os iniciadores de metacaspase para análise da expressão gênica de metacaspase.....	73

<b>Figura 17</b> – Alinhamento das sequências dos produtos de amplificação para metacaspase 4 obtidas a partir de cDNAs de folhas de <i>Vigna unguiculata</i> e tegumentos de soja com a metacaspase 4 de soja.....	75
<b>Figura 18</b> – Análise da expressão dos genes da actina, metacaspase e $\beta$ -VPE a partir de cDNAs de tegumentos liofilizados de <i>Vigna unguiculata</i> .....	76
<b>Figura 19</b> – Alinhamentos da sequência obtida a partir do produto de amplificação para a metacaspase 4 de <i>V. unguiculata</i> de 20 DAP com a metacaspase 4 de soja, com a metacaspase 4 de <i>A. thaliana</i> (ATMC4) e com a metacaspase do tipo II MCII-PA de <i>Picea abies</i> .....	77
<b>Figura 20</b> – PCR de DNA genômico de <i>Vigna unguiculata</i> para análise da amplificação de cistatina.....	78
<b>Figura 21</b> – PCR de DNA genômico de <i>Vigna unguiculata</i> para confirmação do tamanho do produto de amplificação utilizando-se os iniciadores cysF3R3.....	80
<b>Figura 22</b> – Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização da digestão de plasmídeos de colônias positivas para a clonagem do produto de amplificação oriundo dos iniciadores cysF3R3.....	80
<b>Figura 23</b> – Alinhamento da sequência obtida da digestão do plasmídio com a sequência da cistatina de <i>Vigna unguiculata</i> .....	81
<b>Figura 24</b> – Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização das camadas microdissecadas a laser utilizando-se os primers para actina, metacaspase 4 e $\beta$ -VPE.....	83
<b>Figura 25</b> – Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização das camadas microdissecadas a laser de 8 DAP (A), 12 DAP (B) e 18 DAP (C) e amplificadas utilizando-se os primers para cistatina.....	84
<b>Figura 26</b> – Representação esquemática dos principais eventos biológicos observados durante o processo de morte celular programada de tegumentos em desenvolvimento de <i>V. unguiculata</i> .....	85

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados e os tamanhos esperados de seus respectivos produtos de amplificação.....	34
<b>Tabela 2:</b> Atividade da citocromo C oxidase (U/mL) em frações citosólicas e mitocondriais em tegumentos em desenvolvimento de sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	58
<b>Tabela 3:</b> Pares de iniciadores para actina, $\beta$ -VPE e metacaspase selecionados e temperatura de anelamento ideal dos mesmos.....	72
<b>Tabela 4:</b> Tamanhos esperados dos produtos da amplificação dos diferentes iniciadores para cistatina e o tamanho real encontrado.....	79

## ABREVIATURAS

MCP - morte celular programada

DAP - dias após a polinização

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

SDS-PAGE - sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel

VPE - vacuolar processing enzymes

HEPES - hidroxietil piperazina ácido etanosulfônico

HR – hypersensitive response (resposta hipersensível)

PVPP - polivinilpirrolidona

APS – persulfato de amônio

Ac-DEVD-pNa - N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide

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

Ac-IETD-pNA - N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp p-nitroanilide

Ac-DEVD-al - N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp aldehyde

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

Ac-IETD-al - N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp aldehyde

TEMED - Tetrametiletenodiamina

OsO<sub>4</sub> - tetróxido de ósmio

MET - microscopia eletrônica de transmissão

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

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

DTT - Dithiothreitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio

## RESUMO

A morte celular programada (MCP) é um suicídio celular controlado, essencial para o desenvolvimento normal dos organismos eucariotos. O objetivo desta pesquisa foi diagnosticar e caracterizar eventos de MCP em tegumentos de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda) em desenvolvimento. Para tal, plantas foram cultivadas até seu estágio reprodutivo e as sementes produzidas foram coletadas em diferentes dias após a polinização (DAP). Sementes inteiras foram fixadas e os tegumentos foram analisados por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de transmissão, e testados para fragmentação do DNA por TUNEL e viabilidade celular por coloração dupla com brometo de etídio / laranja de acridina. Tegumentos dissecados foram liofilizados, macerados e testados para presença de oligonucleossomos em frações citoplasmáticas e liberação do citocromo C pelas mitocôndrias. Os perfis protéico e de atividade de proteases cisteínicas foram analisados por SDS-PAGE e zimografia, respectivamente, e atividades de enzimas caspase-símile foram analisadas. Estudos de expressão gênica para metacaspases 4,  $\beta$ -VPE (“vacuolar processing enzymes”) e cistatinas ao longo do desenvolvimento da semente, em diferentes camadas do tegumento, foram realizados por microdissecção por captura a laser. A MCP detectada durante o desenvolvimento dos tegumentos pode ser classificada como autolítica, ocorrendo de forma assíncrona, da camada paliçádica para as camadas mais internas de parênquima, a partir de 10 DAP. A partir deste estágio, observaram-se, ao longo do desenvolvimento do tegumento, a expansão do vacúolo, que ao final substitui o citoplasma, a desorganização da cromatina, desorganização e posterior desaparecimento de organelas (mitocôndrias, plastídios, complexo de Golgi e retículo endoplasmático), o espessamento das paredes celulares e o achatamento das camadas celulares nos estágios mais tardios do desenvolvimento. Este processo inicia-se na camada paliçádica e estende-se para as camadas mais internas do tegumento com o decorrer do desenvolvimento. A liberação do citocromo C e a fragmentação do DNA são eventos iniciais da MCP (a partir de 10 DAP) e a liberação de DNA oligonucleossomal e a perda da viabilidade das membranas são eventos tardios (a partir de 20 DAP). Diferentes atividades de proteases cisteínicas foram detectadas por zimografia, e atividades caspase-símile dos tipos 3, 6, 8 e 9 foram

observadas, tanto em pH ácido (simulando condições vacuolares), como em pH neutro (simulando condições citosólicas). A maioria destas atividades foram inibidas por inibidores específicos para caspases animais. Foram detectados cDNAs para metacaspase 4 e cistatinas, ao longo do desenvolvimento do tegumento e nas diferentes camadas celulares deste tecido, mas não para enzimas do tipo  $\beta$ -VPE, indicando uma não participação desta classe enzimática na MCP dos tegumentos. A metacaspase 4 de *V. unguiculata* apresentou alta similaridade (88%) com a com a metacaspase 4 de soja, com a metacaspase 4 de *Arabidopsis thaliana* (78%) e com a mCII-Pa de *Picea abies* (76%), todas estas envolvidas em MCP induzida por estresses bióticos e abióticos.

Palavras-chave: Caspase-símile, cistatina, metacaspase, morte celular programada, tegumento, *Vigna unguiculata*.

## ABSTRACT

The programmed cell death (PCD) is a controlled cellular suicide, essential for normal growth and development of eukaryotes. The goal of this research is to diagnose and characterize PCD events in developing cowpea seed coats. Plants were cultivated until reproductive stage and developing seeds were collected at different days after pollination (DAP). Whole seeds were fixed and the seed coat layers were analyzed by light and transmission electron microscopy and tested for DNA fragmentation by TUNEL and cellular viability by double staining with ethidium bromide / acridine orange. Dissected and lyophilized seed coats were tested for oligonucleosomes accumulation in cytoplasmic fractions and mitochondrial cytochrome C release. Protein and cysteine protease activities profiles were analyzed by SDS-PAGE and zymography, respectively, and caspase-like activities were analysed. Gene expression studies for metacaspases 4,  $\beta$ -VPE (“vacuolar processing enzymes”) and cystatins along seed development at different seed coat layers were carried out by laser capture microdissection. The PCD detected during seed coat development could be classified as autolytic, occurring at an asynchronous way, from the palisade layer to the inner parenchymatic layers, starting from 10 DAP. From this stage towards the quiescence, the following events were notable: the vacuolar expansion that eventually substitutes the cytoplasm, the chromatin disorganisation, organelles disorganisation and disappearance (mitochondria, plastids, Golgi complex and endoplasmic reticulum), cell wall thickening and cell layers flattening at late stages of development. This process starts at the palisade layer towards to the seed coat inner layers along the development. Cytochrome C release and DNA fragmentation are early MCP events (starting from 10 DAP) and oligonucleosomal DNA release and loss of membrane viability are late events (from 20 DAP on). Different cysteine proteolytic activities were detected by zymography and activities of 3, 6, 8 and 9 caspase-like enzymes were detected, both in acid pH (to simulate vacuolar conditions) and in neutral pH (to simulate cytosolic conditions). Most of those activities were inhibited by specific animal caspase inhibitors. Metacaspase 4 and cystatins cDNAs were detected along seed coat development at different cell layers of this tissue, but not for  $\beta$ -VPE, indicating that this protease class does not participate of seed coat PCD. The *Vigna unguiculata* metacaspase 4

showed high degree of homology with the soybean metacaspase 4 (88%), *Arabidopsis thaliana* metacaspase 4 (78%) and with *Picea abies* mCII-PA (76%). All of these previous reported metacaspases were seen to be involved with biotic and abiotic stress-induced PCD.

Keywords: Caspase-like, cystatin, metacaspase, programmed cell death, seed coat, *Vigna unguiculata*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1- Morte celular programada em plantas

Em 1972, Kerr e colaboradores publicaram um trabalho inovador sobre morte celular programada (MCP), no qual eles identificaram um tipo de morte celular que foi denominada apoptose, sendo este tipo de morte morfológicamente diferente da necrose. Este trabalho levou a uma reavaliação da maneira como os pesquisadores viam a morte celular e a categorização deste evento em duas formas: uma regulada e uma não regulada. Considerando este sistema de classificação, a necrose pode ser considerada uma forma de morte celular violenta, não regulada, que é iniciada por algum estímulo ambiental, resultando na quebra da homeostase celular (Bras *et al.*, 2005), enquanto a apoptose, é uma forma de morte celular alternativa, altamente regulada (Kerr *et al.*, 1972).

A palavra apoptose vem do termo grego utilizado para o evento de queda das pétalas e folhas de uma planta (Bras *et al.*, 2005). Hoje, o termo apoptose não pode ser usado para a MCP de plantas, pois, de maneira diferente dos animais, não se observa a formação de corpos apoptóticos, uma vez que a parede celular não permite que este evento ocorra e, além disso, plantas não apresentam células fagocíticas especializadas, como observado em animais (Lam, 2004; Van Doorn *et al.*, 2011). Desta forma, a MCP em plantas pode ser definida como um suicídio celular altamente controlado, essencial para o desenvolvimento normal e para responder de maneira eficaz aos fatores bióticos e abióticos.

Durante o desenvolvimento, as células que são excessivamente produzidas por órgãos ou tecidos que apresentam funções transitórias podem sofrer MCP, contribuindo para o correto desenvolvimento do organismo e para sua adequada modelagem corporal. Exemplos de MCP durante o desenvolvimento vegetal podem ser encontrados nas fases iniciais do desenvolvimento do integumento interno em sementes de *Brassica napus* (Wan *et al.*, 2002), em feixes vasculares durante o processo de diferenciação (Bonke *et al.*, 2003; Kozela e Regan, 2003), na prevenção da auto-polinização de flores *Papaver* (Thomas e Franklin-Tong, 2004; Bosch e Frankling-Tong, 2007), em raízes primárias das Cactaceae *Stenocereus gummosus* e *Pachycereus pringlei* (Shishkova e Dubrovsky, 2005), durante a morfogênese foliar de *Aponogeton madagascariensis* (Gunawardena *et*

*al.*, 2004) e *Monstera obliqua* (Gunawardena *et al.*, 2005), em células do suspensor (um órgão de ligação entre os tecidos do embrião e a mãe) na fase final do desenvolvimento do embrião (Yeung e Clutter, 1979; Lombardi *et al.*, 2007), durante a abscisão de folhas de tomate (Bar-Dror *et al.*, 2011), em células do perisperma de sementes de quinoa em desenvolvimento (López-Fernández e Maldonado, 2013), em coléteres de *Alseis Pickelii* (Tulli *et al.*, 2013), dentre outros.

Durante a polinização, as plantas reforçam a auto-incompatibilidade, como importante meio de prevenir a autofertilização. Pesquisas com a espécie *Papaver rhoeas* revelaram que proteínas do pistilo, no qual o grão de pólen aterrissa, interagem com o pólen e acionam a MCP de grãos de pólen incompatíveis (oriundos de autopolinização). Tal interação promove rápida inibição do crescimento do tubo polínico de tais grãos preteridos (Thomas e Franklin-Tong, 2004). Embora a morfogênese em plantas tipicamente ocorra através de diferenciação celular e crescimento tecidual existe algumas plantas nas quais a MCP desempenha um papel relevante no estabelecimento da forma das folhas. No gênero *Monstera*, blocos de células morrem em estágios iniciais de desenvolvimento de cada lâmina foliar, gerando buracos ou fendas e resultando em folhas que, quando maduras, contêm uma série de perfurações ou ondulações nas bordas (Gunawardena *et al.*, 2005). MCP também ocorre de forma previsível durante o desenvolvimento reprodutivo em plantas. No *tapetum* (camada de células que circunda os grãos de pólen em desenvolvimento nas anteras) células sofrem um programa preciso de degradação que resulta na liberação de seus conteúdos para nutrição do pólen. A deiscência da antera, responsável pela liberação do grão de pólen maduro para o ambiente, também resulta da morte de células que ocupam posições específicas na parede da antera (Goldberg, 1994). Em cada óvulo, um único evento mitótico resulta em quatro células haplóides, três destes megásporos degeneram, deixando o remanescente como responsável pela produção da célula-ovo e de células associadas do saco embrionário (Goldberg, 1994).

A MCP também é desencadeada como uma resposta a estresses abióticos ou ataques por patógenos (Pennel e Lamb, 1997). Entre os exemplos a serem citados relativos ao primeiro grupo de resposta a estesses abióticos, temos o trabalho de Gunawardena *et al.* (2001) que observaram, em *Zea mays*, uma

relação da ocorrência da MCP com a formação do aerênquima, tanto induzida por etileno como por hipóxia. Em *Arabidopsis*, a exposição à luz UVC foi capaz de induzir a MCP (Danon *et al.*, 2004) e, em plântulas de feijão, foi observado que a MCP é induzida por choque térmico (Egorova *et al.*, 2011). Kutik *et al.* (2013) observaram que, em cultura de células de tabaco, a MCP induzida por cádmio é iniciada com a vacuolização do citoplasma e ao final do processo, as células ganham o aspecto de células necróticas. No segundo grupo de resposta a fatores bióticos, viu-se que, durante a resposta hipersensível (HR), a MCP também é ativada como uma alternativa para controlar a proliferação de agentes patogênicos (Del Pozo e Lam, 1998; Chichkova *et al.*, 2004; Hatsugai *et al.*, 2004; McLean *et al.*, 2009).

Aspectos bioquímicos e morfológicos básicos da MCP conservaram-se entre os reinos animal e vegetal (Solomon *et al.*, 1999). Entretanto deve-se notar que tipos celulares típicos de plantas executam programações de MCP únicas. Estas compartilham eventos comuns a MCP de animais, como a degradação do DNA nuclear, no entanto, com peculiaridades, como a degradação nuclear acionada por colapso do vacúolo de elementos traqueais do xilema. Pesquisas realizadas por Balk e Leaver (2001) sugerem que a mitocôndria desempenha um papel chave em tal MCP vascular em plantas.

### **1.1.1 - Classificação da MCP em plantas**

De acordo com van Doorn (2011), duas principais classes de MCP podem ser observadas em plantas. A primeira, chamada morte celular programada do tipo “autolítica”, está diretamente associada com a liberação de hidrolases do vacúolo, seguida por um colapso desta organela, o que resulta em uma rápida degradação do citoplasma. Exemplos deste tipo de MCP são observados durante a senescência das pétalas de tulipa, na camada de aleurona de sementes de cevada em germinação e durante o desenvolvimento de raízes e caules (Van Doorn *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2003; Van Doorn, 2011).

Algo em comum, observado em todos os exemplos deste tipo de MCP, é o aparecimento de pequenos vacúolos citoplasmáticos, que vão se fundindo, tornando-se um grande vacúolo, que ao final, substitui o citoplasma. Organelas como ribossomos, plastídeos, retículo endoplasmático e peroxissomos desaparecem neste processo. Estas mudanças são semelhantes aos eventos

autofágicos em animais e fungos, mas os mecanismos de regulação em plantas ainda não são claros (Van Doorn, 2011). A remobilização de macromoléculas, um aumento na concentração de cálcio citoplasmático, a indução da sinalização por MAPK (mitogen-activated protein kinase), a acidificação no citosol, as mudanças no citoesqueleto, o inchaço das organelas, a degradação dos conteúdos do cloroplasto, a fragmentação do DNA e a condensação da cromatina para a periferia do núcleo são mudanças que geralmente ocorrem antes da ruptura do tonoplasto (Van Doorn, 2011). O fechamento dos plasmodesmos é outro evento que ocorre durante a MCP autolítica (Van Doorn *et al.*, 2003). A MCP autolítica freqüentemente requer a liberação de hidrolases e ativação de proteases serínicas e cisteínicas, como as subtilisinas-símile, saspases e caspases-símile (Pak e Van Doorn, 2005), mas o papel preciso da maioria destas proteases na MCP é desconhecido.

O segundo tipo, chamado de morte celular programada “não autolítica”, caracteriza-se pela ausência da rápida degradação do citoplasma, sendo observada em respostas hipersensíveis (HR), em ataque por patógenos, no endosperma de sementes de cereais e durante a embriogênese somática, dentre outros (Van Doorn, 2011). A MCP que ocorre durante a resposta hipersensível é precedida pelo influxo de íons cálcio para o citoplasma, seguido pela ativação de uma cascata de transdução de sinais por MAPK e produção de óxidos de nitrogênio, espécies reativas de oxigênio e ácido salicílico, levando a danos oxidativos. Dependendo do estímulo, este tipo de MCP pode ou não mostrar o colapso vacuolar mediado por VPEs (enzima de processamento vacuolar) e catepsinas (Heath *et al.*, 1997; Rojo *et al.*, 2004; Gilroy *et al.*, 2007; Hofius *et al.*, 2009 e Zhang *et al.*, 2010). Outro exemplo de MCP “não-autolítica” ocorre durante a interação com fungos necrotróficos (este tipo de interação ocorre quando o agente patogênico se alimenta das células mortas da planta, provocando a MCP de células vivas adjacentes). A infecção com esses patógenos (exemplos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium moliniforme* e *Botrytis cinerea*) provoca um intenso “burst” oxidativo, seguido pela acumulação de espécies reativas de oxigênio, culminando na morte celular (Van Doorn, 2011). As VPEs também estão envolvidas neste processo. A MCP “não-autolítica” ocorre também no endosperma interno dos cereais, onde se relata um aumento na expressão de

proteases cisteínicas como caspases-símile, a indução de RNases e DNases e subsequente perda de integridade de membrana plasmática (Van Doorn, 2011).

## **1.2 – Proteinases cisteínicas e atividades caspase-símile envolvidas na MCP**

O termo proteinase é empregado para se referir a endopeptidases (Barrett, 1987). Estas se classificam, de acordo com o aminoácido envolvido na catálise e seu mecanismo de ação, em serínicas, cisteínicas, aspárticas ou metaloproteinases. Proteinases cisteínicas são amplamente distribuídas em animais, plantas e microorganismos, onde participam de vários processos intra e extracelulares de importância fisiológica. Podem ser constitutivas ou induzidas em resposta a fatores como calor, frio (Schaffer e Fischer, 1990), seca (Koizumi *et al.*, 1993), entre outros.

Dentre as proteinases de órgãos de reserva em plantas que estão envolvidas em processos bioquímicos durante a germinação, as principais são as proteinases cisteínicas (Ryan e Walker-Simmons, 1981). Estas enzimas foram primeiramente estudadas em sementes de leguminosas em germinação (Tully e Beevers, 1978). As proteinases cisteínicas estão envolvidas na degradação de proteínas de reserva durante a germinação de sementes como mostram estudos pioneiros sobre a degradação de vicilinas por uma peptídeo-hidrolase cisteínica em sementes germinantes de *Vigna radiata* (Baumgartner e Chrispeels, 1976).

A ação de proteinases cisteínicas na hidrólise de proteínas de reserva é relatada em trabalhos sobre a germinação de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Csoma e Polgár, 1984) e por Mitsuhashi *et al.* (1986) que mostraram a ação de duas endopeptidases cisteínicas na degradação protéica em cotilédones de sementes de *V. mungo*. Já no período de embriogênese e maturação de sementes, as proteinases cisteínicas catalisam os processos pós-transcricionais da maioria dos precursores protéicos, como no caso da asparaginil endopeptidase de *Canavalia ensiformis* (Abe *et al.*, 1993). Expressão coordenada de proteinases cisteínicas e inibidores de papaína durante a formação e maturação de sementes de feijão-de-corda também foram relatados (Fernandes *et al.*, 1991).

Proteinases cisteínicas estão frequentemente relacionadas à MCP de organismos multicelulares. Em animais, as proteases cisteínicas específicas dependentes de aspartato, ou comumente chamadas caspases (*cysteine-dependent aspartate specific proteases*), estão envolvidas nas fases de iniciação

e execução da apoptose animal (o tipo mais caracterizado de morte celular programada). Caspases geralmente são constitutivamente expressas nas células como zimogênios, e sua ativação envolve a clivagem proteolítica em resposta a estímulos pró-apoptóticos (Earnshaw *et al.*, 1999). O envolvimento onipresente destas proteases na MCP vegetal justifica a crença de muitos pesquisadores que estas enzimas desempenham funções reguladoras essenciais no processo de MCP, reproduzindo as funções das caspases na apoptose em animais (Trobacher *et al.*, 2006). Em plantas, pelo menos oito diferentes atividades proteolíticas caspase-símile foram relatadas sendo ativas contra substratos específicos para caspases, sendo a caspase-1-símile (YVADase) e a caspase-3-símile (DEVDase) as mais marcantes (Bonneau *et al.*, 2008). Esta constatação revela uma semelhança relevante com a MCP animal, ainda que não haja nenhum relato mostrando a existência de ortólogos de caspases nos genomas de plantas até agora (Bonneau *et al.*, 2008; Palavan-Unsal e Arisan, 2011).

Atividades caspase-símile em plantas são identificadas usando-se substratos sintéticos tetrapeptídicos de caspases animais, e suas atividades são definidas com base na sequência de aminoácidos do substrato utilizado. Os substratos não são necessariamente alvos específicos destas caspases, porque existe sobreposição de ações com outras proteases (Stennicke e Salvesen, 2000). Neste sentido, é difícil explicar os perfis de proteases caspase-símile em plantas. Atividades YVADase e DEVDase são as mais estudadas e sua presença na maioria das circunstâncias em que ocorre a MCP sugere sua potencial importância para a planta (Bonneau *et al.*, 2008). Mais recentemente, outros tipos de substratos para caspases vêm sendo utilizados para detectar atividades adicionais de caspase-símile nas plantas, como IETDase, LEHDase, LEVDase, TATDase, VEIDase e outros (Palava-Unsal & Arisan, 2011).

O primeiro relato da atividade proteolítica de caspases-símile em plantas foi feito por Del Pozo e Lam (1998), ao detectarem a atividade YVADase em folhas de tabaco durante a resposta hipersensível (HR) causada por infecção com o vírus do mosaico do tabaco (TMV). Desde então, muitas outras publicações têm demonstrado a presença de atividades do tipo caspase durante a MCP em plantas. Atividades YVADase e DEVDase foram encontradas durante a morte celular do megagametófito de sementes de abeto branco após a germinação (He e Kermodé, 2003), em plântulas de *Arabidopsis* sob superexposição a luz UVC

(Danon *et al.*, 2004) e durante a eliminação dos ramos mais fracos de mudas de *Pisum sativum* (Belenghi *et al.*, 2004). Chichkova *et al.* (2004) observaram o envolvimento da atividade TATDase em folhas de tabaco durante a HR. As VPEs, também conhecidas como enzimas de processamento vacuolar, são legumainas vegetais (proteases cisteínicas asparaginil específicas) com parcial identidade de sequência de aminoácidos com caspases animais, em especial no segmento da cadeia polipeptídica contendo os resíduos catalíticos. Estas proteases são auto-cataliticamente ativadas e são responsáveis por ativar proteases que desempenham um papel na modificação pós-traducional de uma série de proteases vacuolares (Woltering, 2004). Classicamente, as VPEs clivam em um resíduo de aminoácido adjacente a um resíduo de asparagina (Asn), mas elas também são capazes de clivar após resíduos de Asp. O substrato para a caspase humana do tipo 1 (o tetrapeptídeo YVAD) é clivado por caspases de mamíferos e por legumainas vegetais. Hatsugai *et al.* (2004) demonstraram que a VPE tem atividade YVADase e é necessária para ocasionar a morte celular em células infectadas por vírus do mosaico do tabaco. A VPE também foi descrita como sendo essencial na morte celular induzida por fumonisina em *Arabidopsis thaliana* (Kuroyanagi *et al.*, 2005). Nakaune *et al.* (2005) descobriram que a VPE é necessária para formação do tegumento durante os estágios iniciais da maturação de sementes, mostrando o envolvimento desta protease em processos de desenvolvimento. Bozkov *et al.* (2004) mostraram que a principal atividade caspase-símile envolvida na formação do padrão embrionário normal é do tipo VEIDase e esta atividade é essencial para a degeneração do suspensor do embrião. Esta mesma atividade proteolítica também foi encontrada regulando o desenvolvimento da cariopse de cevada (Boren *et al.*, 2006). Bosch e Franklig-Tong (2007) encontraram atividades de DEVDase, LEVDase, IETDase e VEIDase induzidas por auto-incompatibilidade em pólen de *Papaver*. López-Fernández e Maldonado (2013) encontraram atividades do tipo caspase-símile em perisperma de sementes de quinoa em desenvolvimento, sendo a VEIDase a mais proeminente.

Atividade proteolítica durante a MCP em plantas é investigada também através da utilização de substratos naturais para caspases humanas, por exemplo, empregando-se um substrato distinto para caspase-3, a polimerase poli (ADP-ribose) (PARP). Sun *et al.* (1999) detectaram a clivagem da forma

endógena da PARP na MCP induzida por menadiona em protoplastos de tabaco e Tian *et al.* (2000) observaram o mesmo, para as células de tabaco em suspensão durante o estresse por calor. Em extratos de plantas de feijão-de-corda, infectadas por fungo, a PARP exógena foi endoproteoliticamente clivada e a atividade foi inibida pelo inibidor de caspase-3. No entanto, os produtos resultantes da clivagem mostraram um padrão diferente daqueles gerados por uma caspase animal (D'Silva *et al.*, 1998).

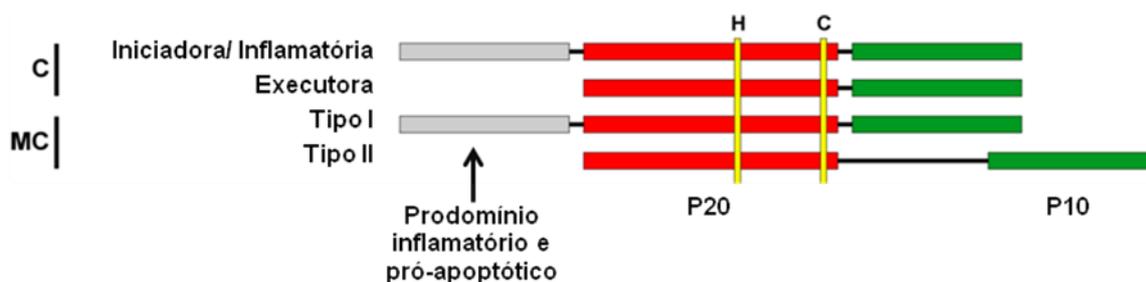
Na literatura é aceito que a MCP pode ser inibida por inibidores de caspases, como Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CMK, z-VEID-FMK, dentre outros (Bonneau *et al.*, 2008; Woltering, 2004). A MCP também pode ser bloqueada por inibidores específicos de caspases animais, como IAP (inhibitors of apoptosis) e p35 de baculovirus (Lincoln *et al.*, 2002; Del Pozo e Lam, 2003). Hansen (2000) mostrou que a MCP induzida por *Agrobacterium* no milho é reprimida pela expressão ectópica da IAP de baculovirus. Solomon *et al.* (1999) demonstraram que a MCP é desencadeada por espécies reativas de oxigênio ou por patógenos avirulentos e é prevenida através da inibição de uma protease cisteínica induzida pela expressão ectópica de cistatina, indicando um outro mecanismo de se regular a morte celular em plantas.

Atividades de proteases caspase-símile encontradas em plantas parecem ser diferentes daquelas encontradas em animais, uma vez que as especificidades aos substratos não são semelhantes às especificidades das caspases animais conhecidas, com exceção da preferência de clivagem específica ao Asp. A descoberta de que proteases não-caspases são capazes de clivar substratos para caspases nos mostra a conservação do evento de MCP em nível de substrato, um fato que poderia explicar as semelhanças morfológicas entre a morte celular programada animal e vegetal. Embora os resultados atuais mostrem a existência de uma rede de eventos proteolíticos durante a MCP vegetal, muitos fatos ainda são desconhecidos, como suas interações e seus substratos endógenos específicos (Woltering, 2004).

### **1.3 – Metacaspases**

Muitos investigadores vêm buscando ortólogos de caspases em organismos não-metazoários por mais de uma década, porém sem sucesso. A frustração terminou com a descoberta das metacaspases, que são proteínas que

apresentam similaridades estruturais com os domínios catalíticos de caspases animais e são encontrados em protozoários, fungos e plantas (Uren *et al.*, 2000). Com algumas poucas exceções, as metacaspases são ativas do pH neutro ao levemente básico pH (7,0-8,5) e necessitam de cálcio para a sua atividade. A família de metacaspases é dividida em dois grupos (figura 1). As metacaspases do tipo I apresentam um prodomínio N-terminal com motivos repetitivos ricos em prolina, e em plantas, elas também podem conter um motif do tipo “zinc finger”. As metacaspases do tipo II não possuem este prodomínio, mas têm uma região de conexão entre as subunidades p20 (maior) e p10 (menor). O genoma de plantas superiores codifica para grandes famílias de metacaspases de ambos os tipos I e II, mas apenas o tipo I é encontrado em protozoários e fungos. Também tem sido observada, em plantas, uma prevalência de metacaspases do tipo I sobre o tipo II quando os números de genes foram analisados (Tsiatsiani *et al.*, 2011).



Adaptado de: Vercammen *et al.* (2007)

**Figura 1 - Comparação entre metacaspases do tipo I e II e caspases animais iniciadoras/inflamatórias e executoras.** Em cinza, nota-se o prodomínio inflamatório e pró-apoptótico presentes apenas nas caspases iniciadoras e metacaspases do tipo I. Em vermelho, a subunidade maior p20, com os resíduos catalíticos de histidina (H) e cisteína (C) (marcados em amarelo); e em verde, a subunidade menor p10. Nota-se que para metacaspase do tipo II, há uma região de conexão entre as duas subunidades mais extensa dos que as encontradas nas metacaspases do tipo I e nas caspases.

A principal característica bioquímica das metacaspases que as diferenciam das caspases é a estrita especificidade na clivagem do substrato após um resíduo de Arg ou Lys (Vercammen *et al.*, 2004; Bozhkov *et al.*, 2005; Watanabe e Lam, 2005; Vercammen *et al.*, 2006). Até agora, a maioria das metacaspases estudadas mostraram uma díade catalítica His-Cys em seu sítio ativo predito, da

mesma forma como encontrado nas caspases. Poucas exceções de metacaspases apresentam um resíduo Ser ao invés de Cys (Szallies *et al.*, 2002). A ativação enzimática, na maioria dos casos, implica no processamento autocatalítico do zimogênio, porém essa etapa nem sempre é requerida para sua ativação (Tsiatsiani *et al.*, 2011).

As funções fisiológicas completas das metacaspases vegetais ainda são obscuras, mas sabe-se que elas são necessárias para a ocorrência da MCP em diferentes circunstâncias. Como exemplos, podemos citar o rápido aumento na expressão de um gene para metacaspase II (*LeMCA1*) em tomate durante a infecção e a morte celular causada por *Botrytis cinerea* (Hoerberichts *et al.*, 2003); o silenciamento gênico de uma metacaspase do tipo II, a *mclIPa* de *Picea abies*, ocasionando a supressão da diferenciação celular e a MCP no embrião-suspensor, culminando na detenção do desenvolvimento do embrião em estágios iniciais de desenvolvimento (Bozhkov *et al.*, 2005); e o gene da metacaspase *NbMC1*, encontrado em *Nicotiniana benthamiana*, que confere resistência ao fungo necrotrófico *Colletotrichum destructivum* (Hao *et al.*, 2007). Além disso, em *Arabidopsis* foi observado que uma metacaspase-8 é ativada por UVC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e um herbicida baseado em metil-viologênio. Linhagens “knockout” para o gene da metacaspase-8 de *Arabidopsis* (*AtMC8*) apresentaram uma redução do processo de morte celular quando expostas a UVC ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (He *et al.*, 2008). Em plântulas de *Arabidopsis*, a perda da *AtMC4*, uma metacaspase tipo II, comprometeu a indução da morte celular pela toxina fúngica fumonisina B-1 e por indutores químicos do estresse oxidativo (Watanabe e Lam, 2011). Foi demonstrado por Coll *et al.* (2010) que as metacaspases do tipo I *AtMC1* e *AtMC2* apresentam funções antagônicas durante a HR em *Arabidopsis*. A *AtMC1* é um regulador positivo da MCP, enquanto que a *AtMC2* é um inibidor da morte celular (Coll *et al.*, 2010). Os autores também relataram que *AtMC1* regula positivamente a morte de celular por resposta hipersensível, mediada por proteínas do receptor imune NB-LRR (*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat*) após o reconhecimento do patógeno invasor. Kim *et al.* (2013) observaram que a metacaspase 9 de pimenta (*Capsicum annuum*) é importante para a ocorrência de MCP em resposta a ataque de patógenos.

