

**CLONAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DE PROTEASES DO  
TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE DEFESA DO  
MARACUJAZEIRO**

**DALVANIA PINHO DOMINGUES**

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ**

**OUTUBRO DE 2013**



**CLONAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DE PROTEASES DO  
TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE DEFESA DO  
MARACUJAZEIRO**

**DALVANIA PINHO DOMINGUES**

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

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ**

**OUTUBRO DE 2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

537 / 2013

Domingues, Dalvania Pinho

Clonagem molecular de inibidores de proteases do tipo Kunitz envolvidos  
no mecanismo de defesa do maracujazeiro/ Dalvania Pinho Domingues. – Campos  
dos Goytacazes, 2013.

52, [7] f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e  
Biotecnologia. Laboratório de Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia Molecular e Biotecnologia

Orientador: Silva, Tânia Jacinto Freitas da

Bibliografia: f.40-50

1.Maracujá 2. Inibidores 3. Tripsina 4. Kunitz 5. Metil Jasmonato  
I.Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

572.8  
D671c

**CLONAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES DE PROTEASES DO  
TIPO KUNITZ ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE DEFESA DO  
MARACUJAZEIRO**

**DALVANIA PINHO DOMINGUES**

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

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca examinadora:

---

Dr. Aline Chaves Intorne (CBB-LFBM-UENF)

---

Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (CBB-LBT-UENF)

---

Dra. Beatriz dos Santos Ferreira (UFRJ-Macaé)

---

Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva (CBB-LBT-UENF)-Orientadora

*Dedico esta conquista á minha mãe*

*Luzia Pinho Domingues.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente por ter me iluminado e dado forças para seguir em frente e nunca desistir apesar das dificuldades no caminho.

À minha mãe Luzia por me incentivar, dar forças e apoiar para continuar sempre.

Às amigas Fralini, Ana Cláudia, Mariana, Vanessa, Roberta e Sâmella pelos momentos de alegria, descontração e aventura.

À professora Cristina Maria Magalhães de Souza que no início de minha graduação sempre me incentivou a progredir.

À professora Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva, pela orientação, pela confiança, pelos puxões de orelha que me fizeram crescer.

Ao grupo do maracujá: Viviane Perdizio (Vivi) pelos momentos de descontração e suporte; ao Sylvio (Silvelino) pela orientação de como proceder em alguns métodos.

Aos técnicos do LBT Zila, Rívea, Telma e Paulo por sempre estarem prontas para ajudar.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. André de Oliveira Carvalho pela colaboração com os experimentos de RT-PCR e ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Francisco José Alves Lemos por gentilmente ceder o termociclador para os experimentos de RT-PCR e digestão de plasmídeos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente e seu grupo de pesquisa da Fiocruz, por ceder equipamentos e reagentes para as primeiras reações de RT-PCR e para o sequenciamento dos clones obtidos, assim como pela acolhida.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Álvaro Fabrício Lopes Rios e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz dos Santos Ferreira por terem aceitado participar da banca e contribuir com este trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Chaves Intorne por ter revisado a minha dissertação, me dando dicas e corrigindo erros que passam despercebidos.

Enfim a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes durante a minha caminhada e contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

## INDÍCE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 O maracujazeiro .....	2
1.2 A importância econômica da cultura do maracujá .....	3
1.3 Mecanismos de defesa vegetal .....	5
1.4 Defesas Vegetais baseadas em jasmonatos .....	7
1.5 Via do Octadecanóide .....	9
1.6 Controle da expressão de genes responsivos a JA .....	11
1.7 Inibidores de proteases .....	13
1.8 Inibidores de proteases serínicos .....	14
1.9 Inibidores do tipo Kunitz .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 Material vegetal .....	20
3.2 Incubação de plantas de maracujá com vapores de Metil Jasmonato .....	20
3.2.1 Extração de RNA total de folhas de maracujá–amarelo .....	20



3.2.2	Análise eletroforética de RNAs totais .....	21
3.3	Construção dos iniciadores 5' .....	21
3.4	Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase .....	22
3.4.1	Análise eletroforética e purificação do produto amplificado .....	23
3.5	Clonagem dos fragmentos de interesse .....	23
3.6	Transformação bacteriana .....	24
3.6.1	Seleção das colônias e isolamento do DNA plasmidial .....	25
3.6.2	Digestão de DNA plasmidial .....	25
3.7	Sequenciamento e análise dos clones .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
4.1	Transcrição reversa, reação em Cadeia da Polimerase, clonagem molecular e sequenciamento dos clones obtidos .....	26
4.1.1	Iniciador Pf1Fw .....	26
4.1.2	Iniciador Pf4Fw .....	30
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Compostos especializados de plantas .....	6
Tabela 2	Iniciadores degenerados construídos .....	22
Tabela 3	Pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos dos clones obtidos do iniciador Pf1Fw .....	30
Tabela 4	Pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos dos clones obtidos do iniciador Pf4Fw .....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O maracujazeiro .....	3
Figura 2	Efeitos dos compostos orgânicos voláteis .....	7
Figura 3	Via das oxilipinas em plantas e animais .....	8
Figura 4	Via do octadecanóide .....	10
Figura 5	Percepção de jasmonatos .....	12
Figura 6	Subdivisão dos inibidores do tipo Kunitz .....	17
Figura 7	Esquema do vetor de clonagem pCR 2.1-TOPO .....	24
Figura 8	Iniciador Pf1Fw .....	27
Figura 9	Pf 1 Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos ...	28
Figura 10	Iniciador Pf4Fw .....	31
Figura 11	Pf 4 Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos ...	32
Figura 12	Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias dos clones ..	33
Figura 13	Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias dos clones e inibidores de protease do tipo Kunitz .....	35

## ABREVIATURAS

12,13-EOT	Ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico
ACX	Acil-CoA Oxidase
AMP	Ampicilina
AOC	Aleno Óxido Ciclase
AOS	Aleno Óxido Sintase
BPTI	Inibidor de tripsina pancreático bovino
C1	Carbono 1
C11	Carbono 11
C12	Carbono 12
C6	Carbono 6
Ca <sup>2</sup>	Cálcio
cDNA	DNA complementar
COI1	<i>Coranatine Insensitive 1</i>
Da	Dáltons
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido Etileno Diamino Tetracético
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPOTE	Hidroperóxido-Octadecatrienóico

IPs	Inibidores de Protease
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-thiogalactopiranosídeo
JÁ	Ácido Jasmônico
JA-Ile	jasmonoil-L-iso-leucina
JAZ	<i>JAsmonate Zim domain</i>
KAN	Canamicina
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Quilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MeJA	Metil Jasmonato
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio
Mn <sup>2</sup>	Manganês
MYC2	Fator de transcrição que ativa ou reprime genes responsivos á jasmonatos
NaCl	Cloreto de Sódio
NINJA	Novel Interactor of JAZ
OPC	Oxo-Pentenilciclopentanos
OPDA	Acido 12-Oxo-Fitodienóico
OPR <sub>3</sub>	Ácido 12-Oxo-Fitodienóico Redutase 3
ORF	Sequência aberta de leitura
Pb	Pares de bases

PCD	Morte Celular Programada
PR	Proteínas Relacionadas à Patogênese
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa de RNA seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SCF <sup>COI1</sup>	Complexo protéico SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase
Serpinas	Serine proteinase inhibitors
TAE	Tris, Ácido Acético, EDTA
TPL	TOPLESS: co-repressores que interagem direta ou indiretamente com fatores de transcrição
UP	Ultra Pura
VOC	Compostos Orgânicos Voláteis
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -Dgalactopiranosídeo
Zn <sup>2</sup>	Zinco
$\alpha$ -LeA	Ácido Linolênico

## RESUMO

As plantas respondem as agressões de predadores ativando uma cascata de sinalização, que leva a produção de ácido jasmônico. Esse fitohormônio e seus derivados, são fortes indutores da expressão de genes, que codificam proteínas com função defensiva, desempenhando papel central na ativação da resposta de defesa vegetal. O Brasil é um grande produtor de maracujá, sendo a maior parte da produção destinada à indústria de sucos. Devido à importância da cultura do maracujá, tal planta foi estudada quanto aos seus mecanismos de defesa dependentes de jasmonatos. Nossos estudos moleculares avaliaram inibidores do tipo Kunitz induzidos em resposta a elicitação por metil jasmonato. Plantas de maracujá com 4 semanas, foram expostas a vapores de metil jasmonato durante 12 h. O RNA total das folhas foi extraído, utilizando-se TRIzol. Para síntese do cDNA utilizamos 5 µg do RNA total. A 1ª fita de cDNA foi submetida à reação em cadeia da polimerase para obtenção da 2ª fita. Para verificar a eficiência da amplificação a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose. Após verificarmos a existência dos fragmentos de interesse (600 pb–750 pb), procedemos à ligação dos fragmentos ao vetor de clonagem e posterior transformação de *Escherichia coli* DH5α. A seleção das colônias que possuíam os vetores recombinantes foi realizada a partir da análise da resistência ao antibiótico ampicilina e funcionalidade do gene LacZ. Colônias selecionadas foram crescidas e o DNA plasmidial foi extraído e digerido com a enzima *EcoRI*. Os clones que possuíam os fragmentos de interesse foram sequenciados. Obtivemos 5 clones diferentes entre si, provenientes de dois iniciadores 5' utilizados. A análise das sequências de aminoácidos deduzidas revelou similaridade com sequências de inibidores de proteases do tipo Kunitz descritas na literatura. As sequências obtidas neste trabalho podem ser úteis para experimentos futuros de superexpressão destas proteínas *in vitro*.

Palavras-chave: Maracujá, inibidores, tripsina, Kunitz, metil jasmonato, RT-PCR.

## ABSTRACT

Plants respond to attacks by predators by activating a signaling cascade that leads to production of jasmonic acid. This phytohormone and its derivatives are strong inducers of the expression of genes that encode proteins with defensive function, played a central role in the activation of plant defense response. Brazil is a major producer of passion fruit, with most of the production for the juice industry. Due to the importance of culture was studied regarding its defense mechanisms dependent jasmonates. Our studies have assessed molecular Kunitz inhibitors in response induced by elicitation methyl jasmonate. Passion fruit after 4 weeks were exposed to methyl jasmonate vapors for 12 h. Total leaves RNA was extracted using TRIzol. 5µg of total RNA was used for cDNA synthesis. The 1<sup>st</sup> cDNA strand was submitted will polymerase chain reaction for obtaining the 2<sup>nd</sup> cDNA strand. For the efficiency of amplification, the sample was subjected to electrophoresis on agarose gel. After we check the existence of the fragments of interest (600 bp - 750 bp), we proceeded to link the fragments to the vector cloning and subsequent transformation of *Escherichia coli* DH5α. The selection of colonies that possessed the recombinant vectors was performed by analyzing the resistance to the antibiotic ampicillin and functionality of the LacZ gene. Selected colonies were grown and plasmid DNA was extracted and digested with the enzyme *EcoRI*. Clones which had the fragments of interest were sequenced. 5 different clones obtained together from two 5'primers used. Analysis of the deduced amino acid sequences revealed sequence similarity to protease inhibitors Kunitz described. The sequences obtained in this study may be useful for future experiments, like superexpression of these proteins *in vitro*.

Keywords : Passion fruit, inhibitors, trypsin Kunitz, methyl jasmonate, RT-PCR.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O maracujazeiro

Maracujá (domínio: *Eukaria*; reino: *Plantae*; divisão: *Magnoliophyta*; classe: *Magnoliopsida*; ordem: *Malpighiales*; família: *Passifloraceae*; gênero: *Passiflora*) é derivado de maraú-ya, que para os indígenas significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo”. O maracujazeiro encontra-se largamente distribuído nos trópicos e regiões temperadas, em especial, da América.

A família *Passifloraceae* apresenta plantas trepadeiras, raramente eretas, com folhas alternadas, geralmente simples, lobadas ou não, possuindo gavinhas axilares, estípulas normalmente caducas e nectários extraflorais (Dhawan e colaboradores, 2004; Souza e Lorenzi, 2008; Zeraik e colaboradores, 2010). As flores do maracujá são hermafroditas, nascem das axilas foliares em brotações novas, tendo cinco sépalas, cinco pétalas e cinco estames, com ovário unilocular, multiovulado, sobre o qual se encontra um estilete com estigma, geralmente, tripartido. São protegidas por brácteas foliáceas, possuindo um colorido atraente com abundância de néctar, ocasionando forte atração aos insetos polinizadores (Malerbo-Souza, 2002; Rocha, 2004).

Não existe consenso sobre o número exato dos gêneros na família *Passifloraceae*, ordem *Malpighiales*. No entanto, é aceito que possua 15 gêneros totalizando 650 espécies (Escobar, 1988), sendo o gênero *Passiflora* mais importante com aproximadamente 400 espécies (Cavichioli e colaboradores, 2008).

A primeira espécie de maracujá descrita no Brasil foi a *Passiflora incarnata* L., por Nicolás Monardes em 1569, sob o nome de Granadilla, porém a primeira referência ao maracujá data de 1587 na obra Tratado Descritivo do Brasil como “erva que dá fruto” (Rocha, 2004). No país atualmente, são registrados cinco gêneros com cerca de 120 espécies, sendo 12 delas raras. A maioria produz frutos comestíveis, porém com poucas cultivadas (Souza e Lorenzi, 2008).

As espécies *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo, maracujá-amarelo, maracujá-roxo, maracujá-preto) (Figura 1A e 1B) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce) (Figura 1C e 1D) são as mais cultivadas no Brasil (Malerbo-Souza e colaboradores, 2002; Bernacci e colaboradores, 2003; Meletti, 2011).



**Figura 1: O Maracujazeiro:** (A) Flor do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims) e (B): fruto maduro. (C) Flor do maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) e (D) fruto maduro. Imagens disponíveis em: [www.camaramuqui.es.gov.br](http://www.camaramuqui.es.gov.br) e [www.florabeijafior.com.br](http://www.florabeijafior.com.br).

## 1.2 A importância econômica da cultura do maracujá

A fruticultura vem se consolidando como um dos principais setores da economia brasileira por possuir grande potencial de geração de emprego e renda. O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de frutas tropicais e o terceiro maior país produtor de frutas, dentre estas o maracujá vem sendo cultivado em grande parte do país. Isto se deve as condições climáticas altamente favoráveis e a rápida produção do maracujazeiro comparando-a com outras frutíferas (Pires e colaboradores, 2009; Ferreira e colaboradores, 2010).

Dentre as espécies cultivadas no país, o maracujá-azedo (*Passiflora edulis* Sims) está presente em 97% da área total plantada e do volume comercializado. Em torno de 60% da produção é destinada ao consumo *in natura*, e o restante, às indústrias de processamento, sendo o suco o principal produto (Cavichioli e colaboradores, 2008).

