

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

VANESSA KARINE SCHNEIDER

**FITOCISTATINAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

TESE DE DOUTORADO

Orientação: Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

VANESSA KARINE SCHNEIDER

**FITOCISTATINAS: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências (Ciências Biológicas). Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular

São Carlos

2018

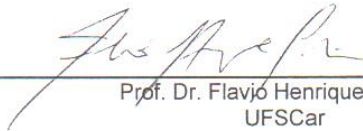


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

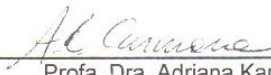
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa Karine Schneider, realizada em 27/02/2018:



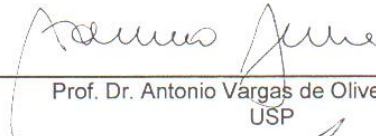
Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva
UFSCar



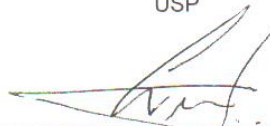
Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann
USP



Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona
UNIFESP



Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira
USP



Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol
UNIFESP

*Dedico aos meus pais, Dirce e Miguel
e ao meu irmão Vanderson,
por todo apoio, amor e dedicação!
Vocês são meu porto seguro!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por proporcionar saúde, disposição e sempre iluminar meus caminhos.

Agradeço à todas as pessoas e as instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular gostaria de agradecer:

À FAPESP, pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho (Processo 2013/05370-0).

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pelo suporte e pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, minha orientadora. Uma professora e pesquisadora de excelência, sempre disposta a ajudar, disponibilizar as melhores oportunidades, esclarecer minhas dúvidas. Agradeço pelo imenso aprendizado, pela confiança em mim depositada e por sempre acreditar no meu potencial. Agradeço também pelos tantos momentos em que foi muito mais do que uma orientadora, por todo carinho e suporte. És exemplo de liderança e fonte de inspiração para a minha trajetória acadêmica!

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, meu segundo orientador. Muito obrigada pelo apoio, por deixar as portas do laboratório sempre abertas, pelos sábios ensinamentos, preocupação e críticas construtivas.

À Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, por me receber tão gentilmente em seu laboratório. Agradeço por me incentivar, pelos ensinamentos, por ser exemplo de professora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol, pelos ensinamentos em inibição de cisteíno-peptidases, por me receber tão gentilmente para discutir ciência, pela troca de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Ariel Domingos Arencibia e sua esposa, por me receber tão gentilmente na Universidade Católica de Maule, no Chile. Agradeço pelos ensinamentos, pelas oportunidades, pela troca de conhecimento e experiências.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório para a realização dos experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar, pelos ensinamentos.

À secretária Ivanildes Menezes, pela atenção, ajuda com as documentações necessárias.

À minha família, pelo amor sem limites, suporte e dedicação. Aos meus pais, Dirce e Miguel, que sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos, me mostrando desde pequena a importância do estudo e dedicação. Ao meu irmão, Vanderson, pela cumplicidade de irmãos, pelos momentos divertidos, carinho, incentivo e exemplo de persistência.

Ao meu namorado, Paulo, por todo o amor, carinho, compreensão, apoio e honestidade, por fazer parte da minha vida. Por estar sempre ao meu lado, pelos tantos momentos inesquecíveis e felizes e por fazer os momentos tristes ficarem suportáveis.

Às minhas grandes amigas Taíse e Cassia, pela compreensão, momentos de alegrias, suporte, carinho, vocês são muito especiais! Amizade valiosa para a vida toda! Agradeço a você, Taíse, por ser minha companheira de trabalho, pelos ensinamentos, pela parceria de trabalho de anos, principalmente nos ensaios de inibição de cisteíno-peptidases. Espero poder trabalhar em muitos projetos com você.

À Lucia, Paulo, Elisa, Cecília, Fernando, Thiago, Francisco, Antônio, minha segunda família, por todo amor, carinho e suporte.

Ao Fernando Mazur, Camilo Araque e Andrés Ortis, pela ótima convivência no laboratório, amizade, conversas e pelas horas de mate.

Aos amigos e colegas de laboratório de Biotecnologia Vegetal Alana, Iron, Natália, Sâmara pela ótima convivência, trabalho em equipe, e em especial à Daniela, pela amizade, apoio, ajuda, pelas tantas conversas e viagens à Piracicaba.

À miha amiga e colega Mariane, pelas tantas conversas, parceria de trabalho, momentos compartilhados, amizade de grande valor.

Às amigas da Biotec, Deborah, Monica, Hemily e Patrícia, pelos ótimos momentos, parceria nas aulas, companheirismo.

Aos colegas de Piracicaba, Tânia Batista, Enio e Fátima, por todo auxílio e amizade.

Aos técnicos Elisabeth Baraldi, Héber Tavares e Daniela Modna, pelos conhecimentos compartilhados, ajuda e amizade.

Aos meus amigos queridos do Chile, Ewelyn, Glória, Barbara, Marjorie, Mirian, Mabel, Miguel, Maurício, Pablo, Cláudia, pela ótima convivência, troca de experiências, momentos de alegria.

Aos colegas do laboratório LBM, Adelita Santiago, Ana Lígia Buzolin, Augusto Balula, Bruna Arcângelo, Bruno Salata, Fernando Fonseca, Danyelle Toyama, Darlan

Nakayama, Gabriel Belém, Lucas Catelli, Luciano Kishi, Mariana Cardoso, Rafael Peduzzi, Priscila Shibao pela amizade, conhecimentos compartilhados e boa convivência. Em especial ao Chakravarthi Mohan e Célio Dias, pela grande amizade, conselhos, ajuda, por discutir ciência.

Aos colegas do laboratório de enzimologia da Unifesp, Bronze, Marcelo, Raquel, Sarah, Yudi, pela ótima convivência, troca de conhecimentos.

Às amigas Inessa e Marina, por todo carinho.

Aos meus amigos de Selbach, e aos que fiz estes anos em São Carlos.

E a todos que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão deste trabalho.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

FERRARA, T. F. D S.*; **SCHNEIDER, V. K.***; KISHI L, T.; CARMONA, A. K.; ALVES M. F. M.; BELASQUE-JÚNIOR J.; et al. (2015) Characterization of a Recombinant Cathepsin B-Like Cysteine Peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): A Putative Target for Control of *Citrus* Huanglongbing. **PLoS ONE** 10(12): e0145132. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145132>

* Autores contribuíram igualmente para o trabalho

SCHNEIDER, V. K.*; SOARES-COSTA, A.*; CHAKRAVARTHI, M.; RIBEIRO, C.; CHABREGAS, S. M.; FALCO, M. C.; HENRIQUE-SILVA, F. (2017). Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Reports**, 36(1), 193-201. DOI: 10.1007/s00299-016-2071-2

* Autores contribuíram igualmente para o trabalho

LEGUIZAMÓN, N. D. P.; NOGUEIRA, A. V. B.; CAMPOS, M. M. L.; RODRIGUES, E. M. **SCHNEIDER, V. V. K.**, FARIA, G.; ... & CIRELLI, J. J. A. BR 006 E POSTER IN BASIC RESEARCH. DOI: 10.1111/clr.131_13042

MOHAN C., **SCHNEIDER V.K.**, HENRIQUE-SILVA F. (2017) Novel Potential Candidate Promoters and Advanced Strategies for Sugarcane Transformation. In: Mohan C. (eds) Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects. **Springer International Publishing**, p. 75-85 DOI: 10.1007/978-3-319-58946-6_6

SOARES-COSTA, A.; **SCHNEIDER, V. K.**; NAKAYAMA, D. G.; ARENCIBIA, A. D.; HENRIQUE-SILVA, F. Plantas transgênicas fundamentos, métodos de produção e aplicações. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. 1ed.: Editora Blucher, 2017, p. 649-674. DOI: 10.5151/9788521211150-18

OLIVEIRA, M. S.; **SCHNEIDER, V. K.**; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, M. R.; SOARES-COSTA, A. Aluminum-tolerant sugarcane reveals higher nutrient absorption, lower

root aluminum accumulation and a distinct expression of genes related with organic acid production. Artigo submetido para publicação na revista Plant and Soils.

RESUMO

Cistatinas são inibidores *tight-binding* e competitivos de cisteíno-peptidases. Em plantas, essas proteínas fazem parte do mecanismo natural de defesa, regulando peptidases endógenas e exógenas. Em humanos as cistatinas são responsáveis pela regulação de processos fisiológicos, que se tornam limitados pela superexpressão de cisteíno-peptidases. A falta de regulação dos mecanismos biológicos que controlam a atividade das cisteíno-peptidases do tipo catepsinas resultam em muitas doenças tais como câncer, osteoporose, obesidade e doenças cardiovasculares. Diversos estudos têm avaliado o potencial de cistatinas na inibição de catepsinas humanas visando à regressão de doenças. Além da aplicação biotecnológica na área da saúde, as cistatinas têm sido amplamente utilizadas em estudos que visam o controle de insetos praga da agricultura. Insetos das ordens Hemiptera, Coleoptera, Homoptera possuem cisteíno-peptidases como enzimas digestivas. A superexpressão de cistatinas em plantas transgênicas tem sido realizada em um grande número de espécies, e os resultados são promissores, com interferência na mortalidade, reprodução e desenvolvimento dos insetos alimentados com estas plantas. Dessa forma, este trabalho divide-se em dois capítulos, o capítulo 1 voltado para a aplicação biotecnológica das fitocistatinas na agricultura, por meio da transformação genética de cana-de-açúcar com uma cistatina (*CaneCPI-4*) visando a resistência ao inseto *Migdolus fryanus* e o capítulo 2 voltado para a aplicação biotecnológica das fitocistatinas na saúde humana, por meio da caracterização de cistatinas de *Citrus* e estudos de inibição de catepsinas humanas e cisteíno-peptidases de diferentes organismos. O capítulo 1 corresponde a experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar com a cistatina *CaneCPI-4*, pelos métodos de biolística e *Agrobacterium tumefaciens*. As transformações feitas por biolística resultaram em poucos eventos transformantes, devido à baixa eficiência de regeneração das plantas. Na transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, foi possível observar que a regeneração das plantas transformadas se mostrou mais eficiente do que a regeneração de plantas transformadas por biolística, apresentando-se mais saudáveis, com maior número de eventos e bom desenvolvimento das plantas, contabilizando 92 plantas em desenvolvimento. O capítulo 2 corresponde à caracterização de cinco cistatinas de *Citrus*, *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* por meio da clonagem em vetor de expressão pET28a, expressão em células de *Escherichia coli*, purificação das proteínas por cromatografia de afinidade e ensaios de inibição de atividade de cisteíno-peptidases. A cistatina *CclemCPI-3* foi

capaz de inibir a atividade de uma legumina e de enzimas da família da papaína, demonstrando um comportamento bifuncional. A atividade da cisteíno-peptidase papaína foi inibida eficientemente por todas as cistatinas testadas, com K_i na ordem de nanomolar. A atividade da catepsina humana S foi eficientemente inibida pela cistatina *CsinCPI-2* ($K_i = 0,11$ nM). As catepsinas K e L são eficientemente inibidas pelas cistatinas *CclemCPI-2* ($K_i = 0,00098$ nM e $0,00608$ nM, respectivamente). A atividade da catepsina B foi eficientemente inibida por *CclemCPI-1* ($0,42$ nM). Esses resultados são promissores para futuros ensaios de avaliação do efeito das cistatinas *in vivo*, podendo resultar na aplicação biotecnológica das cistatinas de *Citrus* no controle de doenças humanas.

ABSTRACT

Cystatins are tight-binding, competitive cysteine-peptidase inhibitors. In plants, these proteins are part of natural defense mechanism, regulating endogenous and exogenous peptidases. In humans, cystatins are responsible for regulation of physiological processes, which are limited by overexpression of cysteine peptidases. The lack of regulation of biological mechanisms that control activity of cathepsin-like cysteine peptidases result in several diseases such as cancer, osteoporosis, obesity and cardiovascular diseases. Several studies have evaluated the potential of cystatins in inhibition of human cathepsins for disease regression. In addition to biotechnological application in health area, cystatins have been widely used in studies aimed at the control of insect pests in agriculture. Insects of Hemiptera, Coleoptera and Homoptera orders have cysteine-peptidases as digestive enzymes. Overexpression of cystatins in transgenic plants has been performed in a large number of species, and results are promising, with interference in mortality, reproduction and development of insects fed with these plants. In this way, this work is divided in two chapters aiming at biotechnological application of phytocystatins in agriculture through the genetic transformation of sugarcane with a cystatin (CaneCPI-4) aiming at resistance to *Migdolus fryanus* insect (Chapter 1) and biotechnological application of phytocystatins in human health through characterization of *Citrus* cystatins and inhibition studies with human cathepsins and cysteine-peptidases from different organisms (Chapter 2). Chapter 1 corresponds to experiments of genetic transformation of sugarcane with cystatin CaneCPI-4 by methods of biolistics and *Agrobacterium tumefaciens*. Transformations made by biolistics resulted in few transforming events, due to low plant regeneration efficiency. In sugarcane genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens* it was possible to observe that regeneration of transformed plants showed to be more efficient than the regeneration of plants transformed by biolistics, being healthier, with greater number of events and good plant development, accounting for 92 plants under development. Chapter 2 corresponds to characterization of five *Citrus* cystatins, *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* and *CclemCPI-3* by cloning into pET28a expression vector, expression in *Escherichia coli* cells, protein purification by affinity chromatography and cysteine-peptidase inhibition assays. Cystatin *CclemCPI-3* is bifunctional, being able to inhibit activity of a legumain and enzymes of papain family. The activity of cysteine-peptidase papain was efficiently inhibited by all cystatin tested, with K_i on the order of nanomolar. Human cathepsin S was efficiently inhibited by *CsinCPI-2* ($K_i = 0.11$ nM).