Apesar de uma série de fatores moleculares das vias de MCP terem sido identificados, a posição das metacaspases nestas vias é ainda inconclusiva. A

descoberta da TSN (*Tudor staphylococcal nuclease*) como um substrato em comum para caspase 3 humana e para a metacaspase vegetal mclIPa de *Picea abies* tem ajudado a esclarecer esta questão (Sundström *et al.*, 2009). Esta proteína é evolutiva e estruturalmente conservada, presente em quase todos os eucariontes. Até agora, a TSN é a única proteína que é clivada por uma metacaspase vegetal *in vivo*. Esta descoberta sugere que as metacaspases podem realizar a MCP da mesma forma que as caspases animais, porém mais estudos são necessários para explicar esse fato, uma vez que a mclIPa cliva a TSN em cinco diferentes fragmentos, enquanto a caspase 3 humana a cliva em um único local (Sundström *et al.*, 2009; Enoksson e Salvesen, 2010). Recentemente, Frei dit Frey *et al.* (2010) observaram, em *Arabidopsis*, que a TSN é capaz de estabilizar mRNAs que codificam para proteínas que são secretadas, conferindo à planta tolerância a estresses. Eles observaram que a maioria destas proteínas secretadas pertence às classes de inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, suprimindo a morte celular em plantas (Solomon *et al.*, 1999, Coffeen e Wolpert, 2004). Com base nesta observação, Tsiatsiani *et al.* (2011) propuseram um modelo onde a proteína TSN poderia proteger as células da morte pela manutenção da expressão dos inibidores de protease em níveis suficientes para inibir a ativação de proteases relacionadas com a morte celular. A clivagem da TSN por mcPall é vista com a função de abolir esta ação estabilizadora da proteína, induzindo a morte celular através da eliminação da inibição de proteases.

O uso de substratos sintéticos específicos para caspases, com um resíduo de Asp na posição P1 (correspondente ao primeiro aminoácido do substrato tetrapeptídico, ligado à metilcumarina ou p-nitroanilida), não é suficiente para provar a presença de atividades de metacaspases. Para detectá-las, substratos com resíduos de Arg ou Lys na posição P1, como VRPR-AMC, GRR-AMC, IISK-AMC e outros devem ser empregados. Em alguns tipos de vias de MCP, o efeito supressor de inibidores de pan-caspases na morte celular confirma a presença de atividades de caspase-símile regulando a morte celular após a ativação das metacaspases (Tsiatsiani *et al.*, 2011), mas os mecanismos exatos de como as metacaspases regulam a cascata de proteases caspases-símile continua a ser elucidado. Para qualquer mecanismo regulador considerado deve-se, porém, levar em conta o *status* energético do organismo, desde que Chivasa *et al.* (2009)

relataram que o ATP extracelular pode modular a morte celular programada em plantas.

Além disso, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido reconhecidos como moduladores-chaves da MCP vegetal, assim como muitos outros processos biológicos, tais como crescimento, desenvolvimento e as respostas de estresse (Gechev *et al.*, 2006). Embora os sensores/receptores específicos para ROS ainda não estejam completamente elucidados, componentes da sinalização *downstream* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e EROS das redes de transdução de sinais que controlam a MCP vegetal foram relatados, como proteínas quinases, fosfatases e fatores de transcrição (Gadjev *et al.*, 2008).

#### **1.4 - Proteases subtilisina-símile**

Proteases subtilisina-símile ou subtilases são proteases serínicas, comumente caracterizadas por conterem os aminoácidos aspartato, histidina e serina na tríade catalítica (Dodson e Wlodawer, 1998). Uma clássica subtilase vegetal contém um peptídeo sinal de secreção predito, um pró-domínio e um domínio peptidase com um domínio associado a protease em seu interior (Tripathi e Sowdhamini, 2006). Na literatura, há uma série de proteases subtilisina-símile, encontradas em diferentes tecidos vegetais. Inicialmente, essas proteínas pareciam estar envolvidas no *turnover* protéico, uma vez que elas foram encontradas em abundância em extratos vegetais e apresentam ampla especificidade aos substratos (Vartapetian *et al.*, 2011). Agora, é aceito que estas proteases têm funções mais específicas nas cascatas de sinalização e desenvolvimento da planta (Schaller, 2004; Rautengarten, 2005).

A descoberta mais interessante nos estudos de MCP em plantas é a capacidade das subtilases clivarem diferentes substratos caspase-símile, a despeito do fato de serem enzimas dependentes de serina, diferentemente das caspases Cys-dependente. Além disso, proteases subtilisina-símile são estruturalmente muito diferentes das caspases (Vartapetian *et al.*, 2011). Existem dois tipos diferentes de (D)-subtilases específicas para o aspartato em plantas que são agora bem estudadas: as saspases e as fitaspases. Saspases são serino-proteases encontradas em aveia e, como as caspases, exibem a atividade "Aspase" e requerem um resíduo de Asp na posição P1 (Coffen e Wolpert, 2004). As saspases de aveia estão envolvidas na proteólise da rubisco durante a PCD

(Coffen e Wolpert, 2004; Navarre e Wolpert, 1999). As fitaspases são encontradas em tabaco e arroz, e foram ativas na fragmentação de VirD2 (uma proteína da bactéria patogênica *Agrobacterium tumefaciens*), induzindo a MCP (Chichkova *et al.*, 2010). As fitaspases estão presentes no apoplasto de tecidos saudáveis, entrando no citoplasma apenas quando há um estímulo de MCP. Estas proteases estão envolvidas na clivagem de proteínas “estranhas” para a planta e na ativação dos eventos mitocondriais na MCP (Chichkova *et al.*, 2010). As fitaspases são constitutivamente sintetizadas como pré-pró-enzimas, sendo a pró-enzima processada autocataliticamente. O mesmo processo é inferido para as saspases (Chichkova *et al.*, 2010).

Estes dados sugerem que o papel desempenhado por caspases animais na MCP é realizado, ao menos em parte, por subtilases em plantas. Caspases e subtilases não são estruturalmente relacionadas, mas apresentam funções e especificidade de clivagem semelhante. A capacidade de saspases e fitaspases de hidrolisar vários substratos para caspases poderia dar a ideia de que elas não apresentam especificidade, mas Chichkova *et al.* (2010) demonstraram que fitaspases apresentam maior especificidade de substratos do que a caspase-3, parecendo ser enzimas muito seletivas. Vartapetian *et al.* (2011) acreditam que estas enzimas são mais de processamento do que de degradação, uma vez que são remanescentes das pró-proteínas convertases, uma família de proteases subtilisina-símile de animais e leveduras, que atuam no processamento proteolítico de precursores para gerar proteínas bioativas e/ou peptídeos, introduzindo uma clivagem após um resíduo de um aminoácido básico, e não após um Asp.

Até agora, a relação entre fitaspase e saspase não é clara. Ambas são subtilases, decompõem uma variedade de substratos de caspases, com exceção do DEVD e ambas se acumulam no apoplasto. A realocação da fitaspase do apoplasto para o citoplasma quando a MCP é induzida, é um fenômeno novo e uma possível causa deste processo é a compartimentalização da protease longe de seus alvos intracelulares em condições normais, impedindo a proteólise acidental na ausência de estímulos de morte celular (Chichkova *et al.*, 2010). Fitaspases, quando dentro da célula, contribuem para a MCP através da hidrólise de seus alvos intracelulares. Em resposta aos estímulos de morte, observou-se que a fragmentação da proteína repórter intracelular VirD2-GFP é mediada por

fitaspase (Chichkova *et al.*, 2004). A MCP é claramente é inibida em plantas de tabaco transgênico silenciado para fitaspases e pode ser restaurada quando expressam fitaspases de arroz do tipo selvagem (Chichkova *et al.*, 2010).

Da mesma forma que com as fitaspases, especula-se que um mecanismo semelhante pode ser utilizado por saspases, uma vez que um dos alvos intracelulares dessa protease após sua ativação é a rubisco (Coffen e Wolpert, 2004; Navarre e Wolpert, 1999). Em contraste com as fitaspases, a atividade saspase no apoplasto é elevada quando a MCP é induzida, mas o mecanismo que regula este processo é desconhecido (Coffen e Wolpert, 2004). A protease que processa diretamente a rubisco tem "atividade aspase" e esta cascata proteolítica envolve também uma atividade DEVDase e uma protease cisteínica, e como conseqüência, esta atividade extracelular pode ser internalizada para o citosol (Coffen e Wolpert, 2004). Desvendar os alvos protéicos de todas estas subtilases com a especificidade ao Asp pode ser um ponto crucial para a compreensão dos mecanismos moleculares que regem os processos de MCP vegetal.

### **1.5 - A MCP em sementes em desenvolvimento e germinação**

Apesar das sementes apresentarem um papel central no ciclo de vida das plantas, existem poucos estudos sobre a MCP durante os processos de desenvolvimento e germinação. Filonova *et al.* (2000) mostraram a ocorrência de duas ondas de MCP durante a formação de embriões somáticos da gimnosperma *Picea abies*. A primeira está implicada no evento de transição da massa poliembriônica para embriões somáticos, enquanto a segunda está envolvida na formação do correto padrão corporal do embrião. Também foi observado por Filonova *et al.* (2002) que a MCP é o principal mecanismo para a eliminação de embriões em sementes poliembriônicas de *Pinus silvestris*, e que o processo segue um padrão basal-apical. Estes dados indicam que, durante poliembriogênese, a MCP termina com a competição entre os embriões monozigóticos, garantindo a sobrevivência de apenas um. Bozkov *et al.* (2004) detectaram que a VEIDase é a principal atividade caspase-símile envolvida na embriogênese somática de *Picea abies*. O aumento desta atividade é observado nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, coincidindo com o momento da MCP que ocorre durante a modelagem corporal do embrião. A inibição da

atividade VEIDase impede o desenvolvimento normal através do bloqueio da diferenciação entre o embrião e o suspensor. Mais tarde, Bozkov *et al.* (2005) descobriram que a mclI-Pa está envolvida na MCP durante a formação do embrião de *Picea abies*. Durante a embriogênese, a mclI-Pa é translocada do citoplasma para o núcleo em células terminais diferenciadas, destinadas para eliminação, causando o desmantelamento do envoltório nuclear e a fragmentação de DNA. Os autores mostraram que mclI-Pa recombinante não cliva substratos para caspases, apontando que a atividade VEIDase é causada por outra protease. Helmerson *et al.* (2008) relataram que a perturbação na homeostase do zinco pode desordenar o equilíbrio entre a proliferação celular e a MCP necessária à embriogênese, sendo o zinco um fator importante para governar o destino das células durante o desenvolvimento da planta.

Ricinossomos, descobertos no endosperma senescente de mamona em germinação (*Ricinus communis*), são organelas muito importantes envolvidas na MCP. Schmid *et al.* (1998) encontraram elevadas quantidades de uma pró-endopeptidase cisteínica, nomeada CysEP que está localizada nos ricinossomos. Esta protease possui um pró-peptídeo N-terminal e um sinal C-terminal de retenção no retículo endoplasmático (KDEL). O ricinossomo é responsável pelo colapso celular e pela acidificação do citosol, provocando a maturação da CysEP (Gietl e Schmid, 2001). Schmid *et al.* (1999) observaram que as células do endosperma de *R. communis* sofrem MCP durante a germinação, após os compostos de reserva terem sido mobilizados, sendo este fenômeno associado com o acúmulo e liberação de endoproteases cisteínicas dos ricinossomos. Greenwood *et al.* (2005) relataram que, durante o desenvolvimento de sementes de *R. communis*, células do nucelo morrem por MCP. Durante este processo, o conteúdo dos ricinossomos é descarregado no citoplasma, e a CysEP ativada destrói as proteínas remanescentes.

Lombardi *et al.* (2007) descreveram eventos de PCD em células de suspensor de *Phaseolus coccineus*, relatando a liberação do citocromo C da mitocôndria para o citosol e a ativação de proteases do tipo caspase-símile. Xie *et al.* (2008) observaram que, em cotilédones germinantes de sementes de algodão, a MCP ocorre de forma assíncrona, onde as células em processo de MCP surgem inicialmente na porção marginal dos cotilédones progredindo para a parte central deste tecido. Em milho, durante a embriogênese, Giuliani *et al.* (2002) detectaram

núcleos TUNEL-positivos no escutelo, coleóptilo, na coifa da raiz e nas células do suspensor. Boren *et al.* (2006) observaram uma atividade VEIDase *in vivo* durante a PCD em cariopse de cevada. Tal atividade foi localizada no endosperma amiláceo e o seu aumento está bem correlacionado com os altos níveis de PCD nos cariopses jovens.

De Bonno e Greenwood (2006) observaram a existência de dois programas diferentes de morte nas células endospermicas de sementes de tomate. A morte pós-germinativa de células do endosperma lateral e micropilar mostraram características morfológicas compatíveis com a MCP, tais como vesículas precursoras de proteases e o surgimento de organelas derivadas do retículo endoplasmático. Na ausência do embrião, a MCP não foi detectada no endosperma lateral. Além disso, a influência do embrião na ocorrência da MCP no endosperma lateral também foi observada através da adição de ácido giberélico (GA). De maneira oposta, as células do endosperma micropilar sofrem MCP com ou sem o embrião, e neste caso, a adição de GA apenas foi capaz de acelerar a MCP. A presença de vesículas contendo proteases e organelas derivadas do retículo endoplasmático, considerados marcadores da MCP, foram vistas tanto em células pós-germinativas laterais quanto nas micropilares. Os autores sugerem que uma pós-embebição tardia com GA promove a MCP no endosperma lateral e a ocorrência da morte no endosperma micropilar ocorre um pouco antes ou então no início de embebição. López-Fernandez e Maldonado (2013) detectaram a ocorrência da MCP durante o desenvolvimento do perisperma de quinoa. Os autores observaram que durante este processo, ocorrem mudanças morfológicas no núcleo, como o desaparecimento do nucléolo e a dispersão da cromatina. A fragmentação do DNA ocorreu em estágios iniciais do desenvolvimento, analisados por ensaio TUNEL, e, nos estágios intermediários do desenvolvimento, houve a participação de uma protease caspase-símile com atividade VEIDase .

### **1.6 – A MCP em tegumentos de sementes**

O tegumento (testa ou casca) das sementes representa a interface entre o embrião e o ambiente exterior à semente. Sua função é bem reconhecida na promoção de dispersão das sementes, sobrevivência em ambientes hostis e proteção do embrião contra pestes e patógenos (Moïse *et al.*, 2005). Ele ainda

monitora o meio para detectar condições favoráveis à germinação. O tegumento constitui-se não somente num envoltório protetor, mas é um tecido fisiologicamente e metabolicamente ativo e dinâmico.

Em sementes em desenvolvimento, as quais estão fisiologicamente conectadas à planta parental, os tegumentos são os condutores para o embrião. Por exemplo, o fluxo de fotoassimilatos dos tecidos maternos ao embrião em desenvolvimento é facilitado por invertases associadas ao tegumento, as quais convertem sacarose em glicose e frutose (King *et al.*, 1997; Sheen *et al.*, 1999; Weber *et al.*; 1995; Wobus e Weber, 1999). Existe um número cada vez maior de evidências que sugerem um diálogo inteligente entre o metabolismo materno e o desenvolvimento da semente (Wan *et al.*, 2002). Acredita-se que sinais morfogênicos para o desenvolvimento do embrião e preenchimento da semente incluem metabólitos e seus respectivos gradientes de transporte entre tecidos maternos e embrionários (Wobus e Weber, 1999). Neste sentido, o tegumento desempenha papel central na garantia de um fluxo de sinais adequados, além do suprimento nutricional para suporte do embrião.

Em certas plantas cultivadas, o tegumento possui ainda implicações econômicas. *Brassica napus* (colza) e *B. rapa* (canola) são importantes culturas oleaginosas, também usadas como um suplemento protéico rico para alimentação forrageira no mundo. O tegumento destas sementes contribui com sua massa e assim reduz o conteúdo protéico e oléico da cultura. O tecido permanece nos resíduos da extração do óleo e sua coloração escura, juntamente com fenóis causadores de tal coloração, são considerados fatores antinutricionais. Cerca de 40 anos atrás, o tegumento da semente de uma variedade incolor de *B. rapa* (então conhecida como *B. campestris*) foi examinado anatomicamente, no entanto apenas sob uma perspectiva de análise de seu potencial uso na alimentação (Vaughan, 1958). De lá para cá, apesar da biologia molecular do desenvolvimento embrionário, da acumulação de moléculas de reserva e da maturação de sementes terem sido bem temas examinados, no que se refere ao desenvolvimento e maturação do tegumento, pouca atenção tem sido dada.

O tegumento é um tecido materno derivado dos integumentos internos e externos do óvulo. O integumento externo foi estudado com detalhes em *Arabidopsis thaliana* (Western *et al.*, 2000; Windsor *et al.*, 2000); já o integumento interno não tem sido investigado. O desenvolvimento do tegumento parece sofrer

uma fase expansiva, seguida de uma redutiva, no que se refere ao número de células e de camadas celulares; alguns dos tecidos que são elaborados nos estágios iniciais e intermediários do desenvolvimento desaparecem em sementes maduras. Os integumentos internos, por exemplo, se tornam comprimidos e impregnados com pigmentos que conferem a coloração marrom característica das sementes da família Brassicaceae. Wan *et al.* (2002) mostrou que o integumento interno de colza (*B. napus*) sofre uma coordenada MCP durante o desenvolvimento da semente, sendo evidente a mobilização de amido, a vacuolização do citoplasma e a fragmentação do DNA. Eles também encontraram um gene de uma protease cisteínica (*BnCysP1*) que é expressa exclusivamente neste tecido quando em processo de MCP. A produção desta proteinase foi vista como sendo temporalmente e espacialmente controlada pela planta para limitá-la à fase degenerativa do desenvolvimento do integumento interno. Este é o primeiro relato de um gene que se expressa apenas no tegumento e está envolvido com a MCP deste tecido. Nakaune *et al.* (2005) encontraram uma enzima de processamento vacuolar ( $\delta$ -VPE) que é específica e transitoriamente expressa em duas camadas celulares do tegumento de *A. thaliana*, durante o estágio inicial do desenvolvimento da semente. Em mutantes deficientes da  $\delta$ -VPE, a MCP nestas camadas é adiada. Esta enzima é encontrada no interior e exterior das paredes celulares do tegumento que estão em processo de MCP e apresenta atividade proteolítica do tipo caspase 1-símile.

A diferenciação do tegumento inclui algumas das mais drásticas alterações celulares no desenvolvimento da semente e culmina na morte de células neste tecido, como descrito em *A. thaliana* (Haughn e Chaudhury, 2005). Análises genéticas nesta espécie têm contribuído substancialmente para o entendimento de muitos aspectos da biologia de tegumentos e tais avanços representam potenciais contribuições ao entendimento de importantes eventos celulares, tais como a síntese de parede celular secundária, direcionamento protéico a vacúolos, morfogênese celular e MCP (Haughn e Chaudhury, 2005). De posse de tais informações, disponibilizar-se-ão ferramentas apropriadas para a manipulação dos processos de dormência e germinação de sementes, por exemplo.

### 1.7 – O papel da mitocôndria na morte celular programada

As mitocôndrias são classicamente sabidas como organelas geradoras de energia das células. Porém, recentemente, tem-se descoberto um papel central desta organela como mediadora do processo de MCP, tanto em plantas como em animais (Green e Read, 1998; Jones, 2000; Blackstone e Kirkwood, 2003). Durante o processo de MCP são observadas mudanças em toda a ultraestrutura e fisiologia da mitocôndria, podendo variar de acordo com o tipo celular em estudo. As mudanças fisiológicas incluem alterações no potencial de membrana, acumulação de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de ATP, e as mudanças estruturais incluem inchaço e desorganização das cristas mitocondriais, descontinuidades na membrana externa, inchaços na matriz mitocondrial e perda de densidade eletrônica (Thomas e Franklin-Tong, 2004).

O citocromo C é uma proteína altamente conservada que está associada à membrana mitocondrial interna. Ele funciona dentro da mitocôndria como um carreador de elétrons entre os complexos III e IV da cadeia transportadora de elétrons, desempenhando um papel-chave na respiração aeróbica de plantas, animais e fungos (Goodsell, 2004). Além disso, o citocromo C é um componente-chave da apoptose, em mamíferos (Balk *et al.*, 1999). Durante o evento de apoptose, o citocromo C é liberado da mitocôndria após a percepção de um sinal de morte e combina-se com Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), procaspase-9 e dATP para formar o apoptossomo. O apoptossomo então inicia uma cascata proteolítica de ativação de caspases, que leva à destruição apoptótica da célula através da clivagem de componentes celulares-chave. O papel central executado pelo citocromo C na apoptose, em mamíferos, em conjunto com o alto grau de conservação de sua seqüência primária, tem levado pesquisadores a tentar descobrir que papel, caso exista, o citocromo C tem na MCP de plantas.

Balk *et al.* (1999) induziu MCP em cotilédones de pepino usando um tratamento de aquecimento a 55°C e demonstrou que o citocromo C começa a migrar da mitocôndria, quase que imediatamente, e torna-se indetectável na mitocôndria após 3 horas. Também foi demonstrado que essa translocação é seletiva e não um resultado da ruptura da membrana mitocondrial, uma vez que outra proteína mitocondrial, a fumarase, não foi detectada no citosol. Virolainen *et al.* (2002) também detectaram a liberação do citocromo C pelas mitocôndrias em

plântulas de trigo submetidas a estresse anóxico e Lombardi *et al.* (2007) observaram o mesmo fenômeno durante a degeneração do suspensor de sementes de *Phaseolus coccineus*. A liberação do citocromo C usualmente precede a fragmentação do DNA; então sua localização celular durante esse período é de crítica relevância para qualquer pressuposto feito sobre o papel do citocromo C na MCP em plantas, em geral.

### **1.8 - Atividades biológicas de cistatinas e suas funções em plantas**

Cistatinas são proteínas capazes de inibir proteases cisteínicas e são amplamente distribuídas nos eucariotos (Turk e Bode 1991; Margis *et al.* 1998). Cistatinas vegetais são chamadas fitocistatinas e têm sido relacionadas com a regulação de proteinases cisteínicas endógenas envolvidas na mobilização de proteínas de reserva durante a germinação de sementes ou em outros processos fisiológicos de tecidos vegetais (Fernandes *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1991; Lim *et al.*, 1996; Ojima *et al.*, 1997; Kiyosaki *et al.*, 2007). A regulação de proteólise endógena é exemplificada pela habilidade de orizacistatinas (inibidores de proteinases cisteínicas de arroz) inibirem orizaínas (proteases cisteínicas de arroz) de sementes de arroz (Watanabe *et al.*, 1991; Ojima *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 1987; Hosoyama *et al.*, 1994).

Estudos do padrão de expressão tecidual e temporal de cistatinas têm sido ferramentas para investigações dos papéis das cistatinas de soja (Misaka *et al.*, 1996), milho (Abe *et al.*, 1994), batata (Grunden *et al.*, 1997), trigo (Kuroda *et al.*, 2001) e de feijão-de-corda (Flores *et al.*, 2001). As localizações determinadas são consistentes com ambos os papéis de proteção (exo-regulação de predadores) e endo-regulação, e diversos destes trabalhos relatam a possibilidade de diferentes isoformas de cistatinas, encontradas em cada espécie, relacionarem-se a diferentes funções. No caso de feijão-de-corda, tais estudos observaram padrões complexos de atividades proteinásicas e de cistatinas durante o desenvolvimento de sementes (Fernandes *et al.*, 1991), bem como variada localização em células e tecidos (Flores *et al.*, 2001). Neste último trabalho uma distribuição uniforme de cistatinas em cotilédones e eixos, exceto por uma maior concentração em células epidérmicas da zona de abscisão entre os cotilédones, foi relatada. Similarmente, a cistatina de soja concentra-se numa camada periférica de células cotiledonárias (Misaka *et al.*, 1996). Estes autores, contudo, não atribuem nenhuma importância

especial a tal localização. Em feijão-de-corda, ao contrário, sugeriu-se que tal concentração elevada em uma camada celular periférica seria compatível com um papel de defesa do tecido vegetal. Por outro lado, a seqüência de aminoácidos deduzida de uma cistatina clonada de sementes de feijão-de-corda (Fernandes *et al.*, 1993) foi vista como deficiente em peptídeo sinal N-terminal, sugerindo que não deva ser transportada por um sistema secretório. Outros resultados demonstram que além de uma localização citoplasmática, cistatinas de *V. vexillata*, espécie não cultivada do gênero *Vigna*, são encontradas em espaços extracelulares e em paredes celulares de cotilédones e que, portanto, um processo de translocação poderia ser admitido (Ávila *et al.*, 1999; Da Cunha *et al.*, 2007).

O interessante fato registrado em 1990 (Kondo *et al.*, 1990), acerca de diferenças estruturais entre orizacistatinas I e II que implicavam em diferentes potenciais inibitórios e especificidades contra enzimas-alvo, ficou quase 10 anos inexplorado. Trabalhos recentes mostraram que especificidade e potência de cistatinas contra proteinases-alvo, dependem de detalhes estruturais, em geral, na região N-terminal (Estrada *et al.*, 1999; Tseng *et al.*, 2000; Wojnar *et al.*, 2001; Koiwa *et al.*; 2001). Variantes de cistatinas de soja, com mutações no resíduo W78 em regiões de alças tipo “hairpin”, mostraram valores duas vezes maiores de Ki contra papaína (Koiwa *et al.*, 2001). Aguiar *et al.*, em 2006, constataram que o alto potencial de uma cistatina de feijão-de-corda contra insetos bruquídeos *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*, provavelmente devia-se à presença de 5 resíduos N-terminais, não presentes na cistatina de soja, cujo potencial inibitório contra enzimas de tais insetos era aproximadamente 50 a 60 vezes inferior.

Existe uma complexidade de papéis fisiológicos pensados hoje para as fitocistatinas. Dentre esses, há indícios de que elas participariam de processos de sinalização celular e transdução de sinais (Satoh, 1998). Nos trabalhos do grupo japonês, uma cistatina extracelular, insolúvel (Ojima *et al.*, 1997), de tecidos cultivados *in vitro* de sementes de cenoura, foi envolvida em processos de transdução de sinais celulares e de interação tecidual entre células, sendo capaz de interagir com glicoproteínas solúveis de 57 kDa, que por sua vez, ligavam-se a peptídeos homólogos à insulina.

Ainda no campo das novas sugestões de papéis fisiológicos para fitocistatinas está sua participação em eventos de MCP que se seguem, por exemplo, a ataques de patógenos, levando a resposta de hipersensibilidade (Ussuf *et al.*, 2001). Tem sido demonstrado que a expressão ectópica de cistatinas inibe a atividade de proteinases cisteínicas induzidas, o que por sua vez, bloqueia a MCP (Solomon *et al.*, 1999). Também foi observado por Belenghi *et al.* (2003), que a super-expressão da cistatina constitutiva ATCYS1 suprime a resposta hipersensível em plantas de tabaco e cultura de células de *Arabidopsis*, bloqueando a morte celular. Sugere-se, assim, que o balanço entre proteinases cisteínicas e cistatinas regula a MCP.

### **1.9 - Justificativa do estudo**

A diferenciação do tegumento inclui modificações celulares das mais dramáticas observadas durante o desenvolvimento da semente, culminando na sua completa desidratação ao final do desenvolvimento, e subsequente eliminação após a reidratação da semente, durante a germinação. Mesmo completamente desidratadas, as células do tegumento conferem proteção ao embrião até sua subsequente reidratação, além de estarem envolvidas nos processos de dormência e germinação e também na dispersão das sementes. A submissão deste tecido a tais drásticos processos de alterações e desidratação pressupõe um processo de morte celular, o qual é objeto direto do estudo da presente tese. A detecção de proteinases cisteínicas ativas em tegumentos de sementes desidratadas e quiescentes de *Vigna unguiculata* por nosso grupo de pesquisa (Lima, 2011) levantaram questionamentos acerca do possível envolvimento destas enzimas com processos orquestrados de MCP nestes tecidos e reforçam nossa suposição da ocorrência de MCP em tegumentos.

A hipótese aqui investigada diz respeito a vinculação compulsória da ocorrência da morte celular programada do tegumento ao processo posterior de germinação das sementes. Para que este evento germinativo ocorra com eficiência seria vital a MCP de tegumentos e sua subsequente eliminação antes da germinação. Portanto, a presente pesquisa visa contribuir com o conhecimento científico sobre eventos de MCP em tegumentos de sementes e sua relevância

aos fenômenos fisiológicos do desenvolvimento e posterior germinação de sementes.

A evolução do conhecimento acerca de tais processos propicia a geração de uma fundamentação sólida para o desenvolvimento de tecnologias de manipulação genética de sementes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo geral**

Pretendeu-se, neste trabalho, investigar a ocorrência de MCP em tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata* durante o processo de desenvolvimento.

### **2.2 – Objetivos específicos**

2.2.1 - Diagnosticar, por análises morfogênicas e bioquímicas, eventos de MCP em tegumentos em desenvolvimento e quiescentes de sementes de *Vigna unguiculata*;

2.2.2 - Detectar, quantificar e caracterizar moléculas potencialmente envolvidas com MCP em tegumentos, tais como proteinases cisteínicas caspase-símile, metacaspases e cistatinas;

2.2.3 - Estudar a expressão de metacaspases e cistatinas, ao nível gênico e de produtos de tradução, em tegumentos, ao longo dos seus processos de desenvolvimento e maturação;

2.2.4 - Analisar a expressão de genes codificadores de metacaspases e cistatinas ao nível celular, em diferentes camadas do tegumento.

### **3. MATERIAIS E METODOLOGIAS**

#### **3.1 - Parte I: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DO EVENTO DE MCP**

##### **3.1.1 – Obtenção do material botânico**

Sementes de *Vigna unguiculata* durante os seus diferentes estágios de desenvolvimento e quiescentes foram utilizadas. Para a obtenção dos tegumentos de sementes em desenvolvimento, sementes quiescentes foram plantadas no período do verão (fevereiro), no campus da Universidade. Durante o período de floração (cerca de dois meses após o plantio), as flores abertas foram etiquetadas com a data em que ocorreu a polinização, e as vagens foram colhidas em diferentes dias após a polinização (6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, e 24 dias após a polinização - DAP). Como a planta de estudo é auto-polinizável e apresenta abertura e fechamento das flores no mesmo dia, o dia em que ocorreu a polinização corresponde ao dia da antese. As vagens então foram abertas e as sementes retiradas; após terem sido pesadas, tiveram seus tegumentos removidos (exceto nos dias 6 DAP e 8 DAP, em que ainda não é possível a dissecação). Todo o processo de dissecação foi realizado a baixas temperaturas. Os tegumentos foram então liofilizados e macerados com o auxílio de um almofariz e um pistilo. As farinhas obtidas foram armazenadas a -20°C até a posterior utilização. Para a realização dos experimentos de biologia molecular durante o estágio-sanduíche na Universidade de Durham-UK, sementes foram plantadas em estufa com condições controladas para obtenção de sementes frescas. Uma vez que, por motivos desconhecidos, as plantas não floresceram, todos os experimentos de biologia molecular foram realizados com material liofilizado e pré-fixado no Brasil.

##### **3.1.2 - Análise do processo de formação de tegumentos de sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*)**

As sementes em diversos estágios após polinização foram cortadas e fixadas em uma solução contendo cacodilato de sódio 0,1 M; formaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% pH 7,2 por 48 h, lavadas 3 vezes de 30 min com tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2. Após o processo, as sementes foram pós-

fixadas com uma solução de tampão cacodilato de sódio 50 mM contendo 1% de OsO<sub>4</sub> por 1 h e lavadas 3 vezes de 30 min com tampão cacodilato de sódio 50 mM pH 7,2. Posteriormente, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e três vezes de 100%, por 1 h cada uma) e infiltradas em misturas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de epon (3 partes de acetona: 1 de epon; 2 partes de acetona: 1 de epon; 1 parte de acetona: 1 de epon; 1 parte de acetona: 2 de epon; 1 parte de acetona: 3 de epon) por 8 h cada uma. A inclusão foi realizada em epon puro e as amostras foram deixadas em uma estufa a 60°C por 48 h para polimerização. Os blocos foram cortados em um ultramicrotomo (cortes de 0,5 µm de espessura) e corados com azul de toluidina 1%, selados com Entellan R (Merck) e observados em microscópio de campo claro para avaliação da anatomia e morfologia dos tecidos do tegumento.