O maracujazeiro apresenta importância devido às características físico-químicas e fármaco-terapêuticas de suas folhas, sementes e raízes. É popularmente utilizado na América e Europa no tratamento para ansiedade, insônia e irritabilidade (Dhawan e colaboradores, 2001; Akhondzadeh e colaboradores, 2001; Cavichioli e colaboradores, 2008; Zeraik e colaboradores, 2010).

O fruto também possui valor medicinal, sendo fonte de compostos antioxidantes, devido à presença de polifenóis, principalmente flavonóides (Zeraik e colaboradores, 2010). A aplicação do maracujá também tem sido estudada para o tratamento contra dependência a canabinóides (termo genérico usado para descrever substâncias naturais ou artificiais, que ativam os receptores canabinóides) (Dhawan e Sharma, 2003), diminuição da resistência à insulina em pacientes com diabetes tipo 2 (Queiroz e colaboradores, 2012) e alcoolismo crônico (Carlini e colaboradores, 2006).

Os subprodutos (cascas e sementes) do processamento do fruto podem ser utilizados na alimentação humana ou animal. As cascas possuem fibras solúveis (pectina), além de ricas em niacina, ferro, cálcio e fósforo. Das sementes obtém-se o óleo altamente atraente para as indústrias cosméticas devido ao seu alto teor de ácidos graxos (Zeraik e colaboradores 2010; Espírito-Santo e colaboradores, 2013). O maracujá possui ainda potencial para uso em ornamentação, conferido por suas belas flores atrativas pelo tamanho, exuberância de cores e originalidade de formas (Peixoto, 2005).

A cultura é atacada por diversos agentes, como: insetos representados pelas lagartas desfolhadoras (*Dione juno juno* e *Agraulis vanillae vanillae*), moscas-das-frutas, broca-do-maracujazeiro (*Philonis passiflorae*), pulgões, vaquinhas, percevejos e ácaros como também bactérias, vírus, fungos e nematóides. Estes ataques são considerados fatores limitantes para a produção, pois causam danos consideráveis à cultura e, exigem grande atenção por parte dos agricultores (Rocha, D, 2004; Boiça-Júnior e colaboradores, 2008).

Em função de diversos problemas, a Região Sudeste e, mais especificamente, o Estado do Rio de Janeiro não acompanharam a tendência nacional de crescimento na produção de maracujá, apresentando considerável queda (Pires e colaboradores, 2009). Por isto, a cultura foi escolhida para integrar o programa Moeda Verde - FRUTIFICAR, criado em 2000, pelo governo estadual, visando o aumento da

produção e produtividade de frutíferas, através de linhas de crédito específicas para financiamento de projetos de fruticultura irrigada (EMATER–RIO, 2012). Todavia, o Estado continua abaixo na produtividade regional, sendo o Espírito Santo, o maior produtor do Sudeste, responsável por 37% da produção, enquanto o Rio de Janeiro representa apenas 10% (IBGE, 2013).

No Estado do Rio de Janeiro, a região que se destaca é a Norte Fluminense (Ponciano e colaboradores, 2006). Contudo a cultura entrou em decadência em virtude do ataque de doenças que chegaram a comprometer 40% das áreas cultivadas nos anos 2000 (Campo News, 2012). Por isso o conhecimento dos mecanismos de defesa desta planta se torna essencial para minimizar os danos causados por insetos praga e patógenos na cultura do maracujá-amarelo.

### **1.3 Mecanismos de defesa vegetal**

Ao longo do seu ciclo de vida, as plantas são desafiadas por agentes estressores representados, em particular, pelos organismos heterotróficos, que dependem da energia fixada por elas. Como organismos sésseis, as plantas não têm chance de escapar destes ataques, devendo empregar diversos mecanismos para se defender (Frost e colaboradores, 2008). Estratégias variadas foram desenvolvidas ao longo do tempo, uma delas baseia-se na capacidade de sintetizar metabólitos especializados (Tabela 1), que evoluíram em resposta a determinados desafios ecológicos. Atualmente, são descritos mais de 200.000 metabólitos produzidos por plantas (Dicke e colaboradores, 2003; Mithofer e Boland, 2012). Outra é a síntese de proteínas relacionadas á defesa, como os inibidores de proteases (Tabela 1). Assim, as plantas conseguem modular respostas de defesa, retornando ao metabolismo normal (Shah, 2009).

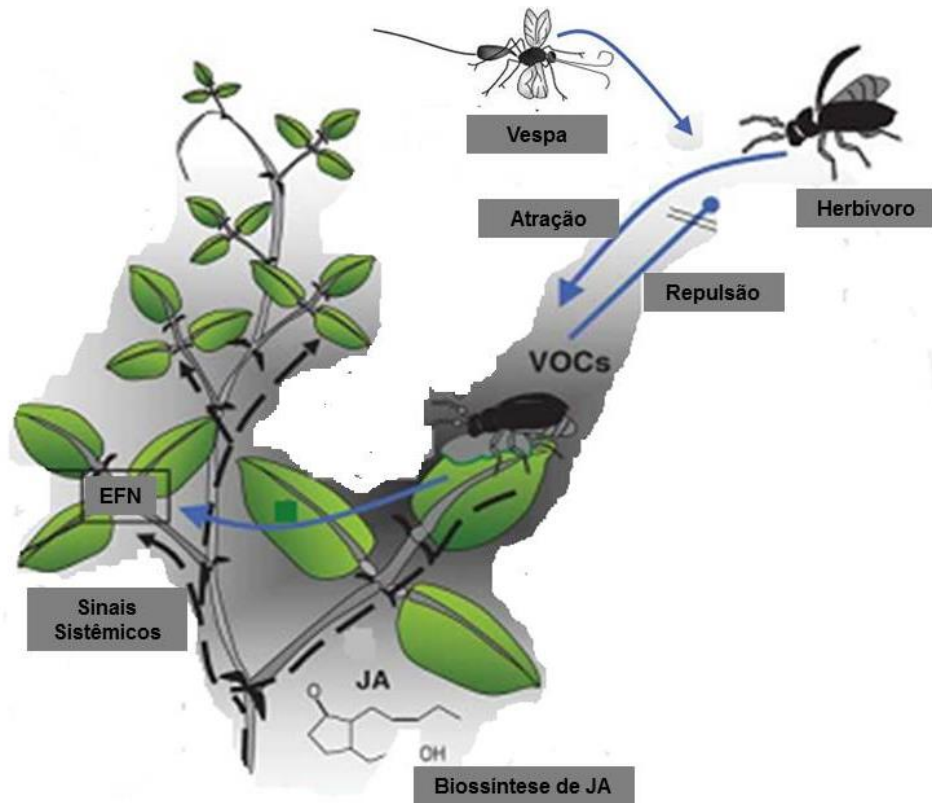
Compostos	Exemplo	Fonte vegetal	Total
Terpenóides	(E)- $\beta$ -Farneseno	Ubíqua	> 30.000
Esteróides	Fitoecdisona	Ranunculaceae	~ 200
Cardenolídeos	Digoxigenina	Plantaginaceae	~ 200
Alcalóides	Nicotina	Solanaceae	> 12.000
Derivados de ácidos graxos	(3Z)-Hexenilacetato	Ubíqua	n.d.
Glucosinolatos	Sinigrina	Capparales	~ 150
Glicosídeos Cianogênicos	Dhurrina	Rosaceae, Fabaceae	~ 60
Fenólicos	Lignina, taninos	Ubíqua	~ 9.000
Sílica	SiO <sub>2</sub>	Poaceae	1
<b>Polipeptídeos</b>	<b>Inibidores de Proteases</b>	<b>Ubíqua</b>	<b>n.d.</b>

**Tabela 1: Compostos especializados de plantas.** (n.d.) não determinado. Modificado de Mithofer e Boland, 2012.

Em princípio, duas grandes categorias de defesa vegetal podem ser distinguidas: a constitutiva, que está sempre presente e a induzida, que é especificamente produzida em resposta a certos agressores.

A defesa constitutiva compõe a primeira linha de resposta do organismo, são aquelas na qual a planta independente de sofrer injúria já a possui. Sendo assim, temos as barreiras físicas, representadas pelas estruturas anatômicas como parede celular, tricomas, cera, cutícula, espinhos, altos níveis de lignificação, e as químicas representadas por compostos que podem ser tóxicos, antidigestivos ou impalatáveis ao agressor, como saponinas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (Léon e colaboradores, 2001; Morant e colaboradores, 2008; Iriti e Faoro, 2009).

As defesas induzidas são disparadas após a planta sofrer uma agressão e incluem produtos do metabolismo secundário, mudanças morfológicas e fisiológicas. Algumas reações geradas podem ocasionar modificações da parede celular, produção de fitoalexinas, peroxidases, inibidores de proteases (IPs), e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Figura 2). Os IPs atuam diretamente no metabolismo do inseto, já os VOCs podem atrair organismos a partir de um nível trófico adicional, por exemplo, predadores naturais dos herbívoros que atacam a planta (Heath, 2000; Mello e Silva-Filho, 2002; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Heil e Bueno, 2007; Llandres e colaboradores, 2010; Das e colaboradores, 2013).

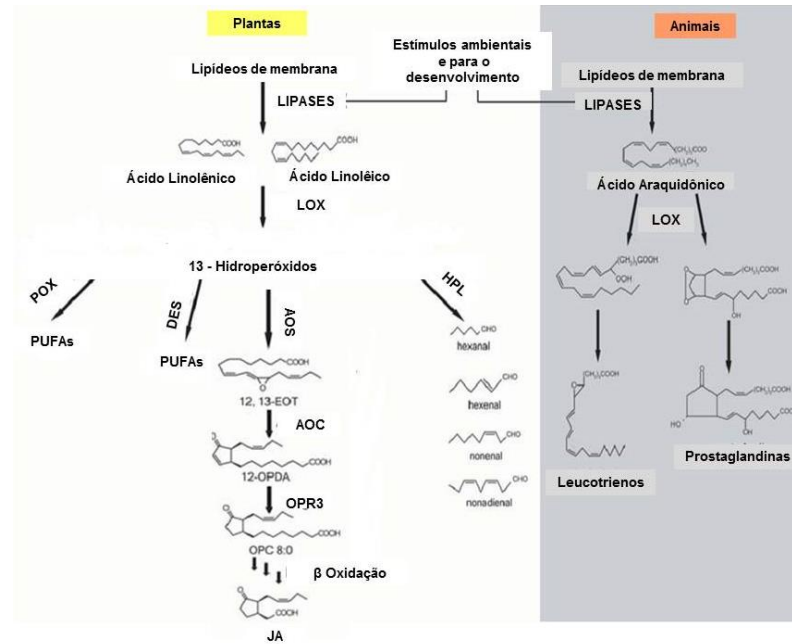


**Figura 2: Efeitos dos compostos orgânicos voláteis.** A predação por um herbívoro leva a uma cascata de sinalização, que culmina na biossíntese de ácido jasmônico (JA) e na liberação de compostos orgânicos voláteis (VOCs). Estes podem reprimir o ataque por um determinado herbívoro, atrair predadores para o herbívoro em questão, e induzir a liberação de néctar em nectários extraflorais. EFN: nectários extraflorais. Modificado de Heil, 2008.

#### 1.4 Defesas vegetais baseadas em jasmonatos

O ácido jasmônico (JA) e seus derivados, coletivamente denominados jasmonatos, são produtos de uma das vias das oxilipinas, sintetizados a partir de ácidos graxos poliinsaturados (Shah, 2009). São encontrados largamente distribuídos nos tecidos vegetais (Geyter e colaboradores, 2012). Estão presentes em algas, musgos e fungos, sendo estruturalmente similares a prostaglandinas animais (Figura 3) (Wasternack, 2007; Fonseca e colaboradores, 2009).





**Figura 3: Via das Oxilipinas em plantas e animais.** Em plantas, a via das oxilipinas utiliza o ácido linolênico ou linoléico para a geração de hidroperóxidos, que serão substratos para quatro ramos da mesma (POX, DES, AOS e HPL). A via AOS produz compostos bioativos, como o ácido jasmônico (JA). Em animais a via emprega o ácido araquidônico para a produção de hidroperóxidos, subsequentemente utilizado como substrato para a síntese de compostos bioativos, como prostaglandinas e leucotrienos. POX: Peroxigenase; DES: Divinil Éter Sintase; AOS: Aleno Óxido Sintase; HPL: Hidroperóxido Liase; LOX: Lipoxigenase; AOC: Aleno Óxido Ciclase; OPR3: Ácido 12–13–Oxo–Fitodienóico Redutase 3; PUFAs: Ácidos Graxos Poliinsaturados Oxidados; 12,13-EOT: Ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico; OPC: Oxo-Pentenilciclopentanos. Modificado de Chehab e colaboradores, 2007.

O JA e seu metil éster, o Metil Jasmonato (MeJA) foram, isolados pela primeira vez do óleo essencial de jasmim (*Jasminum grandiflorum*), em 1962 (Wasternack, 2007). Em 1990, Farmer e Ryan demonstraram que o MeJA funciona como eliciador da defesa vegetal, pois quando aplicado em plantas de tomate estimularam a síntese de inibidores de proteases tanto em plantas tratadas, quanto em plantas não tratadas, agindo como um sinal volátil para comunicação. Em 2009, Shah demonstrou que o MeJA pode ser translocado pelo sistema vascular da planta.