Cathepsins K and L are efficiently inhibited by *Cclem*CPI-2 ($K_i = 0.00098$ nM and 0.00608 nM, respectively). Cathepsin B is efficiently inhibited by *Cclem*CPI-1 ($K_i = 0.42$ nM). These results are promising for future trials evaluating effect of cystatin in vivo, which may result in biotechnological application of *Citrus* cystatins in human disease control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Larva do inseto *Migdolus fryanus*. Foto tirada em 30/03/2014 por Vanessa K. Schneider. 11
- Figura 2: Dimorfismo sexual em insetos adultos de *Migdolus fryanus*. Fêmea à esquerda e macho à direita. Foto: Paulo Botelho – disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_132_272200817517.html. 12
- Figura 3: Esquema representativo da reação de recombinação entre os produtos de amplificação do fragmento de interesse (CaneCPI-4) e o vetor pDONR/Zeo. Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen. 21
- Figura 4: Esquema representativo da reação de recombinação entre o plasmídeo de entrada (pDONR/Zeo_CaneCPI-4) e o vetor de expressão (pANIC). Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen. 23
- Figura 5: Processo de obtenção de calos embriogênicos de cana-de-açúcar. Da esquerda para a direita, extremidade apical de cana-de-açúcar, palmito, discos de folhas jovens e calos embriogênicos de cana-de-açúcar Foto: Vanessa K. Schneider 24
- Figura 6: Etapas de transformação de cana-de-açúcar via biolística. (A) Extremidades de plantas de cana-de-açúcar que darão origem aos explantes. (B) Discos de folhas jovens de cana-de-açúcar. (C) Calos embriogênicos de cana-de-açúcar produzidos por meio de subcultivos dos discos foliares em meio contendo reguladores de crescimento. (D) Bombardeamento de partículas contendo DNA adsorvido utilizando o equipamento – Biolistic® PDS-100/He Bio Rad. (E) Regeneração de calos embriogênicos transformados. Reproduzido de Soares-Costa *et al.*, 2017. 25
- Figura 7: Esquema geral das etapas de transformação genética de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens*. Adaptado de Krishnan e Mohan, 2017. 30
- Figura 8: Amplificação da ORF CaneCPI-4. M - marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1, 2 e 3 - banda de amplificação da ORF da CaneCPI-4; 4 - Controle negativo. 32
- Figura 9: Folhas de tabaco transformadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transiente do gene da enzima β -glucuronidase. 33
- Figura 10: Regeneração de plantas a partir de discos de folhas imaturas e calos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 bombardeados com com a construção

pAHC17CaneCPI-4. Discos: A – Discos não bombardeados em meio de regeneração; B - Discos bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina; C – Discos não bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina. Calos: D – Calos não bombardeados em meio de regeneração; E - Calos bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina; F – Calos não bombardeados oxidados em meio de regeneração contendo geneticina.34

Figura 11: Regeneração de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 a partir de discos e calos bombardeados com o gene da CaneCPI-4, 90 dias após o bombardeamento. A – Plantas não-transformadas; B – Plantas regeneradas a partir de discos bombardeados; C – Plantas regeneradas a partir de calos bombardeados.....35

Figura 12: Redução no crescimento das plantas regeneradas a partir da transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 e amarelecimento das folhas, com a presença, inclusive, de uma planta albina..... 36

Figura 13: Folhas de tabaco transformadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transiente do gene da enzima β -glucuronidase.37

Figura 14: Início de regeneração de plantas (construção pAHC17CaneCPI-4), 25 dias após o bombardeamento.37

Figura 15: Planta resultante do segundo bombardeamento com a construção pAHC17_CaneCPI-4 aos 6 meses após o bombardeamento.....38

Figura 16: Análise da presença da CaneCPI-4 na planta regenerada. Gel de agarose 1% mostrando os produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: controle negativo da reação; 2: Controle positivo (construção pAHC17_CaneCPI-4); 3: Planta de cana-de-açúcar regenerada, transformada com a construção pAHC17_CaneCPI-4; 4: Planta de cana-de-açúcar não transformada.39

Figura 17: Processo de multiplicação *in vitro* da planta transformada com a construção pAHC17_CaneCPI-4.....40

Figura 18: Plantas multiplicadas resultantes do segundo bombardeamento com a construção pAHC17_CaneCPI-4 em vasos com cobertura plástica em casa de vegetação41

Figura 19: Plantas resultantes da transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 em casa de vegetação.....41

Figura 20: Gráfico de expressão gênica da CaneCPI-4 em plantas transgênicas (T) e selvagens (WT) de cana-de-açúcar.....42

<p>Figura 21: Imunodeteccção da proteína CaneCPI-4. A: gel espelho, onde M: marcador de peso molecular Benchmark Invitrogen; 1: Extrato proteico de folhas de plantas selvagens de cana-de-açúcar; 2: Extrato proteico de folhas de plantas resultantes do evento de transformação com a construção pAHC17CaneCPI-4; 3: proteína CaneCPI-4 recombinante. B: ensaio de imunodeteccção da proteína CaneCPI-4 realizado com as mesmas amostras da figura A.....</p>	43
<p>Figura 22: Amplificação da CaneCPI-4 contendo as regiões <i>attB1</i> e <i>attB2</i>. 1: controle negativo da reação, 2: amplificação CaneCPI-4 e M o marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).</p>	44
<p>Figura 23: Análise de restrição do plasmídeo pDONR/ZeoCaneCPI_4. O padrão de bandas foi igual ao esperado, com a presença do fragmento correspondente à CaneCPI-4. M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (<i>Thermo Scientific</i>).....</p>	45
<p>Figura 24: Análise de restrição do plasmídeo pDONR/Zeo. O padrão de bandas foi igual ao esperado, com a presença de três fragmentos de 790, 1458 e 2043 pb (coluna 1). M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).</p>	45
<p>Figura 25: Seleção de calos resultantes da transformação de cana-de-açúcar com a construção pANIC5B_CaneCPI-4 em meio com higromicina.....</p>	46
<p>Figura 26: Seleção de calos bombardeados com a construção pANIC5B_CaneCPI-4 em meio MS3K contendo higromicina em câmara escura</p>	47
<p>Figura 27: Regeneração das plantas a partir de calos bombardeados com a construção pANIC5B_CaneCPI-4.....</p>	47
<p>Figura 28: Etapas de seleção de calos transformados via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com a construção pANIC6BCaneCPI-4. A: calos embriogênicos de cana-de-açúcar antes da transformação. B: Calos transformados ao final de 15 dias de seleção. C: Calos transformados ao final de 30 dias de seleção. D: Calos transformados ao final de 60 dias de seleção. E: Calos transformados ao final de 75 dias de seleção. F: calos transformados ao final de 90 dias de seleção.</p>	49
<p>Figura 29: Etapas de regeneração das plantas transformada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com a construção pANIC6BCaneCPI-4. A: início da regeneração de plantas aos 60 dias em meio MRP; B: renegeração das plantas a 90 dias em meio MRP; C: regeneração de plantas aos 120 dias em meio MRP. D: atual fase de regeneração das plantas.....</p>	50
<p>Figura 30: Esquema do modelo de interação peptidase-substrato de Schechter e Berger, 1967. Modificado de (Turk, 2006).</p>	54

Figura 31: Estrutura tridimensional da papaína. Adaptado de (Fujishima <i>et al.</i> , 1997).	55
Figura 32: Modelo estrutural da orizacistatina. Adaptado de Benchabane <i>et al.</i> , 2010.	60
Figura 33: Peptídeos sinais identificados nas sequências das cistatinas <i>CsinCPI-1</i> , <i>CclemCPI-1</i> , <i>CclemCPI-2</i> e <i>CclemCPI-3</i> . Os gráficos gerados com o programa SignalP mostram a presença de sequências com características de peptídeos sinais. O provável sítio de clivagem do peptídeo sinal é mostrado no pico vermelho. A região do peptídeo sinal, altamente hidrofóbica é mostrada em verde no gráfico.....	71
Figura 34: Alinhamento das sequências de aminoácidos das cistatinas <i>CsinCPI-1</i> , <i>CsinCPI-2</i> , <i>CclemCPI-1</i> , <i>CclemCPI-2</i> e <i>CclemCPI_3</i> . As regiões destacadas pelas caixas pontilhadas e as setas indicam os domínios inibitórios G, W e QVVxG das cistatinas e também o domínio SNSL de inibição de legumaínas que algumas cistatinas com extensão da região C-terminal possuem. A região sublinhada indica o motivo característico de fitocistatinas [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N.....	72
Figura 35: Alinhamento da sequência de aminoácidos das cistatinas <i>CsinCPI-1</i> , <i>CsinCPI-2</i> , <i>CclemCPI-1</i> , <i>CclemCPI-2</i> e <i>CclemCPI_3</i> com sequências de aminoácidos de cistatinas de outras plantas. As regiões destacadas pelas caixas pontilhadas e as setas indicam o domínio inibitório G, W e QVVxG das cistatinas e também o domínio SNSL de inibição de legumaínas que algumas cistatinas com extensão da região C-terminal possuem. A região sublinhada indica o motivo característico de fitocistatinas [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]- [VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N.....	75
Figura 36: Análise de integridade do RNA total isolado de folhas de <i>Citrus clementina</i> por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.	76
Figura 37: Amplificação das ORFs das cistatinas de <i>Citrus</i> . M: marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen) 1: amplificação do fragmento de 324 pb correspondente a ORF <i>CclemCPI-1</i> , 2: Controle de amplificação negativo, 3: amplificação do fragmento de 294 pb correspondente a ORF <i>CclemCPI-2</i> , 4: Controle de amplificação negativo, 5: amplificação do fragmento de 624 pb correspondente a ORF <i>CclemCPI-3</i> , 6: Controle de amplificação negativo.	77
Figura 38: Análise da expressão recombinante das cistatinas de <i>Citrus</i> em células de <i>E.coli</i> e purificação. SDS-PAGE 15% das células de <i>E.coli</i> linhagem Rosetta (DE3) transformadas com as construções pET28a- <i>CsinCPI-1</i> (A), pET28a- <i>CsinCPI-2</i> (B), pET28a-	

CclemCPI-1(C) , *pET28a-CclemCPI-2(D)* e *pET28a-CclemCPI-3(E)*. A coluna (1) nas imagens (A, B, C, D e E) corresponde à cultura não induzida, sem a adição de IPTG, coluna (2) corresponde à cultura induzida, após a adição de IPTG, coluna (3) precipitado celular correspondente à fração solúvel e coluna (4) correspondente a fração insolúvel e coluna (5) frações purificadas M: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards – BioRad;78

Figura 39: Titulação das catepsinas B, K, L, S, papaína e *CaneLeg* utilizadas nos ensaios de inibição com cistatinas. A: Titulação do sítio ativo da catepsina B com E-64; B: Titulação do sítio ativo da catepsina L com E-64; C: Titulação do sítio ativo da catepsina K com E-64; D: Titulação do sítio ativo da catepsina S com E-64; E: Titulação do sítio ativo da papaína com E-64. F: Titulação do sítio ativo da legumaína com *CclemCPI-3*..... 101

Figura 40: Inibição da atividade da papaína pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da papaína por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da papaína por *CsinCPI-2*; inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-3*..... 102

Figura 41: Inibição da atividade da catepsina L humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina L por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina L por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-3*..... 103

Figura 42: Inibição da atividade da catepsina K humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina K por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina K por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-3*. 104

Figura 43: Inibição da atividade da catepsina S humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina S por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina S por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da

catepsina S por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina S por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina S por *CclemCPI-3*..... 105

Figura 44: Inibição da atividade da catepsina B humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. 106

Figura 45: Inibição da atividade da *CaneLeg* pela cistatina *CclemCPI-3*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para o isolamento da ORF correspondente à CaneCPI-4. O sítio de restrição para a enzima <i>Bam</i> HI está sublinhado.....	18
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para o isolamento da ORF correspondente à CaneCPI-4.....	20
Tabela 3: <i>Primers</i> para RT-qPCR.....	28
Tabela 4: Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar a região gênica das ORFs de CclemCPI-1, CclemCPI-2 e ClemCPI-3.	64
Tabela 5: Características das sequências de cistatinas de <i>Citrus</i>	70
Tabela 6: Análise de identidade entre as sequências de aminoácidos das cistatinas de <i>Citrus</i>	73
Tabela 7: Identidade entre a sequência de aminoácidos de <i>Csin</i> CPI-1 e cistatinas de outras plantas.....	73
Tabela 8: Identidade entre a sequência de aminoácidos de <i>Csin</i> CPI-2 e cistatinas de outras plantas.....	73
Tabela 9: Identidade entre a sequência de aminoácidos de <i>Cclem</i> CPI-1 e cistatinas de outras plantas.....	74
Tabela 10: Identidade entre a sequência de aminoácidos de <i>Cclem</i> CPI-2 e cistatinas de outras plantas.....	74
Tabela 11: Identidade entre a sequência de aminoácidos de <i>Cclem</i> CPI-3 e cistatinas de outras plantas.....	74
Tabela 12: Inibição da atividade enzimática da CaneLeg, catepsinas humanas B, K, L, S e papaína por cistatinas de <i>Citrus</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
CPI	<i>cysteine peptidase inhibitor</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	ditiotretitol
g	gramas
Gly (G)	glicina
h	hora
His (H)	histidina
kDa	quilodalton
$K_{i,app}$	constante de inibição aparente
K_i	constante de inibição
K_M	constante catalítica de Michaelis-Menten
L	litro
LB	Lysogeny Broth
M	molar
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitros
mM	milimolar
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
NaH_2PO_4	fosfato de sódio monobásico
ng	nanogramas
nm	nanômetros
ORF	fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)

pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
U	unidade enzimática
°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar

SUMÁRIO

I. JUSTIFICATIVA.....	7
CAPÍTULO 1	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. A cana-de-açúcar e o contexto produtivo	10
1.2. Inseto-praga: <i>Migdolus fryanus</i>	11
1.3. Controle de insetos por meio da inibição da atividade de peptidases digestivas.....	13
1.4. Cistatinas de cana-de-açúcar.....	15
1.5 Transformação genética de cana-de-açúcar.....	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Amplificação da ORF que codifica a cistatina (CaneCPI-4).....	18
3.2 - Construção do vetor de expressão pAHC17_CaneCPI-4.....	19
3.3 Construção dos vetores de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4	20
3.4. Construção dos plasmídeos de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4	20
3.5. Obtenção de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar	23
3.6. Transformação genética de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar via biolística	24
3.7- Regeneração das plantas de cana-de-açúcar transformadas	26
3.8. Análise de integração do fragmento que codifica a CaneCPI-4 ao genoma da planta. .	26
3.9. Análise de expressão gênica nas plantas transformadas: extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR	27
3.11. Transformação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> linhagem LBA4404 e EHA105 com a construção pANIC6BCaneCPI-4	29
3.12. Transformação genética de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Construção do vetor de expressão pAHC17CaneCPI-4	32
4.2. Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística com a construção pAHC17_CaneCPI-4 e regeneração	32
4.3. Análise de integração do vetor pAHC17_CaneCPI-4 ao genoma de cana-de-açúcar ...	38
4.4. Multiplicação <i>in vitro</i> da planta resultante do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4	39
4.5 Transferência das plantas transformadas com a construção pAHC17_CaneCPI-4 para vasos.....	40

4.6. Análise da expressão gênica e expressão proteica nas plantas transformadas por RT-qPCR.....	41
4.7. Construção dos vetores de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-444	
4.8. Transformação genética de cana-de-açúcar (variedade SP80-3280) via biolística com a construção pANIC5B_CaneCPI-4	46
4.9. Transformação genética de cana-de-açúcar via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com a construção pANIC6BCaneCPI-4 e regeneração	48
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
CAPÍTULO 2	52
1. INTRODUÇÃO	53
1.1. Peptidases.....	53
1.2. Cisteíno-peptidases	54
1.3. Catepsinas	56
1.3.1. Catepsina B humana	56
1.3.2. Catepsina K humana	57
1.3.3. Catepsina L humana.....	58
1.3.4. Catepsina S humana.....	58
1.4. Legumainas de plantas.....	59
1.5. Cistatinas.....	59
1.6. Fitocistatinas	60
1.6. <i>Citrus</i>	61
2. OBJETIVOS	62
3. MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1. Análises <i>in silico</i> das sequências das cistatinas de <i>Citrus</i>	63
3.2. Extração de RNA de folhas de <i>Citrus</i> e síntese de cDNA.....	63
3.3. Amplificação das ORFS que codificam cistatinas de <i>Citrus</i> e clonagem em vetor de propagação	64
3.3.1- Obtenção das ORFS das cistatinas de <i>Citrus sinensis</i> <i>CsinCPI-1</i> e <i>CsinCPI-2</i>	65
3.4. Construção do vetor de expressão	65
3.5. Expressão das cistatinas recombinantes em células de <i>E. coli</i>	66
3.6. Lise bacteriana e teste de solubilidade.....	67
3.7. Purificação das cistatinas recombinantes.....	67
3.8. Ensaio de inibição de atividade de cisteíno-peptidases utilizando as cistatinas de <i>Citrus</i>	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69

4.1. Análise <i>in silico</i> das sequências de cistatinas de <i>Citrus</i>	69
4.2. Análise de pureza e integridade do RNA extraído de folhas de <i>Citrus clementina</i>	76
4.3. Amplificação das ORFs que codificam as cistatinas de <i>Citrus clementina</i>	76
4.4. Ensaios de expressão heteróloga e purificação das cistatinas recombinantes	76
4.5. Titulação do sítio ativo das enzimas	78
4.6. Avaliação do potencial inibitório das cistatinas de <i>Citrus</i>	78
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
II. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
III. REFERÊNCIAS	86
IV. ANEXOS.....	101

I. JUSTIFICATIVA

As cistatinas são inibidores competitivos que regulam a atividade biológica de cisteíno-peptidases envolvidas em processos proteolíticos e essas estão presentes na maioria das diferentes formas de vida. As cistatinas possuem muitas propriedades benéficas tanto para as plantas quanto para humanos. As fitocistatinas compreendem uma família de inibidores de cisteíno-peptidases específicos de plantas. Tais inibidores estão envolvidos em processos regulatórios endógenos e exógenos de diversos organismos. As fitocistatinas atuam no sistema de defesa da planta nativa e geralmente são expressas em resposta a ferimentos ou ataque de pragas e patógenos. Nesse sentido, o potencial de cistatinas no controle de pragas tem sido intensamente explorado em plantas transgênicas e essa aplicação biotecnológica das fitocistatinas é estudada nesse trabalho, no capítulo 1: Transformação genética de cana-de-açúcar com uma cistatina visando resistência a insetos-praga.

Embora várias cistatinas de plantas já tenham sido caracterizadas, ainda existe pouca informação disponível sobre os possíveis papéis desses genes nas culturas frutíferas. As espécies de laranja doce (*Citrus sinensis* e *Citrus clementina*) são as frutíferas mais cultivadas e uma das mais importantes economicamente. No entanto, as informações sobre as espécies de *Citrus* são limitadas. A base de dados Phytozome (www.phytozome.net) atualmente contém em torno de 300 sequências que codificam cistatinas de plantas, incluindo as cistatinas de *Citrus*. Esta riqueza de dados não só permite a realização de estudos mais detalhados sobre a expressão e análise funcional de fitocistatinas, como também o estudo das suas interações com cisteíno-peptidases de diferentes organismos, desde insetos a humanos, permitindo a aplicação biotecnológica das fitocistatinas com especificidades contra as peptidases alvos de diferentes organismos. Em humanos a atividade inibitória das cistatinas endógenas é vital para a regulação de processos fisiológicos, que se tornam limitados pela atividade altamente destrutiva das suas proteases alvos, as catepsinas. A falta de regulação dos mecanismos biológicos que controlam a atividade das cisteíno-peptidases do tipo catepsinas resultam em muitas doenças tais como, osteoporose, artrite, câncer e doenças cardiovasculares. Dessa forma, esse trabalho tem como proposta no Capítulo 2: Caracterização de cistatinas de *Citrus* e estudos de inibição com diferentes cisteíno-peptidases, incluindo as catepsinas humanas.

Considerando a necessidade de mais estudos sobre o potencial e a especificidade das fitocistatinas e a inclusão realista dessas proteínas em diferentes aplicações biotecnológicas,

tomamos como objetivo geral desse trabalho o estudo das fitocistatinas para diferentes aplicações biotecnológicas, desde aplicações na agricultura, atuando no controle de pragas, já que essas podem interagir como as cisteíno-peptidases de insetos praga; quanto na área de saúde, atuando na inibição de atividade de cisteíno-peptidases envolvidas em diversas desordens patológicas em humanos.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento de linhagens de cana-de-açúcar transgênica superexpressando inibidores de peptidases visando resistência ao inseto *Migdolus fryanus*

1. INTRODUÇÃO

1.1. A cana-de-açúcar e o contexto produtivo

A cana-de-açúcar é uma planta perene e típica de climas tropicais e subtropicais, cuja origem mais provável é o sudeste asiático. Pertence à família Poaceae, gênero *Saccharum*, possui cerca de 10 espécies e os cultivares com interesse comercial são provenientes de programas de melhoramento genético como resultado de processos de hibridação principalmente entre as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum* e *S. robustum* (Dinardo-Miranda et al., 2008). O genoma da cana-de-açúcar é complexo, poliplóide e aneuplóide e número cromossômico variando entre 80 a 120 (D'Hont et al., 1998).

A cana-de-açúcar consiste na principal matéria-prima empregada na produção de etanol, açúcar, aguardente e melaço, podendo ser, inclusive, utilizada para alimentação animal e geração de energia elétrica, o que agrega grande valor econômico aos países onde é cultivada (Dinardo-Miranda et al., 2008). Além disso, a biomassa vegetal - bagaço e palha - possui potencial para a produção de etanol de segunda geração (Bizzo et al., 2014; Sun *et al.*, 2016).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil em 1532 e, atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de seus principais produtos, açúcar e etanol, de modo que a cultura representa uma das mais importantes atividades econômicas da agroindústria nacional. Para a safra 2017/18, a área de cultivo com destino à atividade sucroalcooleira está estimada em 8,4 milhões de hectares. A produção de cana-de-açúcar está estimada em 635,6 milhões de toneladas. (redução de 3,3% em relação à safra anterior). O estado de São Paulo é responsável por 54% da cana-de-açúcar processada. A produção de açúcar atual está estimada em 39,46 milhões de toneladas e de etanol em 27 bilhões de litros (Conab, 2017).

A despeito da liderança brasileira no setor sucroalcooleiro, há redução significativa de produtividade, devido às mais de 200 doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides, que contribuem para uma diminuição de produção mundialmente de cana-de-açúcar (Gonçalves et al., 2012). Além disso, de acordo com Oliveira et al., 2014, a produção de açúcar e álcool é afetada devido ao ataque de insetos aos canaviais, atingindo a ordem de 11,1 % da produção, o que representa uma perda de 2,5 bilhões de dólares. O ataque de larvas do inseto *Migdolus fryanus* tem causado elevadas perdas de produção, principalmente no estado de São Paulo. Além disso, ainda não é possível o cultivo deste inseto em laboratório, o que dificulta estudos direcionados ao controle desta praga, e o controle por inseticidas

químicos não é eficiente pois o inseto vive em grandes profundidades no solo. Diante desse contexto, o desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar pode se tornar uma alternativa eficiente para a tolerância ao ataque de patógenos e insetos.

1.2. Inseto-praga: *Migdolus fryanus*

Migdolus fryanus (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) é um besouro polífago, originário da região centro sul da América do Sul, onde já foi encontrado no Paraguai, na Argentina, na província de Corrientes, e no Brasil, é encontrado nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Rondônia (Nunes, 1996; Bento et al., 2006). O gênero *Migdolus* é composto por dez espécies, e todas são consideradas raras, com exceção de *M. fryanus* (Bento et al., 1995; Bento et al., 2006).

O inseto é holometábolo e passa por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. Possui ciclo biológico longo, de pelo menos 2 a 3 anos (Terán et al., 1983; Bento, 1995; Bento et al., 2006). Os ovos são brancos, de formato ovoide e medem de 6 a 7 mm (Terán et al., 1983; Bento, 1995). As larvas são ápodas (Bento, 1995), apresentam coloração branca leitosa e região anterior do corpo mais alargada em relação à posterior (Terán et al., 1983; Bento, 1995) (Figura 1).



Figura 1: Larva do inseto *Migdolus fryanus*. Foto tirada em 30/03/2014 por Vanessa K. Schneider.

Estudos indicam que a larva passa por sete ínstares larvais (Terán et al., 1984; Bento, 1995) e, quando completamente desenvolvidas, medem até 60 mm de comprimento (Terán et al., 1983; Bento, 1995; Bento et al., 2006). Ao eclodirem, alimentam-se de matéria orgânica, enquanto que nos ínstares mais avançados, nutrem-se dos rizomas de cana-de-açúcar ou das raízes de outros hospedeiros (Terán et al., 1983; Terán et al., 1984; Bento, 1995; Bento et al.,

2006). Podem aprofundar-se por até 3 a 4 metros abaixo do solo (Nunes, 1996), onde constroem a câmara pupal, que protege a pupa. A pupa é livre, branco amarelada (Bento, 1995). O desenvolvimento larval e pupal ocorre no interior do solo e somente os adultos saem para o exterior. Os adultos não se alimentam e vivem à custa da reserva energética (Bento, 1995; Bento et al., 2006). Apresentam acentuado dimorfismo sexual (Figura 2), o macho é escuro (negro), mede de 12 a 37 cm (Bento, 1995; Bento et al., 2006), possui asas funcionais bem desenvolvidas e antenas maiores, com 11 artículos (Bento, 1995), enquanto que a fêmea possui coloração castanho-avermelhada, mede entre 19 e 35 cm (Bento, 1995; Bento et al., 2006), possui asas atrofiadas e antenas menores, com 8 artículos (Bento, 1995). Machos e fêmeas sobem à superfície para o acasalamento, fenômeno conhecido por revoadas, que ocorrem em dias quentes e úmidos. Na região sudeste ocorre entre outubro e março, após o período das chuvas. O aparecimento dos machos é controlado pelas fêmeas, que liberam um feromônio sexual de atração (Terán et al., 1984; Bento, 1995; Bento et al., 2006), cujo principal componente químico é a amida N-(2'S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine (Leal et al., 1994). Após a cópula, as fêmeas retornam imediatamente para dentro do solo, onde realizam a postura dos ovos a diferentes profundidades (Terán et al., 1984; Bento, 1995), depositando de 14 a 45 ovos, e não retornam à superfície (Bento, 1995).