### **3.1.3 – Análise subcelular dos eventos de MCP de tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Sinais ultraestruturais de eventos de MCP, nos estágios de desenvolvimento das sementes, foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As sementes foram fixadas utilizando-se uma mistura de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 50 mM, pH 7,2 por 24 h a 4°C. Posteriormente, as sementes foram pós-fixadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e três vezes de 100%) e embebidas em resina epóxi (Epon®). Cortes ultrafinos (80 nm) foram montados em grades de cobre (300 mesh) e contrastados em acetato de uranila alcoólico a 1%, seguidos por citrato de chumbo aquoso a 5%. As secções foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss TEM 900 (Zeiss, Wiesbaden, Germany) a uma voltagem de aceleração de 80 kV.

### **3.1.4 – Testes de integridade de membranas de tecidos de sementes de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento**

As sementes em diferentes estágios de desenvolvimento foram fixadas em uma solução de etanol 50%, formaldeído 37% e ácido acético glacial (90:5:5 v/v) e cortadas à mão livre e montadas sobre lâminas. Foi então preparada uma solução

concentrada de brometo de etídio e laranja de acridina (50 mg de brometo de etídio e 15 mg de laranja de acridina misturados em 1 mL de etanol e adicionados 49 mL de água destilada). Essa solução foi diluída 100 vezes e 30 µL foram adicionados aos cortes, que foram imediatamente observados em um microscópio de fluorescência (filtro primário 495 nm e filtro secundário 515 nm) para análise da viabilidade celular: células que fluorescem em verde (com laranja de acridina) estão vivas e células que fluorescem em laranja (com brometo de etídio) estão mortas ou em provável processo de MCP.

### **3.1.5 – Análise *in situ* (TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) da fragmentação do DNA em tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento**

Para a realização deste ensaio, sementes frescas em diferentes estágios do desenvolvimento foram fixadas em um solução de etanol 50%, formaldeído 37% e ácido acético glacial (90:5:5 v/v) por 12 h a 4°C e lavadas de hora em hora, por 3 vezes, com etanol 50%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 100%, por 1 h cada uma). A infiltração e inclusão em historesina (Leika) foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos para a detecção da fragmentação *in situ* do DNA através do kit TUNEL (*In situ* cell death detection kit, TMR red - ROCHE), de acordo com as instruções do fabricante. Esta técnica permite a marcação de grupos 3'-OH livres nas terminações de DNAs fragmentados (Wan *et al.*, 2002). Para observação de núcleos, foi utilizado o DAPI como contraste (ProLong® Gold, Life Technologies).

## **3.2 - Parte II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO EVENTO DE MCP**

### **3.2.1 - Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos durante o desenvolvimento**

Para a detecção de oligonucleossomos formados em consequência de eventual processo de MCP, no citoplasma de células de tegumentos em desenvolvimento, foi empregado o kit Cell Death Detection ELISA (Roche Applied Science - version 10.0). Para tal, 50 mg de tegumentos liofilizados de 10 até 24

dias após a polinização foram imersos em nitrogênio líquido para o rompimento das paredes celulares. Tampão de lise (400  $\mu$ L), fornecido no kit, foi adicionado às amostras, então incubadas a 4°C por 30 min. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 200 x g, por 10 min e 20  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionados a uma placa de micropoços, previamente sensibilizada, fornecida no kit pelo fabricante. Uma alíquota de 80  $\mu$ L do imunoreagente, contendo uma mistura de anti-histona-biotina e anti-DNA-POD (peroxidase) foi adicionada. Após a incubação por 2h sob agitação (300 rpm) e à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas e a revelação realizada com tabletes de ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotriazolina-6-sulfônico), de acordo com as instruções do fabricante. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Os dados foram submetidos análise de variância (ANOVA one-way), seguido pelo teste *a posteriori* de Tukey para múltipla comparação entre as amostras. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média.

### **3.2.2 – Isolamento das frações citosólicas e mitocondriais dos tegumentos em desenvolvimento**

Para analisar se durante a MCP do tegumento há a liberação do citocromo C, as mitocôndrias do tecido foram isoladas da fração citosólica como descrito por Lombardi *et al.* (2007). Todo o processo foi realizado no gelo. Para tal, 10 mg de tegumentos frescos foram homogeneizados em um almofariz com 2 ml de tampão homogeneizador (manitol 0,4 M, HEPES/KOH 20 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,2%, PVPP 0,6% e cisteína 8 mM, pH 7,4). O homogenato foi então filtrado e centrifugado por 10 min a 1000 x g, a 4°C, para descartar restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente centrifugado por 20 min, a 15000 x g, a 4°C. O sobrenadante corresponde à fração citosólica e o sedimento corresponde à fração mitocondrial. A fração mitocondrial foi lavada com tampão HEPES/KOH, 20 mM, manitol 0,4 M, EDTA 1 mM, pH 7,4 e recentrifugada por 3 vezes (20 min, 15000 x g, 4°C) para eliminar qualquer contaminação da fração citosólica.

Atividades para a enzima citocromo C oxidase de mitocôndrias isoladas foram analisadas para confirmação da integridade mitocondrial com o emprego do

kit “Cytochrome C Oxidase Assay” (Cytocox1, Sigma). Não foi possível isolar as frações subcelulares de tegumentos de 24 DAP, em virtude do alto grau de desidratação do tegumento neste estágio.

### **3.2.3 - Análise da liberação do citocromo C pelas mitocôndrias**

As frações mitocondriais e citosólicas foram quantificadas quanto ao seu teor protéico por metodologia de Bradford (1976) e a detecção da liberação do citocromo C das mitocôndrias para o citosol foi analisada empregando-se ensaio do tipo ELISA. Uma placa de 96 poços foi sensibilizada por 12 h, a 4°C, com 10 µg de proteínas provenientes das frações citosólicas e mitocondriais resuspensas em 100 µl de tampão carbonato 15 mM, bicarbonato 35 mM, pH 9,6 e lavada 8 vezes com tampão PBS pH 7,6 contendo Tween 0,05% (280 µl/poço). Em cada poço foram adicionados 300 µl de tampão bloqueador (PBS pH 7,6 com Tween 0,05% e BSA 1%). Os poços foram lavados 8 vezes com tampão PBS pH 7,6 contendo Tween 0,05% (280 µl/poço). Foram adicionados, em cada poço, 50 µl do anticorpo primário anti-citocromo C de frango (1:1000) (Santa Cruz) e a placa foi incubada por 2 h à temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados com tampão PBS/ Tween e adicionados 50 µl do anticorpo secundário IgY de frango conjugado com fosfatase alcalina (1:1000) (Santa Cruz). Os poços foram novamente lavados com tampão PBS/ Tween e a reação foi revelada pela adição de 50 µl de uma solução de ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio monobásico 0,2 M, peróxido de hidrogênio 9% e 0,4% de orto-fenilenodiamina, pH 5,0. A reação foi parada adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico 3 N. A análise estatística foi realizada como descrito no item 3.2.1.

### **3.2.4 – Extração de pigmentos de tegumentos quiescentes e em diferentes estágios de desenvolvimento**

Para a remoção de pigmentos, tegumentos de sementes quiescentes e em desenvolvimento foram submetidos a duas extrações consecutivas em éter 100% na proporção de 1:20, por 10 min e centrifugadas a 2000 x g por 1 min. Após a evaporação do éter em temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à extração de proteínas.

### **3.2.5 – Extração de proteínas de tegumentos quiescentes e em diferentes estágios de desenvolvimento**

Após a extração de pigmentos, as farinhas de tegumentos das sementes nos diferentes estágios do desenvolvimento e quiescentes foram submetidas a extração em tampão HEPES/KOH 100 mM, contendo 10% de sacarose, 0,1% de CHAPS, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 2% de PVPP em pH 7,0; na proporção de 1:8 (m/v) por 2 h, a 4°C e em constante agitação. Os extratos foram centrifugados por 10 min a 15.000 x g e a 4°C. Os sobrenadantes foram liofilizados e os sedimentos descartados. As frações protéicas de tegumentos obtidas de sementes em diferentes dias após a polinização e quiescentes foram submetidas à quantificação protéica pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente de Bradford (Bio Agency). Foi realizada uma curva-padrão contendo albumina sérica bovina (BSA) em uma faixa de 0 a 20 µg, a intervalos regulares de 2 µg. As medições de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 595 nm.

### **3.2.6 – Visualização por SDS-PAGE do perfil protéico de extratos de tegumentos ao longo do desenvolvimento**

Amostras protéicas de extratos de tegumentos em diferentes tempos após polinização foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS, de acordo com o método de Laemmli (1970), usando-se um gel de separação a 12% contendo 4,0 mL de poliacrilamida (29,2% de acrilamida e 0,8% de metileno-bis-acrilamida) 3,3 mL de água, 4 µL de TEMED, 100 µL de APS e 100 µL de SDS 10% em 2,5 mL de tampão Tris/HCl 1,0 M pH 6,8 e um gel de aplicação contendo 670 µL de acrilamida, 2,7 mL de água, 4 µL de TEMED, 40 µL de APS 10% e 40 µL de SDS 10% em 0,5 mL de tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8.

A cada poço do gel foi aplicado um volume de 20 µL de amostra, sendo 10 µg de proteínas dissolvidas em 12 µL de tampão de amostra (0,8 mL de glicerol, 1 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 6,8; 1,6 mL de SDS 10%, 400 µL de β-mercaptoetanol e 0,4 mL de azul de bromofenol 1%) e 8 µL de Tris/HCl 50 mM pH 7,0. Os marcadores de massa molecular utilizados foram as seguintes proteínas: miosina (200 kDa) β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina

sérica bovina, (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29,3 kDa) todos dissolvidos em tampão de amostra desnaturante contendo uréia 6M em sua composição.

A eletroforese foi processada em uma voltagem constante de 100 V, por 2 horas. Após o processo, o gel foi corado por Coomassie Brilliant Blue R a 0,1% em uma solução de 40 mL de metanol, 10 mL de ácido acético e 50 mL de água e então descorado com uma solução de 40 mL de metanol, 10 mL de ácido acético e 50 mL de água.

### **3.2.7 – Visualização da atividade de proteases cisteínicas em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento por zimografia**

Para a detecção da atividade gelatinolítica de proteinases cisteínicas foram preparados dois géis contendo gelatina em uma concentração final de 0,1% em gel de poliacrilamida 12%, tendo por base a metodologia descrita primeiramente por Heussen e Doudle (1980). Os marcadores de massa molecular foram os mesmos descritos no item 3.2.5.

Para ambos os géis, a eletroforese foi processada como descrito em 3.2.6 e após o processo, os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% por 2 vezes, durante 30 min cada. Um dos géis foi incubado em um banho-maria por 24 h a 37°C em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 contendo DTT 1 mM e albumina bovina 0,1% (para simular o pH do vacúolo) e o outro gel foi incubado nas mesmas condições, em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 contendo DTT 1 mM e albumina bovina 0,1% (para simular o pH do citosol).

Posteriormente, o gel foi corado por uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R a 0,1% em uma solução de metanol:ácido acético:água (40:10:50) e descorado com uma solução de metanol:ácido acético:água (35:10:55).

### **3.2.8 – Detecção das atividades de proteinases cisteínicas caspase-símile em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento de *V. unguiculata*, na presença e ausência de inibidores específicos**

Extratos protéicos de tegumentos das sementes foram avaliados para a presença de proteinases cisteínicas caspase-símile, usando-se os substratos colorimétricos Ac-DEVD-pNa (específico para caspases 3/7), Ac-VEID-pNA (específico para caspase 6), Ac-IETD-pNA (específico para caspase 8) e Ac-

LEHD-pNa (específico para caspase 9). Os ensaios foram realizados de acordo com Lombardi *et al.* (2007), com algumas modificações. O meio de reação teve um volume final de 150  $\mu\text{L}$ , contendo 25  $\mu\text{g}$  de proteínas de extratos de tegumentos quiescentes ou em diferentes estágios de desenvolvimento (previamente quantificados por Bradford e liofilizados) e 75  $\mu\text{M}$  de substrato. Para simular o pH do citosol e do vacúolo, foram utilizados dois tampões de incubação diferentes: tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,6 contendo DTT 1 mM e 1% de albumina bovina ou tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 contendo DTT 1 mM e 1% de albumina bovina. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C e incubadas por 8 h. O produto derivado da hidrólise dos substratos (*p*-nitroanilida) foi determinado a partir da absorbância em 405 nm utilizando-se um leitor de microplacas. Uma curva-padrão foi feita, utilizando-se caspase 3 humana, para se estabelecerem valores de atividade referenciais, além de leituras-padrão de soluções contendo 5 e 10  $\mu\text{L}$  de *p*-nitroanilida livre (estoque de 1 mg/mL). Uma mistura de tampão de atividade e substrato foi utilizada como controle negativo. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma variação de 0,1  $A_{405} \text{ nm min}^{-1}$ , nas condições do ensaio. Uma vez detectadas atividades de famílias específicas de enzimas, os testes foram repetidos em presença de 75  $\mu\text{M}$  de inibidores, também específicos para as classes de enzimas acima discriminadas: Ac-DEVD-al (caspases 3/7), Ac-VEID-al (caspase 6), AC-IETD-al (caspase 8) e AC-LEHD-al (caspase 9). A análise estatística foi realizada como descrito no item 3.2.1. Todos os substratos e inibidores utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

### **3.3 - PARTE III: CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES ENVOLVIDOS NA MCP**

#### **3.3.1 - Desenho de iniciadores para actina, metacaspase e VPE**

Iniciadores para actina foram inicialmente desenhados utilizando-se o primerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e tomando-se por referência um gene para actina de soja e comparados com *Arabidopsis thaliana* (U60505.1) e *Medicago truncatula* (JQ028731.1). Os seguintes iniciadores foram obtidos: Forward 1 (actF1) – 5'-AGTAACTGGGATGACATGGA-3', Reverse 1

(actR1) – 5'-GCTTCCATTCCGATCAT-3', Reverse 2 (actR2) – 5'-ACCTTAATCTT CATGCTGCT-3'.

Iniciadores para metacaspases foram desenhados realizando-se uma busca por genes de metacaspases de *Arabidopsis* através do TAIR website (*The Arabidopsis Information Resource* - <http://www.arabidopsis.org/>) e verificando-se quais seriam expressos em sementes, utilizando para isso o site *Arabidopsis eFP browser* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Um BLASTn foi realizado (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para buscar a sequência com maior similaridade em soja (uma vez que esta é a leguminosa mais próxima de *Vigna* com sequências gênicas anotadas em bancos genômicos). Os alinhamentos das sequências de interesse foram realizados através do programa ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>), e desenhos dos iniciadores com o auxílio do primerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Também foi realizado um PCR *in silico* para verificar a eficiência dos iniciadores através do programa Amplify 3x. Com base em tal análise, a sequência para a metacaspase 4 foi a que melhor atendeu todas as condições pré-estabelecidas e, dessa forma, foram gerados os seguintes iniciadores para a metacaspase 4: Forward 1 (mcF1) – 5'-GAAACCGGAGAGGATGATGA-3', Forward 2 (mcF2) – 5'-GAGCAGATAGGAGAGAGCAC-3', Reverse 1 (mcR1) – 5'-ACATTCATGAACTTC TTCAC-3' e Reverse 2 (mcR2) – 5'-GCATTGCTAAAAGCTCCATAAGC-3'.

Iniciadores para VPE foram desenhados utilizando-se o primerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e tomando-se por base as sequências de  $\beta$ -VPE de soja (*Glycine max*, acesso NM\_001249635.1) uma vez que não foram encontradas sequências para  $\delta$ -VPE em soja, e comparando-se com sequências de  $\beta$ -VPE de *Medicago truncatula* (acesso MTR\_3g104120) e *Arabidopsis thaliana* (acesso At3g20210). Os seguintes pares de iniciadores para a  $\beta$ -VPE foram obtidos: Forward 1 (vpeF1) – 5'-ATGTTTATAAAGGAGTTCC-3', Forward 2 (vpeF2) – 5'-TGAAGTCTTGAAG AAAAAGCAT-3', Reverse 1 (vpeR1) – 5'-GTGAAATTATCATTAGCAGGAT-3', Reverse 2 (vpeR2) – 5'-CCTACATT GCAGATGTTTGCAA-3'.

### **3.3.2 - Extração do DNA de folhas de soja e *Vigna unguiculata***

Para verificar se os iniciadores para actina de feijão-de-corda amplificariam corretamente, foram extraídos DNAs genômico de folhas de soja e de *Vigna*, utilizando-se o kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep kit – Sigma. A extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o DNA extraído foi quantificado por leitura em Nanodrop (Thermo Scientific).

### **3.3.3 – PCR de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda e soja para teste dos iniciadores para actina, metacaspase e $\beta$ -VPE de feijão-de-corda**

Os pares de iniciadores desenhados para actina, metacaspase e  $\beta$ -VPE foram testados através da realização de um PCR, utilizando-se o DNA genômico de soja e de feijão-de-corda para verificar se a amplificação ocorreria corretamente. Para tal, os iniciadores foram diluídos para se obter uma solução de trabalho a 20 pmol/ $\mu$ L. Em cada tubo de reação foram adicionados 2  $\mu$ L de tampão NH<sub>4</sub> 10x; 0,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 10 mM de dNTPs; 0,1  $\mu$ L de Taq polimerase (5 U/ $\mu$ L) e 14,9  $\mu$ L de água destilada, 1  $\mu$ L da amostra; 0,5  $\mu$ L do iniciador forward e 0,5  $\mu$ L do iniciador reverse. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 min, 40 ciclos (95°C por 30 s; 55°C por 30 s; 72°C por 45 s), seguidas por uma extensão de 72°C, 7 min. Apenas os iniciadores da  $\beta$ -VPE foram submetidos a um maior tempo de alongação (2 min), por possuírem produtos de amplificação muito extensos. A tabela 1 mostra a temperatura de anelamento de cada iniciador utilizado e os tamanhos esperados dos produtos de amplificação. Os produtos do PCR foram eletroforéticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hypperladder IV, Bioline).

**Tabela 1:** Temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados e os tamanhos esperados de seus respectivos produtos de amplificação.

Pares de Iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho esperado dos produtos de amplificação em pares de bases (DNA genômico)	Tamanho esperado dos produtos de amplificação em pares de bases (cDNA)
actF1R1	48	813	584
actF1R2	50	987	758
mcF1R1	49	-	527
mcF1R2	53	-	821
mcF2R1	49	-	356
mcF2R2	54	-	650
vpeF1R1	48	2787	644
vpeF1R2	48	4237	1019
vpeF2R1	48	1444	423
vpeF2R2	48	2894	798

### 3.3.4 - Extração de RNA de folhas de feijão-de-corda e soja e síntese de cDNAs

Para verificar se a amplificação também ocorria em nível de produtos de transcrição, foram extraídos RNAs de 100 mg de folhas frescas de feijão-de-corda e soja utilizando-se o kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O tratamento com DNase foi realizado como indicado no kit. Após este processo, os RNAs recém-extraídos foram quantificados (Nanodrop) e usados para síntese de cDNAs. Para tal, foi utilizado o kit Super Script III First-Strand (Invitrogen). Foram adicionados em tubos de 0,5 mL: 5 µg do RNA extraído em 10 µL de água destilada, 1 µL de oligo dT 20 (50 µM) e 1 µL de dNTPs (10 mM), totalizando um volume de 12 µL. Os tubos foram incubados a 65°C por 5 min e colocados em gelo por 1 min. Posteriormente, foram adicionados aos tubos 8 µL da mistura de síntese de cDNA, que consiste de 2 µL de tampão RT 10x, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2 µL de DTT 0,1 mM, 1 µL de RNase OUT e 1 µL de Superscript III. Os tubos de reação foram agitados em vórtex e centrifugados e incubados em um termociclador a 50°C por 50 min, posteriormente sofrendo um aumento na temperatura para 85°C por 5 min. As amostras foram resfriadas no

gelo por 1 min e às mesmas foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de RNase H, sendo a mistura final incubada por 20 min a 37°C. As amostras então foram diluídas na proporção de 1:4 para serem utilizadas nos RT-PCR, para testes de expressão gênica.

### **3.3.5 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e soja utilizando-se os iniciadores para actina de *Vigna unguiculata***

Para se verificar se os iniciadores também amplificariam os produtos de transcrição, foi realizado um RT-PCR dos cDNAs sintetizados no item 3.3.4. As condições de amplificação foram as mesmas descritas no item 3.3.3. Os produtos do PCR foram eletroforeticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hyperladder IV, Bioline).

### **3.3.6 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja, utilizando-se iniciadores para actina e $\beta$ -VPE, e em gradientes de temperaturas de anelamento**

Um novo PCR foi realizado para verificar a amplificação de transcritos de folhas de soja de feijão-de-corda, utilizando-se os iniciadores para actina e  $\beta$ -VPE. Este PCR foi realizado em gradiente de temperatura, para se detectar a temperatura de anelamento ótima de cada par de iniciador utilizado. Em cada tubo de reação foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  de Tampão  $\text{NH}_4$  10x; 0,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 10 mM de dNTPs; 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e 14,9  $\mu\text{L}$  de água destilada, 0,5  $\mu\text{L}$  do iniciador forward e 0,5  $\mu\text{L}$  do iniciador reverse. As condições de amplificação foram: 94°C por 5 min, 40 ciclos (desnaturação: 94°C, 30 s; anelamento: 45°C, 47°C, 49°C, 51°C, 53°C ou 55°C por 30 s; alongação: 72°C, 1 min), seguidas por uma extensão de 72°C, 7 min. Os produtos do PCR foram eletroforeticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hyperladder IV, Bioline).

### **3.3.7 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se todos os iniciadores para metacaspase**

Um novo PCR foi realizado para verificar a amplificação de cDNAs de folhas de soja de feijão-de-corda por todos os pares de iniciadores desenhados para metacaspase. Em cada tubo de reação foram adicionados 2 µL de Tampão NH<sub>4</sub> 10x; 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 10 mM de dNTPs; 0,1 µL de Taq polimerase (5 U/µL) e 14,9 µL de água destilada, 0,5 µL do iniciador forward e 0,5 µL do iniciador reverse. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 min, 40 ciclos (desnaturação: 94°C, 30 s; anelamento: 49°C por 30 s; elongação: 72°C, 45 s), seguidas por uma extensão de 72°C, 7 min. Os produtos do PCR foram eletroforeticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hypperladder IV, Bioline).

### **3.3.8 – Sequenciamento dos produtos do PCR referentes à amplificação da metacaspase**

Para confirmar se a expressão da metacaspase em folhas de *Vigna* e soja pertenciam a metacaspase 4, os produtos do PCR para metacaspases referentes ao item 4.3.7 foram purificados e seqüenciados. Para tal 15 µL de tais amostras foram submetidas aos procedimentos instruídos pelo kit QIA quick PCR Purification (QIAGEN). As amostras foram então sujeitas ao sequenciamento, utilizando-se o equipamento 3730 DNA Analyzer (AB Applied Biosystems).

### **3.3.9 - Extração de RNA de tegumentos liofilizados, síntese de cDNA e PCR para verificar a expressão de genes de metacaspases, VPE e actina**

Tegumentos liofilizados (100 mg) de sementes colhidas nos tempos 10 DAP, 12 DAP e 20 DAP foram submetidos à extração de RNA utilizado-se o kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante, exceto pela adição de um volume maior de tampão de lise (650 µL de tampão RLT). Para a síntese de cDNA, foi utilizado todo o volume de RNA extraído das amostras (10 µL), e utilizado o kit Super Script III First-Strand (Invitrogen). Após a síntese de cDNAs, as amostras não diluídas foram submetidas a um PCR realizado de acordo com o item 3.3.3, com a diferença da adição de 2 µL de amostras, ao invés de 1 µL. Os iniciadores utilizados foram actF1R2, vpeF1R1 e mcF2R1. As

condições de amplificação foram: 94°C por 3 min, 40 ciclos (95°C, 30 s; 49°C, 30 s; 72°C, 1 min), seguidas por uma extensão de 72°C, 7 min. Os produtos do PCR foram eletroforeticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hyperladder IV, Bioline).

### **3.3.10 – Sequenciamento do produto de amplificação referente à expressão da metacaspase em tegumentos de 20DAP**

Como ocorreu a reamplificação dos produtos de PCR para metacaspase, a banda visível correspondente a expressão de metacaspase de 20DAP foi submetida a seqüenciamento, para confirmar se realmente se tratava de uma metacaspase. Para isso, foi utilizando o kit QIA quick PCR Purification (QIAGEN) e o produto da amplificação purificado foi sequênciado, utilizando-se o equipamento 3730 DNA Analyzer (AB Applied Biosystems).

### **3.3.11 - Desenho de iniciadores para cistatina**

Iniciadores para cistatina foram desenhados utilizando-se como base a seqüência de uma cistatina de cotilédones de *V. unguiculata* descrita por Fernandes *et al.* (1993). Os primeiros pares de iniciadores obtidos foram: Forward F1 (cysF1) - AGAGATCATGGCAGCACTCG, Forward F2 (cysF2) – CGTTGCTGTCCGAGAGATCA, Reverse 1 (cysR1) – TGCAGGTGCATCTCCAACAT, Reverse 2 (cysR2) – CCCACCATCTTTTGCCTCCA. Como os iniciadores acima amplificaram diferentes produtos e com tamanhos muito diferentes, novos iniciadores foram desenhados: Forward 3 (cysF3) – GCAGGAAACCAGAACAGCCT, Forward 4 (cysF4) – TGCCCTTCTGGAGTTGGAC, Reverse 3 (cysR3) - ATGCAGGTGCATCTCCAACA, Reverse 4 (cysR4) – TCCGTAGGCTTTTCACCTTCT.

### **3.3.12 – PCR de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda para teste de todos os iniciadores para cistatinas**

Para verificar se os iniciadores para cistatina amplificariam adequadamente, foram realizados PCRs, utilizando-se todos os iniciadores desenhados para cistatinas (cysF1, cysF2, cysF3, cysF4, cysR1, cysR2, cysR3, cysR4), de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda. O PCR foi realizado como

descrito no item 3.3.3. As condições de amplificação foram: 94°C por 3 min, 40 ciclos (95°C, 30 s; 53°C, 30 s; 72°C, 1 min), seguidas por uma extensão de 72°C, 7 min. Os produtos do PCR foram eletroforéticamente separados em um gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, e o tamanho dos produtos foram comparados com um DNA ladder (Hyperladder IV, Bioneer).

### **3.3.13 - Clonagem do produto do PCR para cistatina utilizando-se os pares de iniciadores específicos F3R3**

Como o seqüenciamento não mostrou nenhum resultado relevante, foi adotada a estratégia de clonar o produto do PCR de cerca de 1500 pb correspondente à amplificação da cistatina referente ao par de iniciadores cysF3R3, na tentativa de se obter um melhor produto de amplificação para possibilitar o seu seqüenciamento.

Para tal, foi utilizado o kit TOPO TA cloning, version R (Invitrogen). Todo o processo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente foi preparada uma mistura de reação de clonagem TOPO, que consiste na adição de 1 µL do produto do PCR, 1 µL de uma solução salina, 3 µL de água destilada estéril e 1 µL do vetor TOPO, totalizando 6 µL da mistura de reação de clonagem TOPO. Esta mistura foi incubada por 20 min a 23°C e colocada imediatamente no gelo. Após este processo, foi realizada a transformação de células competentes pela adição de 2 µL da mistura de reação de clonagem TOPO a um frasco contendo células competentes de *E. coli*, cuidadosamente misturadas e incubadas por 20 min no gelo. As células foram submetidas a um choque térmico por 30 s, a 42°C e sem agitação. Após esta etapa, o tubo foi imediatamente transferido para o gelo e adicionados, ao mesmo, 250 µL de meio LB estéril. Todas as etapas a partir de então foram realizadas em proximidade a chama de um bico de Bunsen, para evitar contaminação. Após a adição do meio LB estéril a solução foi incubada a 37°C por 1 h, sob constante agitação (300 rpm). Após este processo, foram adicionados 50 µL da solução de células em placas de Petri contendo meio seletivo (meio LB sólido contendo kanamicina a 50 µg/mL). Nestas placas também foram adicionados 40 µL de X-Gal, removidos de uma solução estoque de 40 mg/mL de dimetilformamida. As placas de Petri contendo as células transformantes foram incubadas por 12 h a 37°C, e as colônias, analisadas.

Colônias positivas deveriam ter a coloração azul claro ou branca, e as colônias negativas deveriam ser azul escuro.

Após este processo foram selecionadas três colônias positivas, que foram transferidas para erlenmeyers contendo 20 mL de meio LB líquido contendo kanamicina (50 µg/mL). As colônias foram incubadas por 12 h, a 37°C sob agitação e, posteriormente, as mesmas foram submetidas ao isolamento de plasmídios, utilizando-se o kit Plasmid minipreps (Promega), segundo as instruções do fabricante. Após o isolamento dos plasmídios das três colônias positivas, estes foram submetidos à digestão, adicionando-se em tubos 4 µL do DNA plasmidial, 2 µL do tampão para EcoR1 (10x, contendo BSA - Fermentas), 2 µL da enzima EcoR1 (10 U/ µL - Fermentas) e 12 µL de água mili-Q. Os tubos foram incubados a 37°C, por 2 h, e foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio para verificar se a digestão dos plasmídios foi eficiente.

Os tubos contendo os plasmídios digeridos foram então submetidos ao seqüenciamento de acordo como descrito no item 3.3.10.

### **3.3.14 - Preparo das amostras para a microdissecção a laser de camadas celulares dos tegumentos**

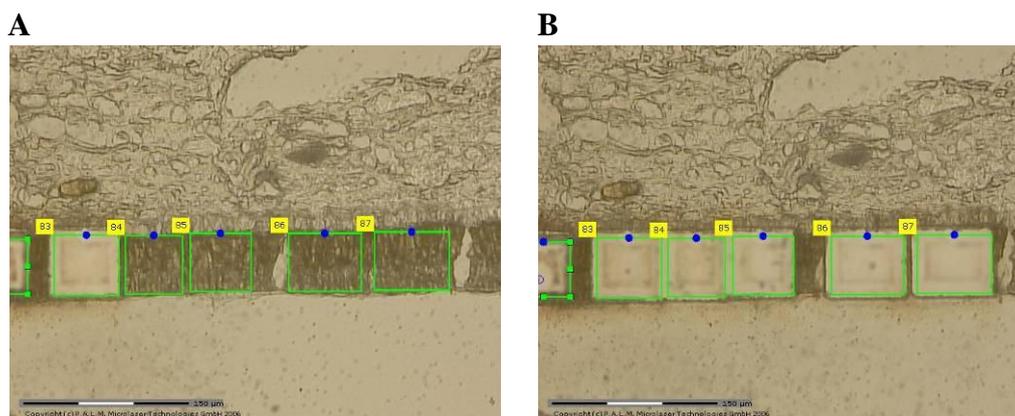
Para testar o melhor método para obtenção de cortes histológicos no criostato, sementes previamente fixadas foram utilizadas. Para minimizar a produção de cristais de gelo durante o congelamento, a solução fixadora foi substituída por uma solução de PBS 10 mM, pH 7,3, contendo 10% de sacarose e infiltradas com o auxílio de vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) por 10 min e colocadas por 24 h em câmara fria (4°C). Após este processo, as amostras receberam uma solução de PBS pH 7,3, contendo 15% de sacarose, submetidas a vácuo por 10 min e colocadas por 24 h em câmara fria (4°C). Posteriormente, as amostras receberam uma solução de PBS pH 7,3, contendo 35% de sacarose. As amostras foram submetidas a vácuo por 10 min e colocadas por 24 h em câmara fria (4°C). Finalmente, a solução de PBS/sacarose presente nas amostras foi substituída por uma solução de OCT (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek) + água destilada (1:1) e submetidas a vácuo por mais 10 min, a 4°C, por 24 h. Após esta etapa, as amostras foram colocadas em moldes e cobertas somente com o meio OCT e congeladas em bécker contendo isopentano

constantemente resfriado com nitrogênio líquido, e finalmente, congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para obtenção de cortes histológicos no criostato.

### **3.3.15 - Obtenção de cortes histológicos e coleta das camadas celulares a partir dos cortes histológicos de tegumentos de 8 DAP, 12 DAP e 18 DAP por microdissecção a laser**

Para o corte das amostras no criostato, as lâminas específicas (Membrane slide NF1.0 PEN - Zeiss) foram ativadas através da exposição à radiação UV por 3 min para eliminar a ação de possíveis RNAses. O interior do criostato (Leica CM3050S cryostat - Leica Microsystems) foi limpo com acetona e sua temperatura programada para  $-18^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram colocadas em seu interior por um período de 20 min, para que atingissem a temperatura ideal de corte. Cortes de  $10\ \mu\text{m}$  de espessura foram obtidos e dispostos nas lâminas. Após o processo, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 min para melhor adesão dos cortes histológicos. Para a remoção do OCT, as lâminas foram recolocadas no interior do criostato ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) e mergulhadas por 30 s em água Mili-Q tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e mais 30 s em etanol 70%. As amostras foram secas à temperatura ambiente e armazenadas em um recipiente contendo cristais de sílica, para impedir a entrada de umidade nos cortes histológicos até serem microdissecadas.