Os níveis de JA encontrados em uma planta variam de acordo com sua função no tecido ou célula, do estágio de desenvolvimento da planta e da resposta a diferentes estímulos ambientais (Creelman e Mullet, 1997). Tal metabólito está

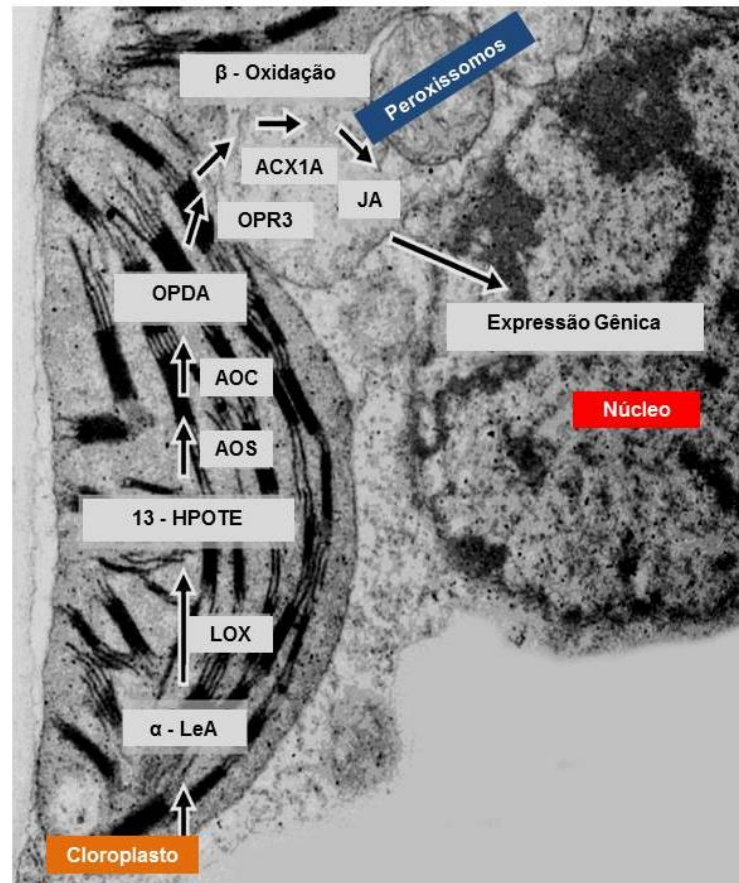
envolvido na resposta de sinalização celular á estresse biótico e abiótico como: defesa contra insetos e patógenos, radiação ultravioleta, ozônio, estresse hídrico, salinização do solo, ascensão e queda de temperatura e ocorrência de metais pesados.

Em plantas saudáveis o JA está envolvido na mecanotransdução, senescência, crescimento de raízes, desenvolvimento de gavinhas e no desenvolvimento reprodutivo (Browse, 2009; Radhika e colaboradores, 2010; Mosolov e Valueva, 2011). Nas flores o JA está participa nos processos de desenvolvimento, como desenvolvimento de pólen, deiscência da antera, esterilidade, secreção de néctar e de néctar extrafloral, além de defesa (Radhika e colaboradores, 2010).

### 1.5 Via do Octadecanóide

O JA e os jasmonatos são sintetizados na via do octadecanóide, que possui essa denominação devido ao precursor da via o ácido linolênico ( $\alpha$ -LeA, 18:3), possuir 18 carbonos (C) (Shah, 2009). Tal via foi exaustivamente estudada com o auxílio de mutantes de plantas silenciados para diversas enzimas na via. Como pode ser observado na Figura 4: o substrato inicial é o ácido linolênico ( $\alpha$ -LeA) liberado de galactolipídios plastidiais por fosfolipases. Em seguida, o  $\alpha$ -LeA é oxidado pela 13-lipoxigenase (LOX), gerando o ácido 13-hidroperóxido-octadecatrienóico (13-HPOTE), metabolizado por diferentes classes de oxilipinas. A conversão do 13-HPOTE a ácido 12, 13 (S)-Epoxi-9(Z),11,15 (Z)-Octadecatrienóico [12,13 (S)-EOT] pela catálise da aleno óxido sintase (AOS) é o primeiro passo que direciona para a formação de JA. O 12,13(S)-EOT é ciclizado enzimaticamente pela aleno óxido ciclase (AOC) a ácido 12-13-oxo-fitodienóico (OPDA), que deixa o cloroplasto e segue para o peroxissomo. No peroxissomo, OPDA é reduzido pela OPDA redutase 3 (OPR3) e passa por duas ou três rodadas de  $\beta$ -oxidação catalisadas pela enzima acil-CoA oxidase (ACX), levando á geração de JA (Wasternack e Xie, 2010; Kombrink, 2012).





**Figura 4: Via do octadecanóide.** Compartimentos celulares envolvidos na síntese de ácido jasmônico.  $\alpha$ -LeA: ácido linolênico; LOX: lipoxigenase; 13-HPOTE: 13-hidroperóxido-octadecatrienóico; AOS: aleno óxido sintase; AOC: aleno óxido ciclase; OPDA: ácido oxofitodienóico; OPR3: ácido 12-oxofitodienólico redutase 3; ACX: acil-CoA redutase; JA: ácido jasmônico; 12, 13(S)-EOT: Ácido 12, 13(S)-Epoxi-9(Z),11, 15 (Z)-Octadecatrienóico Modificado de Wasternack, 2007.

Os jasmonatos estão sujeitos a várias transformações enzimáticas, podendo gerar derivados com diferentes atividades biológicas. Entre as modificações principais do JA estão: *a*) metilação do carbono 1 (C1) para formar o MeJA que é altamente volátil, ativo na comunicação entre plantas; *b*) descarboxilação do C1 para formar outro composto volátil, o *cis-jasmone*; *c*) hidroxilação no C12 ou C11 para formar o ácido tuberônico e derivados, que podem ser modificados por glicosilação; *d*) redução no C6 para gerar ácido cucúrbico; *e*) conjugação com aminoácidos como valina, leucina e isoleucina [jasmonoil-L-isoleucina (JA-Ile), forma ativa natural] (Browse, 2009; Kombrink, 2012).

A fim de esclarecer quais proteínas estão envolvidas na via do octadecanóide em maracujá, foi identificada e purificada em nosso grupo uma 13-LOX, localizada em cloroplastos de folhas de maracujazeiro (Rangel e colaboradores, 2002). Em 2010, Jardim e colaboradores, demonstraram o acúmulo de transcritos para a enzima LOX na folha após tratamento com MeJA, ferimento mecânico e herbivoria causada por um inseto especialista (*Agraulis vanillae vanillae*), e outro generalista (*Spodoptera frugiperda*). Siqueira-Júnior e colaboradores (2008) caracterizaram ainda o cDNA que leva a síntese de uma AOS cloroplasmática, induzida por ferimento mecânico e MeJA em maracujá. Em 2008, Botelho-Júnior e colaboradores demonstraram a acumulação de inibidores de tripsina em folhas de maracujá após tratamento com MeJA e herbivoria. Subsequentemente, Pereira e colaboradores (2011) verificaram o acúmulo diferencial de inibidores de protease serínicos do tipo Kunitz e cisteínicos, durante o desenvolvimento floral em maracujá e em órgãos da flor em antese.

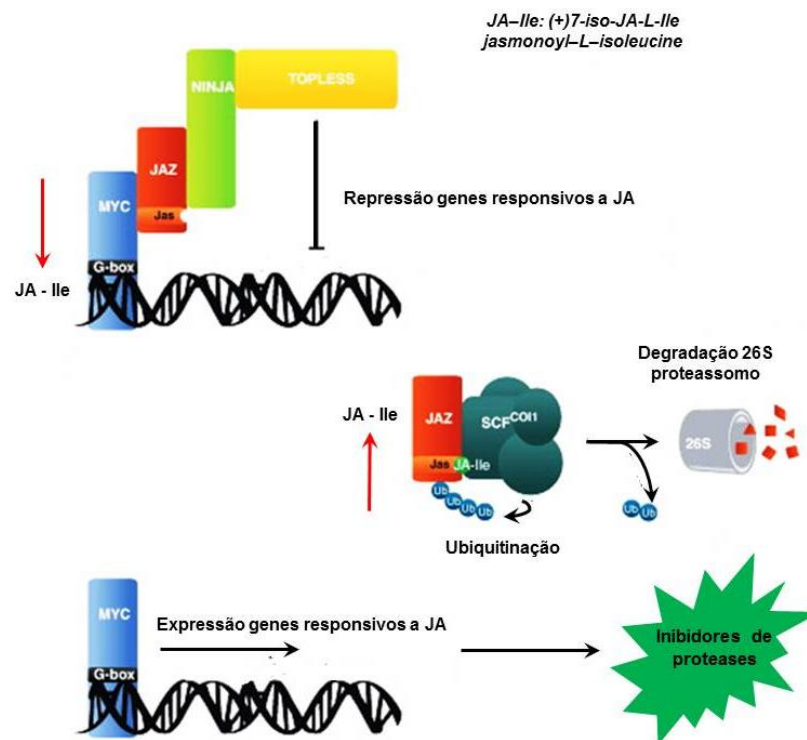
## 1.6 Controle da expressão de genes responsivos a JA

A indução e formação de jasmonatos, em condições de estresse, são seguidas pela expressão de diversos genes, que codificam inibidores de proteases, tioninas e defensinas. Tais proteínas aumentam o status de defesa da planta, juntamente com os jasmonatos (Wasternack e colaboradores, 2000).

Jasmonatos atuam como indutores conservados no metabolismo secundário vegetal. A percepção destes metabólitos desencadeia uma extensa reprogramação transcricional, ocasionando à ativação de vias metabólicas inteiras. Muitos fatores de transcrição ativados por JA foram descobertos. Ao mesmo tempo, tornou-se claro que toda reprogramação metabólica está sujeita a mecanismos de controle complexos integrados em redes celulares robustas (Kallenbach e colaboradores, 2010; Geyter e colaboradores, 2012).

Em estado de repouso, quando o nível de JA-Ile é baixo, fatores de transcrição (por exemplo, MYC2) são ligados a sequência promotora do gene jasmonato-responsivo (por exemplo, G-box), sendo reprimida pela interação com proteínas JAZ (*JAsmonate ZIM domain*), que interage com a proteína adaptadora NINJA (*Novel Interactor of JAZ*) e seu co-repressor TPL (*TOPLESS*) (Figura 5). Após a estimulação por estresse, o bioativo (+)-7-iso-JA-L-Ile acumula-se rapidamente e se liga ao receptor de jasmonato COI1 (*Coronatine Insensitive 1*, proteína F-box), que

faz parte do complexo SCF<sup>COI1</sup> (SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase). Proteínas JAZ são recrutadas a partir de seu local de ligação inicial no complexo SCF<sup>COI1</sup> e são ubiquitinadas. Após a poliubiquitinação as JAZ são degradadas pelo 26S proteassomo, o que leva a desmontagem do complexo repressor, com ativação de fatores de transcrição (MYC2, por exemplo) e expressão de genes de resposta mediada por JA (Figura 5) (Wasternack, 2007; Wasternack e Xie, 2010; Avanci e colaboradores, 2010; Chung e colaboradores, 2010; Gfeller e colaboradores, 2010; Geyter e colaboradores, 2012).



**Figura 5: Percepção de jasmonatos.** Em baixos níveis de JA-Ile, fatores de transcrição (MYC2) são ligados a sequência promotora do gene jasmonato-responsivo (G-box), sendo reprimida pela interação com proteínas JAZ (*JAsmonate ZIM domain*), sua proteína adaptadora NINJA (*Novel Interactor of JAZ*) e seu co-repressor TPL (*TOPLESS*). Após um estresse, o bioativo (+)7-iso-JA-L-Ile acumula-se rapidamente e liga-se a seu receptor, o COI1 (*Coronatine Insensitive 1*, proteína F-box), que faz parte do complexo SCF<sup>COI1</sup> (SKP1, CUL1 e F-box E3 ubiquitina ligase). Em seguida proteínas JAZ são recrutadas a partir de seu local de ligação inicial no complexo SCF<sup>COI1</sup> e são ubiquitinadas. Após a poliubiquitinação as JAZ são degradadas pelo 26S proteassomo, o que leva a desmontagem do complexo repressor, com ativação de fatores de transcrição (MYC2) e expressão de genes de resposta mediada por JA. Modificado de Geyter e colaboradores, 2012.

## 1.7 Inibidores de proteases

Durante o processo evolucionário, as plantas adquiriram mecanismos de defesa, que permitem combater pragas e doenças. Várias proteínas integram estes mecanismos como as 1,3- $\beta$ -glucanases, quitinases, proteases, lectinas, inibidores de enzimas, entre outras, que exibem atividade antimicrobiana (Mosolov e colaboradores, 2001).

As proteases são responsáveis pela clivagem proteolítica de ligações peptídicas, sendo uma das mais frequentes e importantes modificações pós-traducionais. As peptidases são proteases que recebem o prefixo endo quando clivam ligações no meio de cadeias polipeptídicas, podendo, neste caso, serem chamadas de proteinases, e o prefixo exo quando clivam ligações em uma das extremidades da cadeia polipeptídica, compreendendo as chamadas aminopeptidases e carboxipeptidases. Estas enzimas participam de mecanismos metabólicos essenciais para o processamento e ciclagem de proteínas. Estão presentes em vários processos de desenvolvimento celular, além de participarem na interação de plantas com outros organismos, como na infecção por patógenos e na digestão de proteínas vegetais por herbívoros. Elas são encontradas em plantas, animais e micro-organismos (Chye e colaboradores, 2006).

A regulação de proteases é um componente integral para processos bioquímicos essenciais como crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa (Koiwa e colaboradores, 1997). Para este controle foram desenvolvidos muitos mecanismos, sendo dois predominantes. O primeiro deles consiste no fato de que quase todas as proteases são biossintetizadas como precursores inativos chamados pró-proteínas ou zimogênios. Esses são armazenados e ativados por proteólise somente quando necessário. Outro mecanismo é necessário para controlar a enzima uma vez ativada. Isso é providenciado pela presença de proteínas conhecidas como inibidores de proteases (IPs). Esses inibidores formam complexos completamente inativos ou parcialmente ativos com suas enzimas cognatas (Laskowski e Kato, 1980).

Os IPs são encontrados em todos os eucariotos e possuem importante papel na regulação de muitos processos biológicos como apoptose, ciclo celular, sistemas de coagulação e rotas de processamento de hormônios.

Também são importantes no tratamento de patologias humanas como inflamação, hemorragias e câncer (Lingaraju e Gowda, 2008). O principal papel dos IPs é de limitar a atividade de proteases (Gubb e colaboradores, 2010). Eles são genericamente categorizados de acordo com a classe de proteases a qual inibem (Koiwa e colaboradores 1997) e o resíduo de aminoácido presente no seu sítio reativo. Deste modo, são divididos em: serínicos (serina e histidina), cisteínicos (cisteína), aspárticos (grupo aspartato) e metaloproteases ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) (Carlini e colaboradores, 2002). Até o momento, 93 famílias de IPs foram reconhecidas com base em suas similaridades de sequências de acordo com o banco de dados de peptidases *Merops* (disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family>)

Em plantas superiores os IPs estão presentes em muitas espécies de legumes, cereais e solanáceas com importância econômica (Chye e colaboradores, 2006). Diferentes papéis têm sido sugeridos para os IPs em plantas, incluindo ação como proteínas de reserva, reguladores endógenos de atividades proteolíticas (Ryan, 1990) ou participando em diversos processos no desenvolvimento como a morte celular programada (PCD), como também associados à resistência a insetos e patógenos (Carlini e colaboradores, 2002). Estes podem ser sintetizados constitutivamente durante o desenvolvimento normal da planta ou serem induzidos em resposta a herbivoria e ataque de patógenos (Ryan, 1990).