Figura 2: Dimorfismo sexual em insetos adultos de *Migdolus fryanus*. Fêmea à esquerda e macho à direita. Foto: Paulo Botelho – disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_132_272200817517.html.

O inseto é conhecido popularmente como besouro da cana-de-açúcar ou broca do rizoma e a fase larval deste inseto vem causando grandes prejuízos com a infestação de lavouras de cana-de-açúcar, principalmente no estado de São Paulo. Devido ao hábito alimentar, as larvas atacam o sistema radicular das plantas, podendo destruí-lo totalmente, o que gera redução de produtividade e morte das plantas. Os ataques geralmente estão restritos a

reboleiras localizadas, porém, podem estender-se por todo o canavial, quando causam perda total da lavoura (Terán et al., 1983; Terán et al., 1984; Bento, 1995). Em canaviais jovens, os sintomas apresentam-se como touceiras parcial ou totalmente secas e as falhas podem ser numerosas, enquanto que nos mais velhos, as touceiras mostram sintomas de seca ou fogo (Bento, 1995; Bento et al., 2006). Os efeitos são mais evidentes durante períodos mais frios e secos (Bento et al., 2006) e não há relação entre o tipo de solo e a presença e ataque do inseto (Bento, 1995; Nunes, 1996). O que acontece é que solos arenosos retém menor quantidade de água e por isso, os sintomas tornam-se rapidamente evidentes, ao contrário do que ocorre em solos argilosos, onde os sintomas demoram mais a aparecer (Bento, 1995).

Além da cana-de-açúcar, o inseto ataca outras culturas de valor econômico como café, eucalipto, feijão, mandioca, uva, amora e pastagens (Nunes, 1996; Bento, 1995; Bento et al., 2006). *M. fryanus* é um inseto de difícil controle, principalmente por apresentar ciclo de vida longo e pelo fato das larvas se aprofundam muito no solo (Arrigoni, 1986), além de ser praticamente impossível prever exatamente em quais talhões o inseto irá aparecer em cada ano. Dessa forma, faz-se necessário o emprego de medidas de controle basicamente por toda área de plantio, o que eleva o custo de produção. Além disso, os inseticidas químicos recomendados para o controle da praga podem contaminar mananciais aquáticos, por serem facilmente carregados pelas chuvas e podem prejudicar organismos benéficos, por apresentarem persistência indeterminada no solo (Machado et al., 2003).

Diante desse contexto, o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque dessa praga pode se tornar uma alternativa eficiente para o controle deste inseto. Uma estratégia que tem sido amplamente utilizada em estudos para o controle de pragas é o desenvolvimento de plantas transgênicas superexpressando inibidores de peptidases. Dessa forma, essas proteínas podem inibir a atividade de peptidases digestivas do inseto e comprometer seu desenvolvimento.

1.3. Controle de insetos por meio da inibição da atividade de peptidases digestivas

Insetos herbívoros obtêm nutrientes essenciais a partir da proteólise de proteínas vegetais. Genes que codificam peptidases são superexpressos em tecidos do intestino de insetos (Fonseca *et al.*, 2012; Ferrara *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2016) e diferentes insetos utilizam diferentes peptidases para a digestão. As enzimas do tipo cisteíno-peptidases desempenham papel na função digestiva de muitos insetos (Terra e Ferreira, 1994). As

cisteíno-peptidases foram identificadas inicialmente no intestino de coleópteros, tais como *Callosobruchus maculatus*, *Chrisomela tremulae*, *Sphenophorus levis*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Migdolus fryanus* (Gatehouse *et al.*, 1985, Murdock *et al.*, 1987; Wolfson e Murdock, 1987; Terra e Cristofolletti, 1996; Cristofolletti *et al.*, 2005; *Tribolium Genome Sequencing Consortium*, 2008; Soares-Costa *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2012; Vorster *et al.*, 2015; Nakayama *et al.*, 2017). Insetos das ordens Hemiptera, Homóptera, Díptera e Lepidoptera também tiveram cisteíno-peptidases identificadas a partir do trato digestivo (Martinez *et al.*, 2016).

Ensaio *in vitro* de inibição da atividade enzimática de cisteíno-peptidases de intestinos de insetos têm sido realizados para selecionar inibidores de cisteíno-peptidases com alta afinidade (Ribeiro *et al.*, 2008; Carrillo *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2012; Ferrara *et al.*, 2015; Valdés-Rodríguez *et al.*, 2015; Rasoolizadeh *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2016) para a posterior aplicação no controle de pragas.

Os recentes avanços na área de cultura de tecidos e biologia molecular tornaram possível a introdução, nas plantas cultivadas, de genes provenientes de diferentes organismos. A transformação de plantas visando o aumento da resistência a insetos tem sido uma das abordagens de aplicações bem-sucedidas dos transgênicos. Durante 20 anos (1996-2016) a tolerância a herbicidas têm sido a característica predominante das cultivares transgênicas, ocupando 86,6 milhões de hectares. Entretanto, nos últimos anos, houve um crescimento exponencial na área ocupada por cultivares que apresentam tolerância a herbicidas e ao mesmo tempo resistência a insetos. No ano de 2015, a área ocupada era de 58,5 milhões de hectares e no ano de 2016, 75,4 milhões de hectares foram cultivados com variedades tolerantes a herbicidas e resistentes a insetos (ISAAA, 2016).

Plantas transgênicas superexpressando inibidores de peptidases surgiram como alternativa para o controle de insetos que são insensíveis às toxinas de *Bacillus thuringiensis* (proteínas Bt) (Lawo *et al.*, 2009; Li e Romeis, 2010). Plantas transgênicas superexpressando cistatinas visando o controle de insetos têm sido reportadas em muitos estudos (Martinez *et al.*, 2016). Ensaio biológico em que insetos se alimentam de plantas transgênicas superexpressando cistatinas mostram que há interferência na fecundidade, peso e desenvolvimento de espécies como *Podisus maculiventris* (Hemiptera) (Álvarez-Alfageme *et al.*, 2007), *Myzus persicae* (Hemiptera) e *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera) (Carrillo *et al.*, 2011), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera) (Cingel *et al.*, 2015; Cingel *et al.*, 2017), *Sphenophorus levis* (Coleoptera) (Schneider *et al.*, 2017).

1.4. Cistatinas de cana-de-açúcar

As primeiras cistatinas de cana-de-açúcar, denominadas de canacistatinas, foram descritas por Reis e Margis (2001). Ao total, foram identificadas 25 diferentes cistatinas, a partir do banco de dados do SUCEST (programa para caracterizar ETSs de cana-de-açúcar). Seis cistatinas de cana-de-açúcar foram caracterizadas até o momento, denominadas CaneCPI-1, CaneCPI-2, CaneCPI-3, CaneCPI-4, CaneCPI-5 e CaneCPI-6. A CaneCPI-1 possui 13 kDa e apresenta atividade antifúngica sobre o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (Soares-Costa *et al.*, 2002). As cistatinas CaneCPI-2 (12,2 kDa) e CaneCPI-3 (24,5 kDa) inibem a atividade da cisteíno-peptidase modelo papaína (Gianotti *et al.*, 2006). A CaneCPI-4 (12,8 kDa) apresenta expressiva atividade inibitória contra catepsinas B e L humanas (Gianotti *et al.*, 2008). A proteína CaneCPI-5 (14,5 kDa) apresentou expressiva atividade inibitória contra catepsinas humanas B, K e L ($K_i = 6,87 \text{ nM}$, $0,49 \text{ nM}$ e $0,34 \text{ nM}$, respectivamente) (Santiago *et al.*, 2017). A proteína CaneCPI-6 apresentou K_i de $1,83 \mu\text{M}$ contra a catepsina B humana (Miguel, 2014).

Fonseca e colaboradores (2011), relataram a inibição da atividade da cisteíno-peptidase denominada rSI-CathL (catepsina L recombinante de *Sphenophorus levis*) pela cistatina CaneCPI-4 ($K_i = 0,196 \text{ nM}$). Ribeiro e colaboradores (2008), realizaram ensaios de atividade inibitória utilizando a CaneCPI-1, contra cisteíno-peptidases digestivas do intestino médio de larvas do *S. levis* e demonstraram que esse inibidor foi capaz de reduzir 85% da atividade de cisteíno-peptidases intestinais deste inseto. Além disso, larvas do inseto *Sphenophorus levis* alimentadas com cana-de-açúcar transgênica superexpressando a cistatina CaneCPI-1 apresentaram redução de peso e as plantas transgênicas apresentaram menor dano ao ataque das larvas do que plantas selvagens de cana-de-açúcar (Schneider *et al.*, 2017). Com base nesses resultados, observa-se que essas cistatinas podem ter ação inibitória contra enzimas digestivas de *Migdolus fryanus* e contribuir para o controle do dessa praga por meio de experimentos de transformação genética de plantas de cana-de-açúcar visando a resistência ao inseto *Migdolus fryanus*.

1.5 Transformação genética de cana-de-açúcar

A primeira cana-de-açúcar transgênica foi desenvolvida por Bower e Birch (1992), utilizando a técnica de biolística. Desde então, plantas transgênicas de cana-de-açúcar com a incorporação de diversas características de interesse agrônomo e comercial têm sido reportadas: resistência a insetos (Arencibia et al., 1997,1999; Falco e Silva-Filho, 2003; Weng *et al.*, 2011; Gao et al., 2016 Schneider *et al.*, 2017), resistência a herbicidas (Gallo-Meagher e Irvine, 1995; Enriquez-Obregon et al., 1998; Snyman *et al.*, 2006; Manickavasagam *et al.*, 2004; Wang et al., 2017), resistência a fungos e vírus (McQualter et al., 2004; Nayyar *et al.*, 2017), tolerância a estresse abiótico (Belintani et al., 2012; Guerzoni et al., 2014; Ramiro *et al.*, 2016), produção de proteínas farmacêuticas (Wang *et al.*, 2005), produção de polihidroxibutirato (Petrasovits *et al.*, 2012), aumento do teor de sacarose (Wu e Birch, 2007; Groenewald e Botha, 2008).

Diversos protocolos de transformação genética de cana-de-açúcar via eletroporação, biolística e *Agrobacterium tumefaciens* têm sido publicados (Bower et al., 1996; Arcencibia et al., 1998; Arcencibia et al., 1995; Snyman et al., 2001; Manickavasagam *et al.*, 2004; Snyman *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2007; Joyce *et al.*, 2010; Basnayake et al., 2011; Taparia et al., 2012; Fouad *et al.*, 2015). Os métodos mais utilizados para a transformação de cana-de-açúcar são biolística e transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

O bombardeamento de partículas ou biolística foi descrito pela primeira vez por Sanford, 1988. Consiste na utilização de micropartículas, de ouro ou tungstênio, que são aceleradas a uma alta velocidade para penetrar, de forma não letal, a parede celular e membrana plasmática, carreando moléculas de DNA, RNA ou proteínas para o interior da célula (Lacorte, 1998, Krishnan e Mohan, 2017). O equipamento que tem sido mais utilizado é PDS-1000/He, onde o gás hélio impulsiona as partículas. Esse método é versátil, podendo ser utilizado para transformação de diferentes tipos de tecidos de cana-de-açúcar e é o método de transformação mais utilizado para cana-de-açúcar (Krishnan e Mohan, 2017).

O método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* possui vantagens em relação à biolística, por apresentar menor custo, pela inserção de baixo número de cópias, e fácil manipulação (Krishnan e Mohan, 2017). Esta bactéria fitopatogênica gram-negativa é responsável pela doença conhecida como “galha da coroa”, em que ocorre a formação de um tumor no tecido vegetal infectado. A doença é resultado de um processo natural de transferência de uma região de DNA (T-DNA do inglês “*Transferred DNA*”) contido no plasmídeo bacteriano *Ti* (*Tumor inducing*) da bactéria para a célula vegetal. A região *vir* do plasmídeo *Ti* é responsável pelos processos de excisão, transporte, proteção e integração do T-

DNA ao genoma da célula. Na célula, o T-DNA se integra ao genoma e passa a expressar genes envolvidos na biossíntese de auxinas, citocinas e também oncogenes, resultando na multiplicação descontrolada de células. As linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas como vetores de transformação são “desarmadas”, isso é, com a deleção da região que codifica oncogenes do plasmídeo *Ti* (Van Sluys, 1998; Soares-Costa et al., 2017).