Para a microdissecção por captura a laser, foi utilizado o sistema PixCell II, que utiliza tubos de coleta CapSure HS LCM ((Arcturus, Mountain View, CA, USA). A força e o comprimento do feixe do laser utilizados foram 90-11-mW por 70 ms. Foram coletadas duas camadas dos tegumentos em desenvolvimento, a exotesta paliçádica e a mesotesta. Foram coletados, por amostra, no mínimo 800 cortes microdissecados com tamanhos aproximados de  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ . Os tubos contendo as amostras microdissecadas, foram congelados em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de RNA das amostras e análises posteriores (não mais que 3 dias). A figura 2 mostra camadas celulares de tegumentos de 12DAP, antes e após a microdissecção por captura a laser.



**Figura 2 -** Imagens de microdissecção por captura a laser de tegumentos de 12DAP (camada externa) de *V. unguiculata*. A: Regiões escuras indicando áreas selecionadas antes da microdissecção, B: Regiões claras indicando os cortes após a microdissecção. Escala 150µM.

### 3.3.16 – Extração de RNA e RT-PCR de cDNAs das camadas paliçádica e subepidérmica de tegumentos microdissecados de 8, 12 e 18 DAP

As camadas de tegumentos microdissecados de 8, 12 e 18 DAP foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNA utilizando-se o kit Message Booster™ cDNA Synthesis (Epicentre) para a síntese de cDNA a partir de RNA extraído das amostras e amplificado (aRNA).

Os cDNAs foram imediatamente submetidos a um RT-PCR de acordo como descrito no item 3.3.7.

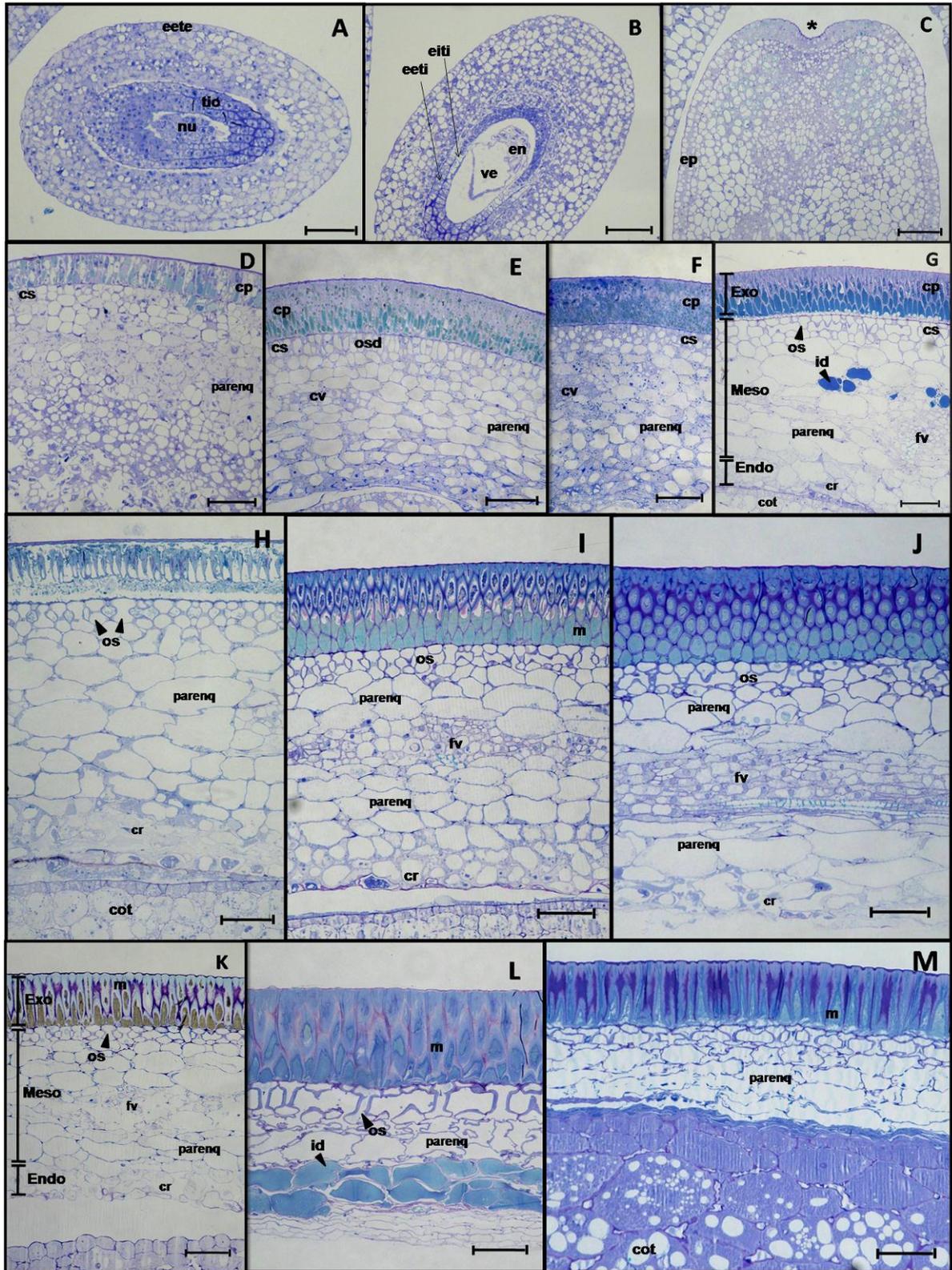
## 4.0 – RESULTADOS

### 4.1 - Parte I: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DO EVENTO DE MCP

#### 4.1.1 – Análise do processo de formação de tegumentos de sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*)

As imagens realizadas por microscopia óptica mostram o desenvolvimento do tegumento da semente de *V. unguiculata* (figura 3). A figura 3A mostra os tecidos do ovário de uma flor antes da ântese, sendo possível visualizar a epiderme externa do integumento externo do ovário (eete), com camadas de parênquima apresentando células em desenvolvimento e citoplasma denso e os integumentos internos do óvulo (tio) em desenvolvimento com o nucelo (nu) na porção central. Em ovários coletados no dia da ântese (figura 3B) foi possível observar a parede do ovário com células desenvolvidas e tegumentos externos (eeti) e internos (eiti) do óvulo em processo de diferenciação, o endosperma (en) sendo consumido e um vacúolo central (ve) presente nesta estrutura. Na figura 3C nota-se o início da diferenciação da semente, com 2 camadas de epiderme (ep) em processo de divisão e os outros tecidos ainda indiferenciados, algumas com vacúolos pequenos espalhados pelo citoplasma denso e outras em processo de expansão. No estágio de 4DAP, as células da epiderme estão se alongando e seus vacúolos corados com azul de toluidina. Neste estágio foi possível visualizar a diferenciação da camada paliçádica (cp). A camada subepidérmica (cs) inicia a sua diferenciação em osteoesclerídeos (células em formato de ampulheta, importantes para a estrutura do tegumento), e abaixo desta, inúmeras camadas de células parenquimáticas (parenq) em diferenciação (figura 3D). Na figura 3E e 3F (8DAP e 10DAP, respectivamente), nota-se a organização da camada subepidérmica (cs) e do parênquima (parenq). A camada subepidérmica e o parênquima situado logo abaixo dela apresentam origem em comum. No parênquima, foi possível visualizar a diferenciação das células vasculares (fv), e as camadas mais internas do tegumento apresentando suas células pequenas, osteosclerídeos, em divisão e com citoplasma bastante denso (osd). Na figura 3G (12 DAP), foi possível definir as três camadas do tegumento: a exotesta (exo), camada mais externa formada por uma camada de células em paliçada (cp),

chamadas macroesclereídeos (m), cujas paredes são espessadas desigualmente; a mesotesta (meso), formada pela camada subepidérmica com células em ampulheta, ou osteoesclereídeos (os), e várias camadas de tecido parenquimático (parenq), contendo feixes vasculares diferenciados (fv) e idioblastos (id); e a endotesta (endo), formada por células ramificadas (cr) semelhantes estruturalmente ao parênquima lacunoso. A partir de 14 DAP a 18 DAP (figura 3H, I e J) a semente começou a aumentar em tamanho significativamente, e notou-se o acúmulo de substâncias na camada paliçádica, o aumento do volume das células do parênquima e a presença de células ramificadas completamente diferenciadas abaixo da camada parenquimática. No estágio de 16 DAP e 18 DAP (3I e 3J, respectivamente) as células parenquimáticas ganham maior volume. Em 20 DAP (figura 3K), quando se inicia a perda de água da semente, os feixes vasculares começaram a degenerar e em 22 DAP (figura 3L) a aparência do tegumento modificou-se drasticamente. Neste estágio as camadas celulares do tegumento estão achatadas devido à perda de água. As células da camada paliçádica mostraram-se bastante espessas e a parede celular das células do parênquima, bastante irregulares. A partir deste estágio não foram mais visíveis tecidos condutores e a porção basal da mesotesta mostrou-se repleta de idioblastos. Em 24 DAP (figura 3M), o tegumento estava colapsado e os cotilédones repletos de amido, componente principal de reserva da semente.



**Figura 3 – Desenvolvimento do tegumento de sementes de *Vigna unguiculata*.** (A) ovário imaturo, (B) Ovário maduro, (C) 2 DAP, (D) 4 DAP, (E) 8 DAP, (F) 10 DAP, (G) 12 DAP, (H) 14 DAP, (I) 16 DAP, (J) 18 DAP, (K) 20 DAP, (L) 22 DAP, (M) 24 DAP. Legendas: cot – cotilédone, cp – camada paliçádica, cs – camada subepidérmica, cr – células ramificadas, eete – epideme externa do tegumento externo, eeti – epiderme externe do tegumento interno, eiti – epiderme interna do tegumento interno, en – endosperma nuclear, Endo – endotesta, ep – epiderme, cv – células vasculares, fv – feixe vascular, Exo – exotesta, id – idioblastos, m – macrosclereídeos, nu – nucléo, os – osteosclereídeos, parenq – parênquima, Meso – mesotesta, osd – osteoesclereídeos em diferenciação, tio – tegumento interno do óvulo, ve – vacuolo do endosperma, \* - zona de união ao funículo. Escala: 50µm.

#### **4.1.2 – Análise subcelular dos eventos de MCP de tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento**

Para analisar as modificações ultraestruturais decorrentes da MCP, tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em tegumentos de 4 DAP (figura 4A) foi possível observar a camada paliçádica diferenciada e em processo de expansão, apresentando muitos vacúolos (V) de diferentes tamanhos não contendo substâncias osmiofílicas. Os núcleos (N) apresentaram-se íntegros, sem cromatina condensada e a parede celular (PC), ainda delgada neste estágio do desenvolvimento. As células da camada parenquimática apresentavam um vacúolo central (V) grande e citoplasma com suas organelas dispostas na periferia, com mitocôndrias (M) e plastídeos (P) bem desenvolvidos (figura 4B).

Em 8 DAP, a camada paliçádica e a camada parenquimática apresentaram integridade celular e características ultraestruturais similares (figuras 4C e 4D). O citoplasma apresentou mitocôndrias globulares com cristas bem desenvolvidas, plastídeos globóides com estroma denso e membranas tilacóides bem desenvolvidas, com algumas contendo grãos de amido. Outras organelas, como o retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi (CG) e vacúolos, estavam dispersas no citoplasma (figura 4C e 4D). Na camada paliçádica, os vacúolos começam a acumular substâncias osmiofílicas, porém o mesmo não é observado na camada parenquimática (dados não mostrados). O núcleo permanece intacto, com membranas nucleares bem preservadas e pouca heterocromatina visível (figura 4C e 4D).

Em 10 DAP, a camada paliçádica começou a se desorganizar (figura 4E e 4F). As membranas nucleares ainda estavam conservadas, porém com a cromatina em seu interior começando a condensar (CC). Vacúolos de diferentes tamanhos repletos de substâncias osmiofílicas foram observados com maior frequência, as mitocôndrias ainda permaneceram íntegras, com cristas bem definidas (figura 4E) e plastídeos globulares e amebóides presentes (dados não mostrados). O complexo de Golgi foi observado em menor intensidade e o retículo endoplasmático rugoso foi observado fragmentado. Na camada parenquimática (figura 4F), as células apresentaram características similares às das células parenquimáticas de 8 DAP. As células da camada subepidérmica (figura 4M) apresentaram osteoesclereídeos diferenciados, com mitocôndrias bem

desenvolvidas e abundantes plastídeos com grãos de amido em seu interior e dois vacúolos grandes sem substâncias osmiofílicas acumuladas.

De 12 a 16 DAP, as células começaram a aumentar de tamanho rapidamente. Em 16 DAP, modificações críticas ocorreram na camada paliçádica (figura 4G), as organelas estavam indistinguíveis, com exceção do vacúolo e do núcleo. Os vacúolos ocupavam a maior parte do volume da célula e estão repletos de substâncias osmiofílicas. O núcleo apresentou-se completamente desorganizado, com cromatina condensada e perda da integridade do envelope nuclear. Na camada parenquimática e subepidérmica (figuras 4H e 4N, respectivamente), a membrana nuclear apresentou-se em boas condições, porém com cromatina condensada em seu interior. No citoplasma, as mitocôndrias apresentavam cristas desorganizadas e plastídeos amebóides com as membranas tilacóides desorganizadas e sem grãos de amido em seu interior. Um grande vacúolo sem substâncias osmiofílicas ocupava quase todo o volume celular. Em 20 DAP, a aparência do tegumento modificou-se drasticamente (figura 4I e 4J). Neste estágio a semente começa a sofrer perdas de água significativas. As paredes celulares (PC) dos macroesclereídeos encontrados na camada paliçádica mostraram-se mais espessas, com a maioria das organelas rompidas e um grande vacúolo escuro visível no citoplasma (figura 4I). Na camada subepidérmica (figura 4J) os tecidos vasculares não estavam mais presentes, o núcleo remanescente encontrava-se completamente desorganizado, com cromatina altamente desorganizada e material membranar indefinido espalhado pelo citoplasma. As organelas desapareceram neste estágio. Em 24 DAP, as camadas dos tegumentos mostraram-se achatadas e colapsadas, e apenas restos celulares (RC) foram encontrados em todas as camadas (figuras 4K, 4L e 4O).

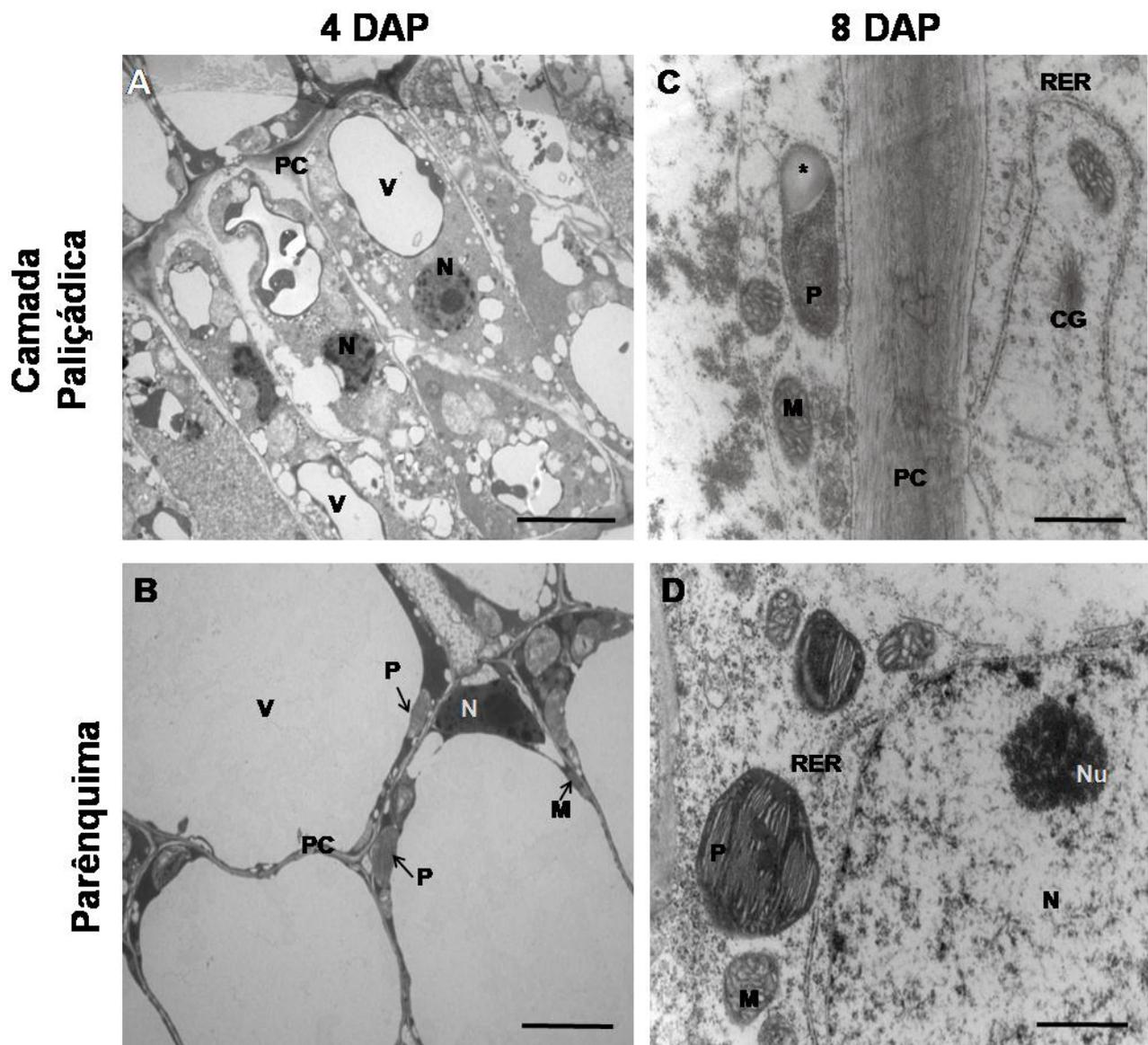
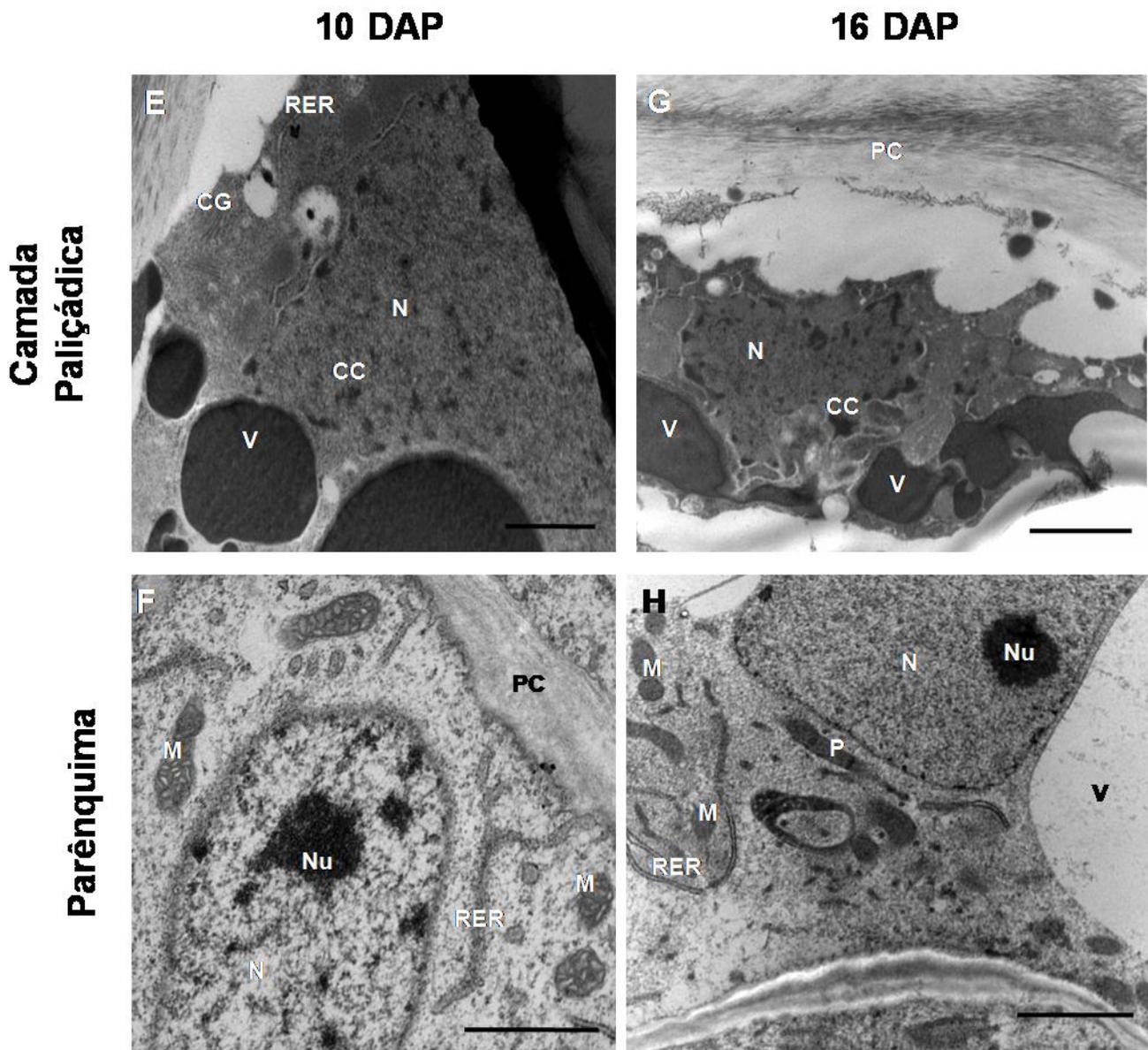
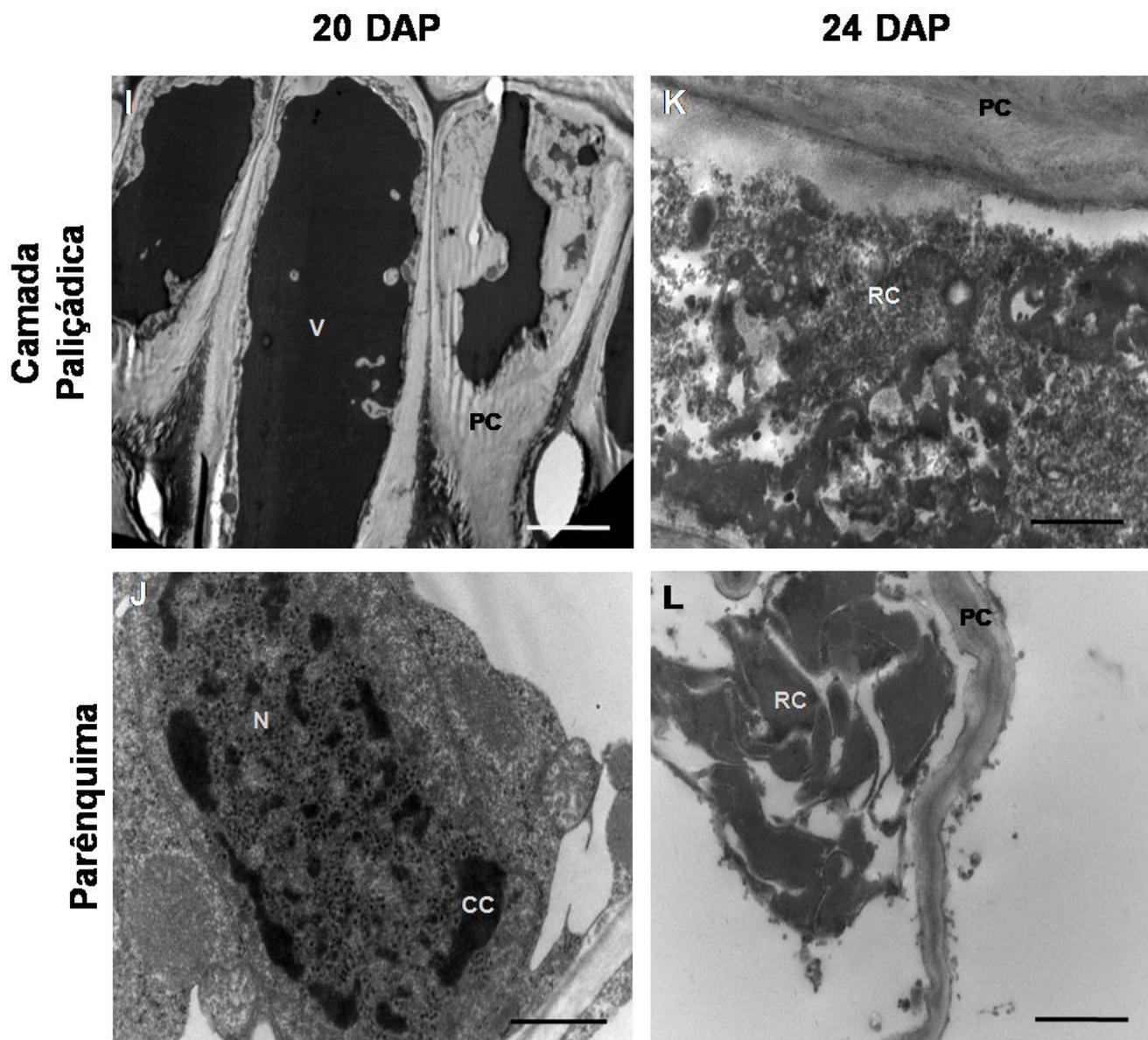


Figura 4 (Parte 1 de 4) – Análise do desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata* por microscopia eletrônica de transmissão. Abreviações: CG: complexo de Golgi, M – mitocôndria, N – núcleo, Nu – nucléolo, P – Plastídeos, PC - parede celular, RER - retículo endoplasmático rugoso, V – vacúolo, (\*) – grão de amido. Escala: 5 μM para A e B; 1 μM para C e D.



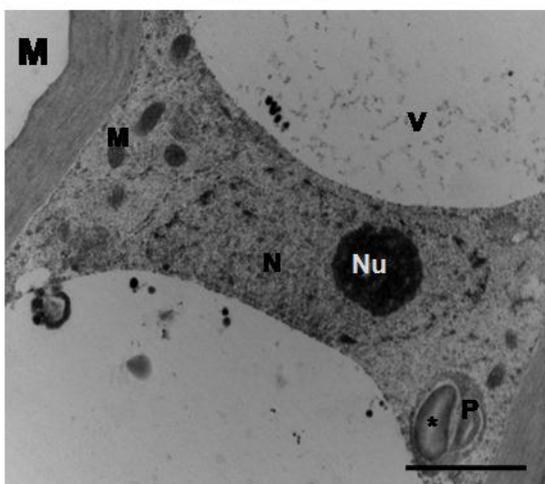
**Figura 4 (Parte 2 de 4) – Análise do desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata* por microscopia eletrônica de transmissão.** Abreviações: CC - cromatina condensada, CG: complexo de Golgi, M – mitocôndria, N – núcleo, Nu – nucléolo, P – Plastídeos, PC - parede celular, RER -retículo endoplasmático rugoso, V – vacúolo. Escala: 1  $\mu$ M para E, 5  $\mu$ M para F; 2 $\mu$ M para G e H.



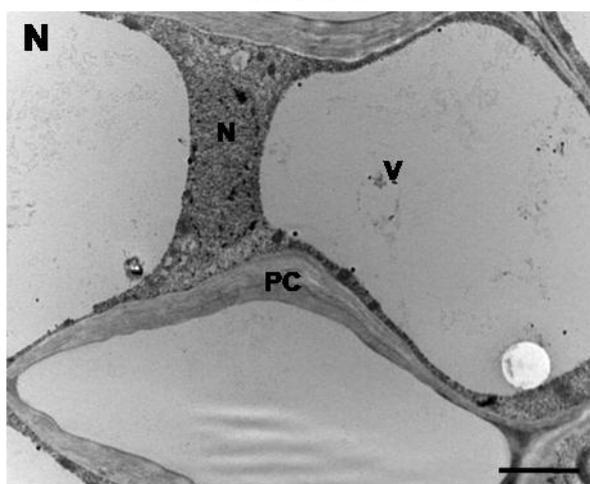
**Figura 4 (Parte 3 de 4) – Análise do desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata* por microscopia eletrônica de transmissão. Abreviações: CC - cromatina condensada, N – núcleo, PC - parede celular, RC - restos celulares, V – vacúolo. Escala: 5  $\mu$ M para I; 2 $\mu$ M para J; 1  $\mu$ M para K e L.**

## Osteoesclereídeos

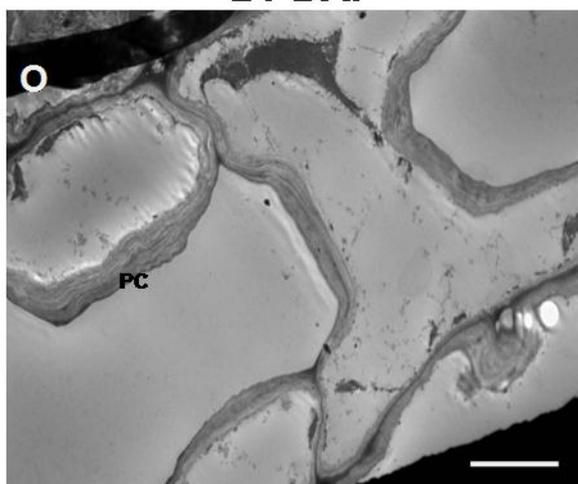
10 DAP



16 DAP



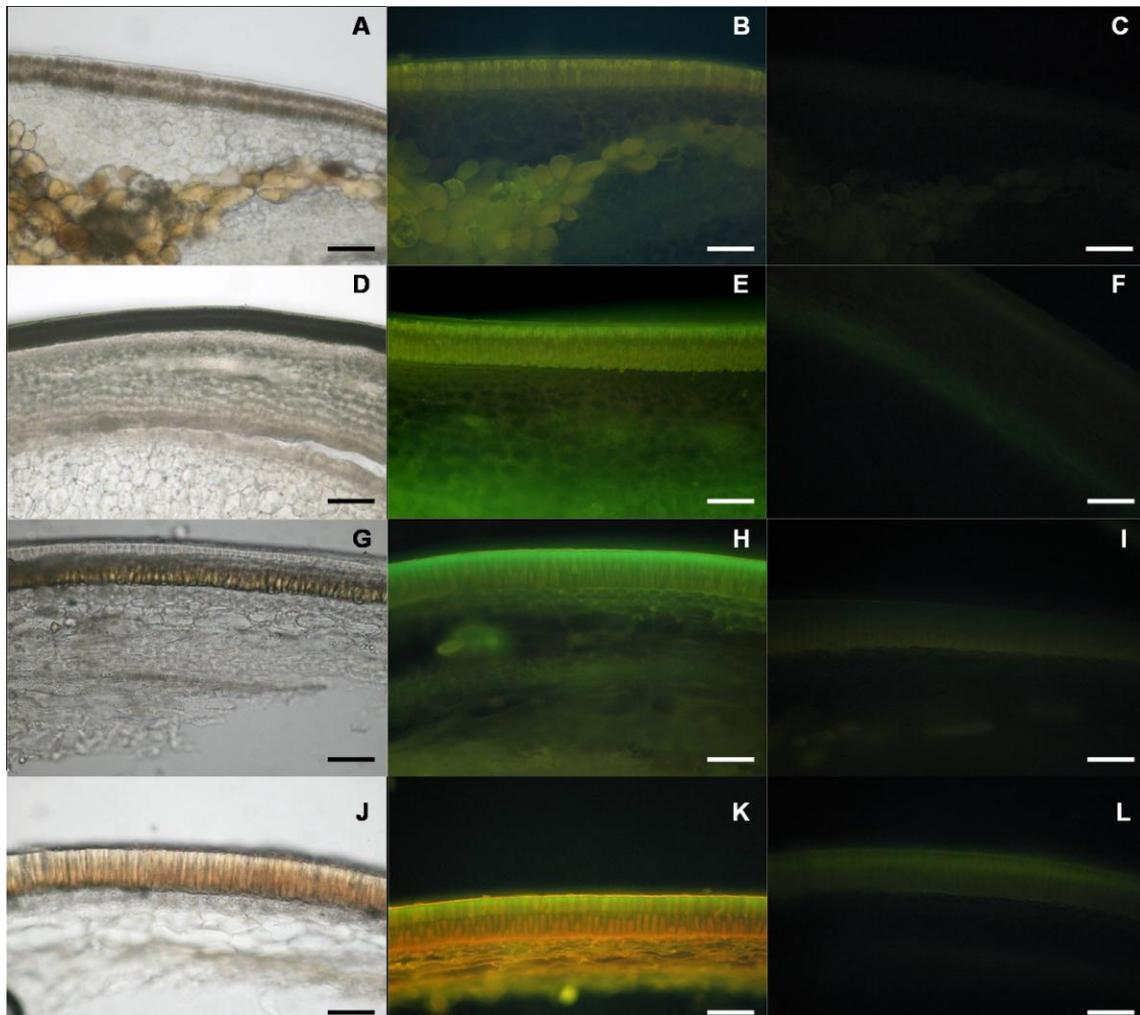
24 DAP



**Figura 4 (Parte 4 de 4) – Análise do desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata* por microscopia eletrônica de transmissão.** Abreviações: CC - cromatina condensada, CG: complexo de Golgi, M – mitocôndria, N – núcleo, Nu – nucléolo, P – Plastídeos, PC - parede celular, V – vacúolo, (\*) – grão de amido. Escala: 2 $\mu$ M para M; 5  $\mu$ M para N e O.