O mecanismo de ação de IPs se dá através de interações intramoleculares como pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e hidrofóbicas, formando complexos estáveis com proteases. No caso de estresse biótico os IPs se ligam ao trato digestivo de insetos herbívoros, dificultando a proteólise e levando a morte dos mesmos, tendo uma importante função na defesa vegetal (Ee e colaboradores, 2009). Já que muitos insetos usam uma combinação de proteases serínicas, cisteínicas e aspárticas como enzimas digestivas (Koiwa e colaboradores, 1997).

### **1.8 Inibidores de proteases serínicos**

Os inibidores de proteases serínicos, também chamados serino-proteases, são inibidores competitivos, que possuem mecanismos de ação semelhantes (Ryan, 1990). As serino-proteases inibem tripsina, quimiotripsina e  $\alpha$ -amilase. Muitas destas proteínas são bifuncionais, inibindo tanto tripsina quanto  $\alpha$ -amilase.

A acumulação de inibidores serínicos ocorre em sementes, durante a maturação de tubérculos, sugerindo que estes facilitam a acumulação de proteínas de estocagem pela atenuação da atividade de proteases. Tais inibidores também são acumulados como resposta de defesa, tanto no sítio do ferimento (local), quanto em locais distantes (sistêmica) (Koiwa e colaboradores, 1997).

Em plantas, a classe das serino-proteases é subdividida em oito famílias, com base na seqüência primária de proteínas e fonte. São elas: Inibidores da família Kunitz, Bowman-Birk, *Potato I*, *Potato II*, *Squash*, família de inibidores de tripsina da cevada, do milho (Ragi I-II) e serpinas (*serine proteinase inhibitors*). Apesar das famílias possuírem seqüências primárias e estruturas diferentes, os mecanismos de catálise e estrutura do local de reação do inibidor da protease serínica são bem conservados, com exceção das proteínas da família das serpinas (Koiwa e colaboradores, 1997).

As serino-proteases inibidoras de tripsina, pertencentes as famílias *Solanaceae*, *Leguminosae* e *Gramineae* vem sendo investigadas por representarem importantes fontes de alimentos (Tremacoldi e Pascholati, 2004). Tem sido observado seu papel na dormência das sementes e na proteção contra insetos e predadores microbianos (Lingaraju e Gowda, 2008). Dentre os inibidores serínicos os mais estudados são os do tipo Kunitz e Bowman-Birk, por estarem presentes em plantas de interesse agrícola (Bode e Huber, 1992). Eles diferem entre si em massa molecular, teor de ligação dissulfeto, estrutura tridimensional, estabilidade ao calor e a agentes desnaturantes (Kang e colaboradores, 2009).

Atualmente, as plantas podem ser transformadas com genes de inibidores associados a fortes promotores para expressá-los em níveis relativamente altos em intervalos de tempos específicos. A expressão destes pode ocorrer em tecidos particularmente vulneráveis ao ataque, como sementes, ou induzidos através de ferimentos no tecido atacado pela mastigação, como as folhas. Em algumas plantas transgênicas, ainda não comercializadas, os inibidores vem sendo utilizados em conjunto com toxinas Bt (*Bacillus thuringiensis*) (Mosolov e Valueva, 2008) reforçando sua ação contra fitopatógenos.

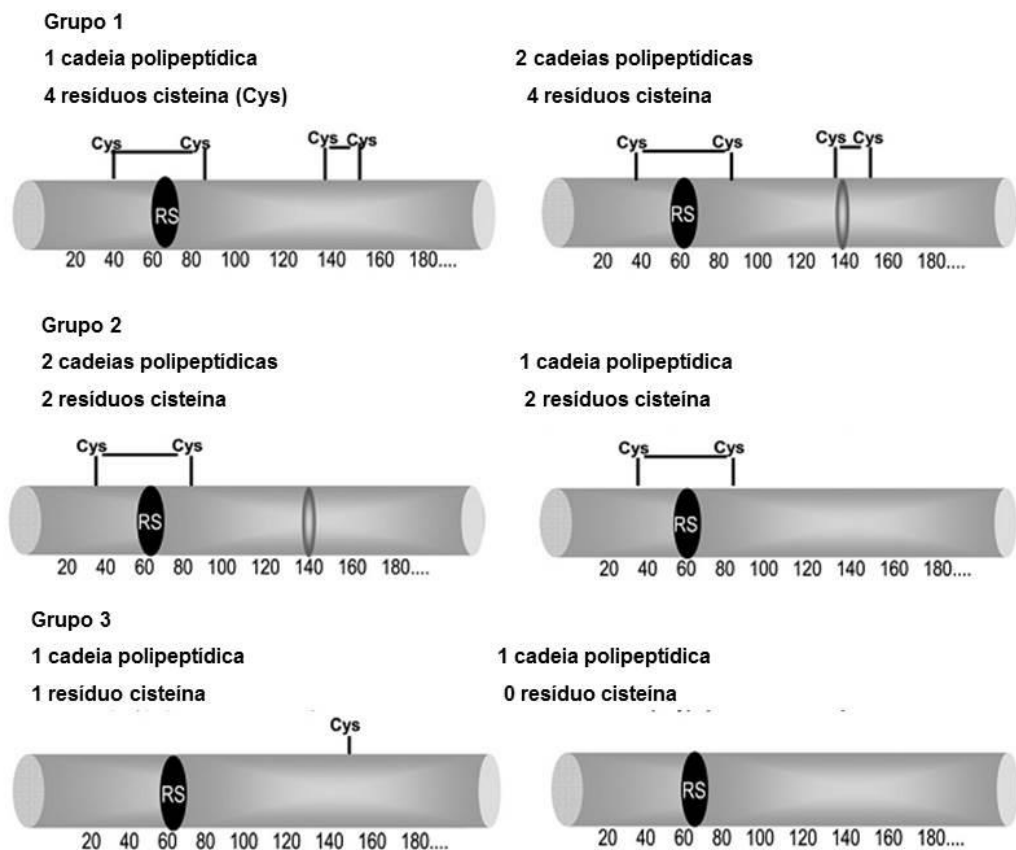
### 1.9 Inibidores do tipo Kunitz

O primeiro inibidor serínico do tipo Kunitz isolado foi o BPTI (inibidor de tripsina pancreático bovino), em 1936 por um pesquisador chamado Moses Kunitz (Renko e colaboradores, 2012). Em plantas, estes inibidores estão concentrados em sementes de leguminosas das subfamílias taxonômicas *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae*.

Os inibidores do tipo Kunitz consistem em proteínas com 18 a 24 KDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas, duas pontes dissulfeto, sítio reativo único com um resíduo de arginina (Arg, R) ou lisina (Lys, K) e quatro resíduos de cisteína em um *loop*. A conformação canônica deste *loop* é importante para um posicionamento adequado e uma adaptação efetiva ao sítio ativo da enzima proteolítica. No entanto, podemos encontrar inibidores com apenas dois, um ou até mesmo nenhum resíduo cisteínico (Lingaraju e Gowda, 2008; Oliva e colaboradores, 2010).

Em geral, os inibidores serínicos do tipo Kunitz se comportam como pseudo-substratos. Sua especificidade é definida pelo aminoácido presente na posição P1 do inibidor (Carlini e colaboradores, 2002; Kang e colaboradores, 2009). O estudo cristalográfico destes inibidores revela uma estrutura terciária globular composta por 12 folhas  $\beta$ -pregueadas antiparalelas, levando a formação de seis harpinas. Três destas harpinas estão interligadas por longos *loops* formando uma estrutura em barril denominada  $\beta$ -*trefoil fold*, a qual se atribui a alta afinidade de ligação destes inibidores com suas enzimas alvo (Murzin e colaboradores, 1992; Krowarsch e colaboradores, 2003; Renko e colaboradores, 2012).

Com base no conteúdo de cisteínas, os Kunitz podem ser subdivididos em três grupos (Figura 6). No grupo 1, temos aqueles que possuem 4 resíduos de cisteína, formando 2 pontes dissulfeto intra ou intermoleculares. No grupo 2, encontramos Kunitz que possuem 2-3 resíduos, sendo capazes de formar uma ponte. No grupo 3, estão os Kunitz que possuem um ou nenhum resíduo de cisteína, logo são incapazes de formar pontes dissulfeto (Leung e colaboradores, 2013).



**Figura 6: Subdivisão dos inibidores do tipo Kunitz.** De acordo com o conteúdo de resíduos de cisteína tais inibidores são divididos em 3 grupos. Modificado de Oliva e colaboradores, 2010.

Proteínas pertencentes à família Kunitz possuem na região N-terminal de suas sequências primárias, uma assinatura comum (*Kunitz signature motif*). Uma assinatura típica consiste na seguinte sequência: [LIVM]-x-D-{EK}-[EDNTY]-[DG]-[RKHDENQ]-x-[LIVM]-x-{E}-{Q}-(x)2-Y-x-[LIVM]. Este motivo é semelhante ao primeiro inibidor do tipo Kunitz descrito em plantas, o inibidor de soja. Tal motivo pode sofrer modificações de acordo com diferenças genéticas entre famílias de plantas (Lam e colaboradores, 1999; Patil e colaboradores, 2012).

A família Kunitz compreende proteínas com atividade inibitória contra várias enzimas proteolíticas, como as serínicas, cisteínicas e aspárticas (Christeller, 2005; Oliva e colaboradores, 2010). Logo são consideradas importantes na defesa vegetal



contra insetos, pois levam a inibição de proteases digestivas e a absorção inadequada de aminoácidos essenciais. Como consequência pode levar a morte do herbívoro por inanição. Por isso seu emprego contra pragas agrícolas se tornou pertinente (Mosolov e colaboradores, 2001; Rodriguez-Saona e colaboradores, 2010; Smigocki e colaboradores, 2013). No entanto, a aplicação de inibidores de protease do tipo Kunitz, não está restrita a agricultura. Ao se ligarem a proteases serínicas, estes inibidores exibem uma gama de propriedades benéficas para os seres humanos, abrangendo atividades antifúngicas, anti-apoptóticas, anti-inflamatórias, anti-metastáticas (Nakahata e colaboradores, 2013), anti-HIV (Ye e Ng, 2011) e anti-proliferativas (Leung e colaboradores, 2013). A fruticultura cresceu no país e se tornou um dos principais setores da economia, com o maracujá sendo cultivado em diversos locais do país. A maior parte da produção obtida é destinada à indústria de sucos. Nosso estado, porém não seguiu a tendência nacional de aumento na produção do fruto, principalmente devido à incidência de doenças e pragas. Em virtude da importância econômica da cultura, esta será avaliada quanto a seus mecanismos de defesa baseados em jasmonatos por Biologia Molecular. Nossos estudos analisarão a indução de inibidores do tipo Kunitz em resposta a elicitação por metil jasmonato.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Clonar inibidores de proteases serínicos do tipo Kunitz induzidos em folhas de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) após tratamento com vapores de metil jasmonato (MeJA).

### **2.2 Específicos:**

- ☐ Isolar o RNA total de folhas de maracujá expostas á vapores de MeJA.
- ☐ Desenhar iniciadores para inibidores de proteases do tipo Kunitz de maracujá.
- ☐ Obter o cDNA a partir do RNAm codificante para inibidores de proteases de maracujá por RT - PCR.
- ☐ Clonar o cDNA destes inibidores de proteases do tipo Kunitz em vetor plasmidial , transformando bactérias *Escherichia coli* por choque térmico
- ☐ Sequenciar os clones obtidos e analisar a estrutura primária das proteínas por ferramentas de bioinformática.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal**

Os frutos de maracujá-amarelo foram adquiridos no mercado local em Campos dos Goytacazes, RJ. As sementes foram separadas da polpa utilizando-se uma peneira e uma colher. Em seguida, foram levadas para secagem em estufa a 37 °C. Feito isso, procedeu-se a semeadura. Para tanto, utilizamos copos plásticos de 50 mL contendo vermiculita. Os copos foram mantidos em sala de cultivo, sendo regados com água de torneira uma vez ao dia. Depois do aparecimento dos primeiros cotilédones, foram transferidas para copos plásticos (50 mL) contendo terra enriquecida com húmus de minhoca (Húmus Fazenda do Algodão) (três plantas em cada copo). As plantas foram irrigadas uma vez por dia com água e a cada três dias com adubo (Ouro Verde), preparado de acordo com as instruções do fabricante (Rangel e colaboradores, 2002). As plantas permaneceram por 15 a 20 dias em sala de cultivo sob condições normais de luz a 60 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> em fotoperíodo de 17 h na luz a 28 °C e 7 h no escuro a 18 °C.

#### **3.2 Incubação de plantas de maracujá com vapores de Metil Jasmonato**

Para cada experimento foram utilizados cinco grupos de plantas (5 copos com três plantas cada). Os grupos continham plantas com no mínimo quatro folhas de tamanhos similares. Foram colocadas em um pote de vidro vedado, onde foram aplicados 3 µL de MeJA (95 %) (Sigma), embebido em um cotonete preso na parede do mesmo. O frasco foi exposto a luz direta durante 12 h em fluxo laminar para cultura vegetal (Jardim e colaboradores, 2010).

##### **3.2.1 Extração de RNA total de folhas de maracujá-amarelo**

Plantas de maracujá incubadas com vapores de MeJA durante 12 h foram utilizadas neste procedimento. As folhas foram coletadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e maceradas em almofariz até a obtenção de um pó fino. Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente comercial TRIzol (Gibco) seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de RNA foi estimada por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop®. Para isso, 2 µL de cada solução contendo RNA total, foram utilizados. A absorbância das amostras foi monitorada a 260 nm e 280 nm. A quantidade de RNA total obtida foi calculada seguindo a relação: 1 DO = 40 µg/mL de RNA (Sambrook e Russell, 2001).

### **3.2.2 Análise eletroforética de RNAs totais**

Géis de agarose 0,8 % foram preparados pela mistura de agarose (Sigma) com tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM e água - DEPC). A agarose foi fundida a 100 °C, evitando-se a fervura. A solução foi resfriada e a ela foi adicionado brometo de etídeo (0,5 µg.mL<sup>-1</sup>). A solução foi homogeneizada e vertida sobre uma placa preparada para eletroforese, em seguida mantida a temperatura ambiente, preconizando sua solidificação. As amostras de RNA total foram preparadas misturando-se 2 µL de amostra e 1 µL de tampão de amostra 1 X (estoque 10 X: glicerol 50 %, TAE 10 x e azul de bromofenol 0,025 %). As amostras foram homogeneizadas e aplicadas no gel solidificado. O fracionamento foi realizado a uma voltagem constante de 80 V. Após a eletroforese, as amostras foram visualizadas sob luz UV.