Esse método de transformação tem sido o mais utilizado para a obtenção de plantas transgênicas, principalmente dicotiledôneas. (Van Sluys, 1998; Soares-Costa et al., 2017). Em monocotiledôneas, o número de trabalhos relatando plantas transformadas via *Agrobacterium* é reduzido, tendo como exemplos arroz (Chakraborty et al., 2016; Reddy et al., 2016), cevada (Tingay et al., 1997; Harwood et al., 2014), trigo (Ishida et al., 2015; Aadel et al., 2017), milho (Cao et al., 2014), sorgo (Che et al., 2018). Arencibia et al., 1998 produziu a primeira cana-de-açúcar transformada via *Agrobacterium tumefaciens*. Em cana-de-açúcar, os protocolos devem ser adaptados, pois fatores críticos influenciam a eficiência de transformação como genótipo, método de cocultivo, vetor de expressão, marcador de seleção, eficiência de regeneração, promotores (Krishnan e Mohan, 2017).

Nesse capítulo serão abordados experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar com a citatina CaneCPI-4 utilizando os métodos de biolística e *Agrobacterium tumefaciens*.

2. OBJETIVOS

Desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar transgênia superexpressando uma cistatina (*CaneCPI-4*) visando resistência ao inseto *Migdolus fryanus*, com os seguintes objetivos específicos:

- Amplificação da ORF codante da cistatina;
- Clonagem da ORF que codifica a *CaneCPI-4* nos vetores de expressão pAHC17, pANIC5B e pANIC6B;
- Cultura de tecidos de cana-de-açúcar utilizando discos de folhas imaturas para a indução de calos embriogênicos;
- Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística e *Agrobacterium tumefaciens*;
- Regeneração e enraizamento de plantas após a transformação genética;

- Multiplicação dos eventos de transformação com integração do transgene ao genoma;
- Avaliação da expressão gênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amplificação da ORF que codifica a cistatina (CaneCPI-4)

O inibidor de cisteíno-peptidase selecionado para a realização da transformação genética de cana-de-açúcar foi a proteína CaneCPI-4 (Gianotti *et al.*, 2008). A CaneCPI-4 é uma cistatina de cana-de-açúcar que apresenta eficiente atividade inibitória contra enzimas do tipo cisteíno-peptidases, inibindo catepsinas humanas B, L e catepsina L de *Sphenophorus levis* com uma constante de inibição na ordem de nanomolar (Gianotti *et al.*, 2008, Fonseca *et al.*, 2012).

A fase aberta de leitura que codifica a CaneCPI-4 foi isolada a partir do cDNA contido no clone SCMCRT2087B02 (genbank accession number CA142099). Este clone é proveniente do banco de dados de ESTs (Expressed Sequence Tags), que foi gerado no projeto genoma da cana-de-açúcar – SUCEST.

A amplificação da região codante foi realizada por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos, na orientação *forward* pAHC_CaneCPI4_Pdel_F e *reverse* pAHC_CaneCPI4_R (Tabela 1) que foram desenhados de modo a amplificar a cistatina sem a região do peptídeo sinal. Para uma reação de volume final de 20 uL, foram utilizados 10 ng do DNA molde, 200 µM de dNTP (Invitrogen™), tampão 1x da *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol de cada *primer* e 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific). A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler® Gradient Thermal Cyler (Eppendorf), com a seguinte ciclagem: [1x] 94°C por 3 [35x] 94°C por 45 segundos, 51°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e [1x] 72°C por 10 minutos. O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1% e purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega).

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para o isolamento da ORF correspondente à CaneCPI-4. O sítio de restrição para a enzima *Bam* HI está sublinhado

pAHC_CaneCPI4_Pdel_F	5' AAAGGATCCGCGCGTGCAGGGGC 3'
pAHC_CaneCPI4_R	5' AAAGGATCCTCAGTCGGCCGACGCGAAG 3'

3.2 - Construção do vetor de expressão pAHC17_CaneCPI-4

O plasmídeo de expressão utilizado foi o pAHC17, cedido gentilmente pelo Dr. Eugênio Cesar Ulian. O plasmídeo tem como características a presença do promotor da ubiquitina do milho (*ubi-1*) para taxas elevadas de expressão em monocotiledôneas, marcador de seleção que confere resistência à ampicilina e um único sítio de restrição para a enzima *Bam* HI (Christensen e Quail, 1996).

Foi realizada uma construção utilizando o plasmídeo pAHC17 e o fragmento correspondente à CaneCPI-4 com exclusão da região codante do peptídeo sinal. O plasmídeo pAHC17 foi clivado com a enzima *Bam* HI. A reação contou com 5 µg do plasmídeo, 10 U da enzima *Bam* HI, tampão 1x da enzima [10 mM Tris-HCl (pH 8.0 a 37°C); 100 mM KCl; 0.02% Triton X-100; 0.1 mg.mL⁻¹ BSA] (Thermo Scientific) e água, com incubação a 37 °C por 4 horas. O plasmídeo clivado foi recuperado do gel de agarose 1% e defosforilado com a enzima SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase* (GE Healthcare) para evitar a recircularização. Na reação de defosforilação, utilizou-se 2,6 µg do plasmídeo, 1U da enzima SAP, tampão da enzima 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgCl₂] (GE Healthcare) e água, com incubação a 37°C durante 1 hora e inativação a 70°C por 20 minutos. Posteriormente, o DNA foi precipitado com 0,1 v/v de acetato de sódio 3M pH 5,2; 2,5 v/v de etanol 95%.

A reação de ligação entre o fragmento correspondente à CaneCPI-4 e o vetor pAHC17 contou com 40 ng de vetor pAHC17, 150 ng de inserto, 1 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™), tampão da enzima 5X [250 mM Tris-HCl pH 7.6; 50 mM MgCl₂; 5 mM ATP; 5 mM DTT; 25% (w/v) polyethylene glycol-8000] (Invitrogen™) e água em volume final de 10 µL, com incubação a 4°C, *overnight*. O volume da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, células quimiocompetentes da cepa de propagação DH5- α de *Escherichia coli* de acordo com Sambrook e Russel, 2001. Os clones foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB Ágar e 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

Aleatoriamente, foram escolhidas colônias bacterianas resistentes a ampicilina para a realização de uma PCR de colônia. A PCR foi realizada nas mesmas condições da reação de isolamento da ORF da CaneCPI-4, como mencionado anteriormente. Um clone bacteriano que apresentou amplificação positiva foi cultivado em meio LB Broth adicionando-se 100

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado pelo método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001). O plasmídeo pAHC17_CaneCPI-4 foi sequenciado no MegaBACE 1000 *Flexyble* (GE Healthcare UK), utilizando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare). O primer utilizado no sequenciamento foi o *M13 reverse* 5' cag gaa aca get atg ac 3'.

3.3 Construção dos vetores de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4

A amplificação da região codante da CaneCPI-4 foi realizada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, Gateway_CaneCPI-4pdel_F e Gateway_CaneCPI-4_R (Tabela 2). Para uma reação de volume final de 50 μL , foram utilizados 10 ng do DNA molde, 200 μM de dNTP (Invitrogen™), tampão 1x da *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1,5 mM de MgCl_2 (Thermo Scientific), 5 pmol de cada oligonucleotídeo e 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific). A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf), com a ciclagem: [1x] 94 °C por 3 min, [35x]: 94 °C por 45 s, 50 °C por 90 s e 72°C por 90 s e [1x] 72°C por 10 min.

A verificação do resultado da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento foi purificado com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega).

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados para o isolamento da ORF correspondente à CaneCPI-4.

Gateway_CaneCPI-4p+_R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCTCAGTCGGCCGACGCGAA 3'
Gateway_CaneCPI-4_F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TGGACCGCGCGTGCGGGGGC 3'

Negrito: adaptadores *attB1* (primer forward) e *attB2* (primer reverse).

3.4. Construção dos plasmídeos de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4

Os vetores de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4 foram posteriormente utilizados para a transformação genética de cana-de-acúcar. Ambos os vetores foram projetados para um alto nível de expressão constitutiva (promotor *ZmUbi1*) de genes

heterólogos em monocotiledôneas. O vetor pANIC5B é específico para transformação mediada por biolística e pANIC6B para transformação mediada por *A. tumefaciens* (Mann *et al.*, 2012). Os vetores possuem o gene reporter GUSPlus, regulado pelo promotor *PvUbi 1* e o marcador de seleção para plantas (*hph*), regulado pelo promotor *OsAct1*, que confere resistência ao antibiótico higromicina.

O sistema de clonagem destes vetores é *gateway*®. Este sistema baseia-se na rápida e eficiente troca de fragmentos de DNA entre um vetor de entrada contendo o gene de interesse e o vetor de expressão, por meio de uma reação de recombinação sítio específica do bacteriófago lambda (Hartley *et al.*, 2000).

Após a amplificação da CaneCPI-4 utilizando os *primers* específicos contendo os adaptadores *attB1* e *attB2*, seguiu-se com a reação de recombinação entre os sítios *attB1* e *attB2* do produto de PCR e os sítios *attP1* e *attP2* do vetor pDONR/Zeo (vetor de entrada) (Figura 3). O vetor pDONR/Zeo possui marcador de seleção positiva que confere resistência ao antibiótico zeocina. Além disso, possui o marcador de seleção negativa *ccdB* que é letal para as linhagens sensíveis, pois interfere no completo girase-DNA, impedindo a passagem da polimerase, induzindo a quebra de duplas fitas de DNA. Além disso, a subunidade A da DNA girase foi encontrada inativada como um complexo com a proteína *ccdB*. O gene *ccdB* é flanqueado pelos sítios de recombinação *attP1* e *attP2*.

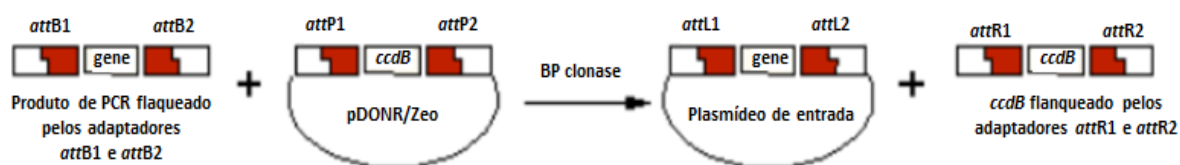


Figura 3: Esquema representativo da reação de recombinação entre os produtos de amplificação do fragmento de interesse (CaneCPI-4) e o vetor pDONR/Zeo. Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen.

Para a reação BP foram utilizados 150 ng do plasmídeo de entrada pDONR/Zeo (Invitrogen), 120 ng do produto de PCR, 2 µL da BP Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen) e q.s.p. 10 uL de tampão TE pH 8.0. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 8 horas. Após, foi adicionado 1 uL de proteinase K para interromper a reação. 5 uL da reação foram utilizados para transformar, por choque térmico, células quimiocompetentes da linhagem DH5- α de *Escherichia coli* (sensível ao gene *ccdB*) de acordo com Sambrook e Russel, 2001. Os clones bacterianos foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB Ágar e 25

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ de antibiótico zeocina. A presença do marcador de seleção negativa *ccdB* é letal para as células bacterianas e a presença do marcador de seleção com o antibiótico zeocina, somente as bactérias que receberam o plasmídeo pDONR Zeo contendo o gene CaneCPI-4 (reação de recombinação eficiente) crescem no meio de cultura.

Aleatoriamente, foram escolhidas colônias bacterianas para a realização de uma PCR de colônia. A reação de PCR seguiu-se com 10 ng do DNA molde, 200 μM de dNTP (Invitrogen™), tampão 1x da *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1,5 mM de MgCl_2 (Thermo Scientific), 5 pmol dos *primers* universais M13 *forward* e M13 *reverse* e 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific), em volume fial de 20 μL . A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf), com a ciclagem: [1x] 94 °C por 3 min, [35x]: 94 °C por 45 s, 50 °C por 90 s e 72°C por 90 s e [1x] 72°C por 10 min. Um clone bacteriano que apresentou amplificação positiva foi cultivado em meio LB Broth com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado pelo método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001) e submetido à análise de restrição utilizando a enzima BsrGI. O plasmídeo pDONR Zeo possui três sítios de clivagem para esta enzima, localizados em ambas as regiões de recombinação (sítios *attP1* e *attP2*) e também no interior do gene *ccdB*. Dessa forma, a restrição do plasmídeo vazio resulta em três bandas de aproximadamente 790, 1458 e 2043 pb. Entretanto, se a reação de recombinação acontecer de maneira eficiente, o plasmídeo pDONR Zeo, ao sofrer recombinação, perde uma região de aproximadamente 2248 pb que inclui o gene *ccdB*. Dessa forma, uma reação de restrição com a enzima *Bsp1407I* (*BsrGI*) gera duas bandas, uma correspondente ao plasmídeo (2054 pb) e também outra correspondente, ao gene de interesse, de 342 pb.

A reação de restrição foi realizada utilizando 600 ng de DNA plasmidial, 10 U da enzima *Bsp1407I* (*BsrGI*) (Thermo Scientific), 1x Thermo Scientific Tango Buffer (Thermo Scientific) e água em volume final de 20 μL , com incubação a 37 °C por 4 horas. Tendo a confirmação da presença do inserto de tamanho esperado na análise de restrição, o plasmídeo pDONR/Zeo_CaneCPI-4 foi submetido à sequenciamento.