#### **4.1.3 – Testes de integridade de membranas de tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento**

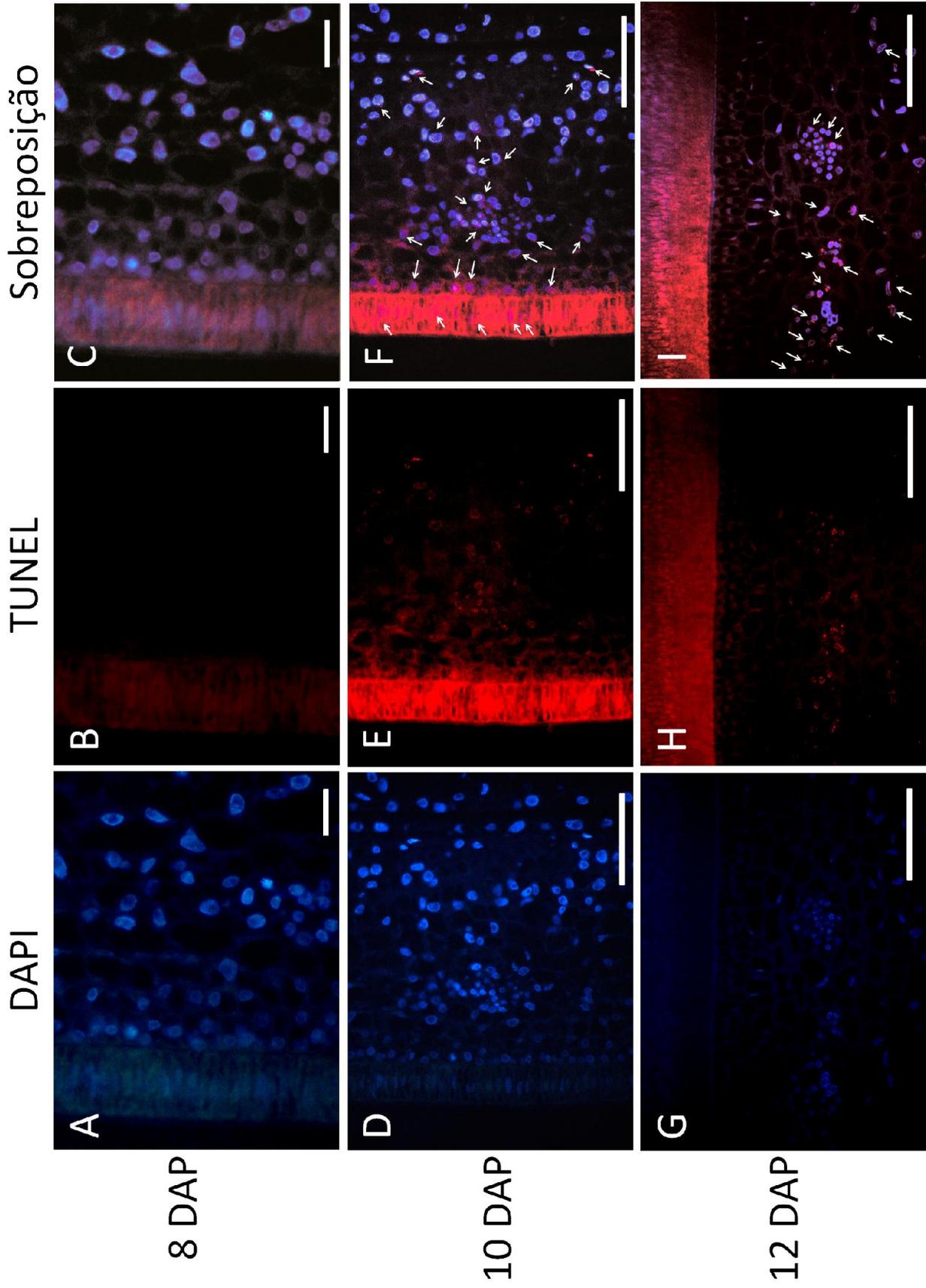
Para visualizar a viabilidade das células e a integridade das membranas em diferentes estágios de desenvolvimento do tegumento, sementes em diferentes estágios de desenvolvimento fixadas foram cortadas à mão livre para aplicação de uma mistura de brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA). É possível observar que os tegumentos jovens de sementes de 4 DAP, 10 DAP e 16 DAP (figura 5B, 5E, 5H, respectivamente) apresentaram suas células viáveis, com membranas íntegras, coradas em verde, como reflexo da entrada do corante vital laranja de acridina. Já no tempo de 22DAP, todas as camadas do tegumento apresentaram células coradas em laranja, mostrando a perda da integridade de suas membranas, permitindo a entrada do brometo de etídio (figura 5K). Uma fraca auto-fluorescência foi observada nos controles (figura 5A, 5D, 5G e 5J).

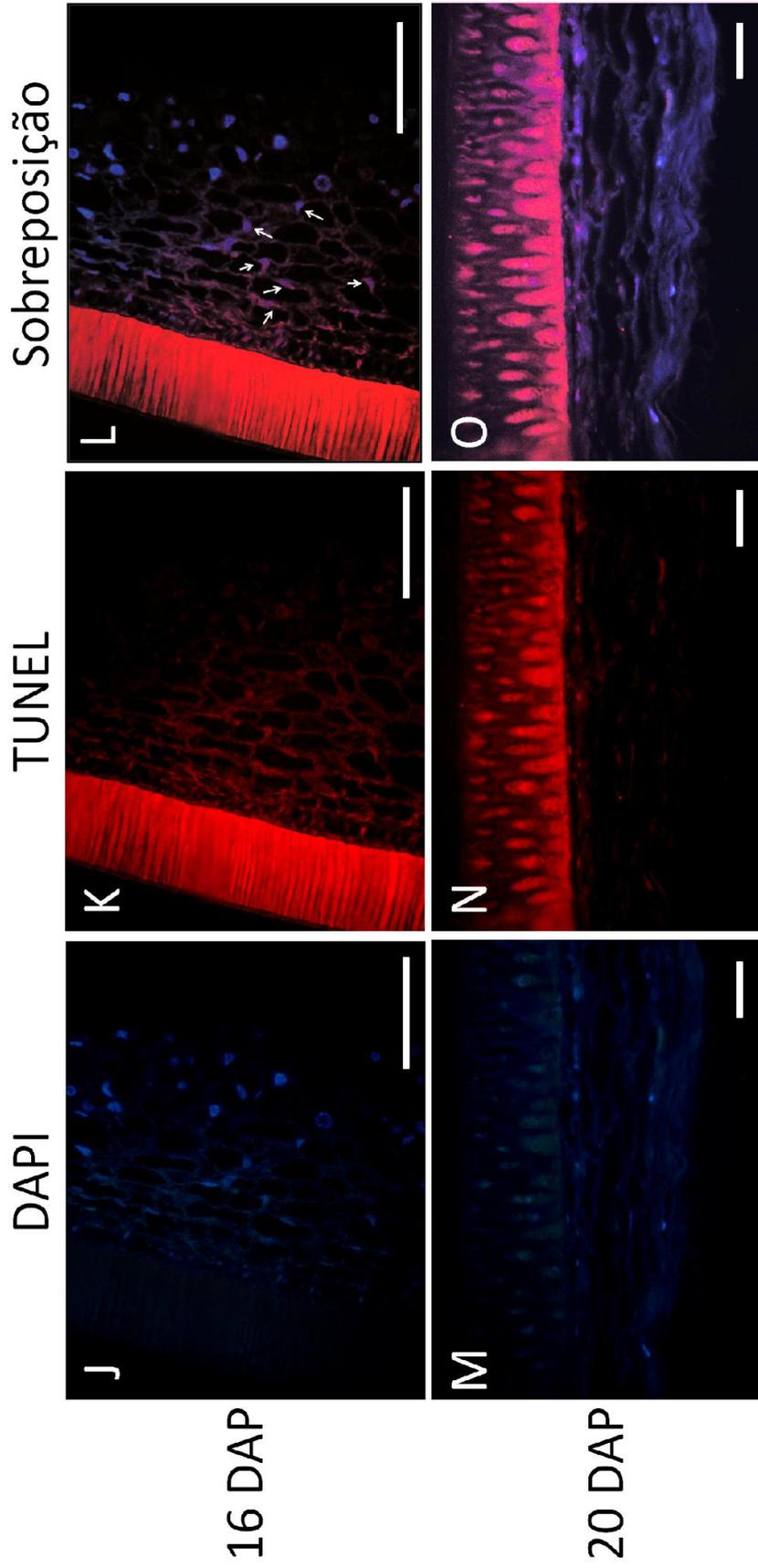


**Figura 5 – Testes de integridade de membranas em tegumentos de *V. unguiculata* em desenvolvimento.** Figuras A, D, G e J: Tegumentos de 4 DAP, 10 DAP, 16 DAP e 22 DAP em microscopia óptica, respectivamente. Figuras B, E, H e K: Tegumentos de 4 DAP, 10 DAP, 16 DAP e 22 DAP em microscopia de fluorescência, respectivamente. Figuras C, F, I e L: Controle negativo de tegumentos de 4 DAP, 10 DAP, 16 DAP e 22 DAP, respectivamente. Escala: 50  $\mu$ M.

#### **4.1.4 – Análise *in situ* (TUNEL) da fragmentação do DNA nos tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento**

A análise da fragmentação do DNA foi realizada em cortes histológicos de sementes incluídas em historesina. A figura 6 mostra cortes histológicos dos tegumentos de sementes de 8 DAP, na presença de DAPI (fig. 6A), após o ensaio TUNEL (fig. 6B) e estas mesmas imagens quando sobrepostas (fig. 6C). Não foram observados núcleos TUNEL-positivos neste estágio do desenvolvimento, o que nos indica que a fragmentação do DNA ainda não estava presente. No estágio subsequente (10 DAP), todas as camadas celulares do tegumento apresentaram núcleos TUNEL-positivos (figuras 6D, 6E, 6F), uma das características diagnósticas da ocorrência de morte celular programada. Em 12 DAP, a fragmentação do DNA foi observada apenas na meso- e endotesta (6G, 6H e 6I), mas não mais na exotesta desta camada, onde apenas a autofluorescência foi visível (figura 6H). Nos tegumentos de 16 DAP (figura 6J, 6K e 6L), o mesmo padrão foi visível, porém com menor intensidade da fluorescência de núcleos TUNEL-positivos. No estágio de 20 DAP (figuras 6M, 6N e 6O) foi possível observar a ausência de núcleos TUNEL-positivos.





**Figura 6 – Coloração por DAPI, ensaio TUNEL e sobreposição das imagens de tegumentos de *V. unguiculata* em desenvolvimento.** Figuras A, B e C: DAPI, TUNEL e sobreposição das imagens de 8 DAP respectivamente; figuras D, E e F: DAPI, TUNEL e sobreposição das imagens de 10 DAP respectivamente; figuras G, H e I: DAPI, TUNEL e sobreposição das imagens de 12 DAP respectivamente; figuras J, K e L: DAPI, TUNEL e sobreposição das imagens de 16 DAP respectivamente; figuras M, N e O: DAPI, TUNEL e sobreposição das imagens de 20 DAP respectivamente. Setas indicam núcleos TUNEL-positivos em sobreposição com coloração por DAPI. Escala: 25  $\mu\text{m}$  for A, B, C, M, N e O; 50  $\mu\text{m}$  – para as demais imagens.

## 4.2 - Parte II: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO EVENTO DE MCP

### 4.2.1 - Análise da fragmentação do DNA através da detecção de oligonucleossomos em tegumentos de *Vigna unguiculata* durante o desenvolvimento

Utilizando o kit Cell Death Detectionp ELISA (Roche Applied Science - version 10.0), foi possível observar o aumento do enriquecimento oligonucleossomal no citoplasma ao longo do desenvolvimento do tegumento, sendo o valor máximo encontrado em 22 DAP (figura 7), indicando que neste estágio o DNA encontra-se bastante degradado. Em tegumentos de 24 DAP e quiescentes, ocorre uma diminuição nestes valores, sugerindo o avançado colapso celular nestes estágios. A análise de variância mostrou diferenças significativas ( $P < 0,0001$ ) entre a maioria dos estágios do desenvolvimento, exceto entre 14 DAP, 16 DAP, 18 DAP e 24 DAP, e entre 14 DAP e QUI.

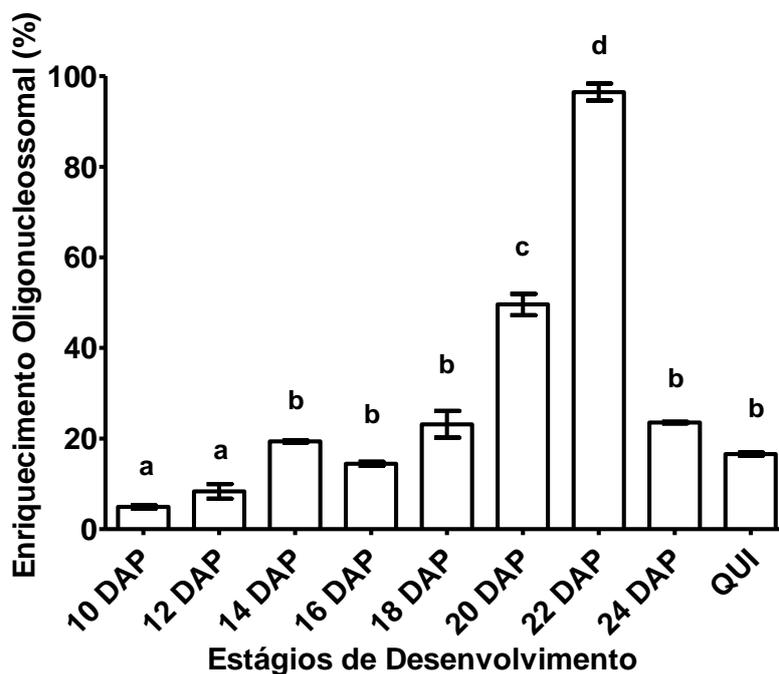


Figura 7 – Enriquecimento de DNA oligonucleossomal fragmentado em frações citoplasmáticas de tegumentos de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento. Os níveis de fragmentação foram determinados utilizando-se o kit Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics) e expressos como correspondente enriquecimento oligonucleossomal, considerando como 100% o resultado obtido do controle positivo fornecido pelo kit. Os valores mostrados representam as médias ( $\pm$  Erro Padrão da Média) para três replicatas e letras diferentes representam resultados estatísticos significativamente diferentes.

#### **4.2.2 - Análise da liberação do citocromo C pelas mitocôndrias**

Frações mitocondriais e citosólicas isoladas de tegumentos de *Vigna unguiculata* em diferentes estágios do desenvolvimento foram incubadas com anticorpo anti-citocromo C produzido em cabra. Nas frações citosólicas, a análise por ELISA mostrou liberação de citocromo C a partir de 10 DAP, indicando que este processo ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento (figura 8A). Nestas frações, os níveis de citocromo C de 10 a 18 DAP foram significativamente diferentes dos níveis em 20 e 22 DAP ( $P < 0,0001$ ). Nas frações mitocondriais (figura 8B) foi possível detectar menores quantidades de citocromo C do que nas frações citosólicas (figura 8A). Estágios anteriores a 10 DAP não puderam ser mostrados devido ao tamanho reduzido da semente, não sendo possível separar o tegumento dos cotilédones e do eixo embrionário. Para testar se o processo de homogeneização dos tecidos havia rompido a membrana mitocondrial externa e ocasionado a liberação acidental de citocromo C no citoplasma, foram realizados testes para atividade da citocromo C oxidase nas frações citosólicas e mitocondriais (tabela 2). A atividade da enzima foi fracamente detectada nas frações citosólicas, demonstrando a integridade das mitocôndrias isoladas e a ausência da contaminação mitocondrial no citosol.

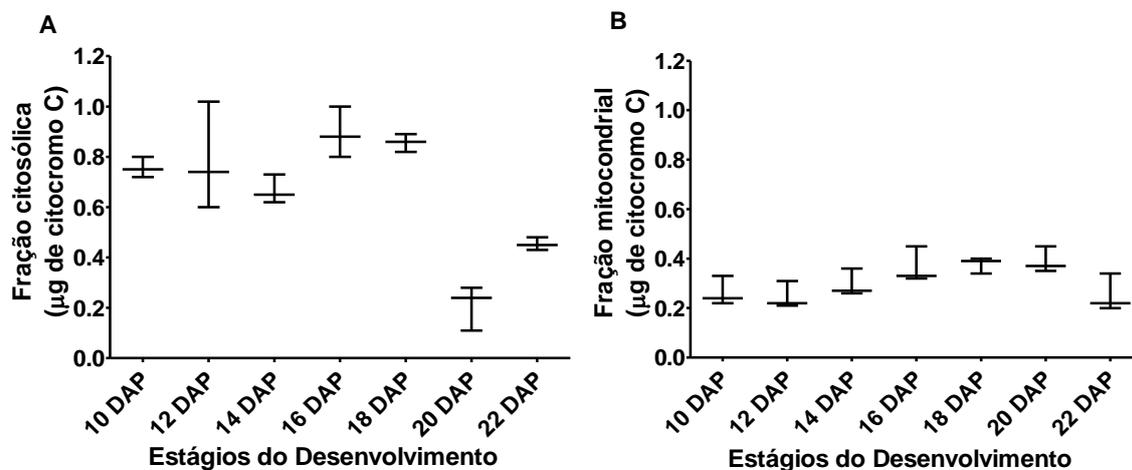


Figura 8 – Imunodeteção do citocromo C em frações citosólicas (A) e mitocondriais (B) de tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata* em desenvolvimento.

**Tabela 2:** Atividade da citocromo C oxidase (U/mL) em frações citosólicas e mitocondriais em tegumentos em desenvolvimento de sementes de *Vigna unguiculata*.

Atividade da citocromo C oxidase (U/mL)							
	10 DAP	12 DAP	14 DAP	16 DAP	18 DAP	20 DAP	22 DAP
<b>Mitocôndria</b>	0,34	0,28	0,27	0,54	0,43	0,59	0,63
<b>Citosol</b>	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02	0,05	0,04

### 4.2.3 – Quantificação protéica

A figura 9 apresenta os teores de proteína contidos em extratos de tegumentos de sementes em diferentes dias após a polinização. É possível notar que o estágio de 12DAP apresentou os níveis protéicos mais elevados, cerca de 1,5  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de farinha. Após este estágio, os níveis de proteína dos tegumentos ao longo do processo de desenvolvimento decresceram, seguidos por um aumento entre 22 e 24 DAP, e logo depois deste período, as taxas protéicas sofreram uma nova queda, alcançando cerca de 0,3  $\mu\text{g}$  de proteína/mg de farinha de tegumentos em sementes quiescentes.

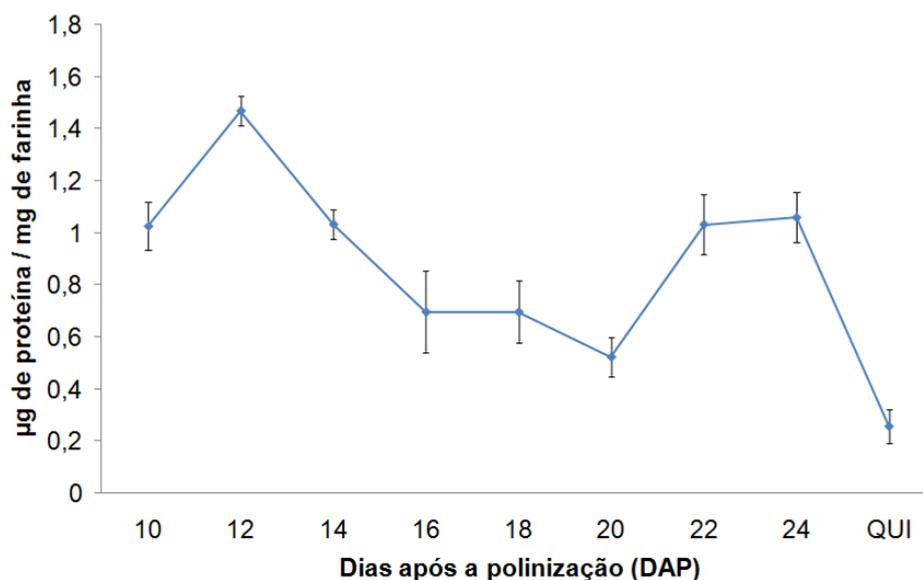


Figura 9 – Quantificação protéica (Bradford, 1976) de tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata* ao longo do seu desenvolvimento.

#### 4.2.4 – Acompanhamento por SDS-PAGE do perfil protéico de extratos de tegumentos ao longo do desenvolvimento

Os extratos de tegumentos de *V. unguiculata* em diferentes estágios de desenvolvimento foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), sob condições semi-desnaturantes para a visualização do perfil protéico. As proteínas eletroforeticamente separadas de acordo com suas massas moleculares foram visualizadas após o gel ser corado com Coomassie Brilliant Blue (figura 10).

Não foi possível visualizar bandas protéicas no gel, apenas alguns rastros de migração protéica, sem resolução; proteínas específicas não puderam ser visualizadas.



Figura 10 - Perfis protéicos visualizados por SDS-PAGE de extratos de tegumentos de *V. unguiculata* em desenvolvimento.

#### **4.2.5 – Visualização zimográfica da atividade de proteases cisteínicas em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento**

A figura 11 apresenta os zimogramas de atividades gelatinolíticas de proteinases cisteínicas de extratos de tegumentos de *V. unguiculata* em diferentes estágios de desenvolvimento, em pHs 5,6 (A) e 7,4 (B).

No zimograma referente à incubação em pH 5,6 (figura 11A) é possível observar uma banda de atividade principal de cerca de 116 kDa (seta aberta), que apresentou um aumento na sua atividade à medida que a semente avança o seu desenvolvimento até 20 DAP. Em 22 DAP e 24 DAP esta banda apresentou sua atividade bastante reduzida, retornando a aumentar no estágio quiescente. Também foi observada outra banda minoritária, de cerca de 55 kDa (setas fechadas), que apareceu nos estágios avançados de desenvolvimento, em 20 DAP e 22 DAP.

No zimograma referente à incubação em pH 7,4 (figura 11B) é possível observar o mesmo perfil da banda de atividade de cerca de 116 kDa (seta aberta), porém em uma intensidade menor que no zimograma da incubação em pH ácido.

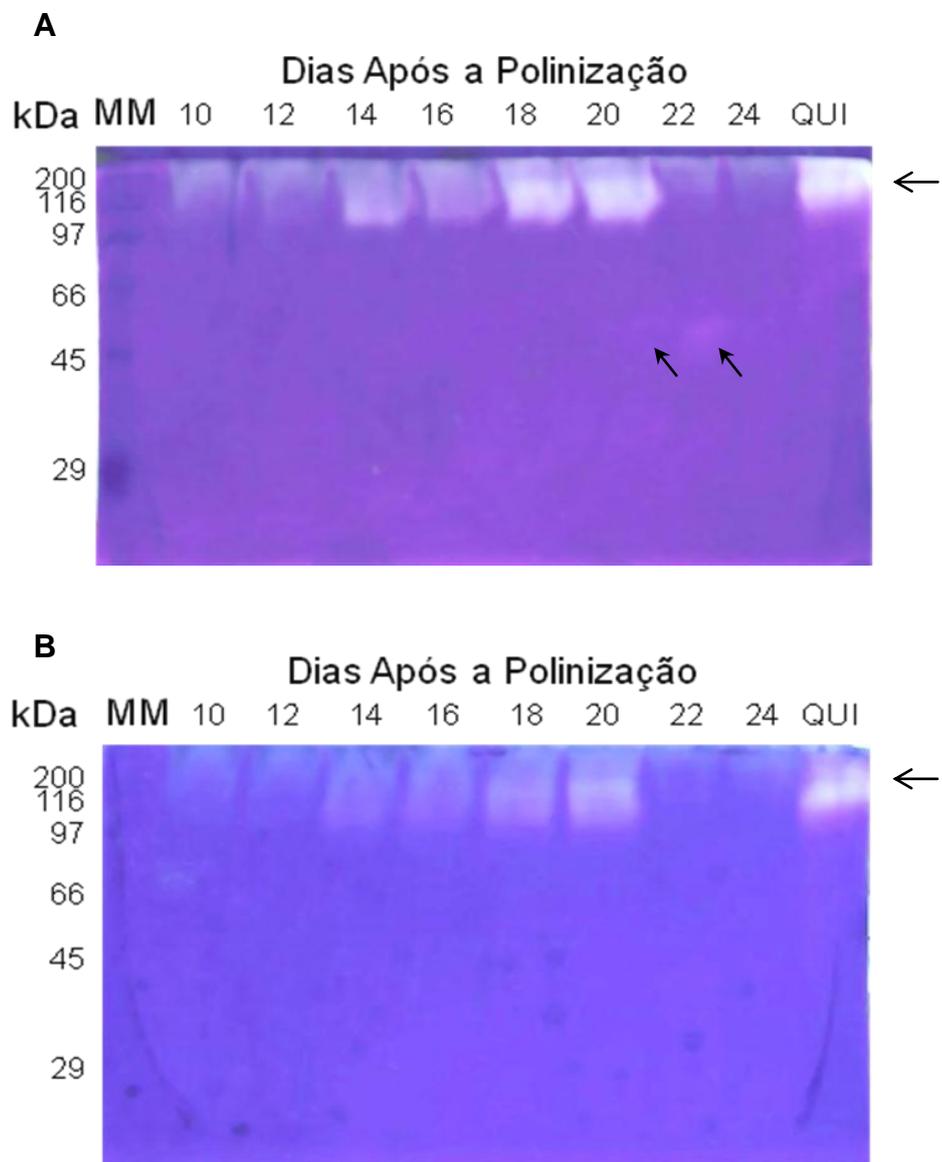


Figura 11 – Zimogramas de extratos tegumentos de *V. unguiculata* em desenvolvimento incubados em pH 5,6 (A) e 7,4 (B). Setas apontam as bandas de atividade citadas no texto.

#### **4.2.6 – Detecção das atividades de proteinases cisteínicas caspase-símile em tegumentos quiescentes e em desenvolvimento de *V. unguiculata*, na presença e ausência de inibidores específicos**

Após a detecção de atividades proteolíticas por zimografia, extratos protéicos de tegumentos das sementes foram avaliados para a presença de proteinases cisteínicas do tipo caspase-símile, usando-se os substratos colorimétricos Ac-DEVD-pNa (específico para caspase 3/7), Ac-VEID-pNA (específico para caspase 6), Ac-IETD-pNA (específico para caspase 8) e Ac-LEHD-pNA (específico para caspase 9). Uma vez detectadas atividades de famílias específicas de enzimas, os testes foram repetidos em presença de 75 mM de inibidores também específicos para as classes de enzimas determinadas: Ac-DEVD-al, Ac-VEID-al, AC-IETD-al e Ac-LEHD-al.

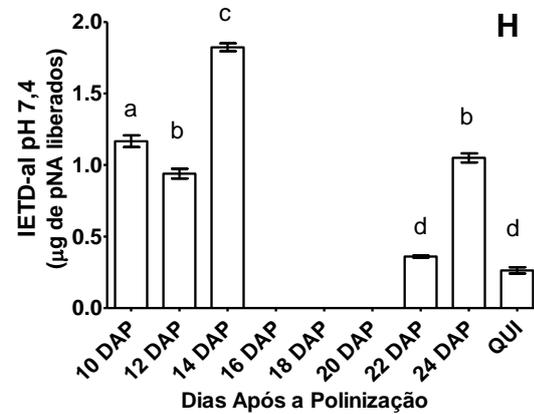
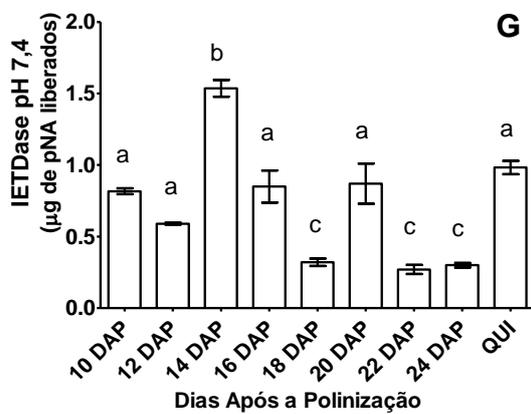
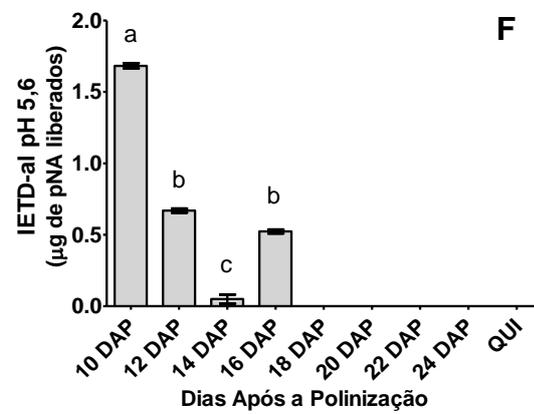
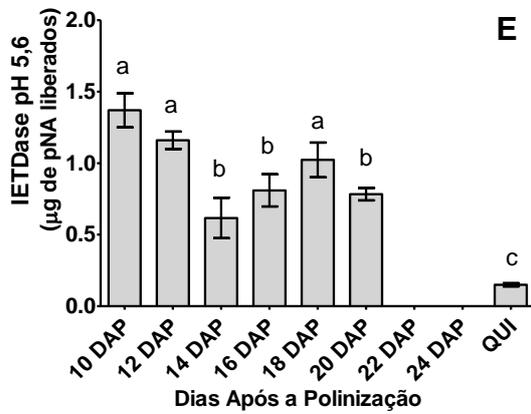
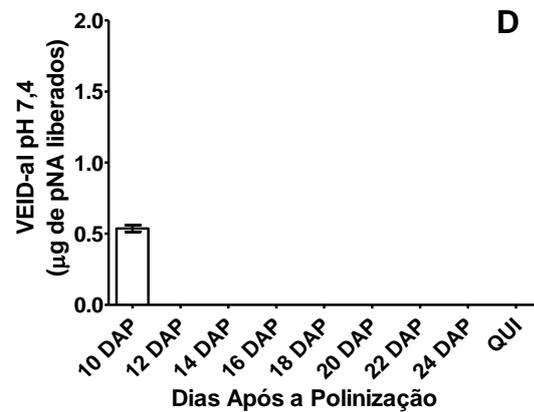
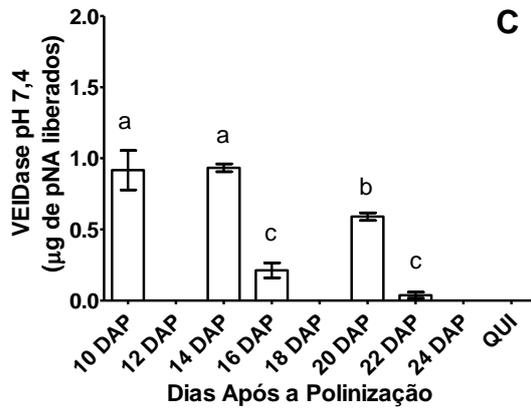
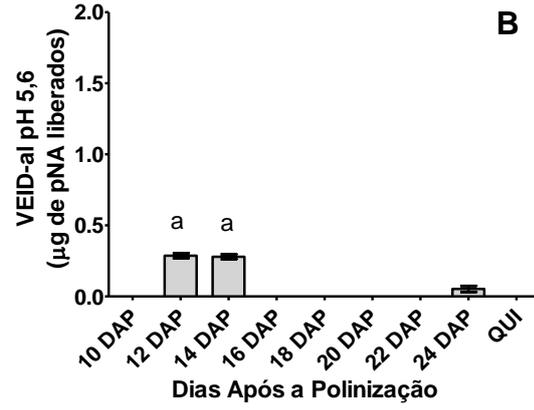
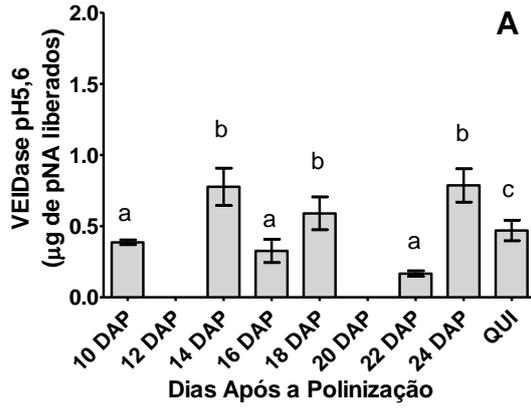
Para a caspase-símile 6 (atividade VEIDase) em pH 5,6, foram detectadas três ondas de atividade, sendo a primeira em 10 DAP, a segunda entre 14 e 18 DAP e a terceira de 22 DAP até o estágio quiescente (figura 12A). Todas as atividades foram completamente inibidas pelo inibidor específico VEID-al (figura 12B), exceto em 14 DAP, onde uma taxa de inibição de 36,04% foi estimada ( $P < 0,0001$ ). De maneira curiosa, o estágio 12 DAP não apresentou atividade proteolítica (figura 12A), porém, na presença do inibidor foi detectada atividade proteolítica, sugerindo a presença de atividades proteolíticas inespecíficas neste estágio (figura 12B). Em pH 7,4, as principais atividades detectadas foram em 10, 14 e 20 DAP (figura 12C). As análises estatísticas mostraram que as atividades em 16 e 22 DAP não são significativas ( $P > 0,0001$ ). Quando o inibidor específico foi adicionado, houve completa redução das atividades de 14 e 20 DAP e uma redução na atividade detectada em 10 DAP de cerca de 58,54% (figura 12D).