### **3.3 Construção dos iniciadores 5'**

Com base na sequência N-terminal de 2 inibidores de proteases, induzidos por MeJA em maracujá, previamente purificados e sequenciados no grupo (Botelho–Júnior, comunicação pessoal), foram construídos iniciadores degenerados (Tabela 2). A sequência utilizada como modelo corresponde a assinatura Kunitz em maracujá (Botelho–Júnior e colaboradores, 2008). Os iniciadores foram nomeados de acordo com a cultura estudada e a ordem de purificação das proteínas utilizadas como modelo.

Iniciadores 5'	
Pf1Fw	CTC CGA ACT GGG GTT CCN TAY TAY ATG L R T G V P Y Y M
Pf4Fw	CTC CGA ACT GAR ACN CCN TAY TAY ATG L R T E T P Y Y M

**Tabela 2: Iniciadores degenerados construídos.** Pf: *Passiflora*; A: adenina; T: timina; G: guanina; C: citosina; L: lisina; R: arginina; T: treonina; G: glicina; V: valina; P: prolina; Y: tirosina; M: metionina; E: ácido glutâmico.

### 3.4 Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Para a transcrição reversa, utilizou-se o *kit ThermoScript RT-PCR System* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Foram aliqüotadas 5 µg de cada amostra de RNA total e adicionados a eles 1 µL do iniciador OligodT<sub>20</sub> (Invitrogen) (50 µM), 2 µL de dNTPs (0,4 mM) e água ultrapura (Invitrogen) suficiente para 12 µL. Após 5 min a 65 °C foram acrescentados a cada amostra: 4 µL de tampão 5X cDNA *Synthesis Buffer*, 1 µL de 0,1 M de DTT (ditiotretitol), 1 µL de inibidor de RNase comercial (RNaseOUT 40 U.mL<sup>-1</sup>) e 1 µL de ThermoScript RT (15 U.mL<sup>-1</sup>). As amostras foram submetidas à transcrição reversa por 1 h a 60 °C, seguidos de incubação por 5 min a 85 °C.

Na síntese da 2ª fita de cDNA, foi utilizado o *kit Platinum Taq DNA Polymerase*. As reações foram montadas com 38,1 µL de água; 5 µL do tampão específico para a polimerase utilizada (Platinum Taq 10X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM) 1µL de dNTPs 10 mM, 1µL dos iniciadores Pf1Fw/Pf4Fw 10 µM; 1 µl de oligodT<sub>20</sub> (10 µM) e 2 µl de cDNA. As amplificações foram realizadas segundo o programa abaixo:

94°C – 3 min – desnaturação inicial	}	40 ciclos
94°C – 1min - desnaturação		
45°C – 1min - anelamento dos primers		
72°C – 1min – extensão		
72°C – 10 min – extensão final		

Todas as amplificações foram feitas em termociclador Eppendorf Mastercycler Personal. Com base na sequência primária das proteínas utilizadas para a construção dos iniciadores, era esperado obter a amplificação de um fragmento de entre 500-750 pb.

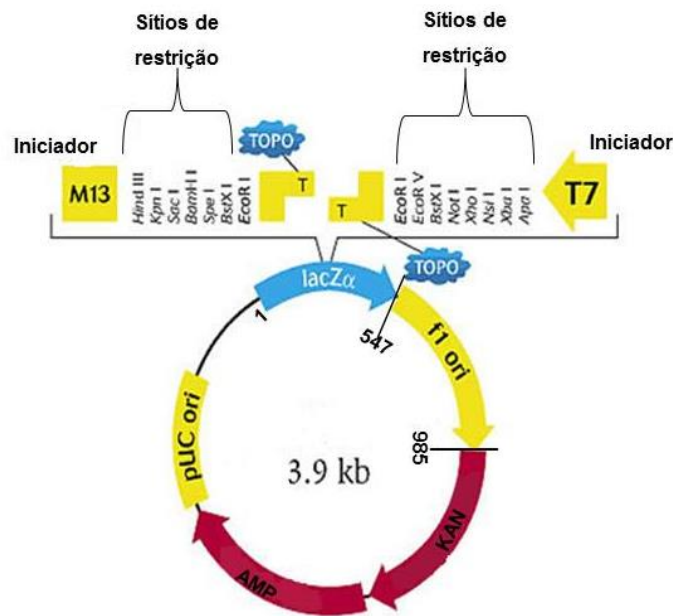
#### **3.4.1 Análise eletroforética e purificação do produto amplificado**

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 1 % (m/v), corado com brometo de etídio ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). A eletroforese se deu sob voltagem constante (90 V) utilizando o marcador de peso molecular *GeneRuler Express DNA Ladder ready-to-use* 1 Kb (Thermo Scientific). Os fragmentos de interesse (500-750 pb) foram excisados do gel com o auxílio de um bisturi e purificados, utilizando-se o *kit GeneJet Gel Extraction* (Fermentas), de acordo com instruções do fabricante.

#### **3.5 Clonagem dos fragmentos de interesse**

Para a ligação dos fragmentos amplificados, ao vetor de clonagem utilizamos o TOPO TA *Cloning Vector* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

A reação foi incubada por 5 min a 23 °C. Em seguida foi mantida em gelo até o momento de utilização, para a transformação das bactérias *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$ T1 providas no *kit*. Na figura 7, pode-se observar o mapa do vetor de clonagem pCR 2.1 - TOPO.



**Figura 7: Esquema do vetor de clonagem pCR 2.1-TOPO.** Fragmento LacZ $\alpha$ : bases 1-547; iniciador reverso M13: bases 205-221; promotor/iniciador T7: bases 364-383; origem de replicação f1: bases 584-985; ORF de resistência a canamicina (KAN): bases 1319-2113; ORF de resistência a ampicilina (AMP): bases 2131-2991; origem de replicação pUC: bases 3136-3809

### 3.6 Transformação bacteriana

Foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  da reação de clonagem produzido no item anterior adicionados as células competentes de *E.coli* DH5 $\alpha$  *One Shot* (Invitrogen) previamente descongeladas. Após incubação por 30 min a 25  $^{\circ}\text{C}$ , as células foram submetidas a choque térmico sendo mantidas a 42  $^{\circ}\text{C}$  por 30 s. Em seguida, foram colocadas em gelo e adicionados 250  $\mu\text{L}$  de meio SOC (2 % triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl $_2$ , 10 mM MgSO $_4$  e 20 mM de glicose). As bactérias foram incubadas por 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Então, 100  $\mu\text{L}$  da mistura (células–vetor–meio SOC) foram distribuídos em placas contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani) (Sambrook e Russel, 2001) sólido suplementado com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina, mais 40  $\mu\text{L}$  de X-gal (5–bromo–4–cloro–3–indolil  $\beta$ –D–galactopiranosídeo) (40  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) que forma um precipitado azul quando a  $\beta$ –galactosidase está ativa e 40  $\mu\text{L}$  de IPTG (Isopropil  $\beta$ –D–thiogalactopiranosídeo) 100 mM, que induz a atividade da  $\beta$ –galactosidase. As placas foram incubadas por 16 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

A identificação das colônias que possuíam os vetores recombinantes foi realizada a partir da análise de resistência ao antibiótico e funcionalidade do gene repórter LacZ, onde as bactérias transformadas resistentes a ampicilina produziram colônias azuis (carregavam somente o vetor) e brancas (colônias com o vetor recombinante mais o fragmento de interesse).

### **3.6.1 Seleção das colônias e isolamento do DNA plasmidial**

As colônias brancas obtidas no meio de crescimento seletivo foram repicadas em meio LB líquido (acrescido de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina) e incubadas por 16 h a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante de 200 rpm. O DNA plasmidial das colônias repicadas foi isolado, utilizando-se o *kit Purelink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.6.2 Digestão de DNA plasmidial**

Para liberação do fragmento clonado no vetor pCR 2.1–TOPO foi realizada a digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. A reação de digestão foi preparada adicionando-se  $10 \mu\text{L}$  (500 ng) dos vetores (pCR 2.1–TOPO contendo os fragmentos de interesse) isolados,  $2 \mu\text{L}$  de tampão 10 x buffer H,  $1 \mu\text{L}$  da enzima *EcoRI* ( $15 \text{U.mL}^{-1}$ ) e água ultra-pura até  $20 \mu\text{L}$  de reação. A mistura foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 3 h. Após esse intervalo, as amostras foram analisadas por fracionamento em gel de agarose 1%.

## **3.7 Sequenciamento e análise dos clones**

O sequenciamento dos clones foi realizado em colaboração com a Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Paulo Vicente, no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, situado no instituto de pesquisa Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. No processo foi utilizado o *kit* de sequenciamento *ABI Prism Dye Terminator* (Perkin Elmer) seguindo a metodologia do fabricante. Foi utilizado o sequenciador automático ABI Model 370 (Perkin Elmer).



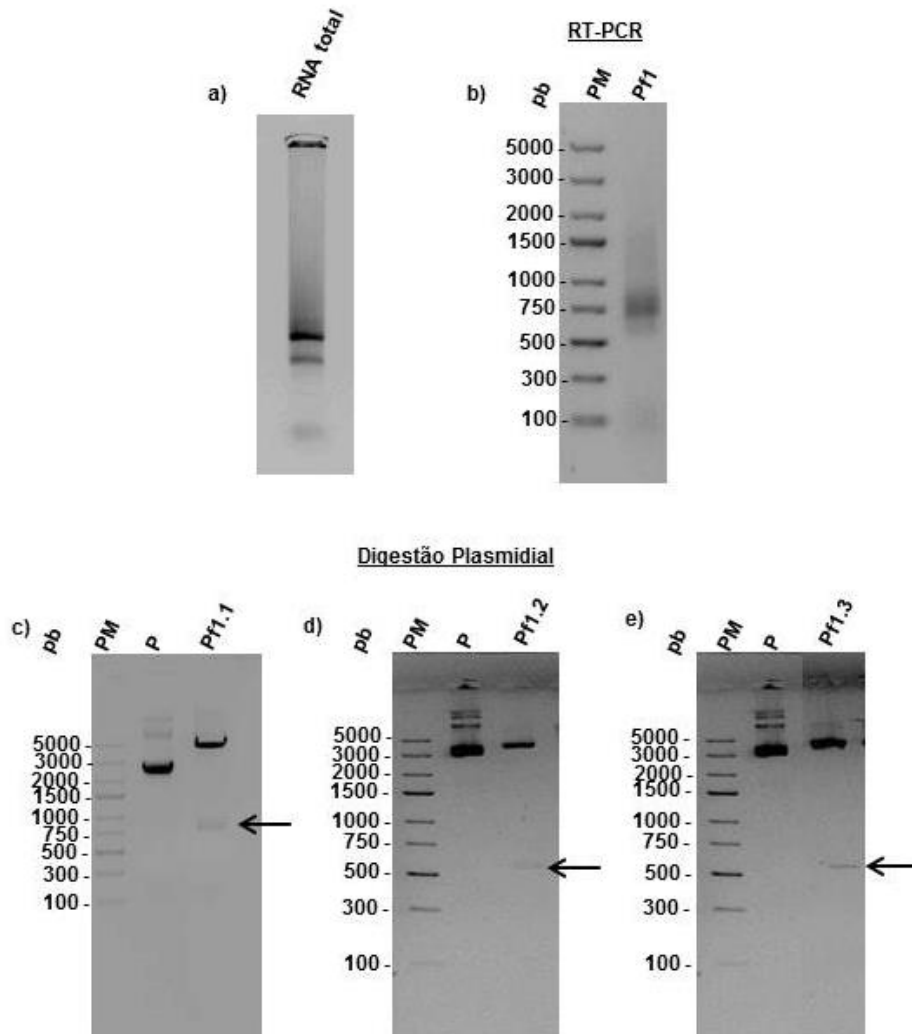
As sequências obtidas foram editadas com a utilização do software *Bioedit* (Hall, 1999). Tais sequências foram comparativamente analisadas com ferramentas disponíveis no portal *Expasy* (disponível em: <http://expasy.org/tools/>). Para busca de sequências abertas de leitura (ORFs) foi utilizada a ferramenta *ORFinder* (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). As sequências deduzidas de aminoácidos foram comparadas entre si e com inibidores do tipo Kunitz das seguintes espécies: *Bauhinia unguolata* (BuXI) gi|32363179; *Bauhinia variegata* (BvTI) gi|32363181; *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) gi|292630818; *Glycine max* (Sti) gi|157830108 e *Tamarindus indica* (TKI) gi|308756025. Para estas análises foi utilizado o programa *ClustalW* (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Para predição dos pesos moleculares e pontos isoelétricos das sequências, foi utilizada a ferramenta *ProtParam* (disponível em: <http://web.expasy.org/protparam>).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Transcrição reversa, reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), clonagem molecular e sequenciamento dos clones**

#### **4.1.1 Iniciador Pf1Fw**

Foi extraído RNA total de folhas de maracujá, expostas a vapores de MeJA por 12 horas (Figura 8a). O material foi retro-transcrito com a utilização de transcriptase reversa e o cDNA resultante foi utilizado para PCR com a utilização do iniciador Pf1Fw e oligo (dt)<sub>20</sub> (Figura 8b). As reações foram visualizadas em gel de agarose 1% (m/v). Após a confirmação da amplificação de tamanho esperado (500–750 pb), procedeu-se a ligação ao vetor e clonagem. O DNA plasmidial das colônias selecionadas, foi extraído e clivado pela endonuclease de restrição *EcoRI*. Nesta etapa foram obtidos 3 (Figura 8c, 8d e 8e) clones positivos (com inserto do tamanho esperado).



**Figura 8: Iniciador Pf1Fw.** Gel de agarose 1 % (imagens negativas). **a)** RT - PCR utilizando o iniciador Pf1Fw. **b) c) e d)** clones provenientes do iniciador Pf1Fw. pb: pares de base; PM: peso molecular; P: plasmídeo não digerido; Pf1Fw: iniciador 1; Pf 1.1, Pf 1.2, Pf 1.3: clones provenientes do iniciador 1. Colchete indica a faixa de amplificação de interesse. As setas indicam o fragmento liberado do plasmídeo após digestão. DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo.

Os clones provenientes da transformação com o produto de PCR do Pf1Fw foram nomeados de acordo com a ordem na qual foram obtidos (Pf 1.1, Pf 1.2, Pf 1.3), estes foram submetidos a sequenciamento automatizado de DNA, sendo então possível determinar a sequência de seus nucleotídeos e predizer suas sequências em aminoácidos (Figura 9a, 9b, 9c). Os três clones possuem aproximadamente 600 pb e com a utilização do software *ProtParam* seus pesos moleculares e seus pontos isoelétricos foram preditos (Tabela 3).