Após confirmação da integridade entre vetor e inserto, o plasmídeo pDONR/Zeo_CaneCPI-4 foi utilizado para a reação LR de recombinação entre os sítios *attL1* e *attL2* da construção pDONR/Zeo-CaneCPI-4 e os sítios *attR1* e *attR2* do vetor pANIC5B e pANIC6B (Figura 4).

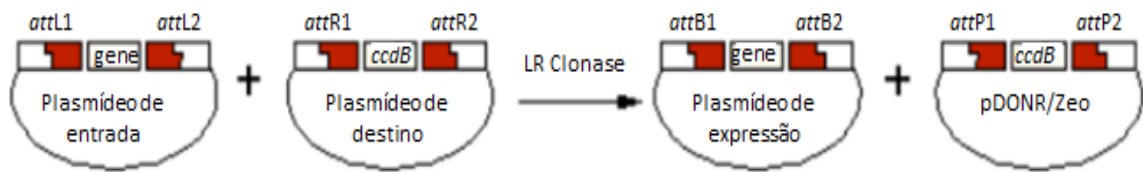


Figura 4: Esquema representativo da reação de recombinação entre o plasmídeo de entrada (pDONR/Zeo_CaneCPI-4) e o vetor de expressão (pANIC). Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen.

Para a reação LR de recombinação foram utilizados 150 ng do plasmídeo pDONR/Zeo_CaneCPI-4, 150 ng do plasmídeo de expressão, 2 µL da LR Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen) e q.s.p. 10 uL de tampão TE pH 8.0. As reações foram incubadas a temperatura de 25 °C por 8 horas. Após, foi adicionado 1 uL de proteinase K para interromper a reação. 5 uL da reação foram utilizados para transformar, por choque térmico, células quimiocompetentes da linhagem DH5-α de *Escherichia coli* (sensível ao gene *ccdB*) de acordo com Sambrook e Russel, 2001. Os clones bacterianos foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB Ágar e 100 µg.mL⁻¹ de kanamicina. A presença do marcador de seleção negativa *ccdB* é letal para as células bacterianas e a presença do marcador de seleção para kanamicina, somente as bactérias que receberam o plasmídeo de expressão contendo o gene da CaneCPI-4 (reação de recombinação eficiente) crescem no meio de cultura.

3.5. Obtenção de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar

Todos os procedimentos relativos à obtenção de discos e calos, transformação genética via biolística e regeneração das plantas transformadas foram realizados no laboratório da professora Dra. Helaine Carrer da Esalq – USP (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). A variedade de cana-de-açúcar utilizada para a transformação genética foi a SP80-3280. Esta variedade foi escolhida por ser bem adaptada à cultura de tecidos.

Os discos de folhas imaturas foram obtidos a partir da excisão da porção apical de plantas de cana-de-açúcar com máximo de 6 a 7 meses após o plantio entre o quarto e quinto nó. O processo de obtenção de calos embriogênicos é representado na figura 5. Em bancada previamente esterilizada, foram retiradas as folhas externas. Seguiu-se com a excisão de um segmento de aproximadamente 15 cm que contém o meristema apical envolto por lâminas foliares imaturas sobrepostas, que chamamos de palmito. A esterilização do material foi realizada com duas lavagens com etanol 70% e uma terceira lavagem em água destilada

estéril. Em seguida, o material foi transferido para uma câmara de fluxo laminar onde foram retiradas mais uma ou duas folhas até aparecer a cicatriz da bainha do último nó. O nó foi retirado e, a partir dele, foram cortados discos transversalmente de aproximadamente 2 mm de espessura. Para evitar a oxidação, os discos foram mergulhados em solução de ácido cítrico (150 mg.L⁻¹) e colocados sobre papel filtro estéril para retirar o excesso. Por fim, foram colocados em placa de Petri contendo meio MS3K pH 5,8 (sais e vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 3 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 50 mL.L⁻¹ de água de coco, solidificado com 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®) de forma que a face contrária ao sentido de crescimento ficasse para cima, a fim de aumentar a eficiência de geração de calos.

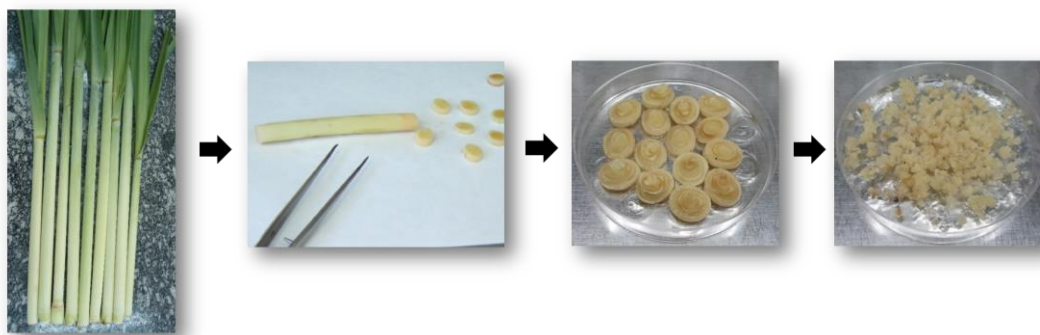


Figura 5: Processo de obtenção de calos embriogênicos de cana-de-açúcar. Da esquerda para a direita, extremidade apical de cana-de-açúcar, palmito, discos de folhas jovens e calos embriogênicos de cana-de-açúcar
Foto: Vanessa K. Schneider

Os discos de folhas imaturas permaneceram por trinta dias em câmara escura à temperatura de 25°C até serem bombardeados. Como o objetivo do experimento foi realizar o bombardeamento tanto de discos quanto de calos embriogênicos, os calos formados a partir dos discos foliares foram removidos no decorrer do seu desenvolvimento e cultivados também em meio MS3K até no máximo a quarta geração, ou seja, quatro repicagens.

Quando os discos de folhas jovens apresentaram calos friáveis (embriogênicos), o que depende da qualidade do material, época do ano e variedade, o bombardeamento pôde ser realizado.

3.6. Transformação genética de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar via biolística

A figura 6 mostra a representação das etapas gerais da transformação genética de cana-de-açúcar via biolística.

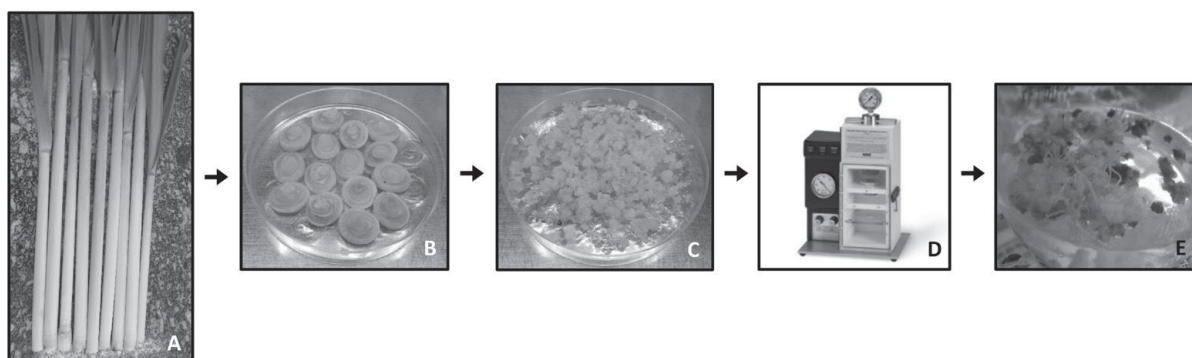


Figura 6: Etapas de transformação de cana-de-açúcar via biolística. (A) Extremidades de plantas de cana-de-açúcar que darão origem aos explantes. (B) Discos de folhas jovens de cana-de-açúcar. (C) Calos embriogênicos de cana-de-açúcar produzidos por meio de sub-cultivos dos discos foliares em meio contendo reguladores de crescimento. (D) Bombardamento de partículas contendo DNA adsorvido utilizando o equipamento – Biolistic® PDS-100/He Bio Rad. (E) Regeneração de calos embriogênicos transformados. Reproduzido de Soares-Costa *et al.*, 2017.

Para o bombardeamento, foram utilizadas partículas de ouro de 1 μm (Bio-Rad) que foram lavadas e misturadas ao DNA plasmidial. O processo de preparo das partículas com o DNA para bombardeamento consistiu basicamente em lavagens sucessivas das partículas e mistura das mesmas ao DNA plasmidial. Para tanto, foram utilizados 2 mg de partículas de ouro para cada preparo e 100 μL de etanol absoluto gelado. Esta quantidade de partículas é suficiente para a realização de 10 tiros de bombardeamento. A suspensão foi misturada vigorosamente durante 1 minuto e então centrifugada a 5500 rpm, 4°C por 1 s. O sobrenadante foi completamente removido e as partículas ressuspensas em 1 mL de água MILLI-Q autoclavada gelada. Centrifugou-se a 6500 rpm, 4°C por 1 s e o sobrenadante foi descartado. As partículas foram ressuspensas em 250 μL de água MILLI-Q autoclavada gelada e foram feitas alíquotas de 245 μL referentes ao número de amostras. A cada alíquota foi adicionado 25 μg de DNA plasmidial, 250 μL de CaCl_2 2,5 M e 50 μL de espermidina 0,1 M e a mistura foi agitada vigorosamente após a adição de cada um dos componentes. A suspensão foi, então, incubada em gelo por 10 minutos, agitada vigorosamente durante poucos segundos em intervalos de 1 minuto. Seguiu-se com centrifugação a 5500 rpm, 4°C 1 segundo e remoção do sobrenadante. As partículas foram ressuspensas em 600 μL de etanol absoluto gelado e centrifugadas a 5500 rpm, 4°C por 1 segundo e este processo repetido. Por fim, as partículas foram ressuspensas em 35 μL de etanol absoluto gelado e utilizou-se 6 μL para cada tiro, colocando este volume diretamente

sobre o disco carreador. Além do preparo das partículas, os discos e calos de cana-de-açúcar foram colocados no centro da placa de Petri para maximizar a quantidade de material para cada tiro.

Como controle da eficiência do bombardeamento, os primeiros tiros foram realizados em folhas de tabaco. As folhas foram dispostas no centro de placa de Petri, de forma que a face abaxial ficasse voltada para cima. O plasmídeo utilizado para esta transformação controle foi o pFF19G que possui o gene uid-A (GUS). Este gene codifica a enzima β -glucuronidase que cliva o substrato X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico), gerando um precipitado de coloração azul, que pode ser observado a partir da realização de um teste histoquímico segundo Jefferson e colaboradores em 1987, que consiste em incubar as folhas bombardeadas em solução de 1mM de X-Gluc em 50 mM de NaH₂PO₄, pH 7, por 20 horas a 37°C e, posteriormente, realizar uma lavagem com etanol 70%.

O bombardeador utilizado foi o PDS-1000/He™ da Bio Rad. A pressão de disparo foi de 1100 PSI e os discos de ruptura foram escolhidos de acordo com esta pressão. As placas contendo os calos a região central foram alocadas a 9 cm do aparato de disparo.

3.7- Regeneração das plantas de cana-de-açúcar transformadas

Após o bombardeamento, as placas contendo o tecido de cana-de-açúcar bombardeado foram incubadas por três dias em câmara escura a 27°C. Posteriormente, o material foi transferido para frascos contendo meio de regeneração MRP (meio MS (Murashine e Skoog, 1962) + 0,5 mg.L⁻¹ BAP + 3,5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®) pH 5,8) com adição 30 mg.L⁻¹ de geneticina e acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, com temperatura em torno de 27°C. O material foi repicado a cada 15 dias, totalizando 6 etapas de regeneração. Após, os calos foram transferidos para frascos com meio MS pH 5,8 (Murashigne e Skoog, 1962) suplementado com de 30 g.L⁻¹ de sacarose + 30 mg.L⁻¹ de geneticina + 2,3 g.L⁻¹ de Phytigel® (Sigma-Aldrich®) com agente de seleção e acondicionado em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, em torno de 27°C. As plântulas foram mantidas nestas condições até a regeneração completa das mesmas.

3.8. Análise de integração do fragmento que codifica a CaneCPI-4 ao genoma da planta.

A extração de DNA de folhas da planta de cana-de-açúcar resultante do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 foi realizada com 100 mg de folhas e utilizando o reagente Plant DNAzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para a PCR, foram utilizados aproximadamente 25 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP (Invitrogen™), tampão 1x da *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific), 1,5 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific), 5 pmol dos *primers* CaneCPI-4_R (Tabela 5) e Ubi_F (5' CCTGCCTTCATACGCTATTTATTTGCTTG 3'), 2,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific), em volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler® Gradient Thermal Cycler* (Eppendorf), coma ciclagem: [1x] 94 °C por 3 min, [35x]: 94 °C por 45 s, 48 °C por 90 s e 72°C por 90 s e [1x] 72°C por 10 min.

3.9. Análise de expressão gênica nas plantas transformadas: extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR

Os primers utilizados para a análise de expressão gênica da CaneCPI-4 nas plantas transgênicas e para a análise da expressão gênica do gene de referência Poliubiquitina (ISKANDAR et al., 2004) estão listados na tabela 3.