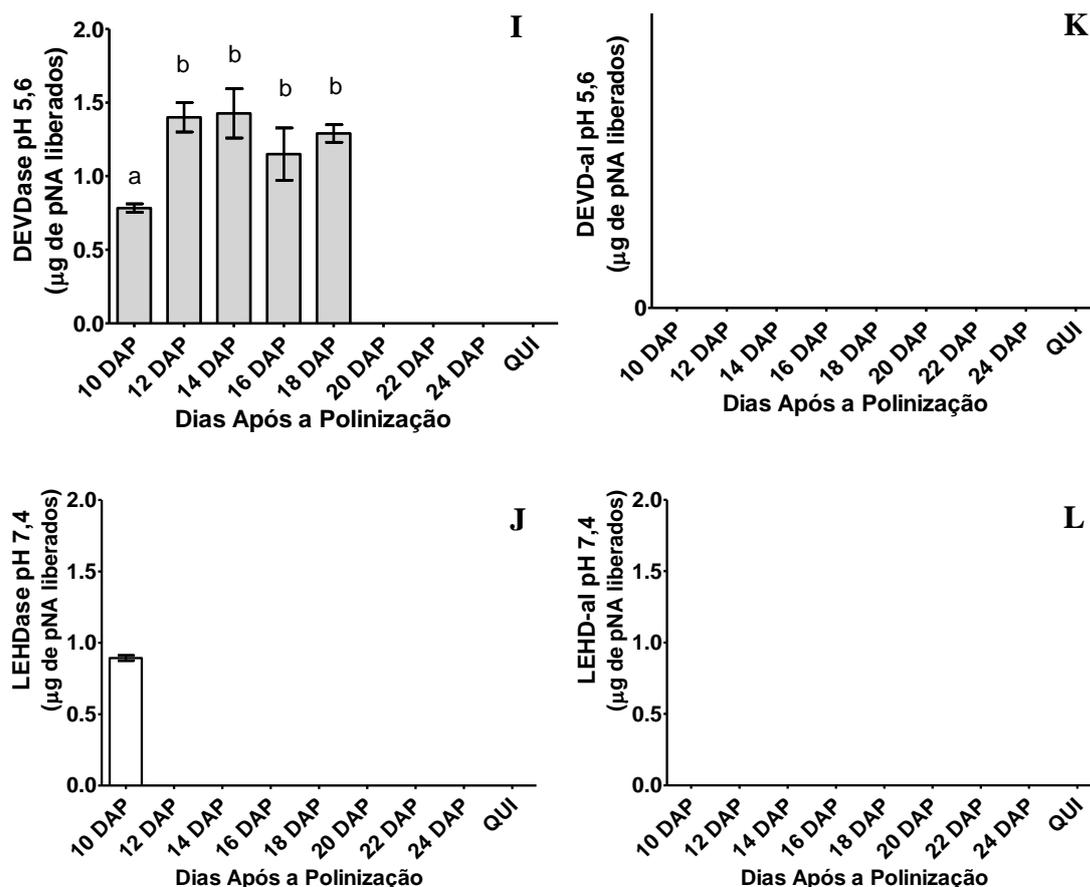
A atividade do tipo caspase-símile 8 (IETDase) em pH 5,6 foi detectada de 10 a 20 DAP, sendo o valor mais elevado em 10 DAP (1,37  $\mu$ g de pNA liberados) e o valor mais baixo em 14 DAP (0,62  $\mu$ g de pNA liberado) (figura 12E). Não foram detectadas atividades IETDase estatisticamente significativas nos estágios 22 DAP, 24 DAP e QUI ( $P < 0,0001$ ) (Figura 12E). Após a adição do inibidor específico IETD-al (figura 12F), houve a completa inibição da atividade proteolítica detectada em 14, 18 e 20 DAP. Já as atividades dos tempos 12 e 16 DAP, mostraram níveis de inibição de 57,75% e 64,2%, respectivamente. Por outro lado, a atividade IETDase de tegumentos de 10 DAP se elevaram na presença do

inibidor, indicando a clivagem não específica para caspase-símile 8 neste estágio (figura 12F). Em pH 7,4 (figura 12G), atividades IETDase foram encontradas em todos os estágios, sendo o nível mais elevado em 14 DAP (1,53  $\mu$ g de pNA liberados). Estudos de inibição mostraram que apenas atividades dos tempos 16, 18 e 20 DAP foram completamente inibidas, enquanto o estágio quiescente teve sua atividade reduzida em 26,77% (figura 12H). Nos outros estágios pode-se notar a presença de atividades inespecíficas, uma vez que nota-se o aumento da atividade enzimática mesmo na presença do inibidor específico.

Um aumento na atividade do tipo caspase-símile 3 (DEVDase) foi observado de 10 a 12 DAP, e os níveis desta atividade foram mantidos até 18 DAP em pH 5,6 (figura 12I). A partir deste estágio nenhuma atividade contra esse substrato foi detectada. Quando o inibidor DEVD-al foi adicionado, todas as atividades do tipo caspase-símile 3 foram completamente inibidas (figura 12J). Nenhuma atividade caspase-símile 3 foi encontrada em pH 7,4 (dados não mostrados).

A atividade do tipo caspase-símile 9 foi encontrada apenas em 10 DAP e em pH 7,4 (figura 12K) e esta foi totalmente abolida pelo inibidor específico LEHD-al (Figura 12L). Nenhuma atividade do tipo caspase-símile 9 foi detectada em pH ácido (dados não mostrados).



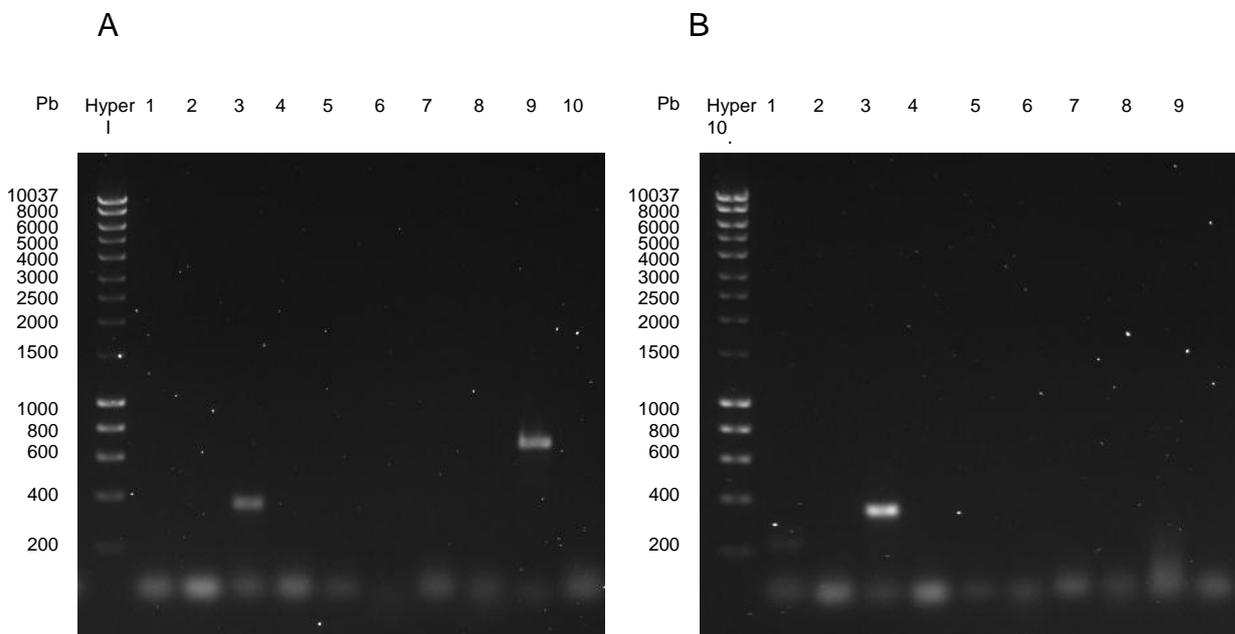


**Figura 12 – Atividades do tipo caspase-símile durante o desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata*.** As clivagens *in vitro* dos substratos peptídicos específicos para diferentes caspase animais foram: VEID-pNa em pH 5,6 (A) e 7,4 (C) para a caspase-símile 6, IETD-pNa em pH 5,6 (E) e 7,4 (G) para a caspase-símile 8, DEVD-pNa em pH 5,6 (I) para caspase-símile 3 e LEDH-pNa em pH 7,4 (K) para a caspase-símile 9. Para estudos de inibição, os extratos foram incubados por 15 min com os inibidores na presença de seus respectivos substratos. Os inibidores utilizados foram: VEID-al em pH 5,6 (B) e em pH 7,4 (D) para a caspase-símile do tipo 6, IETD- al em pH 5,6 (F) e pH 7,4 (H) para caspase-símile 8, DEVD-al em pH 5,6 (J) para caspase-símile 3 e LEHD-al em pH 7,4 (L) para caspase-símile 9. Os dados representam as médias ( $\pm$  Erro Padrão da Média) da clivagem dos peptídeos, expressos como  $\mu\text{g}$  de p-Nitroanilida liberada (pNA) e letras diferentes representam resultados estatísticos significativamente diferentes.

### **4.3 - PARTE III: CARACTERIZAÇÃO E PADRÃO DE EXPRESSÃO TEMPORAL DE GENES ENVOLVIDOS NA MCP**

#### **4.3.1 – PCR para testes de amplificação de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se os iniciadores para actina, para metacaspase e $\beta$ -VPE**

A figura 13 mostra o resultado da amplificação de DNA genômico isolado de folhas de soja e de feijão-de-corda, testando-se os iniciadores para actina, metacaspase e  $\beta$ -VPE. Podemos observar, que, para o DNA genômico (gDNA) de folhas de *Vigna unguiculata*, os produtos de amplificação que mostraram um tamanho esperado foram os originados a partir dos iniciadores mcF2R1 com um tamanho de 356pb (figura 13A, linha 3) e actF1R1, com 813pb (figura 13A, linha 9). As combinações dos outros pares de iniciadores não foram capazes de originar produtos de amplificação. Em soja, o produto do PCR para os iniciadores mcF1R1e mcF2R1 geraram produtos de amplificação, sendo o primeiro (figura 13B, linha 1), menor que o esperado, e o produto mcF2R1 (figura 13B, linha 3) de tamanho próximo ao esperado (356 pb). Como a seqüência do gene da  $\beta$ -VPE é muito extensa e possivelmente pode conter íntrons, a amplificação provavelmente não foi capaz de se completar, nem em DNA genômico de *Vigna* (figura 13A, linhas 5, 6, 7 e 8) e nem de soja (figura 13B, linhas 5, 6, 7 e 8).

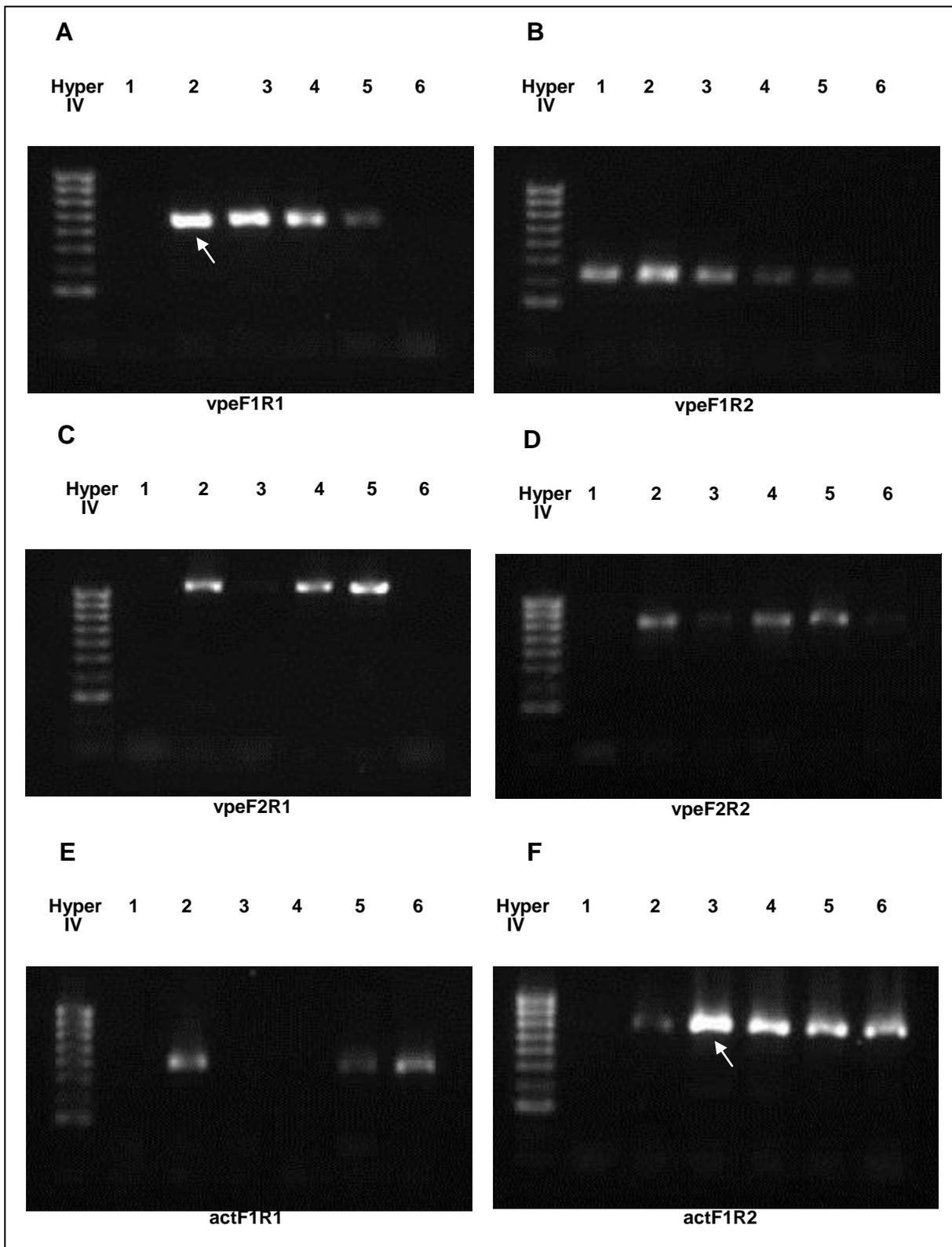


**Figura 13 - Análise da amplificação de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda (A) e de soja (B), utilizando-se iniciadores para actina, metacaspase e  $\beta$ -VPE. Figura A :** hyper I - Hyperladder I, 1 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores mcF1R1, 2 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores mcF1R2, 3 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores mcF2R1, 4 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores mcF2R2, 5 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores vpeF1R1, 6 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores vpeF1R2, 7 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores vpeF2R1, 8 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores vpeF2R2, 9 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores actF1R1, 2 - gDNA de *V. unguiculata* + iniciadores actF1R2. **Figura B:** hyper I - Hyperladder I, 1 - gDNA de soja + iniciadores mcF1R1, 2 - gDNA de soja + iniciadores mcF1R2, 3 - gDNA de soja + iniciadores mcF2R1, 4 - gDNA de soja + iniciadores mcF2R2, 5 - gDNA de soja + iniciadores vpeF1R1, 6 - gDNA de soja + iniciadores vpeF1R2, 7 - gDNA de soja + iniciadores vpeF2R1, 8 - gDNA de soja + iniciadores vpeF2R2, 9 - gDNA de soja + iniciadores actF1R1, 2 - gDNA de soja + iniciadores actF1R2.

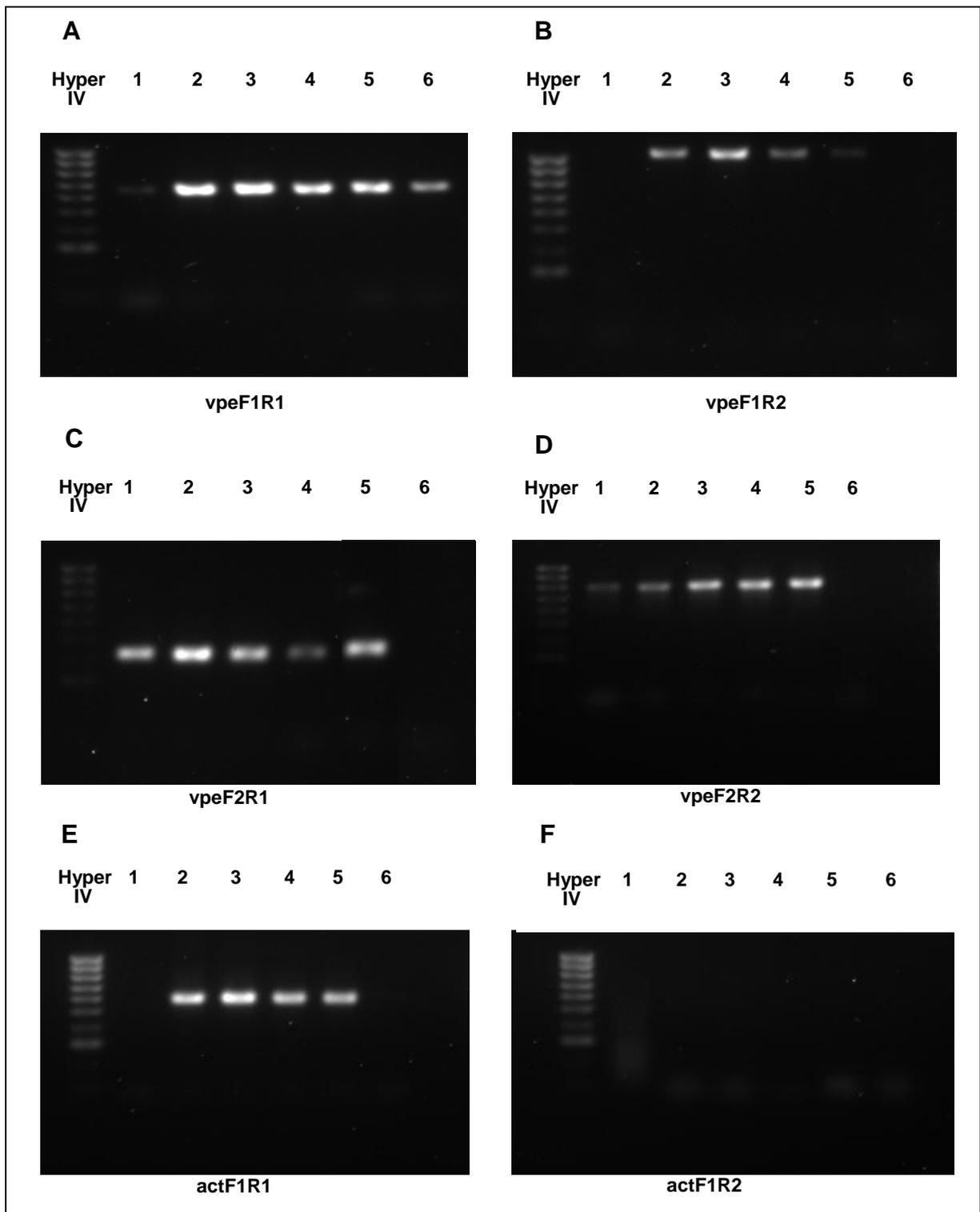
#### **4.3.2 – RT-PCR de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se os iniciadores para actina e $\beta$ -VPE, em gradientes de temperaturas de anelamento**

As figuras 14 e 15 mostram o resultado da amplificação de cDNA de folhas de *Vigna* e soja, em gradiente de temperatura, utilizando novos iniciadores para actina,  $\beta$ -VPE e metacaspase. Foi possível observar uma correta amplificação dos cDNAs para todos os pares de iniciadores testados, uma vez que todos os produtos de PCR obtidos mostraram o tamanho esperado em gel de agarose (vide tabela 1, no item 4.3.3). Com este experimento foi observado que o melhor par de iniciadores para amplificação da  $\beta$ -VPE foi o vpeF1R1, com a temperatura de anelamento de 49°C, tanto para *Vigna* (figura 14A, linha 3, seta) como para soja (figura 14A, linha 3, seta). Já para actina, o melhor par de iniciadores a ser utilizado foi o actF1R2 para *Vigna* (figura 14F, linha 3) e actF1R1 para soja (figura 15E, linha 3), sendo a melhor temperatura de anelamento a 49°C para ambos os pares de iniciadores. Curiosamente, ao contrário da amplificação da  $\beta$ -VPE a partir de DNA genômico, a amplificação para a  $\beta$ -VPE a partir de cDNAs foi bem sucedida em todos os pares de iniciadores testados. Provavelmente isto se deu porque a sequência genômica da  $\beta$ -VPE é muito longa, ao contrário da presente no cDNA, que é menor (tabela 1).

Os experimentos descritos neste permitiram ainda encontrar a melhor combinação de iniciadores e a melhor temperatura de anelamento para cada um deles, mostradas na tabela 3.



**Figura 14 - RT-PCR em gradiente de temperatura de anelamento para análise da expressão gênica de  $\beta$ -VPE e actina, utilizando-se cDNA de folhas de *Vigna unguiculata*. (A) iniciadores vpeF1R1; (B) iniciadores vpeF1R2 (C) iniciadores vpeF2R1, (D) iniciadores vpeF2R2 (E): iniciadores actF1R1 (F) iniciadores actF1R2, amplificados à temperatura de anelamento de 45°C (linha 1), 47°C (linha 2), 49°C (linha 3), 51°C (linha 4), 53°C (linha 5) e 55°C (linha 6). Marcador: Hyperlader IV (1013, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100pb). As setas indicam a melhor combinação de par de iniciadores e temperatura encontrada.**



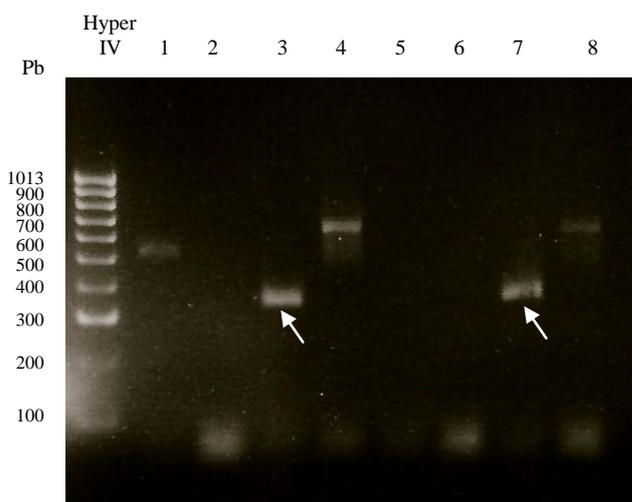
**Figura 15 - RT-PCR em gradiente de temperatura de anelamento para análise da expressão gênica de  $\beta$ -VPE e actina, utilizando-se cDNAs de folhas de soja.** (A) iniciadores vpeF1R1; (B) iniciadores vpeF1R2 (C) iniciadores vpeF2R1, (D) iniciadores vpeF2R2 (E): iniciadores actF1R1 (F) iniciadores actF1R2, amplificados à temperatura de anelamento de 45°C (linha 1), 47°C (linha 2), 49°C (linha 3), 51°C (linha 4), 53°C (linha 5) e 55°C (linha 6). Marcador: Hyperlader IV (1013, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100pb). As setas indicam a melhor combinação de par de iniciadores e temperatura encontrada.

**Tabela 3:** Pares de iniciadores para actina,  $\beta$ -VPE e metacaspase selecionados e temperatura de anelamento ideal dos mesmos.

<b>Gene alvo</b>	<b>Par de iniciadores</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>
Actina de <i>Vigna</i>	actF1R2	49°C
Actina de soja	actF1R1	49°C
$\beta$ -VPE	vpeF1R1	49°C
Metacaspase	mcF2R1	49°C

### 4.3.3 – RT-PCR para testes de amplificação de cDNA de folhas de feijão-de-corda e de soja utilizando-se todos os iniciadores para metacaspase

A figura 16 mostra o resultado da amplificação de cDNAs de folhas de soja de feijão-de-corda, utilizando-se todos os pares de iniciadores desenhados para metacaspase. Como já havia sido detectada a temperatura ótima de anelamento (49°C) para estes iniciadores na amplificação do DNA genômico, um RT-PCR em gradiente de temperatura foi desnecessário. Foi possível observar que apenas o par de iniciadores mcF2R1 foi capaz de amplificar um produto de tamanho correto, de aproximadamente 356 pb, tanto para soja como para *Vigna* (figura 16, linhas 3 e 7, respectivamente - setas).



**Figura 16 - RT-PCR de cDNAs de folhas de soja e *Vigna* utilizando-se os iniciadores de metacaspase para análise da expressão gênica de metacaspase.** Hyper IV – Hyperladder IV, 1 – cDNA de soja + mcF1R1, 2 - cDNA de soja + mcF1R2, 3 - cDNA de soja + mcF2R1, 4 - cDNA de soja + mcF2R2, 5 - cDNA de *V. unguiculata* + mcF1R1, 6 - cDNA de *V. unguiculata* + mcF1R2, 7 - cDNA de *V. unguiculata* + mcF2R1, 8 - cDNA de *V. unguiculata* + mcF2R2. As setas indicam a melhor combinação de par de iniciadores encontrada.

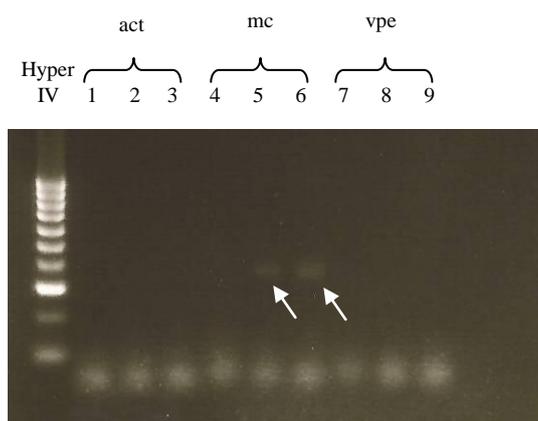
#### **4.3.4 – Sequenciamento dos produtos do PCR referentes à amplificação da metacaspase**

Para verificar se os produtos de amplificação de folhas de *Vigna* e soja pertenciam a metacaspase 4, os produtos do PCR para metacaspases referentes a tabela 3 foram purificados e seqüenciados. Quando as sequências foram comparadas por BLAST, observamos que todas as sequências apresentaram grande similaridade com a metacaspase 4 de soja. Folhas jovens e senescentes de *Vigna* mostraram 87% de similaridade com a metacaspase 4 de soja (Figura 17A) e tegumentos jovens e senescentes de soja apresentaram 99% de similaridade com a metacaspase 4 de soja (Figura 17B). Como apenas este tipo de metacaspase foi encontrado, acreditamos que os iniciadores desenhados sejam específicos para esta classe de metacaspase.



#### 4.3.5 – Expressão de genes de metacaspases, VPE e actina em tegumentos liofilizados de sementes de *Vigna*

A figura 18 mostra o resultado do RT-PCR de cDNA de tegumentos liofilizados de 10, 12 e 20 DAP. Foi possível observar a presença de fracas bandas de amplificação para metacaspase nas amostras de 12 e 20 DAP (raias 5 e 6). Não foram observadas bandas de amplificação para actina e nem para a  $\beta$ -VPE.



**Figura 18 - Análise da expressão dos genes da actina, metacaspase e  $\beta$ -VPE em cDNAs de tegumentos liofilizados de *Vigna unguiculata*.** Linhas 1, 2 e 3 - tegumentos de 10, 12 e 20 DAP, respectivamente, testados para os iniciadores da actina (actF1R2); linhas 4, 5 e 6 - tegumentos de 10, 12 e 20 DAP, respectivamente, testados para os iniciadores da metacaspase 4 (mcF2R1); Linhas 7, 8 e 9 - tegumentos de 10, 12 e 20 DAP, respectivamente, testados para os iniciadores da  $\beta$ -VPE (vpeF1R1).

#### 4.3.6 – Sequenciamento do produto de amplificação referente à expressão da metacaspase em 20DAP

Quando realizado um BLAST da sequência obtida após purificação da banda de amplificação da metacaspase dos cDNAs de tegumentos de 20 DAP de *V. unguiculata*, foi observado que a mesma apresentava 88% de similaridade com a metacaspase 4 de soja (Figura 19 A), 78% de similaridade com a metacaspase 4 de *A. thaliana* (ATMC4) (Figura 19 B) e 76% de similaridade com a metacaspase do tipo II MCII-PA de *Picea abies* (Figura 19 C).

### A

<i>Vigna 20DAP MCA</i>	1	ATGCCATTGAGTCTCGCGGATTCCATATCCCTTCAGGTTTGCGCCATCACAGAGACAGGG	60
<i>Soja MCA</i>	604	ATGCCATTGAGTCTCGCGGATTCCATATCCCTTCAGGTTTGCGCCACAACAGAGGCAGGG	663
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	61	ATGATG--G-TGATGAGGCTGACGATAGGGATATCGATCTTCCACATGGGGACTATGGCT	117
<i>Soja MCA</i>	664	ATGATGATGGTGATGAAGCTCAAATAGGGATATTGAACTTCCGGATGGGG----G-CT	717
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	118	ATGTAAAGAATAGATCTCTGCCCTTTCAACCCTCATTGATATACTAAAGCAGAAACTG	177
<i>Soja MCA</i>	718	ATGTAAAGAACAGGTCTTTGCCCTTTCAACCCTCATTGATATACTCAAGCAGAAACTG	777
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	178	GGAAAGATGACATTGATGTTGGGAACTCAGACCTACCCTTTTCGATGCTTTGGGGAAG	237
<i>Soja MCA</i>	778	GGAAAGATGATATAGATGTTGGGAACTGAGACCTACCCTTTTCGATGTTTTGGGGAAG	837
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	238	ATTCTAGTCCTAAAGTGAAGAAGTTCATGAAT	269
<i>Soja MCA</i>	838	ATGCTAGTCCTAAAGTGAAGAAGTTCATGAAT	869

### B

<i>Vigna 20DAP MCA</i>	131	ATCTCTGCCCCTTTCAACCCTCATTGATATACTAAAGCAGAAACTGGGAAAGATGACAT	190
<i>Arabidopsis ATMC4</i>	753	ATCTCTTCCTCTGCAGACCTTGATTGATATTCTCAAGCAGCAAACAGGGAAATGATAATAT	812
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	191	TGATGTTGGGAACTCAGACCTACCCTTTTCGATGTCITTTGGGGAAGATTCTAGTCTCTAA	250
<i>Arabidopsis ATMC4</i>	813	CGAAGTTGGGAAATCAGGCCAAGCCTTTTTCGATGCGTTTGGTGATGATTGAGCCCGAA	872
<i>Vigna 20DAP MCA</i>	251	AGTGAAGAAGTTCATGAA	268
<i>Arabidopsis ATMC4</i>	873	AGTGAAGAAGTTTATGAA	890

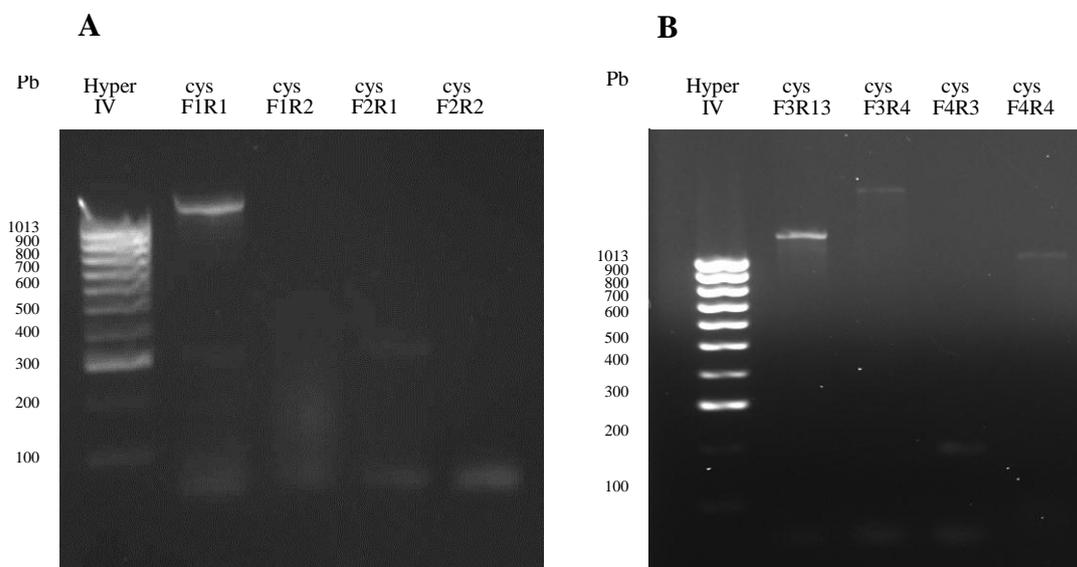
### C

<i>Vigna MCA</i>	123	AAGAATAGATCTCTGCCCTTTCAACCCTCATTGATATACTAAAGCAGAAACTGGGAAA	182
<i>Picea MCHPA</i>	736	AAAAACAGGTCCTTCTCTGTCTACCTTGATAGAAATTCGAATGAGAAAACGGTCGA	795
<i>Vigna MCA</i>	183	GATGACATTGATGTTGGGAACTCAGACCTACCCTTTTCGATGTCITTTGGGGAAGATTCT	242
<i>Picea MCHPA</i>	796	CATGACATTGATGTTGGGAAATCAGGCCAACTCTTTTTCGATGTTTGGAGATGATGCA	855
<i>Vigna MCA</i>	243	AGTCCCTAAAGTGAAGAAGTT	262
<i>Picea MCHPA</i>	856	AGTCCCAAGGTGAAGAAGTT	875

**Figura 19** - Alinhamentos da sequência obtida a partir do produto de amplificação para a metacaspase 4 de *V. unguiculata* de 20 DAP com a metacaspase 4 de soja (A), com a metacaspase 4 de *A. thaliana* (*ATMC4*) (B) e com a metacaspase do tipo II MCII-PA de *Picea abies* (C).