**3 CTCCGAAGTGGGGTTCCTTACTACATGCGCCAGTTAATAGAGCATTGGTGGTGGTGGCT a)**  
**L R T G V P Y Y M R P V N R A F G G V A**  
63 CCAGCAAGAATTCGGAACGAAGAA**TGCC**CAACAACGGTGAAGCTCAGACCTGAGGTTGAT  
P A R I R N E E **C** P T T V K L R P E V D  
123 CCTGGTGTCCCGATCACATTCTCAACACCTTACAATAATGGAGAGAGTGTTGTCATCGAT  
P G V P I T F S T P Y N N G E S V V I D  
183 GAGAACACAGACGTATAACATCAGCTTCAATGCCAGCGT**CTGCC**GAAGGACGAAAGACTTGG  
E N T D V Y I S F N A S V **C** E G R K T W  
243 ATGTATCGTTTCCGCTCTCCTTTGCCACCTGCAGTGCATAGAGCTTGGTACCCTTGCT  
M Y R F R S P L P P A V R I E L G T L A  
303 TTCATCTACGTACGCACCAGATTCAGGATTGAGAAATCAGACATTGGTTACAGCGTTTAT  
F I Y V R T R F R I E K S D I G Y S V Y  
363 TATCGTTATGTGGACTCAGATGAGAGTGTGAACTCTACTATCCTATCCCTTCCTTTACA  
Y R Y V D S D E S V K L Y Y P I P S F T  
423 GGGCATTGGTGGTGGAGTAGTCTGAGATCCTCTTTCGATTATGATTTTTTTGAGGCTCAA  
G H L V L S S L R S S F D Y D F F E A Q  
483 AATGATGAAGGGATGATAAAATCTGTAGT**GTGA**TTTCTATATCGCAC**AAAAA**GCTGTAA  
N D E G M I K S V V **\***  
543 GGTATCTAAGGGATCCACCAACTTATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 597

2 **CTCCGAACAGGGTTCCGTACTACATG**CGCCCAGTTATAAGAAATATTTGGTGGTGTGCT **b)**  
**L R T G V P Y Y M R P V I R I F G G V A**  
62 CCAGCAAGAATTCGAAACGAAGAA**TGCC**CATCAACGGTGCAACTCAGACATGAGGTTGAT  
P A R I R N E E **C** P S T V Q L R H E V D  
122 CCCGGTGTCCCATAATATTTTCAACATCAGCTTACGATGATGAAGAGAGTGTGTGCATT  
P G V P I I F S T S A Y D D E E S V V I  
182 GACGAGAACACAGACGTATAACATCAGCTTCAATGCCAGCGCC**TGC**GAAGGACGAAGGACT  
D E N T D V Y I S F N A S A **C** E G R R T  
242 TGGGCACATCGTTTCGCCAATCCTATGCCACCTGCAGTGGGTATCGAGCTTGCTACCCCT  
W A H R F A N P M P P A V G I E L A T P  
302 GCTAGAATTTACGTACGCATCAGATTCAGGATTAAGAAATCAGACATTGGTTACAGCGTT  
A R I Y V R I R F R I K K S D I G Y S V  
362 TATTCTCCTTATGAGGACTATGATGGGAATGTGAAACTGTACTATCCTGTGCCTTGGGCC  
Y S P Y E D Y D G N V K L Y Y P V P W A  
422 AATTCAAGGCATTTGGTGTGAGTAGTCTGAGATCCTCTTTTCGATTATGACTTTTATGAG  
N S R H L V L S S L R S S F D Y D F Y E  
482 GCTCAAAATGATGAAGGGATGATAAAATCTGTAGTG**TGA**TTTCTATATCGCACGTGAGGT  
A Q N D E G M I K S V V **\***  
542 TATGTAAGGGATCCACCAACTTATGTATCCGTACAATAAGTGGATCAAATGATGATGCTT  
602 GCAACATTGCATTAGCGTGTACTTTTA**AATAAT**AACCCTATTCATCTGAATCAAAAAA  
662 AAAAAAAAAAAAAA 675

2 **CTCCGAACAGGGTTCCGTATTACATG**CGCCCAGTTATAAGAGCATATGGTGGTGTGCT  
**L R T G V P Y Y M R P V I R A Y G G V A**  
62 CCAGCAAGAATTCGAAACGAAGAA**TGCC**CATCAATGGTGAAACTCAGACCCGAGGTTGAT  
P A R I R N E E **C** P S M V K L R P E V D  
122 CGTGGTGTCCCATAACATTTTCAACATCAGCTTACGGTAGTGGAGAGAGTGTGTGCATC  
R G V P I T F S T S A Y G S G E S V V I  
182 GACGAGAACACAGCCGTATAACATCAGCTTCAATGCCAGTGT**TGC**GAAGGACTAAAGACT  
D E N T A V Y I S F N A S V **C** E G L K T  
242 TGGGCACATCGTTTCGCCAATCCTATGCCACCTGCAGTGGGTATAGAGCTTGCTACCCCT  
W A H R F A N P M P P A V G I E L A T L  
302 GCTAGAATTTACGTACGCATCAGATTCAGGATTAAGAAATCAGACATAATTGGTTTCAGC  
A R I Y V R I R F R I K K S D I I G F S  
362 GTTTATTCTCCTTATGAGGACTCAGATGGGAATGTGAAACTCTACTATCCTGTCCCTTGG  
V Y S P Y E D S D G N V K L Y Y P V P W  
422 TCCAATTCAGGCATTTGGTGTGAGTAGTGGATATCCTCTTTTCGATTATGCTTTTTTT  
S N S R H L V L S S E V S S F D Y A F F  
482 GAGGCTCAAACCTTATGACGGGATGATAAAATCTGTAGTG**TGA**TTTCTCTATCGCACAAAA  
E A Q T Y D G M I K S V V **\***  
542 AAGCTGTGAGGGATCCACCAACTTATGAATCCGTACAATAAGTGGATCAAATGATGATG  
602 CTTGTAACATTGCATTAGCGTGTACTTTTA**AATAAA**AACCCTATTCGTCTGAATCATAA  
662 AAAAAAAAAAAAAA 680

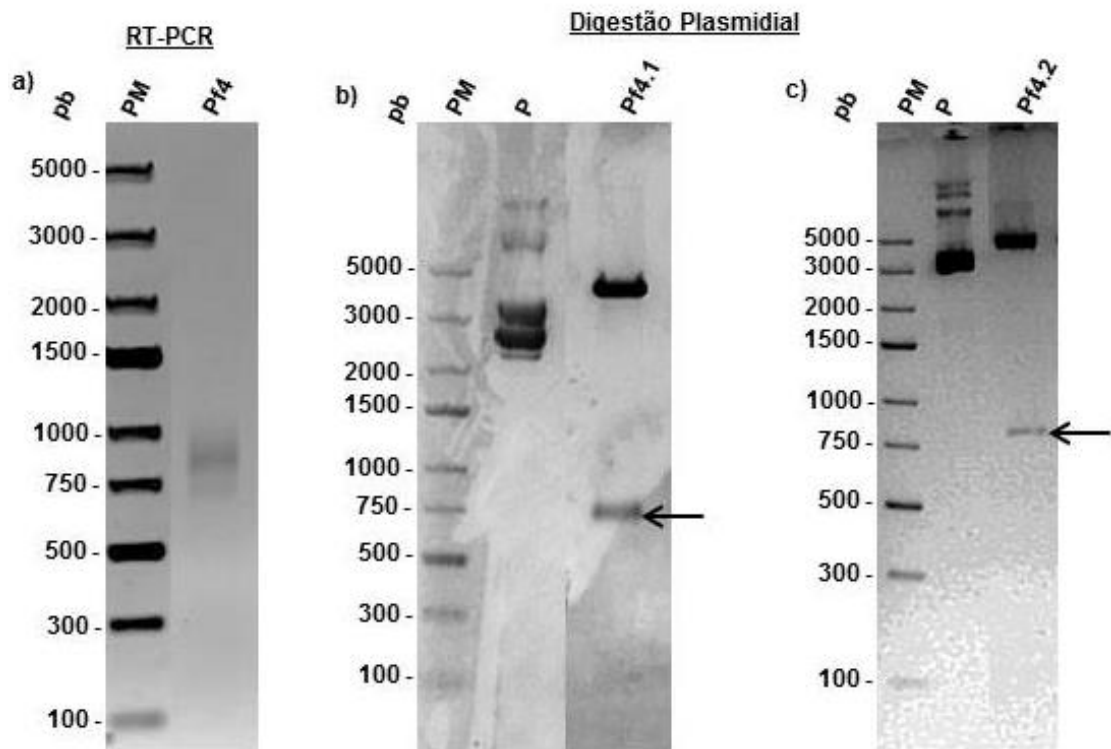
**Figura 9: a) Pf 1.1; b) Pf 1.2; c) Pf 1.3.** Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos. (\*) representa o códon de parada da tradução. Em azul temos a sequência do iniciador. Um suposto sítio de poliadenilação encontrado na região 3' não traduzida está marcado em verde com cisteínas em vermelho.

Clone	MW teórico (Da)	pI teórico
Pf1.1	19483.1	6,81
Pf1.2	19640.1	5,64
Pf1.3	19379.1	8,53

**Tabela 3: Pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos dos clones obtidos do iniciador Pf1Fw.** Com a utilização do software *ProtParam* foi possível prever a massa molecular e o ponto isoelétrico dos clones obtidos. MW: peso molecular

#### 4.1.2 Iniciador Pf4Fw

RNA total foi extraído, retro-transcrito e o cDNA resultante foi amplificado com a utilização do iniciador Pf4Fw (Figura 12a). Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose 1%. Após ligação ao vetor e transformação o DNA plasmidial das colônias selecionadas, foi extraído e clivado com a *EcoRI* (Figura 12b e 12c). Foram obtidos 2 clones positivos nesta fase.



**Figura 10: Iniciador Pf4Fw.** Gel de agarose 1% (imagens negativas). **a)** RT-PCR utilizando o iniciador Pf4Fw. **b)** e **c)** clones provenientes do iniciador Pf4Fw. pb: pares de base; PM: peso molecular; P: plasmídeo não digerido; Pf 4.1, Pf 4.2: clones provenientes do iniciador 4. Colchete indica a faixa de amplificação de interesse. As setas indicam o fragmento liberado do plasmídeo após digestão. DNA foi visualizado por coloração com brometo de etídeo.

Os clones Pf 4.1 e Pf 4.2 foram sequenciados. As sequências obtidas foram analisadas em busca de sequências abertas de leitura (ORFs). Na Figura 11 (11a e 11b) demonstramos as sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos dos fragmentos sequenciados. Os clones obtidos possuem aproximadamente 600 pb e 750 pb, respectivamente. Com a utilização do software *ProtParam* seus pesos moleculares e seus pontos isoelétricos foram preditos (Tabela 4).

2 **CTCCGA**ACTGAGACCCCGTATTATAT**GG**CCCCGTACATTTGGGCTATTGGTGGCGGTGTT **a)**  
**L R T E T P Y Y M A P Y I W A I G G G V**  
62 GCTCCGGTACCAGTTGGAACGACGAA**TGCC**CCATCGGCGGTGACACTAACACCAGAGGTT  
A P V P V G N D E **C** P S A V T L T P E V  
122 CTCCATGGTGTTCCTATAGTATTTTCGGCTCTACACTCTCCTGGAAAAAGTGTGTGCATC  
L H G V P I V F S A L H S P G K S V V I  
182 GATGAGAACATGGACGTGCTCATCAGATTCAATGCCAGCGTCGAAGGG**TGCC**ATTTAACG  
D E N M D V L I R F N A S V E G **C** H L T  
242 ACTTGGGGAAATAGGTTCTTTGTTCCTACGCCAAAACACTACCTATAAAACTTCTTGGC  
T W G N R F F V P T P K T L P I K L L G  
302 CCCTTTACAGTTCTAATTTATGAGCCCATCTACTTCAGAGTAAAGAGTGCGGGGCAGTAT  
P F T V L I Y E P I Y F R V K S A G Q Y  
362 TACAGAGTTTATACAAAGAAGCAAGCAGAAGAGGGTATTGCAGAGTACGATCTTACCATT  
Y R V Y T K K Q A E E G I A E Y D L T I  
422 TACCATGACAAAGCAAATGATATTTTCAAGCGTTTGGCTATAACTAAAAAGAAACCAAC  
Y H D K A N D I F K R L A I T K K E T N  
482 TTGTTTTTTTTATTTTCACGAGGCCAAAGATTATAACAGGATGATAGAATCAGTGGT**TGA**  
L F F Y F H E A K D Y N R M I E S V V **\***  
542 TTTCTATCGCAAATAAGGGCATCATGCGTTTAAAGATCCATCGGATATCCACCTACTTTGG  
602 TATCCCTATAGAATAACATATATGGATCTATCGGTGATGGTTGTAATATTGCGTTAG**AA**  
662 **TATA**TGCTATCAAATTATAAAACTCTGTTTCGATGGATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
722 AA 723

3 **CTCCGA**ACAGAGACTCCTTATTACAT**GG**CCCCGTACATTTGGGCTATTGGTGGCGGTGTT **b)**  
**L R T E T P Y Y M A P Y I W A I G G G V**  
63 GCTCCGGTACCAGTTGGAACGACGAA**TGCC**CCATCGGCGGTGACACTAACACCAGAGGTT  
A P V P V G N D E **C** P S A V T L T P E V  
123 CTCCATGGTGTTCCTATAGTATTTTCGGCTCTACACTCTCCTGGAAAAAGTGTGTGCATC  
L H G V P I V F S A L H S P G K S V V I  
183 GATGGGAACATGGACGTGCTCATCAGATTCAATGCCAGCGTCGAAGGG**TGCC**ATTTAACG  
D G N M D V L I R F N A S V E G **C** H L T  
243 ACTTGGGGAAATAGGTTCTTTGTTCCTACGCCAAAACACTACCTATAAAACTTCTTGGC  
T W G N R F F V P T P K T L P I K L L G  
303 CCCTTTACAGTTCTAATTTATGAGTCCATCTACTTCAGAGTAAAGAGTGCGGGGCAGTAT  
P F T V L I Y E S I Y F R V K S A G Q Y  
363 TACGGAGTTTATACAAAGAAGCAAGCAGAAGAGGGTATTGCAGAGTACGATCTTACCATT  
Y G V Y T K K Q A E E G I A E Y D L T I  
423 TACCATGACAAAGCAAATGATATTTTCAAGCGTTTGGCTATAACTAAAAAGAAACCAAC  
Y H D K A N D I F K R L A I T K K E T N  
483 TTGTTTTTTTTATTTTCACGAGGCCAAAGATTATAACAGGATGATAGAATCAGTGGT**TGA**  
L F F Y F H E A K D Y N R M I E S V V **\***  
543 TTTCTATCGCAAATAAGGGCATCATGCGTTTAAAGATCCATCGGATATCCACCTACTTTGG  
603 TATCCCTATAGAATAACATATATGGATCTATCGGTGATGGTTGTAACAAAAAAAAAATAA  
663 ATTATAATTATATAAATTTATTACAATATTATTAATACAGGGGGG 707

**Figura 11: a) Pf 4.1; b) Pf 4.2.** Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos. (\*) representa o códon de parada da tradução. Em azul temos a sequência do iniciador. Um suposto sítio de poliadenilação encontrado na região 3' não traduzida está marcado em verde e cisteínas em vermelho.