O RNA total foi extraído de folhas de cana-de-açúcar utilizando Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio a partir do padrão do RNA ribossomal, ou seja, a presença das bandas 28S e 18S e ausência de rastros de degradação. A pureza foi verificada pelas razões 260/280 e 260/230 em espectrofotômetro Nanodrop – 1000 (Thermo Fisher Scientific). 3 µg de RNA total foram tratados com DNase I Amplification Grade, para evitar contaminação com DNA genômico. O tratamento com DNase foi validado por qPCR, para comprovação de que a amplificação não ocorra pela presença de DNA genômico, usando *primers* do gene de referência poliubiquitina e RNA tratado com DNase como molde. Após, 500 ng de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o kit High Capacity Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, com a adição de 100pmol de oligoDT20V.

Na qPCR foram adicionados 2 uL de cDNA, 5uL de Platinum SYBR Green qPCR Supermix (Invitrogen), 400 nM de cada *primer* em volume final de 10 µL. A reação foi realizada em triplicata no equipamento Eco Real-Time PCR System - Illumina com os seguintes ciclos: 50°C durante 2 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos 94°C por

30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, finalizando com a curva de *melting* de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 95°C por 15 segundos. A curva de *melting* foi realizada após cada reação para confirmar a ausência de produtos de amplificação não específicos. As concentrações de *primer* foram otimizadas antes da análise da eficiência da reação. As reações apresentaram eficiência de amplificação entre 95 e 105% e $R^2 > 99\%$. Os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen 2001). As diferenças observadas na expressão gênica foram consideradas significativas se *p* menor que 0,05 com um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3: *Primers* para RT-qPCR

Gateway_CaneCPI-4p+_R	5' CCGATCAGGAACGTGAGC 3'
CaneCPI-4 RT-qPCR_R	5' GACGAGCCTGTAGTTCATCC 3'
Poliubiquitina_F	5' CCCTCTGGTGTACCTCCATTTG 3'
Poliubiquitina_R	5' CCGGTCCTTTAAACCAACTCAGT 3'

3.10. Ensaio de *Western blot*

Para as análises em *Western blot*, as amostras de proteínas extraídas, com o reagente TriZol, de folhas do evento de transformação de cana-de-açúcar com a construção pAHC17CaneCPI-4 e folhas de plantas selvagens de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram separadas por SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de PVDF [poli (fluoreto de vinilideno)] (Bio Rad) em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM, metanol - concentração final de 20%) durante 2 horas, à 150 mA. Após a transferência, a membrana foi corada por aproximadamente 3 minutos em solução Ponceau (Merck) (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%) para visualização da localização das bandas e marcação das mesmas com o auxílio de uma agulha.

O bloqueio das membranas foi realizado utilizando uma solução de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) 5% diluído em TBS 1x (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, pH 8.0) à 4°C por 16 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS 1X (5 minutos cada lavagem e leve agitação) e incubada com o anticorpo primário anti-*CaneCPI-4* (diluição 1: 3.000) durante 90 minutos sob leve agitação em temperatura ambiente. Após, a membrana foi lavada com em TBS 1x e foi realizada a incubação com anticorpo secundário Anti - mouse IgG (diluição 1:10.000) do kit GE Healthcare Amersham

ECLTM Western Blotting Analysis System, durante 90 minutos sob leve agitação em temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi lavada com TBS 1x, três vezes de 5 minutos e leve agitação, e as bandas correspondendo às proteínas reconhecidas pelos anticorpos foram reveladas pela adição de solução NBT-BCIP (Thermo Fisher Scientific).

3.11. Transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA4404 e EHA105 com a construção pANIC6BCaneCPI-4

As linhagens LBA4404 e EHA105 de *A. tumefaciens* foram utilizadas para os experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar. Uma colônia isolada de cada linhagem foi crescida em 5 mL de YEP (extrato de levedura 1%, peptona 1%, NaCl 0,5%) com adição de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do antibiótico rifampicina e incubação a 28°C, 180 rpm, 16 horas. Após, a cultura foi incubada em geladeira por 8 horas e então, 500 μL da cultura foram adicionados a 50 mL de meio YEP contendo 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina. A cultura foi incubada a 28°C, 180 rpm, por aproximadamente 16 horas - até atingir DO – 600 nm em torno de 1,0. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 7800 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo colocado em gelo. O precipitado foi ressuspendido em 10 mL de CaCl_2 20 mM gelado e após centrifugado a 7800 rpm, 10 min a 4°C. O frasco contendo as células foi colocado no gelo e as células foram ressuspendidas em 1 mL de CaCl_2 20 mM gelado. 200 μL de células foram transferidos para um tubo de 1,5 mL e acrescentou-se 100 ng da construção pANIC6BCaneCPI-4. O tubo foi colocado em nitrogênio líquido por 15 s e em seguida incubado a 37°C por 3 horas. Os clones foram selecionados em placas de Petri com YEP ágar contendo 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicina e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina, com incubação a 28 °C por 2-3 dias.

3.12. Transformação genética de discos de folhas imaturas e calos embriogênicos de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens*

Calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram utilizados para a transformação genética via biolística. Todos os procedimentos relativos à obtenção de discos e calos, transformação genética via *A. tumefaciens* e regeneração das plantas transformadas, foram realizados no laboratório de Biotecnologia Vegetal - professora Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes – UFSCar (Universidade Federal de São Carlos), com

supervisão do Dr. Chakravarthi Mohan. A figura 7 mostra um esquema geral das etapas de transformação genética de cana-de-açúcar via *A. tumefaciens*.

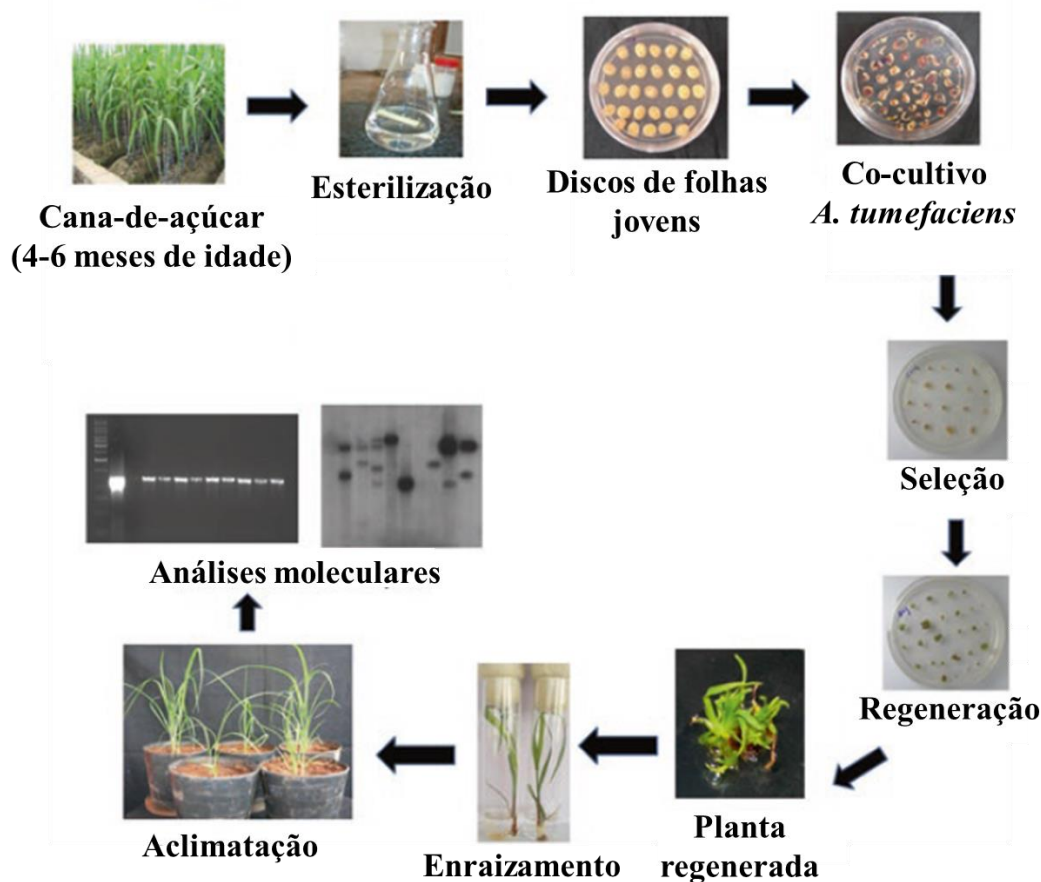


Figura 7: Esquema geral das etapas de transformação genética de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens*. Adaptado de Krishnan e Mohan, 2017.

Dois dias antes da transformação genética de calos de cana-de-açúcar com a construção pANIC6BCaneCPI-4, os calos embriogênicos selecionados de aproximadamente 60 dias em meio MS (MS (Murashige e Skoog, 1962) + 30g/L de sacarose + 9 mg/L de 2,4-D pH 5,8) foram transferidos para meio MS com acetoseringona (MS (Murashige e Skoog, 1962) + 30 mg/L de sacarose + 9 mg/L de 2,4-D + concentração final de 200 μ M de acetoseringona pH 5,8). Foram realizados 16 experimentos independentes de transformação genética de calos via *Agrobacterium*, com aproximadamente 3 placas de calos em cada experimento.

Uma colônia das linhagens LBA4404 e EHA105 transformada com a construção pANIC6BCaneCPI-4 foi inoculada em 5 mL de YEP (extrato de levedura 1%, peptona 1%, NaCl 0,5% pH 7,0) com adição de 10 μ g.mL⁻¹ do antibiótico rifampicina e incubação a 28°C,

180 rpm, 16 horas. Após, a cultura foi incubada em geladeira por 8 horas e então, 500 µL da cultura foram adicionados a 50 mL de meio YEP contendo 10 µg.mL⁻¹ de rifampicina. A cultura foi incubada a 28°C, 180 rpm, por aproximadamente 16 horas - até atingir DO – 600 nm em torno de 1,0. Em seguida, colocar a cultura no gelo por 15 min e centrifugar a 6000 rpm por 10 min, temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 25 mL de meio de infecção (1/2 MS (Murashigine e Skoog, 1962) + 15g/L de dextrose + 15g/L de sacarose pH 5,3) e adicionou-se acetoseringona numa concentração final de 200 µM. A cultura foi incubada a 28 °C, 180 rpm, por 1 hora na presença de luz LED. Após, os calos de 3 placas de Petri foram adicionados à cultura. A cultura foi então incubada por 1h a 28 °C, 180 rpm, no escuro. Em seguida, a cultura foi submetida a vácuo de 25 mm de Hg por 3 min, com intervalo sem vácuo de 2 min e novamente submetida à vácuo de 25 mm de Hg por 3 min. Incubar a cultura por 1 hora a 28°C sem agitação, no escuro. Então, o meio foi descartado, os calos foram colocados sobre papel filtro e transferidos para placas contendo MS + acetoseringona. As placas foram incubadas em câmara Fitotron a 27 °C, por 72 horas, no escuro.

O material transformado foi transferido para um erlemeyer estéril e aproximadamente 100 mL de água estéril foram adicionados. O frasco foi levemente agitado durante dois minutos e o líquido descartado. Este processo foi repetido três vezes. Em seguida, foram adicionados 100 mL de água e 50 mg do antibiótico cefotaxima e o frasco foi agitado por 5 minutos. O líquido foi descartado e os calos foram colocados sobre papel filtro e transferidos para meio de seleção da Agrobacterium (MS (Murashigine e Skoog, 1962) + 30mg/L de sacarose + 9mg/L de 2,4-D + 500 mg/L de cefotaxima pH 5,8). Os calos permaneceram nesse meio por 15 dias e então foram transferidos para meio de seleção da agrobactéria e dos calos transformados (MS (Murashigine e Skoog, 1962) + 30 mg/L de sacarose + 9mg/L de 2,4-D + 500mg/L de cefotaxima + 30 mg/L de higromicina) e incubados na câmara Fitotron a 27°C, no escuro. Iniciou-se neste momento, a seleção dos calos de cana-de-açúcar transformados com a construção de interesse. Os calos foram transferidos para novo meio de seleção (cefotaxima + higromicina) a cada 15 dias, totalizando 6 estágios de seleção. Após o período de seleção dos calos transformados com a construção pANIC6BCaneCPI-4, o material foi transferido para meio MRP (MS (Murashigine e Skoog, 1962) + 30mg/L de sacarose + 1mg/L de BAP + 0,5mg/L de ANA Ph 5,8) e incubado a 27°C com fotoperíodo de 16 h. A cada 15 dias os calos foram transferidos para meio MRP, totalizando 6 etapas de regeneração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Construção do vetor de expressão pAHC17CaneCPI-4

CaneCPI-4 possui uma fase aberta de leitura de 360 pb. A região codante do peptídeo sinal foi excluída (60 pb) e foram inseridos sítios de restrição para a enzima *Bam* HI em cada *primer*. A ORF foi obtida por PCR e a análise do produto de amplificação mostrou a presença de fragmentos de tamanho esperado de aproximadamente 318 pb (Figura 8).