#### 4.3.7 – PCR de DNA genômico de folhas de feijão-de-corda para teste de todos os iniciadores para cistatinas

As figuras 20A e 20B mostram os resultados do RT-PCR para verificação da amplificação de cistatina em DNA genômico de *V. unguiculata*, utilizando-se diferentes combinações dos iniciadores desenhados para cistatina. A tabela 4 mostra os tamanhos esperados dos produtos da amplificação e o tamanho real encontrado. Como a banda maior que 1013 pb apareceu mais intensa e mais de uma vez ao se utilizarem diferentes combinações de iniciadores, especula-se que a mesma possa estar correta, porém com um íntron extenso no meio da sequência, uma vez que foi utilizado DNA genômico para a amplificação. Esta banda, originada do par de iniciadores cysF3R3, foi purificada e sequenciada como descrito anteriormente e comparada através de um BLAST. Não foi encontrada nenhuma similaridade com a sequência para a cistatina de *Vigna unguiculata*, provavelmente devido à sequência apresentar um íntron muito extenso.



**Figura 20 - PCR de DNA genômico de *Vigna unguiculata* para análise de amplificação de cistatina.** Em A – RT-PCR com diferentes combinações dos iniciadores cysF1, cysF2, cysR1 e cysR2; em B – RT-PCR com diferentes combinações dos iniciadores cysF3, cysF4, cysR3 e cysR4.

**Tabela 4:** Tamanhos esperados dos produtos da amplificação dos diferentes iniciadores para cistatina e o tamanho real encontrado.

Iniciadores para cistatina	Tamanho esperado (Pb)	Tamanho encontrado
F1R1	298	Banda intensa maior que 1013pb e outra com cerca de 300pb
F1R2	205	-
F2R1	310	Banda muito fraca de cerca de 320pb
F2R2	217	-
F3R3	262	Banda intensa maior que 1013pb
F3R4	332	Banda muito fraca superior a 1013pb
F4R3	269	Banda muito fraca de cerca de 200pb
F4R4	258	Banda fraca de cerca de 1013pb

#### **4.3.8 – Clonagem do produto do PCR para cistatina utilizando-se os pares de iniciadores específicos F3R3**

Para se obter um melhor produto de amplificação e do tamanho correto, o produto do RT-PCR obtido da amplificação com os iniciadores *cysF3R3* foi clonado em *E. coli*. Antes de se iniciar a amplificação, foi realizada uma corrida eletroforética do produto de amplificação com o par de iniciadores *cysF3R3*, para se verificar o seu real tamanho. Após a corrida, foi observado que o produto amplificado possuía cerca de 1300pb (figura 21). A figura 22 mostra a corrida eletroforética de 3 colônias positivas, após digestão de plasmídeos clonados com o produto de amplificação oriundo dos iniciadores *cysF3R3* (setas). O produto de digestão da primeira linha do gel, por apresentar-se mais completamente digerido, foi encaminhado para sequenciamento, e depois alinhado com a sequência conhecida de cistatina de *Vigna unguiculata* (figura 23). Através deste

alinhamento foi possível observar que houve o alinhamento de apenas 250 pb, e não de toda a sequência esperada, que seria de 522pb. Também não foram encontrados nenhum dos iniciadores *reverse* desenhados ao longo da sequência (R1, R2, R3 e R4).

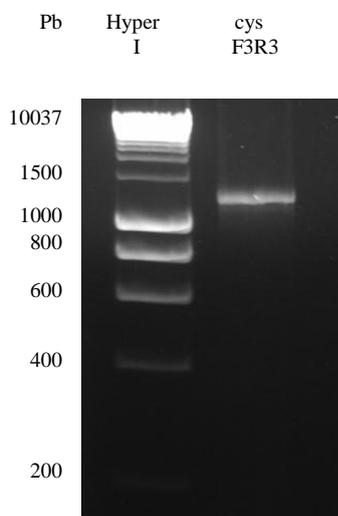


Figura 21 - PCR de DNA genômico de *Vigna unguiculata* para confirmação do tamanho do produto de amplificação utilizando-se os iniciadores *cysF3R3*.

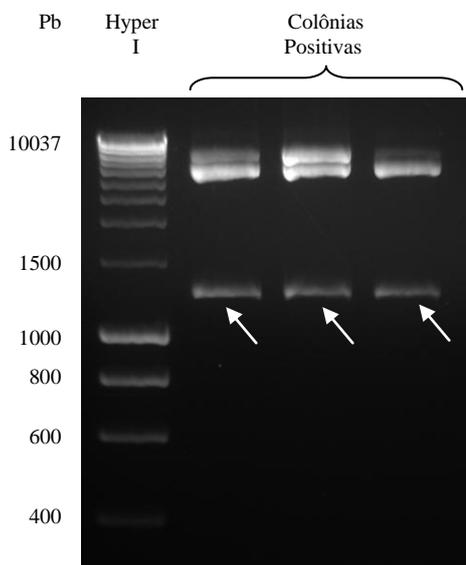


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização da digestão de plasmídeos de colônias positivas para a clonagem do produto de amplificação oriundo dos iniciadores *cysF3R3*.



#### **4.3.9 – RT-PCR de RNAs das camadas exotesta e mesotesta de tegumentos microdissecados de 8, 12 e 18 DAP**

As camadas paliçádica e subepidérmica de tegumentos microdissecados de 8 DAP, 12 DAP e 18 DAP foram submetidas à extração de RNA e síntese de cDNAs e estes foram submetidos a um RT-PCR para verificação da expressão de metacaspase, VPEs e cistatinas em tais camadas, durante o desenvolvimento do tegumento. Na figura 24, nota-se a amplificação da metacaspase 4 tanto na exotesta como na camada mesotesta em estágios iniciais (8 DAP – figura 24A), como em estágios intermediários (12 DAP – figura 24B) e tardios (18 DAP – figura 24C). O fragmento encontrado apresenta um tamanho próximo ao esperado (356 pb). Não foi detectada a amplificação da  $\beta$ -VPE em nenhuma das camadas microdissecadas durante o desenvolvimento do tegumento.

A figura 25 mostra os produtos de amplificação utilizando-se os primers para a cistatina nas camadas microdissecadas de 8 DAP, 12 DAP e 18 DAP. É possível observar a amplificação da cistatina tanto na camada paliçádica como na camada subepidérmica durante todo o desenvolvimento do tegumento. O fragmento encontrado apresenta um tamanho próximo ao esperado (262 pb).

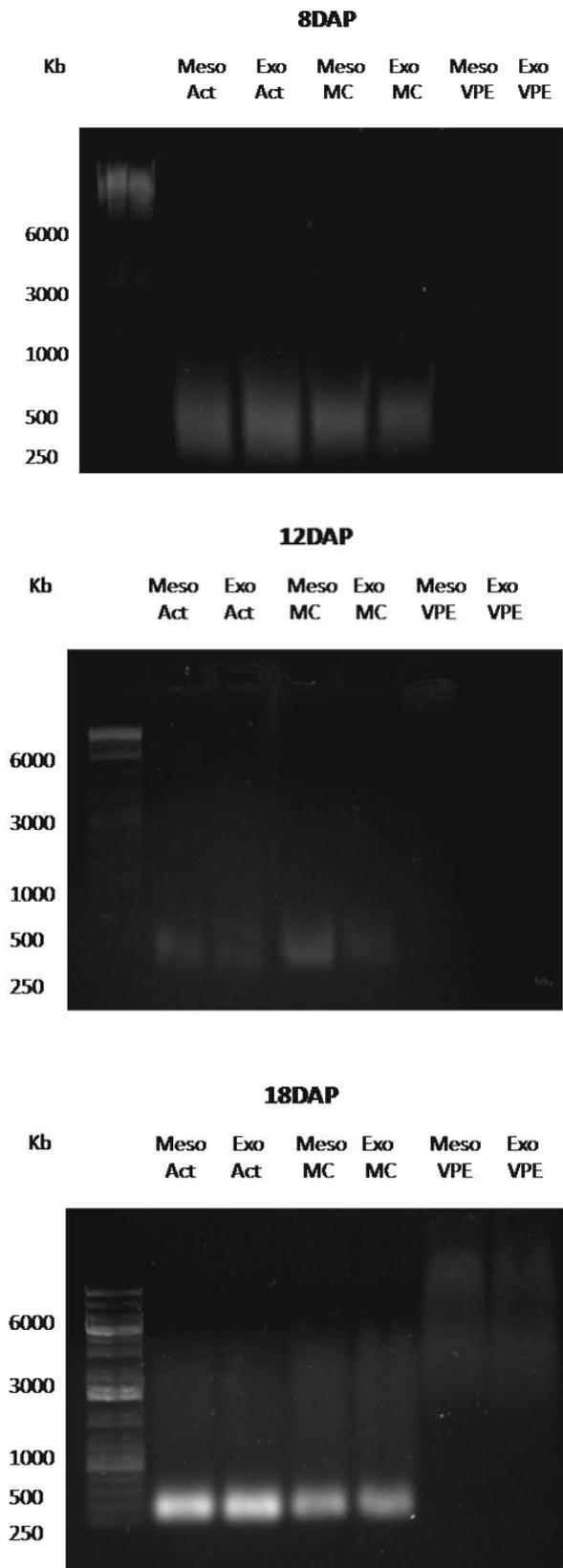


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização das camadas microdissecadas a laser de 8 DAP (A), 12 DAP (B) e 18 DAP (C) e amplificadas utilizando-se os primers para actina, metacaspase 4 e  $\beta$ -VPE. Legendas: Meso – mesotesta, Exo – exotesta.

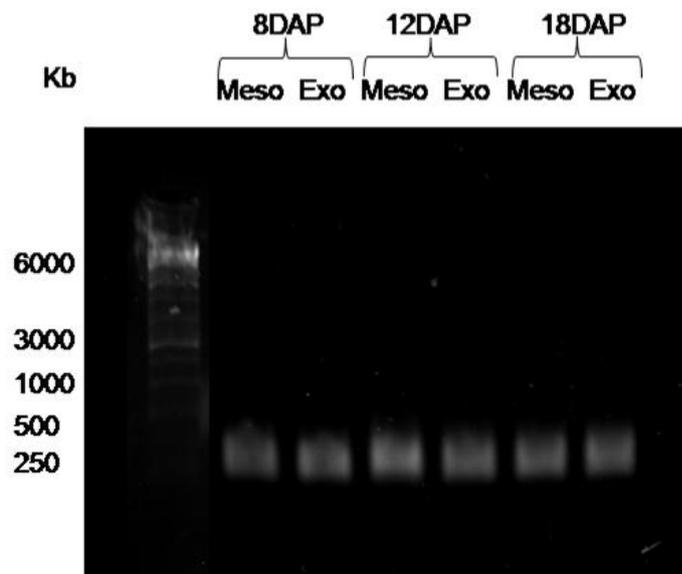
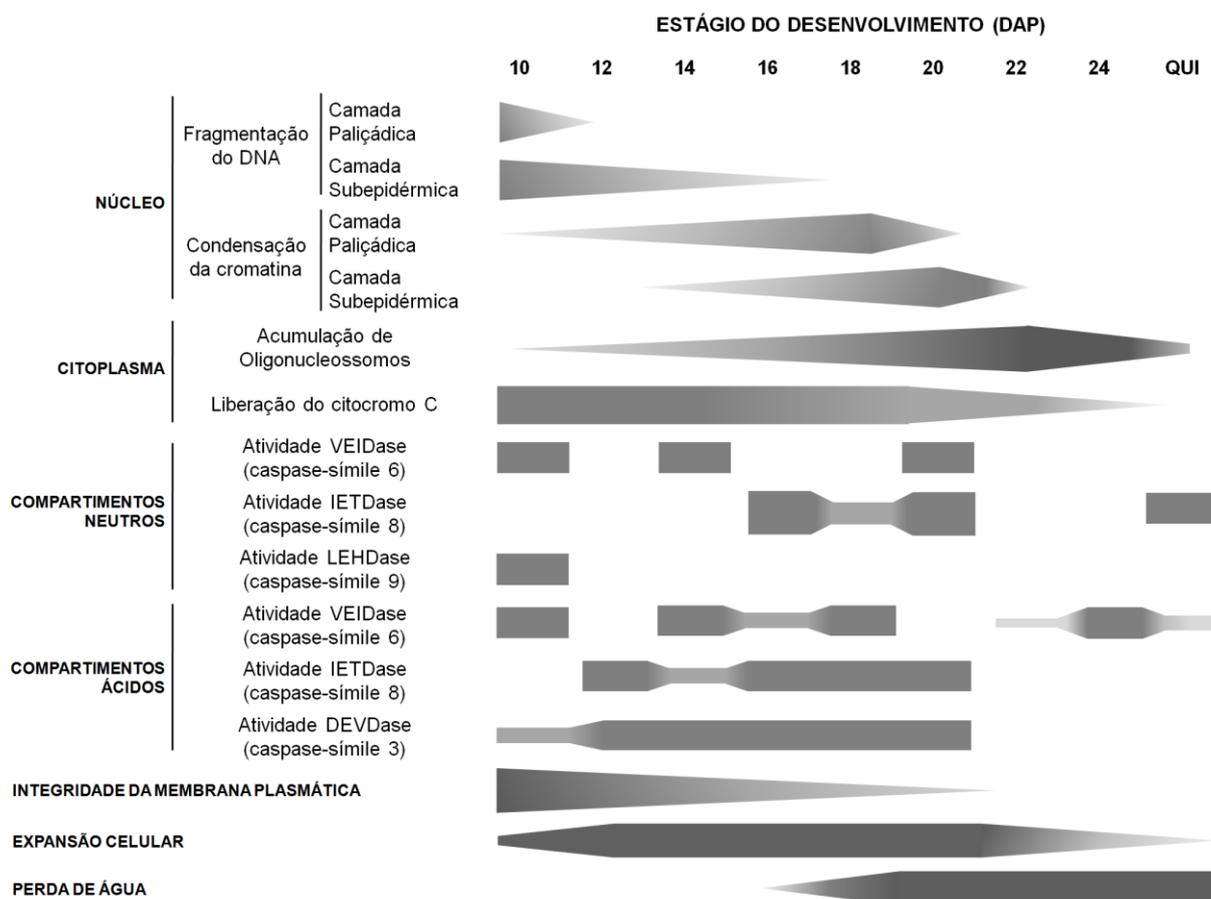


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio para visualização das camadas microdissecadas a laser de 8 DAP (A), 12 DAP (B) e 18 DAP (C) e amplificadas utilizando-se os primers para cistatina. Legendas: Legendas: Meso – mesotesta, Exo – exotesta.

## 5 – Discussão

A morte celular programada é um evento-chave crucial para o desenvolvimento adequado dos organismos (Lima *et al.*, 2012). No presente estudo são descritos eventos de morte celular programada durante o desenvolvimento do tegumento da semente de *Vigna unguiculata*, analisando aspectos anatômicos, ultraestruturais, bioquímicos e moleculares deste processo. A figura 26 representa esquematicamente os principais eventos biológicos observados durante a MCP de tegumentos de *V. unguiculata*.



**Figura 26 – Representação esquemática dos principais eventos biológicos observados durante o processo de morte celular programada de tegumentos em desenvolvimento de *V. unguiculata*.**

A maioria das sementes de leguminosas se diferencia a partir de um óvulo com dois integumentos (Wang e Grusak, 2005). Durante o desenvolvimento do óvulo, o integumento interno desaparece e o externo se diferencia nas camadas que irão compor o tegumento da semente. Por microscopia óptica e por

microscopia eletrônica de transmissão (figuras 3 e 4), foi possível observar a morte celular assíncrona do tegumento, iniciando-se pela camada paliçádica e se estendendo em direção às camadas mais internas do tegumento. A desorganização celular teve início na camada paliçádica, a partir de 10 DAP, com vacúolos aumentando em tamanho e acumulando substâncias osmiofílicas (figura 4E). A fragmentação do DNA desta camada celular, detectada pelo ensaio TUNEL (figura 6F e 26) coincidiu com o início dos eventos de desorganização celular em 10 DAP, que se completaram antes de 20 DAP. No desenvolvimento do tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* a fragmentação do DNA iniciou-se cedo durante o processo de desenvolvimento (figura 26). Fato similar foi observado por Gunawardena *et al.* (2005), nos sítios de perfuração das folhas de *Monstera obliqua*, onde a fragmentação do DNA (detectada por TUNEL) foi observada como um evento inicial da morte celular programada.

Apesar da detecção da fragmentação do DNA a partir de 10 DAP na camada parenquimática dos tegumentos (figuras 5C, 5E, 5I e 26), as mudanças ultraestruturais típicas da MCP ainda não estavam visíveis neste estágio (figura 4F). Em 16 DAP, a desorganização das membranas tilacóides dos plastídeos e das cristas mitocondriais, assim como a condensação da cromatina se tornaram aparentes (figura 4G e H). Em 20 DAP, a única organela aparente na camada paliçádica foi um vacúolo grande e escuro, repleto de substâncias osmiofílicas em seu interior (figura 4I). Na camada parenquimática apenas núcleos danificados, com cromatina condensada e um grande vacúolo puderam ser distinguidos (figura 4J). As demais organelas não estavam mais preservadas neste estágio. Também em 20 DAP e em 22 DAP, observou-se a liberação de grandes quantidades de DNA oligonucleossomal para o citoplasma (figura 7), confirmando a degradação do material genético e demonstrando que este evento é tardio no processo de MCP dos tegumentos.

A permeabilização das membranas também foi confirmada nos estágios finais do desenvolvimento do tegumento (22 DAP), indicando o completo colapso celular (figura 5K e 26). Em 24 DAP, apenas restos celulares foram detectados em todas as camadas celulares estudadas (figura 4K, L e O), mostrando a morte completa destes tecidos em 24 DAP. Outros exemplos de morte celular programada assíncrona foram observados em cotilédones de algodão durante a germinação, onde ocorre o processo de MCP das bordas para o interior dos

cotilédones (Xie *et al.*, 2008), e também há relatos de MCP assimétrica em folhas e flores de tomate na zona de abscisão, durante o processo natural de senescência destes tecidos (Bar-Dror *et al.* 2011).

No presente estudo, também foi analisada a liberação do citocromo C pelas mitocôndrias para o citosol. Nas frações citosólicas, o citocromo C foi detectado já a partir de 10 DAP, indicando que o processo de liberação ocorreu nos estágios iniciais do desenvolvimento (Figura 8A e 26). Nestas frações, os níveis de citocromo C se elevaram entre 10 DAP a 18 DAP, e seus níveis reduziram-se em 20 e 22 DAP. A liberação do citocromo C em estágios tão iniciais do desenvolvimento do tegumento indica a sua importância crucial para a ocorrência da MCP nestes tecidos. Exemplos deste evento durante a MCP em plantas foram observados em diferentes tipos de MCP. Balk *et al.* (1999) detectaram a liberação do citocromo C em plantas de pepino durante a MCP induzida por calor, Virolainen *et al.* (2002) observaram o mesmo fenômeno em plantas de trigo sob estresse anóxico. Lombardi *et al.* (2007) mostraram a liberação do citocromo C durante a degeneração do suspensor em sementes de *Phaseolus coccineus* em desenvolvimento.

Também foi observado por Balk e Leaver (2001) que uma mutação mitocondrial do gene *CMS* (“cytoplasmic male sterility”) em girassol está associada à MCP prematura e à liberação do citocromo c. Em plantas PET1-CMS, portadoras da mutação, as primeiras células do tapete e os micrósporos jovens perdem seu formato normal e ao mesmo tempo o DNA se condensa e é quebrado em oligonucleossomos. Nas células do tapete, o citocromo C é liberado para o citosol. Este evento precede a condensação celular, a fragmentação do DNA e a perda da integridade da membrana mitocondrial externa. Os autores sugerem que estes eventos são fortes evidências de que esta mutação causa a indução prematura da MCP no tapete, levando à morte dos micrósporos, resultando no fenótipo macho estéril, e sugerem que a mitocôndria está envolvida no processo de indução de MCP.

Existem poucos estudos sobre a MCP durante o desenvolvimento do tegumento de sementes. Wan *et al.* (2002) descobriram que o integumento interno de sementes de canola sofre um desenvolvimento organizado seguido por MCP, evidenciada pela vacuolização das células, fragmentação do DNA e compressão. Radchuk *et al.* (2011) estudaram o desenvolvimento do pericarpo de

cevada e observaram que durante este evento ocorre a fragmentação do DNA. A morte celular assíncrona dos tegumentos de sementes de *Vigna unguiculata*, progredindo da camada paliçádica para a parenquimática ao longo do desenvolvimento da semente encontra paralelo apenas com o observado por Kladnik *et al.* (2004), em relação a MCP em cariopse de milho, estudada através de análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão e por ensaio TUNEL, para detectar a fragmentação do DNA. Os autores também se referem a dois subdomínios distintos do processo de MCP detectados por TUNEL em diferentes camadas placento-calazal, sugerindo diferentes papéis fisiológicos para cada processo de MCP, assim como diferentes naturezas dinâmicas e bioquímicas, de acordo com sua origem a partir de diferentes tecidos maternos (Kladnik *et al.*, 2004).

De acordo com van Doorn (2011), a MCP vegetal pode ser classificada em duas classes principais, de acordo com a participação do vacúolo durante o processo: autolítica e não-autolítica. A MCP autolítica é reconhecida pelo rompimento do vacúolo seguido pela rápida degradação do citoplasma, enquanto a MCP não-autolítica não apresenta esta característica. De acordo com o autor, a principal vantagem em utilizar este critério está na possibilidade de se distinguir duas classes de MCP utilizando-se uma diferença biológica (o envolvimento do vacúolo). De maneira geral, a MCP autolítica ocorre durante o desenvolvimento normal da planta e sob estresse abiótico moderado, enquanto a MCP não-autolítica é caracteristicamente encontrada em interações planta-patógeno (van Door, 2011).

No presente estudo, a MCP observada durante o desenvolvimento do tegumento de sementes de *Vigna unguiculata* pode ser classificado como MCP autolítica, uma vez que são observados pequenos vacúolos no citoplasma, que se fundem em um maior. Além disso, foi observada a substituição do citoplasma pelo volume vacuolar, o inchaço e desaparecimento das organelas como plastídeos, mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, condensação da cromatina e a migração da mesma para a periferia nuclear (figura 4) e a degradação do DNA (figura 6), todos indicativos deste tipo de MCP, também foram detectados (van Doorn, 2011; van Doorn *et al.*, 2011).

A MCP autolítica freqüentemente requer a presença de proteases serínicas e cisteínicas (Pak and van Doorn, 2005; van Doorn, 2011), porém, seus papéis

específicos na maioria das vezes ainda são desconhecidos. No presente estudo, foram detectadas diferentes atividades de proteases quando géis co-polimerizados à gelatina foram incubados em condições ótimas para a atividade de proteases cisteínicas (na presença de DTT), tanto em pH ácido, para simular as condições do vacúolo, como em pH neutro, para simular o ambiente citosólico (figuras 11A e 11B, respectivamente). Atividades enzimáticas similares, observadas por zimografia também foram relatadas nas zonas de abscisão de folhas e flores de tomate por Bar-Dror *et al.* (2011). Como a MCP autolítica requer a participação de proteases cisteínicas (Pak and van Doorn, 2005; van Doorn, 2011), e com os resultados obtidos a partir da zimografia, a presença de atividades de proteases do tipo caspase-símile foi investigada durante o desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata*. Foram detectados diferentes tipos de atividades caspase-símile durante a MCP dos tegumentos, sob dois diferentes pHs de incubação, com o objetivo de simular condições vacuolares e citosólicas e também sob a ação de inibidores específicos (figura 12).

Em pH ácido (figura 12A e 26), três picos de atividades do tipo caspase-símile 6 (VEIDase) foram detectadas (em 10 DAP, de 14 a 18 DAP e de 22 DAP ao estágio quiescente). De forma interessante, quando incubadas em pH neutro (figura 12C e 26), outras três ondas de atividade são detectadas (em 10 DAP, em 14 DAP e em 20 DAP). Este último pico de atividade em 20 DAP em pH neutro coincide com o desaparecimento da atividade VEIDase em pH ácido, e em 22 DAP, a mesma atividade desaparece em pH neutro e é aumentada em pH ácido, permanecendo até a semente se tornar quiescente. Este é o primeiro relato de atividades enzimáticas do tipo caspase-símile com tal comportamento. Estudos posteriores são necessários para confirmar se há isoformas de enzimas VEIDases localizadas em diferentes compartimentos celulares, que possam estar sendo finamente reguladas por inibidores em diferentes estágios do desenvolvimento ou se as atividades VEIDases são executadas pela mesma enzima, que poderia ser translocada do compartimento vacuolar para o citoplasma e vice-versa. De acordo com Sanmartin *et al.* (2005), existem vários níveis de regulação das atividades caspases-símile em plantas, como maturação de zimógenos inativos ou relocalização subcelular.

Para a caspase-símile 8 (IETDase), atividades proteolíticas específicas foram encontradas em pH ácido de 12 DAP a 20 DAP (figura 12E e 26), e em pH

neutro estas atividades são detectadas de 16 a 20 DAP e no estágio quiescente (figura 12G e 26). Atividades caspase-símile encontradas no estágio quiescente podem possivelmente estar envolvidas no futuro processo de germinação da semente, porém mais estudos são necessários para confirmar tal observação.

Um aumento na atividade de caspase-símile 3 (DEVDase) de 10 DAP a 20 DAP foi observado apenas em pH ácido (figura 12I e 26) e a atividade caspase-símile 9 (LEHDase) apenas foi observada em 10 DAP e em pH neutro (figura 12K e 26). Atividade do tipo VEIDase foi encontrada por Bozkov *et al.* (2004) durante a embriogênese de *Picea abies*, e esta atividade foi vista como essencial para o estabelecimento do padrão apical-basal de formação do embrião. Uma atividade VEIDase em pH neutro também foi encontrada durante o desenvolvimento do perisperma em sementes de quinoa (López-Fernández e Maldonado, 2013). Bóren *et al.* (2006) detectaram, no endosperma de cevada, atividades VEIDase, DEVDase, IETDase e LEHDase em pH neutro, sendo a VEIDase a atividade mais proeminente de todas. Atividades proteolíticas IETDase e DEVDase também foram observadas em folhas de *Avena sativa* (Coffen e Wolpert, 2004) e atividades DEVDase e LEHDase foram relatadas em folhas de tabaco, durante a MCP induzida pela inativação do proteassomo (Kim *et al.*, 2003). A atividade DEVDase também foi encontrada em folhas de batata durante a infecção por *Phytophthora infestans* (Fernández *et al.*, 2012), em plântulas de *A. thaliana* (Danon *et al.*, 2004) e durante a germinação de sementes de *Picea glauca* (He e Kermode, 2003) e em pólen de *Papaver* (Thomas e Frankling-Tong, 2004).

Para estudar a MCP a nível molecular, iniciadores para metacaspase 4,  $\beta$ -VPE e cistatinas foram desenhados e realizados testes de amplificação em DNA genômico e cDNA de folhas de *Vigna unguiculata* e de soja (esta última utilizada como referência) e em gradiente de temperatura, para a escolha dos pares de iniciadores mais adequados (figuras 13, 14, 15 e 16).

Quando realizados testes de amplificação com os iniciadores para metacaspase 4,  $\beta$ -VPE e actina em tegumentos liofilizados de 10 DAP, 12 DAP e 20 DAP, apenas notou-se uma fraca banda de amplificação da metacaspase 4 em 12 DAP e 20 DAP (figura 18), tendo sido, a banda de 20 DAP, seqüenciada e confirmada como uma metacaspase 4 (88% de similaridade com a metacaspase 4 de soja, Gene ID: 100802658; LOC100802658 metacaspase-4-like [ *Glycine max* (soybean) ]), como mostrado na figura 19A. Como não foi observada

nenhuma banda de amplificação para actina, utilizada como controle, e nem para a  $\beta$ -VPE, não foi possível concluir se existe a expressão gênica da  $\beta$ -VPE durante o desenvolvimento do tegumento. Provavelmente este fato ocorreu pela utilização de tegumentos liofilizados para os experimentos, uma vez que o não florescimento das plantas durante o estágio sanduíche (realizados na Universidade de Durham, UK) impossibilitou a realização dos experimentos com tegumentos frescos.

Com relação às cistatinas, foi realizado um PCR para verificar a amplificação de cistatina em DNA genômico de *V. unguiculata*, porém apenas bandas com tamanhos muito diferentes do esperado foram encontradas (figura 20). Como uma banda maior do que 1013 pb apareceu com maior frequência e intensidade ao se utilizarem diferentes combinações de iniciadores, acreditamos que a mesma possa estar correta, porém com um íntron extenso no meio da sequência, uma vez que foi utilizado DNA genômico para a amplificação. O produto do PCR obtido da amplificação com os iniciadores cysF3R3 (que originou uma banda com maior resolução no gel e no tamanho maior que 1013pb) foi então clonado em *E. coli* (figura 22). O produto de digestão plasmidial melhor digerido foi sequenciado, e depois alinhado com a sequência conhecida de cistatina de *Vigna unguiculata* (figura 23). Através deste alinhamento foi possível observar que houve o alinhamento de apenas 250 pb, e não de toda a sequência esperada, que seria de 522pb. Interessantemente, também não foi encontrado nenhum dos iniciadores reverse desenhados ao longo da sequência (R1, R2, R3 e R4), sendo estes dois dados indicadores de que a sequência genômica da cistatina possui ao menos 2 íntrons, com os iniciadores reverse localizados nos éxons não detectados.