Clone	MW teórico (Da)	pl teórico
Pf4.1	20313.4	6,58
Pf4.2	20132.2	6,5

**Tabela 4: Pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos dos clones obtidos do iniciador Pf4Fw.** Com a utilização do software *ProtParam* foi possível prever a massa molecular e o ponto isoelétrico dos clones obtidos. MW: peso molecular

As sequências deduzidas de aminoácidos dos cinco clones obtidos a partir da amplificação com os iniciadores Pf1Fw e Pf4Fw, foram alinhadas (Figura 15) com o auxílio do software *ClustalW* em busca de similaridades.

Todos os clones obtidos possuem dois resíduos de cisteína e pesos moleculares preditos em torno de 20 000 Da, de acordo com o esperado para inibidores do tipo Kunitz. Com base no número de resíduos de cisteína, os clones obtidos podem ser incluídos no grupo 2 de subclassificação para Kunitz, no qual encontramos proteínas que possuem de 2-3 resíduos de cisteína formando uma ponte dissulfeto (Oliva e colaboradores, 2010; Bateman e James, 2011).

```

Pf1.1 LRTGVPYYMRPVNRAFGG-VAPARIRNEECPTTVKLRPEVDPGVPIITFST-PYNNGESVV 58
Pf1.2 LRTGVPYYMRPVIRIFGG-VAPARIRNEECPTSTVQLRHEVDPGVPIIFSTSAVDDEESVV 59
Pf1.3 LRTGVPYYMRPVIRAYGG-VAPARIRNEECPSMVKLRPEVDRGVPIITFSTSAVGSSESVV 59
Pf4.1 LRTETPYYMAPYIWAIGGGVAPVPVGNDECPSAVTLTPEVLHGVPIVFSA-LHSPGKSVV 59
Pf4.2 LRTETPYYMAPYIWAIGGGVAPVPVGNDECPSAVTLTPEVLHGVPIVFSA-LHSPGKSVV 59
*** .***** * ** ** . : *:***: * * ** ***** **: .. :***

Pf1.1 IDENTVYISFNASV--CEG-RKTWYRFRSPLPPAVRIELGTLAFIYVVRTRFRIEKSD-114
Pf1.2 IDENTVYISFNASA--CEG-RRTWAHRFANPMPPAVGIELATPARIYVRIRFRIKSD-115
Pf1.3 IDENTAVYISFNASV--CEG-LKTWAHRFANPMPPAVGIELATLARIYVRIRFRIKSDI-116
Pf4.1 IDENMDVLRIRFNASVEGCHLTTWGNRFFVPTPKLPIKLLGPFTVLIYEPIYFRVKSAG-118
Pf4.2 IDGNMDVLRIRFNASVEGCHLTTWGNRFFVPTPKLPIKLLGPFTVLIYESIYFRVKSAG-118
** * * * * ** * * :: : . ** **:::..

Pf1.1 IGYSVYYRYVDSDE----SVKLYYPIP-SFTGHLVLSLRSDFDYDFFEAQNDEGMKSV169
Pf1.2 IGYSVYSPYEDYDG----NVKLYYVVPWANSRHLVLSLRSDFDYDFFEAQNDEGMKSV171
Pf1.3 IGFVSVYSPYEDSDG----NVKLYYVVPWNSRHLVLSSEVSSFDYAFFEAQTYDGMKSV172
Pf4.1 QYYRVYTKKQAEETAEYDLTIYHDKANDIFKRLAITKKETNLFYFHEAKDYNRMIESV178
Pf4.2 QYYGVYTKKQAEETAEYDLTIYHDKANDIFKRLAITKKETNLFYFHEAKDYNRMIESV178
: ** : .::*: . :*:.. :.: : *.** : **:*

Pf1.1 V 170
Pf1.2 V 172
Pf1.3 V 173
Pf4.1 V 179
Pf4.2 V 179

```

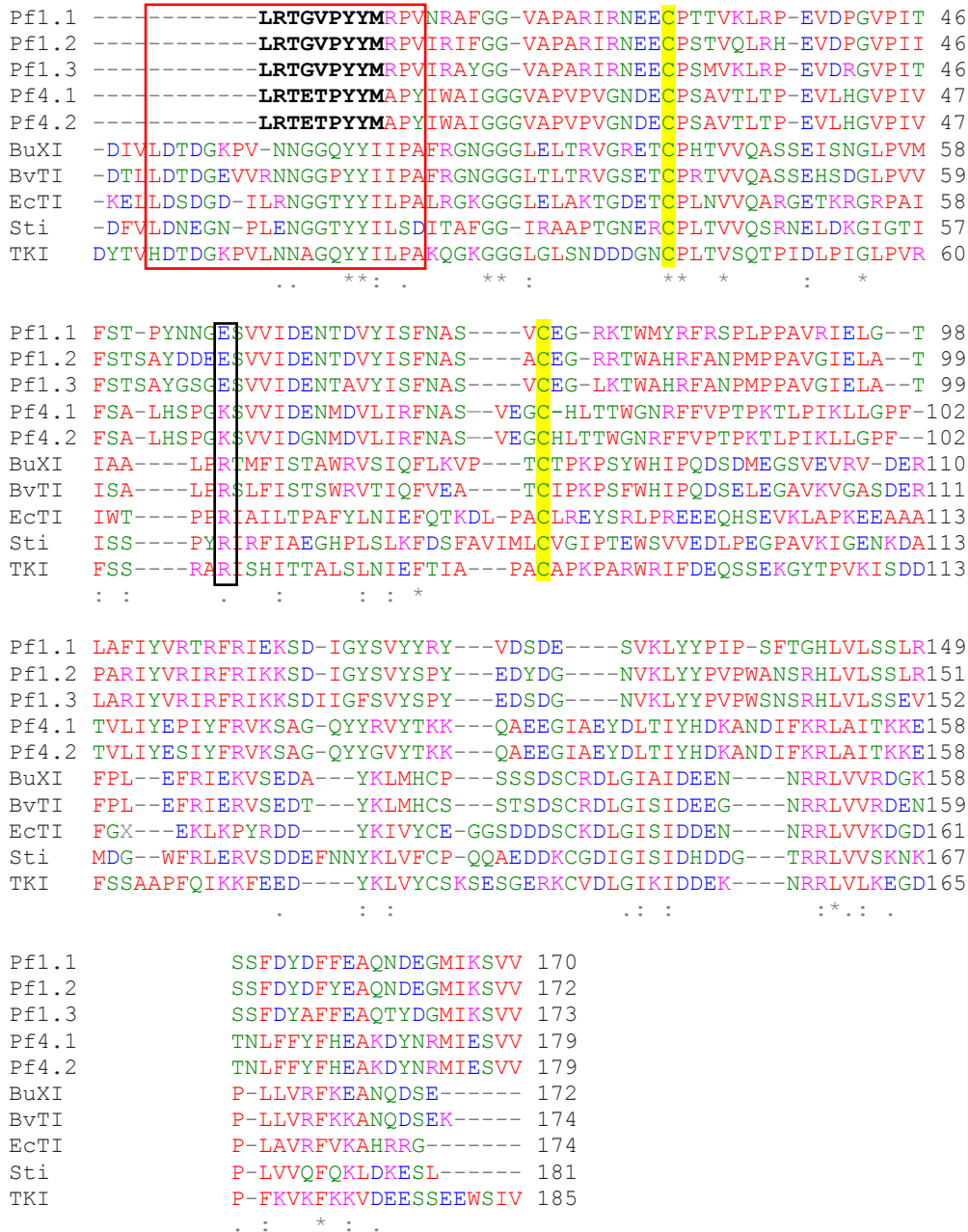


\*

**Figura 12: Alinhamento múltiplo entre as sequências primárias dos clones.** Em destaque no box preto estão os iniciadores utilizados nas reações de PCR. Em realce amarelo temos as cisteínas presentes nas sequências. (-) espaços foram incluídos para aperfeiçoar o alinhamento. (\*) indicam resíduos de aminoácidos que são comuns a todas as sequências alinhadas; (:) indicam resíduos de aminoácidos diferentes, mas com homologia em propriedade química, nas sequências analisadas.

Na Figura 13, foi feito o alinhamento das sequências deduzidas dos fragmentos clonados e sequenciados ( Pf1.1, Pf1.2, Pf1.3, Pf4.1 e Pf4.2) com inibidores do tipo Kunitz com as seguintes sequências de inibidores tipo Kunitz descritos na literatura: *Bauhinia unguolata* (BuXI) gi|32363179; *Bauhinia variegata* (BvTI) gi|32363181; *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) gi|292630818; *Glycine max* (Sti) gi|157830108 e *Tamarindus indica* (TKI) gi|308756025.

O sítio P1 putativo foi selecionado com base no alinhamento das sequências com o inibidor de protease do tipo Kunitz de tamarindo (TKI) (Patil e colaboradores, 2012).



**Figura 13: Alinhamento múltiplo entre as seqüências primárias dos clones e inibidores de protease do tipo Kunitz.** Em destaque (box vermelho) temos os aminoácidos presentes no Kunitz *motif*. Em negrito estão os iniciadores 5' utilizados. Em realce verde temos os iniciadores utilizados nas reações de PCR. Em realce amarelo temos as cisteínas presentes nas seqüências. No box preto, temos os aminoácidos presentes no sítio putativo P1 (sítio reativo) das proteínas. As seqüências de inibidores alinhadas foram: (BuXI) *Bauhinia unguolata*, (BvTI) *Bauhinia variegata*, (EcTI) *Enterolobium contortisiliquum*, (Sti) *Glycine max* e (TKI) *Tamarindus indica*. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa *ClustalW* disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/clustalW>. (-) espaços foram incluídos para aperfeiçoar o alinhamento. (\*) indicam resíduos de aminoácidos conservados nas seqüências analisadas; (:) indicam resíduos de aminoácidos com similaridade em propriedade química; (.) indicam resíduos de aminoácidos com distintas propriedades químicas nas plantas analisadas.

## 5. DISCUSSÃO

Uma das formas das plantas respondem a agressões de predadores, ativando uma cascata de sinalização que leva a produção do ácido jasmônico. Esse fitohormônio, assim como seus derivados, é um forte indutor da expressão de genes, que codificam proteínas com função defensiva (Vasyukova e colaboradores, 2011).

Ferimentos por insetos mastigadores ou danos mecânicos resultam no acúmulo localizado e sistêmico de altos níveis de inibidores de proteases em folhas de diversas plantas (Farmer e colaboradores, 1992). Possíveis utilidades para inibidores naturais de enzimas proteolíticas têm sido vistos em biotecnologia vegetal. Entre as áreas potenciais de uso dos inibidores estão à construção de plantas transgênicas com aumento da resistência a pragas e o desenvolvimento de procedimentos para a biossíntese de proteínas recombinantes. Neste último caso, os inibidores servirão para impedir a degradação da proteína por proteases do inseto (Mosolov e Valueva, 2008).

Em estudos prévios, Botelho-Júnior e colaboradores (2008) mostraram o acúmulo de inibidores de proteases do tipo Kunitz em folhas de maracujá após tratamento com MeJA e herbivoria. A partir desse trabalho iniciamos o estudo do acúmulo de transcritos para inibidores de proteases serínicas em folhas de maracujá. Com base nestes dados buscamos a clonagem molecular de inibidores induzidos em plantas de maracujá submetidas a vapores de metil jasmonato em um período de 12 h.

Partindo de sequências primárias de proteínas purificadas e caracterizadas no grupo (Botelho-Júnior e colaboradores, comunicação pessoal) como sendo inibidores de proteases serínicos do tipo Kunitz, desenhamos os inibidores utilizados nos experimentos de RT-PCR. Os iniciadores utilizados geraram produtos de amplificação entre 600-750 pb (Figura 8b e 12a). Os *amplicons* foram ligados em vetor de clonagem e após a transformação de bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  obtivemos colônias positivas, estas foram selecionadas e o DNA plasmidial foi extraído e clivado com a utilização da endonuclease de restrição *EcoRI* para liberação e confirmação do produto clonado (Figura 8c, d, e e 12b, c). Neste processo obtivemos 5 clones, estes foram sequenciados automaticamente e através de ferramentas de bioinformática suas sequências nucleotídicas e deduzidas de aminoácidos foram analisadas (Figuras 9 e 10).

Quando utilizamos alinhamento múltiplo entre as sequências deduzidas para os clones provenientes de um mesmo iniciador (Figura 12), observamos que para os oriundos do Pf1Fw temos diferenças em 41 posições (75% de identidade) enquanto os originários do Pf4Fw diferem em apenas 3 posições (98% de identidade). Essas observações nos levam a supor que as proteínas codificadas pelos genes clonados são isoformas.

Quando comparamos estas sequências com inibidores de proteases do tipo Kunitz descritos na literatura (Figura 16), diversos pontos apresentam conservação na sequência e são importantes para a estrutura da proteína, assim como para a sua função, como tirosinas (Y), cisteínas (C), prolínas (P), glicinas (G), valinas (V), ácidos glutâmicos (E), fenilalaninas (F) e isoleucina (I), se apresentam de forma conservada. De acordo com Krowarsch e colaboradores (2003), esses aminoácidos colaboram para a estabilidade e funcionalidade de inibidores de proteases serínicas.

Botelho-Júnior e colaboradores (2008) e Pereira e colaboradores (2011), isolaram e sequenciaram IPs presentes em folhas submetidas a tratamento com MeJA, ferimento mecânico e herbivoria, e presentes constitutivamente durante o desenvolvimento floral e flores em antese, respectivamente. Esta é a primeira vez que se reporta a seleção de genes de inibidores de proteases serínicos do tipo Kunitz para maracujazeiro, podemos encontrar IPs Kunitz em batata (SuH e colaboradores, 1999), grão-de-bico (Srinivasan e colaboradores, 2005), feijão (Wang e Rao, 2010) e cacau (Silva e Figueira, 2005), plantas economicamente importantes.