Para analisar se há expressão diferenciada dos genes estudados na exotesta e mesotesta dos tegumentos de *V. unguiculata* de 8 DAP, 12 DAP e 18 DAP, foi realizada a microdissecção a laser e purificação de RNAs dos tecidos microdissecados. cDNAs gerados a partir destes RNAs foram amplificados, utilizando-se todos os pares de iniciadores disponíveis. A metacaspase 4 mostrou produtos de amplificação tanto na camada paliçádica, como na camada subepidérmica, em estágios iniciais (8 DAP), intermediários (12 DAP) e tardios (18 DAP) (figuras 24A, 24B e 24C respectivamente), indicando que possivelmente esta metacaspase seja fundamental para a execução da MCP em todos os

tecidos do tegumento. A metacaspase 4 de *V. unguiculata* apresentou 88% de similaridade com a metacaspase 4 de soja (XM\_003546612.1), 78% de similaridade com a metacaspase 4 de *Arabidopsis thaliana* (AT1G79340) e 76% de similaridade com a metacaspase mcll-Pa de *Picea abies* (figura 19A, 19B e 19C, respectivamente). A metacaspase 4 de *Arabidopsis* é uma metacaspase do tipo II, ou seja, não possui o prodomínio pró-apoptótico, mas apresenta a região de conexão entre as subunidades p20 e p10 (figura 1). Quando foi realizada uma busca pelas funções desta protease em *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org/>) foi encontrada como principal função a de regulação positiva da MCP induzida por estresses bióticos e abióticos (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=137999&type=locus>). Estudos sobre a metacaspase 4 de *Arabidopsis* revelaram que a mesma é dependente de cálcio para sua atividade como regulador positivo da MCP, além de ser ativada por processamento autocatalítico (Zhang e Lam, 2011; Watanabe e Lam, 2011). A metacaspase 4 de *Arabidopsis* apresenta 64,3% de similaridade com a metacaspase do tipo II (mcll-Pa) de *Picea abies*. Bozkov *et al.* (2005) demonstraram que o silenciamento gênico da mcll-Pa suprime a MCP do suspensor, acarretando na paralisação do desenvolvimento embrionário da planta. Também foi demonstrado a capacidade da mcll-Pa de clivar a TSN (*Tudor staphylococcal nuclease*), uma proteína evolutiva e estruturalmente conservada, presente na maioria dos eucariontes, e que é um substrato da caspase 3 presente em animais (Sundström *et al.*, 2009). Até agora, a TSN é a única proteína que é clivada por uma metacaspase vegetal *in vivo* (Sundström *et al.*, 2009; Enoksson e Salvesen, 2010). Foi observado por Frei dit Frey *et al.* (2010) que, em *Arabidopsis*, a TSN estabiliza mRNAs codificantes para proteínas da via secretória que confere à planta tolerância a estresses. A maioria das proteínas secretadas são inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, e a ação destas pode suprimir a morte celular em plantas (Solomon *et al.*, 1999, Coffeen e Wolpert, 2004). Assim, especula-se que a proteína TSN poderia proteger as células da morte pela manutenção da expressão dos inibidores de protease em níveis suficientes para inibir a ativação de proteases relacionadas com a morte celular (Tsiatsiani *et al.*, 2011). A clivagem da TSN por mcPall agiria portanto induzindo a morte celular através da liberação da ação de proteases, anteriormente inibidas. Mais estudos são necessários para confirmar se a metacaspase 4 de *Vigna unguiculata*

apresentaria as mesmas propriedades da metacaspase 4 de *Arabidopsis* e da mcll-Pa de *Picea abies*.

Não foi detectada a amplificação da  $\beta$ -VPE em nenhuma das camadas microdissecadas durante o desenvolvimento do tegumento, indicando que a mesma provavelmente não se encontra envolvida no processo de MCP durante o desenvolvimento do tegumento de *Vigna unguiculata*.

Já a cistatina mostrou um perfil de expressão similar àquele visto na metacaspase 4, com produtos de amplificação presentes tanto na camada paliçádica como na camada subepidérmica durante todo o desenvolvimento do tegumento (figura 25). Possivelmente a presença de mRNAs codificantes para cistatinas durante todo o desenvolvimento do tegumento implique na necessidade da rápida tradução dos mesmos para a regulação das proteases cisteínicas envolvidas na MCP. Solomon *et al.* (1999) observaram que a expressão de cistatinas em células de soja em cultura é capaz de inibir as atividades de proteases cisteínicas que foram induzidas por estresse oxidativo, impedindo a ocorrência da MCP. Também foi observado por Belenghi *et al.* (2003) que a super-expressão de uma cistatina constitutiva (ATCYS1) é capaz de suprimir a resposta hipersensível induzida em plantas de tabaco e em cultura de células de *Arabidopsis* (Belenghi *et al.*, 2003). Uma protease cisteínica presente em sementes germinantes de trigo foi detectada por Kiyosaki *et al.* (2007) e vista como regulada por cistatinas intrínsecas. Em *Vigna unguiculata*, foi detectada a expressão coordenada entre proteases cisteínicas e cistatinas durante o desenvolvimento das sementes (Fernandes *et al.*, 1991).

Desde que o cometimento do suicídio celular não é uma decisão trivial para o organismo vegetal, as atividades relacionadas à MCP são submetidas a um cuidadoso controle, com diversos mecanismos refinados de ativação e regulação como respostas aos diversos sinais recebidos. Assim, elucidar como as cascatas de sinalização das vias envolvidas na MCP vegetal são ativadas e reguladas é meta central para a compreensão de como a morte celular programada é orquestrada em plantas.

## 6 – Conclusões

➤ Eventos típicos de MCP foram detectados durante o desenvolvimento de tegumentos de *Vigna unguiculata*.

➤ A MCP foi vista como autolítica e assíncrona, ocorrendo da camada paliçádica (mais externa) em direção às camadas mais internas de parênquima, a partir de 10 DAP.

➤ A partir deste estágio, ao longo do desenvolvimento do tegumento, observou-se a expansão do núcleo, que ao final substitui o volume do citoplasma, a desorganização da cromatina e fragmentação do DNA, a perda da viabilidade das membranas, a desorganização e posterior desaparecimento de organelas, como mitocôndrias, plastídios, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, o espessamento das paredes celulares e o achatamento das camadas celulares nos estágios mais tardios do desenvolvimento. Este processo inicia-se na exotesta e estende-se para as camadas mais internas do tegumento com o decorrer do desenvolvimento.

➤ A liberação do citocromo C e a fragmentação do DNA aparentam ser eventos iniciais e a permeabilização das membranas e a liberação de grandes quantidades de DNA oligonucleossomal são eventos tardios da MCP de tegumentos de *Vigna unguiculata*

➤ Diferentes atividades de proteases cisteínicas foram detectadas, e atividades caspase-símile dos tipos 3, 6, 8 e 9 foram observadas durante a MCP dos tegumentos, em pH ácido, simulando condições vacuolares, e neutro, simulando condições citosólicas. A maioria destas atividades foram parcialmente ou totalmente inibidas por inibidores específicos para caspases animais.

➤ Foram detectados produtos de amplificação dos iniciadores para metacaspase 4 e cistatinas, ao longo do desenvolvimento do tegumento de *V. unguiculata* e nas diferentes camadas celulares deste tecido, mas não para  $\beta$ -VPE.

➤ A metacaspase 4 de *Vigna unguiculata* apresentou alta similaridade (88%) com a metacaspase 4 de soja, com a metacaspase 4 de *Arabidopsis thaliana* (78%) e com a mclI-Pa de *Picea abies* (76%), que possuem papéis na MCP induzida por estresses bióticos e abióticos.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe K., Emori Y., Kondo H., Suzuki K., Arai S. **Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin) homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds.** J. Biol. Chem., 262: 16793-16797, 1987.
- Abe K., Kondo H., Watanabe H., Emori Y., Arai S. **Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds.** Biomed. Biochim. Acta, 50: 637-641, 1991.
- Abe M., Abe K., Iwabuchi K., Domoto C., Arai S. **Corn cystatin-I expressed in *Escherichia coli*: Investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels.** J. Biochem., 116: 488-492, 1994.
- Abe Y., Shirane K., Yokosawa H., Matsushita H., Mitta M., Kato I., Ishii S. **Asparaginyl endopeptidase of jackbean seeds. Purification, characterization and high utility in protein sequence analysis.** J. Biol. Chem., 268: 3525-3529, 1993.
- Aguiar J. M., Franco O. L., Rigden D. J., Bloch C., Monteiro A. C. S., Flores V. M. Q., Jacinto T., Xavier-Filho J., Oliveira A. E. A., Grossi-de-Sá M. F., Fernandes K. V. S. **Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests.** Proteins: Struct. Funct. Bioinform., 63: 662-670, 2006.
- Ávila D. S., *et al.* (1999). **Anais da XXVIII Reunião Anual da SBBq**, E-64,35.
- Balk J., Leaver C. J. **The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release.** The Plant Cell, 13: 1803-1818, 2001.
- Balk J., Leaver C. J., McCabe, P. F. **Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants.** FEBS Lett., 463: 151–154, 1999.
- Bar-Dror T., Dermastia M., Kladnik A., Znidaric M. T., Novak M. P., Meir S., Burd S., Philosoph-Hadas S., Ori N., Sonogo L., Dickman M. B., Lers A. **Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato.** Plant Cell, 23(11): 4146-4163, 2011.
- Barrett A. J. **The Cystatins: a new class of peptidase inhibitors.** Trends Biochem. Sci., 12: 193-196, 1987.

- Baumgartner B. e Chrispeels M. J. **Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans.** *Plant Physiol.*, 58: 1-6, 1976.
- Belenghi B., Acconcia F., Trovato M., Perazzolli M., Bocedi A., Polticelli F., Ascenzi P., Delledonne M. **AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death.** *Eur. J. Biochem.*, 270: 2593-2604, 2003.
- Belenghi B., Solomon M., Levine A. **Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death.** *J. Exp. Bot.*, 55: 889-897, 2004.
- Blackstone N. W., Kirkwood T. B. L. **Mitochondria and programmed cell death: “slave revolt” or community homeostasis?** In: *Genetic and Cultural Evolution of Cooperation* (ed. Hammerstein P), pp. 309–325. The MIT Press, Cambridge, MA, 2003.
- Bonke M., Thitamadee S., Mähönen A. P., Hauser M. T., Helariutta Y. **APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*.** *Nature*, 426: 181-186, 2003.
- Bonneau L., Gel Y., Drury G. E., Gallois P. **What happened to plant caspases?** *J. Exp. Bot.*, 59(3): 491-499, 2008.
- Boren M., Hoglund A. S., Bozhkov P., Jansson C. **Developmental regulation of a VEIDase caspase-like proteolytic activity in barley caryopsis.** *J. Exp. Bot.*, 57(14): 3747-3753, 2006.
- Bosch M., Franklin-Tong V.E. **Temporal and spatial activation of caspase-like enzymes induced by self-incompatibility in *Papaver* pollen.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(46): 18327-18332, 2007.
- Bozhkov P. V., Filonova L. H., Suarez M. F., Helmersson A., Smertenko A. P., Zhivotovsky B., Von Arnold S. **VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation.** *Cell Death Differ.*, 11(2): 175-182, 2004.
- Bozhkov P. V., Suarez M. F., Filonova L. H., Daniel G., Zamyatnin Jr. A. A., Rodriguez-Nieto S. **Cysteine protease mclI-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14463–14468, 2005.

- Bradford M. M. **A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding.** Analytical Biochemistry, 72: 248-254, 1976.
- Bras M., Queenan B., Susin S. A. **Programmed cell death via mitochondria: Different Modes of Dying.** Biochemistry (Moscow), 70(2): 231-239, 2005.
- Chichkova N. V., Kim S. H., Titova E.S. Kalkum M., Morozov V. S., Rubtsov Y. P. Kalinina N. O., Taliansky M. E., Vartapetian, A. B. **A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response.** Plant Cell 16: 157-171, 2004.
- Chichkova N. V., Shaw J., Galiullina R. A., Drury G. E., Tuzhikov A. I., Kim S. H. **Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity.** EMBO J., 29: 1149-1161, 2010.
- Chivasa S., Tomé D. F. A., Murphy A. M., Hamilton J. M., Lindsey K., Carr J. P., Slabas A. R. **Extracellular ATP: A modulator of cell death and pathogen defense in plants.** Plant Signal. Behav., 4(11): 1078-1080, 2009.
- Coffeen W. C., Wolpert T. J. **Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*.** Plant Cell, 16: 857-873, 2004.
- Coll N. S., Epple P., Dangl, J. L. **Programmed cell death in the plant immune system.** Cell Death Differ., 18(8): 1247-1256, 2011.
- Coll N. S., Vercammen D., Smidler A., Clover C., Van Breusegem F., Dangl J. L. **Arabidopsis type I metacaspases control cell death.** Science, 330: 1393-1397, 2010.
- Csoma, C. e Polgár, L. **Proteinase from germinating bean cotyledons. Evidence for involvement of a thiol group in catalysis.** Biochem. J., 222: 769-776, 1984.
- Danon A., Rotari V. I., Gordon A., Mailhac N., Gallois P. **Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death.** J. Biol. Chem., 279(1): 779-787, 2004.
- De Bonno A. G., Greenwood J. S. **Characterization of programmed cell death in the endosperm cells of tomato seed: two distinct death programs.** Can. J. Bot., 84: 791-804, 2006.

- Del Pozo O., Lam E. **Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens.** *Curr. Biol.*, 8(20): 1129-1132, 1998.
- Del Pozo O., Lam E. **Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus.** *Mol. Plant–Microbe Interact.*, 16: 485-494, 2003.
- Dodson, G., Wlodawer, A. **Catalytic triads and their relatives.** *Trends Biochem. Sci.*, 23: 347-352, 1998.
- D'Silva I., Poirier G. G., Heath M. C. **Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response: A form of programmed cell death.** *Exp. Cell Res.*, 245: 389–399, 1998.
- Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H. **Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis.** *Ann. Rev. Biochem.*, 68: 383-424, 1999.
- Egorova V. P., Lo Y., Dai H. **Programmed cell death induced by heat shock in mung bean seedlings.** *Bot. Stud.*, 52: 73-78, 2011.
- Enoksson M., Salvesen, G. S. **Metacaspases are not caspases – always doubt.** *Cell Death Differ.* 17: 1221, 2010.
- Estrada S., Pavlova A.; Björk I. **The contribution of N-terminal region residues of cystatin A (stefin A) to the affinity and kinetics of inhibition of papain, cathepsin B, and cathepsin L.** *Biochemistry*, 38(22): 7339-7345, 1999.
- Fernandes K. V. S., Campos F. A. P., Val R. R., Xavier-Filho J. **The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds.** *Plant Science*, 74: 179-184, 1991.
- Fernandes K. V. S., Sabelli P. A., Barrat P., Richardson M., Xavier-Filho J., Shewrry R. **The resistance of cowpea seeds to bruchid beetle is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors.** *Plant Mol. Biol.*, 23: 215-219, 1993.
- Filonova L. H., Bozhkov P. V., Brukhin V. B., Daniel G., Zhivotovsky B., von Arnold S. **Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce.** *J. Cell Sci.*, 113: 4399-4411, 2000.

- Filonova L. H., von Arnold S., Daniel G., Bozhkov P. V. **Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed.** *Cell Death Differ.*, 9: 1057-1062, 2002.
- Flores V. M. Q., Louro R. P., Xavier-Filho J., Barratt D. H. P., Shewry P., Fernandes K. V. S. **Temporal and tissue localization of a cowpea (*Vigna unguiculata*) cystatin.** *Physiol. Plant.*, 112 (2): 195-199, 2001.
- Frei dit Frey N., Muller P., Jammes F., Kizis D., Leung J. **The RNA binding protein Tudor-SN is essential for stress tolerance and stabilizes levels of stress-responsive mRNAs encoding secreted proteins in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*, 22: 1575-1591, 2010.
- Gadjev I., Stone J. M., Gechev T. S. **Programmed cell death in plants: New insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide.** *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 270(3): 87-144, 2008.
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi, C. **Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death.** *Bioassays*, 28: 1091-1101, 2006.
- Gilroy E. M., Hein I., van der Hoorn R. **Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response.** *Plant Journal*, 52: 1-13, 2007.
- Giuliani C., Consonni G., Gavazzi G., Colombo M., Dolfini S. **Programmed cell death during embryogenesis in maize.** *Ann. Bot.*, 90(2): 287-292, 2002.
- Goldberg R. B., Paiva G. Yadegari R. **Plant Embryogenesis: Zygote to Seed.** *Science*, 266: 605-614, 1994.
- Goodsell D. S. **The molecular perspective: cytochrome c and apoptosis.** *Oncologist*, 9: 226–227, 2004.
- Green D. R., Reed J. C. **Mitochondria and apoptosis.** *Science*, 281:1309-1312, 1998.
- Greenwood J. S., Helm M., Gietl C. **Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2238-2243, 2005.
- Gruden K., Štrukelj B., Ravnikar M., Poljšak-Prijatelj M., Mavrič I. **Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterization and immunocytochemical localisation studies.** *Plant Mol. Biol.*, 34: 317-323, 1997.

- Gunawardena A. H. L. A. N., Pearce D. M., Jackson M. B., Hawes C. R., Evans D. E. **Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.)**. *Planta*, 212: 205-214, 2001.
- Gunawardena A. H. L. A. N., Donnelly K. S. P., Greenwood J. S., Dengler N. G. **Programmed cell death and leaf morphogenesis in *Monstera obliqua* (Araceae)** *Planta*, 221: 607-618, 2005.
- Gunawardena A. H. L. A. N., Greenwood J. S., Dengler N. G. **Programmed cell death remodels lace plant leaf shape during development**. *Plant Cell*, 16: 60-73, 2004.
- Hansen G. **Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells**. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 13: 649-657, 2000.
- Hao L., Goodwin P. H., Hsiang T. **Expression of a metacaspase gene of *Nicotiana benthamiana* after inoculation with *Colletotrichum destructivum* or *Pseudomonas syringae* pv. tomato, and the effect of silencing the gene on the host response**. *Plant Cell Rep.*, 26: 1879-1888, 2007.
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. **A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death**. *Science*, 305: 855-858, 2004.
- Haughn G., Chaudhury A. **Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis***. *Trends Plant Sci.*, 10: 472-477, 2005.
- He R., Drury G. E., Rotari V. I., Gordon A., Willer M., Tabasum F., Woltering E. J., Gallois P. **Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis***. *J. Biol. Chem.*, 283: 774-783, 2008.
- He X., Kermode A. R. **Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds**. *Plant Mol. Biol.*, 52: 729-744, 2003.
- Heath M. C., Nimchuk Z. L., Xu H. **Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus**. *New Phytol.*, 135: 689-700, 1997.

- Helmerson A., von Arnold S., Bozkov P. V. **The level of free intracellular zinc mediates programmed cell death/cell survival decisions in plant embryos.** *Plant Physiol.*, 147: 1158-1167, 2008.
- Heussen C., Dowdle E. B. **Electrophoretic analysis of proteases in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl-sulfate and copolymerized substrate.** *South Afric. J. Sci.*, 76: 184, 1980.
- Hoeberichts F.A., ten Have A., Woltering E.J. **A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves.** *Planta*, 217: 517-522, 2003.
- Hofius D., Schultz-Larsen T., Joensen J., Tsitsigiannis D.I., Petersen N. H. T., Mattson O., Jorgensen L. B., Jones J. D. G., Mundy J., Petersen M. **Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in *Arabidopsis*.** *Cell*, 137: 773-783, 2009.
- Hosoyama H., Irie K., Abe K., Arai S. **Oryzacystatin exogenously introduced into protoplasts and regeneration of transgenic rice.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58: 1500-1505, 1994.
- Jones A. **Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?** *Trends Plant Sci*, 5: 225–230, 2000.
- Jones, D. T. **GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences.** *J. Mol. Biol.*, 287: 797-815, 1999.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie, A. R. **Apoptosis – basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics.** *Braz. J. Cancer* 26: 239–257, 1972.
- Kim S. M., Bae C., Oh S. K., Choi D. **A pepper (*Capsicum annuum L.*) metacaspase 9 (Camc9) plays a role in pathogen-induced cell death in plants.** *Mol. Plant Biol.*, 14(6): 557-66, 2013.
- King S. P., Lunn J. E., Furbank, R. T. **Carbohydrate Content and Enzyme Metabolism in Developing Canola Siliques.** *Plant Physiol.*, 114(1): 153-160, 1997.
- Kiyosaki T., Matsumoto I., Asakura T., Funaki J., Kuroda M., Misaka T., Arai S., Abe K. **Gliadain, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum L.*, specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins.** *FEBS J.*, 274: 1908-1917, 2007.

- Kladnik A., Chamusco K., Dermastia M., Chourey P. **Evidence of Programmed Cell Death in Post-Phloem Transport Cells of the Maternal Pedicel Tissue in Developing Caryopsis of Maize.** *Plant Physiology*, 136, 3572–3581, 2004.
- Koiwa H., D'Urzo M.P., Assfalg-Machleidt I., Zhu-Salzman K.; Shade R. E., An H., Murdock L. L., Machleidt W., Bressan R. A., Hasegawa P. M. **Phage display selection of hairpin loop soyacystatin variants that mediate high affinity inhibition of a cysteine proteinase.** *Plant J.*, 27: 383-391, 2001.
- Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozak K. **Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*.** *Gene*, 129: 175-182, 1993.
- Kondo H., Abe K., Nishimura I., Watanabe H., Emori Y., Arai S. **Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases.** *J. Biol. Chem.*, 265: 15832-15837, 1990.
- Kozela C., Regan, S. **How plants make tubes.** *Trends Plant Sci.*, 8(4): 159-164, 2003.
- Kuroda M., Kiyosaki T., Matsumoto I., Misaka T., Arai S., Abe, K. **Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 22-28, 2001.
- Kuroyanagi M., Yamada K., Hatsugai N., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. **VPE is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*.** *J. Biol. Chem.*, 280: 32914-32920, 2005.
- Kutik J., Kuthanova A., Smertenko A., Fischer L., Opatrny Z. **Cadmium-induced cell death in BY-2 cell culture starts with vacuolization of cytoplasm and terminates with necrosis.** *Physiologia Plantarum*, 2013 doi: 10.1111/ppl.12124
- Laemmli, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lam, E. **Controlled cell death, plant survival and development.** *Nat. Rev.*, 5: 305-315, 2004.
- Lim C. O., Lee S. I., Chung W. S., Park S. H., Hwang I., Cho M. J. **Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds.** *Plant Molecular Biology*, 30: 373-379, 1996.

- Lima, R. M. **Proteinases cisteínicas e serínicas presentes em sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Em desenvolvimento, quiescentes e germinação.** Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, 2001.
- Lincoln J. E., Richael C., Overduin B., Smith K., Bostock R., Gilchrist D. G. **Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broadspectrum resistance to disease.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 15217-15221, 2002.
- Lombardi L., Ceccarelli N., Picciarelli P., Lorenzi R. **Caspase-simile proteases involvement in programmed cell death of *Phaseolus coccineus* suspensor.** Plant Sci., 172: 573-578, 2007.
- López-Fernandéz M., Maldonado S. **Programmed cell death during quinoa perisperm development.** The Journal of Experimental Botany 64(11): 3313-3325, 2013.
- Margis R., Reis E. M., Villeret V. **Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins.** Arch Biochem Biophys., 359: 24-30, 1998.
- Martinez M., Rubio-Somoza I., Carbonero P., Díaz I. **A cathepsin B-like cysteine protease gene from *Hordeum vulgare* (gene CatB) induced by GA in aleurone cells is under circadian control in leaves.** J. Exp. Bot., 54: 951-959, 2003.
- McLean H., Gilroy E. M., Yun B. W., Birc P. R. J. Loake, G. J. **Functional redundancy in the *Arabidopsis* Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence.** New Phytol., 183, 408-418, 2009.
- Misaka T., Kuroda M., Iwabuchi K., Abe K., Arai S. **Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin.** Eur. J. Biochem. 240: 609-614, 1996.
- Mitsuhashi W., Koshiba T., Minamikawa T. **Separation and characterization of two endopeptidases from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds.** Plant Physiol. 80: 628-634, 1986.

- Moïse, J. A.; Han, S.; Savitch, L. G.; Johnson, D. A.; Miki, B. L. A. **Seed Coats: Structure, Development, Composition, And Biotechnology.** In *Vitro Cell. Develop. Biol.*, 41: 620-644, 2005.
- Nakaune S., Yamada K., Kondo M., Kato T., Tabata S., Nishimura M., Hara-Nishimura, I. **A Vacuolar Processing Enzyme, dVPE, Is Involved in Seed Coat Formation at the Early Stage of Seed Development.** *The Plant Cell* 17: 876-887, 2005.
- Navarre D. A., Wolpert T. J. **Victorin induction of an apoptotic/ senescence-like response in oats.** *Plant Cell*, 11: 237-249, 1999.
- Ojima A., Shiota H., Higashi K., Kamada H., Shimma Y., Wada M., Satoh S. **An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot.** *Plant Molecular Biology*, 34: 99-109, 1997.
- Pak C., van Doorn W.G. **Delay of Iris flower senescence by protease inhibitors.** *New Phytologist* 165: 473–480, 2005.
- Palavan-Unsal N., Arisan E. D. **Evidences for the presence of caspase-like activities in plants.** *Fen Bilimleri Dergisi*, 23(2): 57-69, 2011.
- Pennel R., Lamb C. **Programmed cell death in plants.** *Plant Cell*, 9: 1157-1168, 1997.
- Radchuk V., Weier D., Radchuck R., Weschke W., Weber H. **Development of maternal seed tissue in barley is mediated by regulated cell expansion and cell disintegration and coordinated with endosperm growth.** *The Journal of Experimental Botany* 62(3): 1217–1227, 2011.
- Rautengarten C., Steinhauser D., Büssis D., Stintzi A., Schaller A., Kopka J. **Inferring hypotheses on functional relationships of genes: analysis of the *Arabidopsis thaliana* subtilase gene family.** *PLoS Comput. Biol.*, 1(4), e40, 2005.
- Rojo E., Martin R., Carter C. **VPEc exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens.** *Curr. Biol.*, 14: 1897-1906, 2004.
- Ryan C. A., Walker-Simmons M. K. In: Marcus A., ed. **The biochemistry of plants.** In: A comprehensive treatise. Vol. 6., New York: Academic Press, 321-351, 1981.
- Sanmartín M. Jaroszewski L., Raikhel N. V., Rojo E. **Caspases. Regulating Death Since the Origin of Life.** *Plant Physiol.*, 137:841–847, 2005.

- Satoh S. **Functions of the Cell Wall in the Interactions of Plant Cells: Analysis Using Carrot Cultured Cells.** *Plant Cell Physiol.*, 39: 361-368, 1998.
- Schaffer M. A., Fischer R. L. **Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato.** *Plant Physiol.*, 93: 1486-1491.
- Schaller A. **A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases.** *Planta*, 220: 183-197, 2004.
- Schmid M., Simpson D., Gietl C. **Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 14159-14164, 1999.
- Schmid M., Simpson D., Kalousek F., Gietl C. **A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome a putative lytic compartment.** *Planta*, 206: 466-475, 1998.
- Sheen J., Zhou L., Jang J. **Sugars as signaling molecules.** *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 410-418, 1999.
- Shishkova S., Dubrovsky J. G. **Developmental programmed cell death in primary roots of sonoran desert cactaceae.** *Amer. J. Bot.*, 92(9): 1590-1594, 2005.
- Solomon M., Belenghi B., Delledonne M., Menachem E., Levine A. **The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants.** *Plant Cell*, 11: 431-444, 1999.
- Stennicke H. R., Salvesen G. S. **Caspase assays.** *Meth. Enzymol.*, 322: 91-100, 2000.
- Sun Y. L., Zhao Y., Hong X., Zhai Z. H. **Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants.** *FEBS Lett.*, 462(3), 317-321, 1999.
- Sundström J. F., Vaculova A., Smertenko A. P., Savenkov E. I., Golovko A., Minina E. **Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome.** *Nat. Cell Biol.*, 11: 1347-1354, 2009.

- Szallies A., Kubata B. K., Duszenko M. **A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** FEBS Lett., 517, 144-150, 2002.
- Thomas S. G., Franklin-Tong V. E. **Self-incompatibility triggers programmed cell death in *Papaver* pollen.** Nature, 429: 305-309, 2004.
- Tripathi L.P., Sowdhamini R. **Cross genome comparisons of serine proteases in *Arabidopsis* and rice.** BMC Genomics, 7: 200-231, 2006.
- Trobacher C. P., Senatore A., Greenwood J. S. **Mastermind or minions? Cysteine proteases in plant programmed cell death.** Can. J. Bot., 84: 651-667, 2006.
- Tseng C. C., Tseng, C. P., Levine M. J., Bobek L. A. **Differential effect toward inhibition of papain and cathepsin C by recombinant human salivary cystatin SN and its variants produced by a baculovirus system.** Arch. Biochem. Biophys., 380: 133-140, 2000.
- Tsiatsiani L., Van Breusegem F., Gallois P., Zavalov A., Lam E., Bozhkov P. V. **Metacaspases.** Cell Death Differ., 18: 1279-1288, 2011.
- Tulli F. C., Miguel E. C., Lima N. B., Fernandes K. V. S., Gomes V. M., Da Cunha M. **Characterization of stipular colleters of *Alseis pickelii* Pilger et Shmale (Rubiaceae).** Botany 91(6): 403-413, 2013.
- Tully R. E., Beevers H. **Proteases and Peptidases of Castor Bean Endosperm: Enzyme Characterization and Changes during Germination.** Plant Physiol. 62: 746-750, 1978.
- Turk V., Bode W. **The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases.** FEBS Lett., 285: 213-219, 1991.
- Uren A. G., O'Rourke K., Aravind L., Pisabarro M. T., Seshagiri S., Koonin E. V., Dixit V. M. **Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma.** Mol. Cell, 6: 961-967, 2000.
- Ussuf K. K., Laxmi N. H., Mitra R. **Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants.** Current Sci. 80, 7: 47-853, 2001.
- Van Doorn W. G. **Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals.** J. Exp. Bot., 21: 1-13, 2011.

- Van Doorn W. G., Balk P. A., van Houwelingen A. M. M. L., Hoeberichts F. A., Hall R. D., Vorst O., van der Schoot C., van Wordragen M. F. **Gene expression during anthesis and senescence in Iris flowers.** *Plant Mol. Biol.*, 53(6): 845-863, 2003.
- Van Doorn W. G., Beers E. P., Dangl J. L., Franklin-Tong V. E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A. J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P. V. **Morphological classification of plant cell deaths.** *Cell Death Differ.*, 18: 1241-1246, 2011.
- Vartapetian A. B., Tuzhikov A. I., Chichkova N. V., Taliansky M., Wolpert T. J. **A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases.** *Cell Death Differ.*, 18: 1289-1297, 2011.
- Vaughan J. G. **Seed coat structure of yellow Chinese rape.** *Nature*, 181: 650, 1958.
- Vercammen D., Belenghi B., van de Cotte B., Beunens T., Gavigan J. A., De Rycke R. **Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9.** *J. Mol. Biol.*, 364: 625-636, 2006.
- Vercammen D., van de Cotte B., De Jaeger G., Eeckhout D., Casteels P., Vandepoele K. **Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine.** *J. Biol. Chem.*, 279: 45329-45336, 2004.
- Virolainen E., Blokhina O., Fagerstedt K. **Ca<sup>2+</sup>-induced high amplitude swelling and cytochrome c release from wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria under anoxic stress.** *Ann. Bot.* 90, 509-516, 2002.
- Wan L., Xia Q., Qiu X., Selvaraj G. **Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument.** *The Plant J.*, 30: 1-10, 2002.
- Watanabe H., Abe K., Emori Y., Hosoyama H., Arai S. **Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains).** *J. Biol. Chem.*, 266: 16897-16902, 1991.
- Watanabe N. Lam, E. ***Arabidopsis* metacaspase 2d is a positive mediator of cell death induced during biotic and abiotic stresses.** *The Plant J.*, 66(6): 969-982, 2011.

- Watanabe N., Lam E. **Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast.** J. Biol. Chem., 280: 14691-14699, 2005.
- Weber H., Borisjuk L., Heim U., Buchner P., Wobus U. **Seed coat-associated invertases of fava bean control both unloading and storage functions: cloning of cDNAs and cell type-specific expression.** Plant Cell, 7: 1835-1846, 1995.
- Western T. L., Skinner D. J., Haughn, G. W. **Differentiation of mucilage secretory cells of the Arabidopsis seed coat.** Plant Physiol., 122: 345-356, 2000.
- Windsor J. B., Symonds V. V., Mendenhall J. Lloyd A. M. **Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument.** The Plant J., 22: 483-493, 2000.
- Wobus U., Weber, H. **Sugars as signal molecules in plant seed development.** Biol. Chem., 380: 937-944, 1999.
- Wojnar P., Van't Hof W., Merschak P., Lechner M., Redl B. **The N-terminal part of recombinant human tear lipocalin/von Ebner's gland protein confers cysteine proteinase inhibition depending on the presence of the entire cystatin-like sequence motifs.** Biol. Chem., 382: 1515-1520, 2001.
- Woltering E. J. **Death proteases come alive.** Trends Plant Sci., 9(10): 469-472, 2004.
- Xie Q. E., Liu I. D., Yu S. X, Wnag R. F., Fan Z. X., Wang Y. G., Shen F. F. **Detection of DNA ladder during cotyledon senescence in cotton.** Biol. Plantarum, 52(4): 654-659, 2008.
- Yeung E. C., Clutter M. E. **Embryology of *Phaseolus coccineus*: The ultrastructure and development of the suspensor.** Can. J. Bot., 57: 120-136, 1979.
- Zhang H., Dong S., Wang M., Song W., Dou X., Zheng X., Zhang Z. **The role of vacuolar processing enzyme (VPE) from *Nicotiana benthamiana* in the elicitor-triggered hypersensitive response and stomatal closure.** J. Exp. Bot., 61, 3799-3812, 2010.
- Zhang Y., Lam E. **Sheathing the swords of death: post-translational modulation of plant metacaspases.** Plant Signal. Behav., 6(12):2051-2056, 2011.