A seleção de genes codificadores para IPs serínicos do tipo Kunitz em maracujazeiro será útil em experimentos de superexpressão destas proteínas *in vitro* e *in vivo*.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ A utilização de iniciadores degenerados foi eficiente para a amplificação de fragmentos entre 600 pb e 750 pb correspondentes a sequência de nucleotídeos para inibidores de proteases.
- ✓ O método de clonagem utilizado foi eficaz para a geração de clones a partir da ligação de *amplicons*, provenientes de reações de RT-PCR.
- ✓ A comparação das sequências deduzidas dos clones obtidos com inibidores Kunitz conhecidos, revelou que estes dividem em várias posições conservação em suas sequências.
- ✓ A análise das sequências deduzidas de aminoácidos dos clones obtidos revelou que estes possuem mais de 70% de identidade entre si tratando provavelmente de isoformas da proteína.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhondzadeh, S.; Naghavi, H. R.; Vazirian, M.; Shayeganpour, A.; Rashidi, H.; Khani, M. (2001). Passion flower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 26: 363-367

Andreou, A.; Brodhun, F.; Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research*, 48: 148–170

Avanci, N. C.; Luche, D. D.; Goldman, G. H.; Goldman, M. H. S. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*, 9: 484-505

Bateman, K. S.; James, M. N. G. (2011). Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Current Protein and Peptide Science*, 12: 341–347

Bernacci, L. C.; Meletti, L. M. M.; Soares-Scott, M. D. (2003). Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25: 355-356

Bode, W.; Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 204: 433-451

Boiça - Júnior, A. L.; Angelini, M. R.; De Oliveira, J. C. (2008). Aspectos biológicos de *Dione Juno Juno* (cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) em genótipos de maracujazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 101-105

Botelho-Júnior, S.; Siqueira-Júnior, C. L.; Jardim, B. C.; Machado, O. L. T.; Neves-Ferreira, A. G. C.; Perales, Jacinto, T. (2008). Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding and herbivory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9404–9409

Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 183-205

Campo News. Disponível em: <<http://www.camponews.com/>> Acesso em: 12 de janeiro de 2013

Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515–1539

Carlini, E. A.; Rodrigues, R.; Mendes, F. R.; Tabach, R.; Gianfratti, B. (2006). Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 690-695

Cavichioli, J. C.; Ruggiero, C.; Volpe, C. A. (2008). Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30: 649-656

Chehab, E. W; Perea, J. V.; Theg, S.; Dehesh, K. (2007). Oxylin pathway in rice and *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 43-51

Chung, H. S.; Cooke, T. F.; DePew, C. L.; Patel, L. C.; Ogawa, N.; Kobayashi, Y.; Howe, G. A. (2010). Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *The Plant Journal*, 63: 613–622

Câmara Muqui. Disponível em: <[http:// www.camaramuqui.es.gov.br/](http://www.camaramuqui.es.gov.br/)> Acesso em: 21 de fevereiro de 2012

Christeller, J. T. (2005). Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 272: 5710–5722

Chye, M. L.; Sin, S. F.; Xu, Z. F.; Yeung, E. C. (2006). Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cellular Development Biology—Plant*, 42: 100–108

*ClustalW*. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>> Acesso em: 16 de agosto de 2013

Creelman, R. A.; Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 355–381

Das, A.; Lee, S.; Hyun, T. K.; Kim, S.; Kim, J. (2013). Plant volatiles as method of communication. *Plant Biotechnology Reports*, 7: 9–26

Dhawan, K.; Kumar, S.; Sharma, A. (2001). Anxiolytic activity of aerial and underground parts of *Passiflora incarnata*. *Fitoterapia*, 72: 922-926

Dhawan, K.; Sharma, A. (2003). Restoration of chronic- $\Delta^9$ -THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. *British Journal of Pharmacology*, 138: 117–120

Dhawan K.; Dhawan S.; Sharma A. (2004). *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94:1–23

Dicke, M.; Poecke, R. M. P. V.; Jetske, G. B. (2003). Inducible indirect defence of plants: from mechanisms to ecological functions. *Basic and Applied Ecology*, 4: 2-42

Ee, K.; Zhao, J.; Rehman, A.; Agboola, A. (2009). Purification and characterization of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Benthams seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7022–7029

Escobar, L. K. (1988). A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76: 877-885

Espírito-Santo, A. P.; Lagazzo, A.; Sousa, A. L. O. P.; Perego, P.; Converti, A.; Oliveira, M. N. (2013). Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurts enriched with passion fruit fiber. *Food Research International*, 50: 224–231



EMATER-RIO. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.agricultura.rj.gov.br/>> Acesso em: 11 de junho de 2013

Expasy: *Bioinformatics Resource Portal*. Disponível em: <<http://expasy.org/tools/>> Acesso em: 16 de agosto de 2013

Farmer E. E.; Ryan C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 7713–7716

Farmer, E. E.; Johnson, R. R.; Ryan, C. A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by Methyl Jasmonate and Jasmonic Acid. *Plant Physiology*, 98: 995–1002

Ferreira, F. M.; Neves, L. G.; Bruckner, C. H.; Viana, A. P.; Cruz, C. D.; Barelli, M. A. A. (2010). Formação de supercaracteres para seleção de famílias de maracujazeiro amarelo. *Acta Scientiarum Agronomy*, 32: 247-254

Fonseca, S; Chico, J. M; Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 539–547

Flora Beija-Flor. Disponível em: <<http://www.florabeijaflor.com.br>> Acesso em: 21 de fevereiro de 2012

Frost, C. J; Mescher, C. M; Carlson, J. E; Moraes, C. M. (2008). Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiology*, 146: 818–824

Geyter, N.; Gholami, A.; Goormachtig, S.; Goossens, A. (2012). Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17: 349–359

Gfeller, A.; Dubugnon, L.; Liechti, R.; Farmer, E. E. (2010). Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling*, 3: 1–6

Gubb, D.; Sanz-Parra, A.; Barcena, L.; Troxler, L.; Fullaondo, A. (2010). Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects. *Biochimie*, 92: 1749–1759

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41: 95–98

Heath, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315–319

Heil, M.; Bueno, J. C. S. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104: 5467-5472

Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178: 41–61

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>> Acesso em: 15 de junho de 2013

Iriti, M.; Faoro, F. (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and Ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 3371-3399

Jardim, B. C.; Perdízio, V. A.; Berbert-Molina, M. A.; Rodrigues, D. C.; Botelho-Júnior, S.; Vicente, A. C. P.; Hansen, E.; Otsuki, K.; Ürményi, T. P.; Jacinto, T. (2010). Herbivore response in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) plants: induction of lipoxygenase activity in leaf tissue in response to generalist and specialist insect attack. *Protein & Peptide Letters*, 17: 480–484

Kallenbach, M.; Alagna, F.; Baldwin, I. T.; Bonaventure, G. (2010). *Nicotiana attenuata* SIPK, WIPK, NPR1, and fatty acid-amino acid conjugates participate in the induction of jasmonic acid biosynthesis by affecting early enzymatic steps in the pathway. *Plant Physiology*, 152: 96–106

Kang, Z.; Jiang, J. H.; Wang, D.; Liu, K.; Du, L. F. (2009). Kunitz-type trypsin inhibitor with high stability from *Spinacia oleracea* L. seeds. *Biochemistry (Moscow)*, 74: 102–109

Koiwa, H.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2: 379-384

Kombrink, E. (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta*, 236: 1351–1366

Krowarsch, D.; Cierpicki, T.; Jelen, F.; Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2427–2444

Laskowski, M.; Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review Biochemistry*, 49: 593–626

Léon, J. Rojo, E. Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52:1-9

Leung, H. H.; Fang, E. F.; Ng, T. B. (2013). *A landscape of the health benefits of different natural protease inhibitors*. In: Fang, E. F.; Ng, T. B. (org). Antitumor

potential and other emerging medicinal properties of natural compounds. Springer Science, p. 213-224

Lingaraju M. H.; Gowda L. R. (2008). A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 850–855

Llandres, A. L.; Rodríguez-Gironés, M. A.; Dirzo, R. (2010). Plant stages with biotic, indirect defences are more palatable and suffer less herbivory than their undefended counterparts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101: 536–543

Malerbo-Souza, D. T.; Nogueira-Couto, R. H.; Toledo, V. A. A. (2002). Insetos associados às flores de diferentes espécies de maracujá (*Passiflora spp.*). *Acta Scientiarum*, 24: 1269-1274

Meletti, L. M. M. (2011). Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Volume Especial: 83-091

Mello, M. O; Silva-Filho, M. C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14:71-81

*MEROPS–The Peptidase Database*. Disponível em <<http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors>>. Acesso em: 16 de agosto de 2013

Mithofer, A.; Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 431–50

Morant, A. V.; Jorgensen, K.; Jorgensen, C.; Paquette, S. M.; Sánchez-Pérez, R.; Moller B. L. ; Bak, S. (2008).  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69: 1795–1813

Mosolov, V. V.; Grigor'eva, L. I.; Valueva, T. A. (2001). Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37: 115–123

Mosolov V. V.; Valueva T. A. (2008). Proteinase Inhibitors in Plant Biotechnology: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 233–240

Mosolov, V. V.; Valueva, T. A. (2011). Inhibitors of proteolytic enzymes under abiotic stresses in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 453–459

Murzin, A. G.; Leske, A. M.; Chothia, C. (1992).  $\beta$ -Trefoil Fold: patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 $\beta$  and 1 $\alpha$  and fibroblast growth factors. *Journal of Molecular Biology*, 223: 531 – 543

Nakahata, A. M.; Mayer, B.; Neth, P.; Hansen, D.; Sampaio, M. U.; Oliva, M. L. V.(2013). Blocking the proliferation of human tumor cell lines by peptidase inhibitors from *Bauhinia* seeds. *Planta Medica*, 79: 227–235

Oliva, M. L. V.; Silva, M. C.C.; Sallai, R. C.; Brito, M. V.; Sampaio, M. U. (2010). A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*, 92: 1667–1673

*ORFinder*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>> Acesso em: 16 de agosto de 2013

Patil, D. N.; Chaudhary, A.; Sharma A. K.; Tomar S.; Kumar, P. (2012). Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 279: 4547–4564

Peixoto, M. (2005). Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético. EMBRAPA Cerrados, 647p.

Pereira, K. R. B.; Botelho-Júnior, S.; Domingues, D. P.; Machado, O. L. T.; Oliveira, A. E. A.; Fernandes, K. V. S.; Madureira, H. C.; Pereira, T. N. S.; Jacinto, T (2011). Passion fruit flowers: Kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. *Phytochemistry*, 72: 1955–1961

Pires, A. A; Monnerat, P. H.; Pinho, L. G. R.; Zampirolli, P. Dom; Rosa, R. C. C.; Muniz, R. A. (2009). Efeito da adubação alternativa sobre os componentes de produção do maracujazeiro-amarelo. *Acta Scientiarum Agronomy*, 31: 655-660

*ProtParam*. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam>> Acesso em: 16 de agosto de 2013

Queiroz, M. S. R; Janebro, D. I. ; Cunha, M. A. L.; Medeiros, J. S.; Sabaa-Srur, A. U.; Diniz, M. F. F.; Santos, S. C. (2012). Effect of the yellow passion fruit peel flour (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg.*) in insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutrition Journal*, 11:89-96

Radhika, V.; Kost, C.; Boland, W.; Heil, M. (2010). The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PLoS ONE*, 5: 1–6

Rangel, M.; Machado, L. T. O.; Cunha, M. E.; Jacinto, T. (2002) Accumulation of chloroplast-targets lipogygenase in passion fruit in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry*, 60: 619-625

Renko, M.; Sabotic, J. ; Turk, D. (2012).  $\beta$ -trefoil inhibitors—from the work of Kunitz onward. *Biological Chemistry*, 393: 1043-1054

Rocha, D. (2004). Produtor de maracujá. 2. Ed. Fortaleza: Ministério da Ciência e Tecnologia, 48 p.

Rodriguez-Saona, C. R.; Musser, R. O.; Vogel, H.; Hum-Musser, S. M.; Thaler, J. S. (2010). Molecular, biochemical, and organismal analyses of tomato plants

simultaneously attacked by herbivores from two feeding guilds. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 1043–1057

Ryan, C. A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 28: 425–449

Sambrook, J. E.; Russel, D. W. (2001). In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Silva, C. R. S.; Figueira, A. (2005) Phylogenetic analysis of *Theobroma* (*Sterculiaceae*) based on Kunitz-like trypsin inhibitor sequences. *Plant Systematics and Evolution*. 250: 93–104

Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 459-464

Siqueira-Júnior, C. L.; Jardim, B. C.; Ümérnyi, T. P.; Vicente, A. C. P.; Hansen, E.; Otsuki, E. K.; Cunha, M.; Madureira, H. C.; Carvalho, D. R.; Jacinto, T. (2008). Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase upregulated by mechanical injury and methyl jasmonate. *Plant Cell Reports*, 27: 387–397

Smigocki, A. C.; Ivic-Haymes, S.; Li, H.; Savic, J. (2013). Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. *PLOS ONE*, 8: 1–12

Souza, V.C.; Lorenzi, H. (2008). Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG II. 2a ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 704p.

Srinivasan, A.; Giri, A. P.; Harsulkar, A. M.; Gatehouse, J. A.; Gupta, V. S. (2005) A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Molecular Biology*. 57: 359–374

Suh, S.; Moon, Y.; Hannapel, D. J. (1999). Posttranslational processing of the Kunitz-type potato proteinase inhibitor. *Journal of Plant Physiology*. 154: 498-502

Tremacoldi, C. R.; Pascholati, S. F. (2004). Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. *Fitopatologia Brasileira*, 29: 135-140

Vasyukova, N. I.; Chalenko, G. I.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskovskaya, O. L. (2011). Wound repair in plant tissues. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 229–233

Wang, S. Rao, P. (2010). A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. *European Food Research and Technology*. 231: 331–338

Wasternack, C.; Maucher, H.; Hause, B.; Feussner, I.; Ziegler, J. (2000) Allene oxide synthase of barley (*Hordeum vulgare* cv. *Salome*): tissue specific regulation in seed development. *The Plant Journal*, 21: 199-213

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on synthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100: 681-697

Wasternack, C.; Xie, D. (2010). The genuine ligand of a jasmonic acid receptor. *Plant signalling & Behavior*, 5: 337-340

Zeraik, M. L. ; Pereira, C. A. M. ; Zuin V. G. ; Yariwake, J. H. (2010). Maracujá: um alimento funcional? *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20: 459-471

Ye, X. J. ; Ng, T. B. (2011). Antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities of a hemagglutinin and a protease inhibitor from mini-black soybean. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 20: 1–12