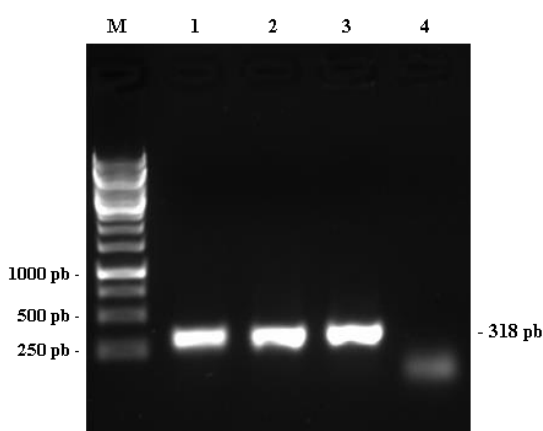


Figura 8: Amplificação da ORF CaneCPI-4. M - marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1, 2 e 3 - banda de amplificação da ORF da CaneCPI-4; 4 - Controle negativo.

Após clivagem com a enzima de restrição *Bam* HI e purificação do fragmento correspondente à CaneCPI-4, este foi ligado ao plasmídeo pAHC17 previamente clivado com a mesma enzima de restrição, gerando o vetor pAHC17_CaneCPI-4. O sequenciamento do plasmídeo recombinante foi realizado e confirmou a integridade e correta orientação da ORF da CaneCPI-4.

4.2. Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística com a construção pAHC17_CaneCPI-4 e regeneração

Foi realizado bombardeamento de calos embriogênicos de cana-de-açúcar, no total de 5 placas de calos e 5 placas de folhas imaturas, com os vetores pAHC17_CaneCPI-4 e pAH9. O vetor pFF19G foi utilizado para transformar folhas de tabaco, utilizadas como controle da eficiência do bombardeamento. A análise de eficiência do bombardeamento é realizada pela

presença de pontos azuis nas folhas de tabaco transformadas, o que indica a expressão transiente da enzima β -glucuronidase. A análise demonstrou que os parâmetros do bombardeador e o preparo das partículas estavam corretos (Figura 9).



Figura 9: Folhas de tabaco transformadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transiente do gene da enzima β -glucuronidase.

Aos 30 dias após o bombardeamento, foi possível observar o início de regeneração de plantas, tanto para discos quanto para calos bombardeados (Figura 10 B e E) quanto para os controles (discos e calos não bombardeados) (Figura 10 A e D). Além disso, calos e discos não bombardeados transferidos para meio MRP contendo geneticina apresentaram-se muito oxidados (Figura 10 C e F), o que demonstra que a seleção do material não-transformado foi efetiva.

Aproximadamente 90 dias após o bombardeamento as plantas apresentaram as primeiras raízes. Nesta fase, obtivemos, ao total, 48 plantas controle e 40 plantas transformadas (Figura 11).

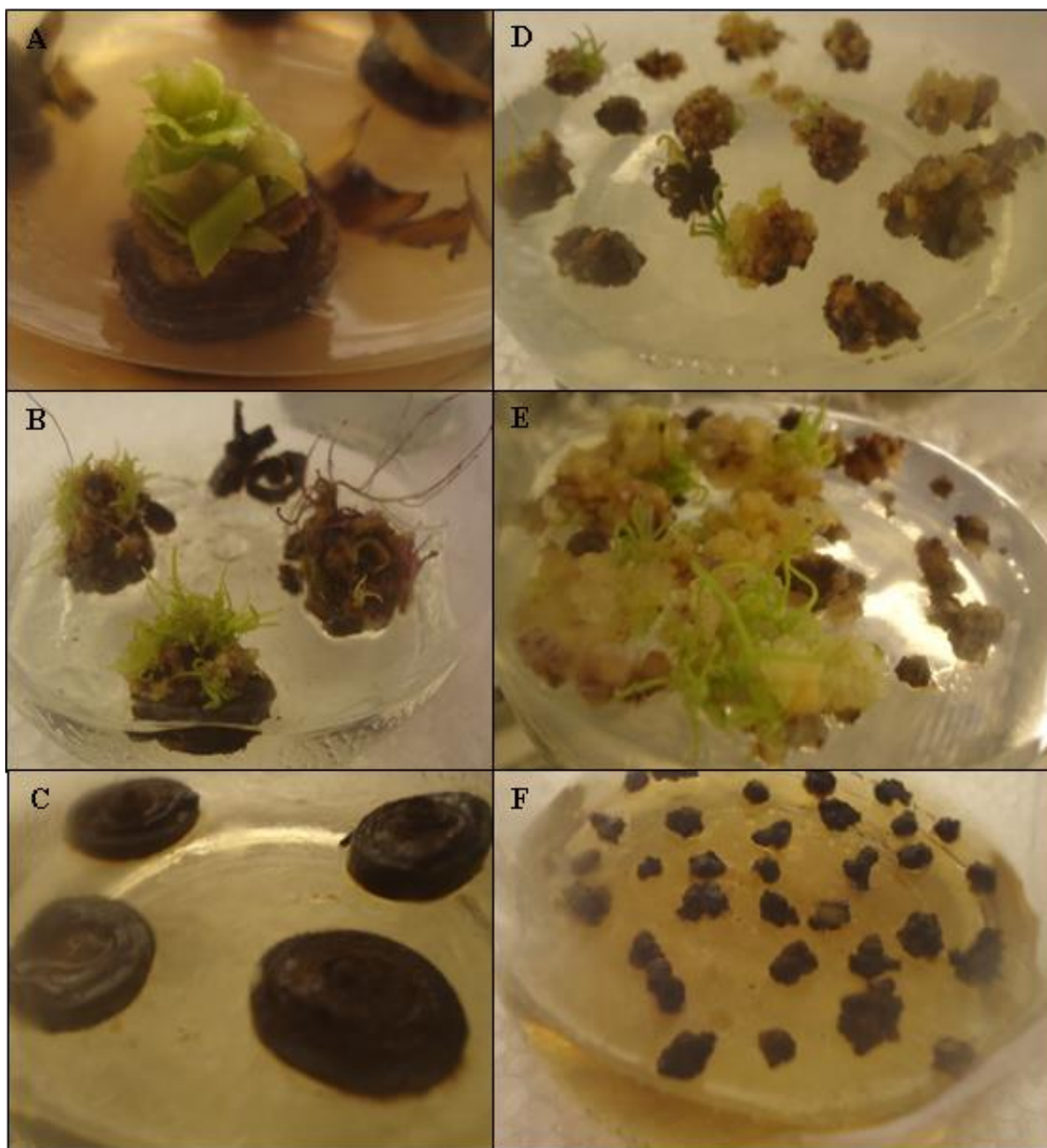


Figura 10: Regeneração de plantas a partir de discos de folhas imaturas e calos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 bombardeados com a construção pAHC17CaneCPI-4. Discos: A – Discos não bombardeados em meio de regeneração; B - Discos bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina; C – Discos não bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina. Calos: D – Calos não bombardeados em meio de regeneração; E - Calos bombardeados em meio de regeneração contendo geneticina; F – Calos não bombardeados oxidados em meio de regeneração contendo geneticina.

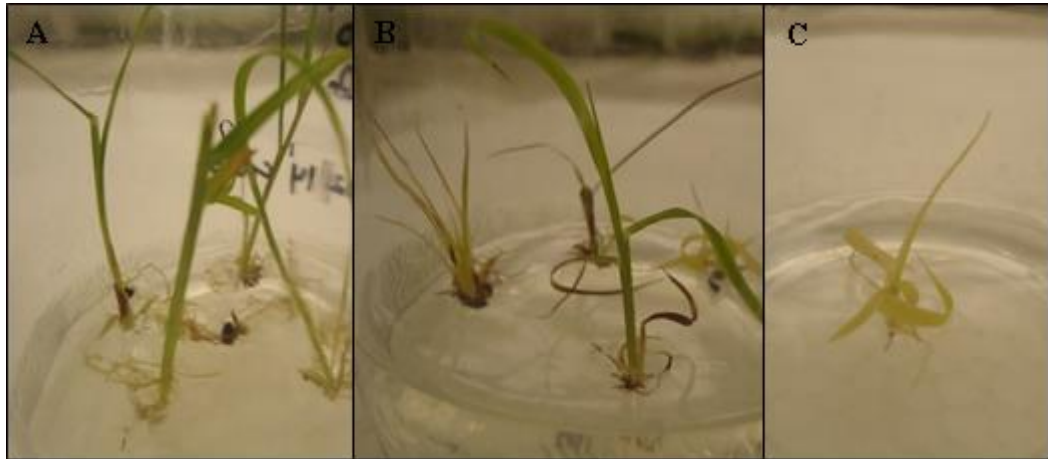


Figura 11: Regeneração de plantas de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 a partir de discos e calos bombardeados com o gene da CaneCPI-4, 90 dias após o bombardeamento. A – Plantas não-transformadas; B – Plantas regeneradas a partir de discos bombardeados; C – Plantas regeneradas a partir de calos bombardeados.

Aos 150 dias após o bombardeamento, as plantas transformadas com a construção pAHC17_CaneCPI-4 apresentaram sintomas de intoxicação, com uma acentuada queda na taxa de crescimento, apresentando folhas amareladas (Figura 12). Nesta fase, obtivemos 43 plantas controle e 21 plantas transformadas (construção pAHC17_CaneCPI-4).

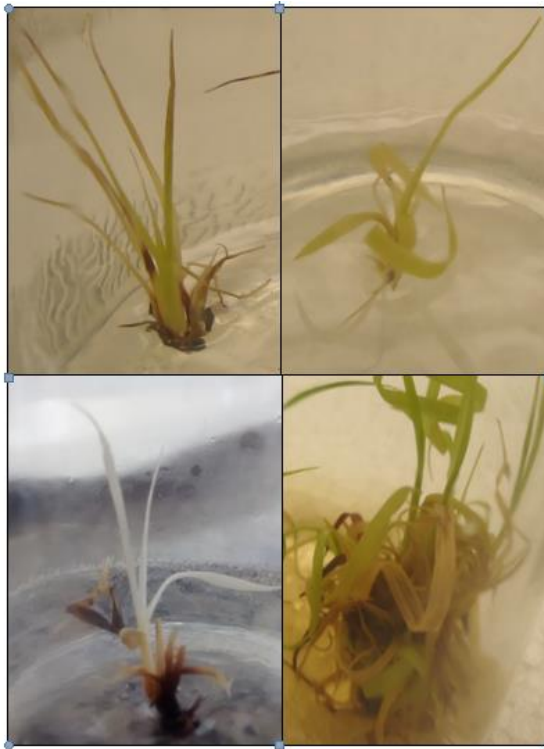


Figura 12: Redução no crescimento das plantas regeneradas a partir da transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 e amarelecimento das folhas, com a presença, inclusive, de uma planta albina.

Apesar da quantidade de antibiótico ter sido reduzida nas repicagens seguintes, ocorreu a morte de todas as plantas da construção pAHC17_CaneCPI-4. Dessa forma, novos experimentos de transformação genética foram iniciados.

Para o novo bombardeamento, utilizou-se calos embriogênicos (10 placas) que foram bombardeados com os vetores pAHC17_CaneCPI-4 e pAH9. O vetor pFF19G foi utilizado para transformar folhas de tabaco, utilizadas como controle da eficiência do bombardeamento. A análise de eficiência do bombardeamento pôde ser verificada pela presença de pontos azuis nas folhas de tabaco transformadas, o que indica a expressão transiente do gene da enzima β -glucuronidase. A análise demonstrou que os parâmetros do bombardeador e o preparo das partículas estava correto, porém não tão eficiente quanto o experimento de transformação genética anterior (Figura 13).



Figura 13: Folhas de tabaco transformadas com o plasmídeo pFF19G apresentando expressão transiente do gene da enzima β -glucuronidase.

Aos 25 dias após o bombardeamento foi possível observar de início de regeneração de plantas (Figura 14).

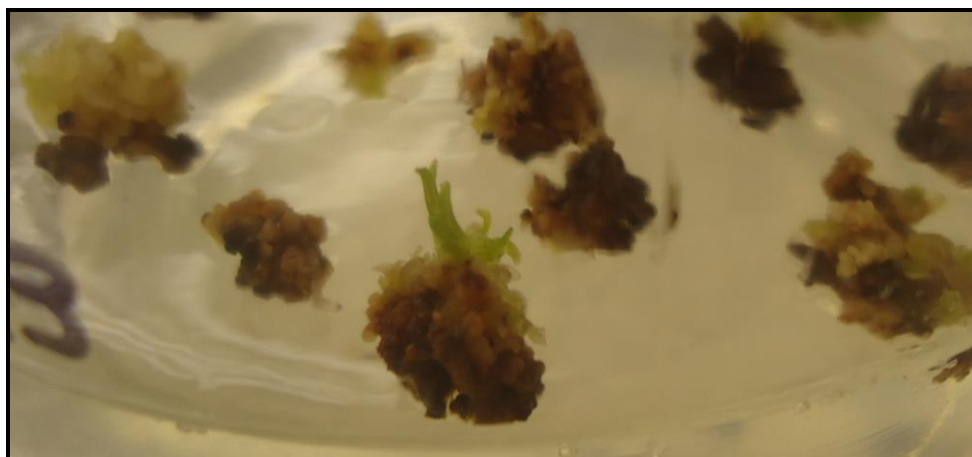


Figura 14: Início de regeneração de plantas (construção pAHC17CaneCPI-4), 25 dias após o bombardeamento.

Aos 75 dias após o bombardeamento, os calos foram repicados e foi possível observar a regeneração de somente uma planta do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4. Os calos que não regeneraram foram novamente transferidos para meio MRP com geneticina, esperando-se que mais plantas fossem regeneradas. Entretanto a posterior regeneração de plantas a partir destes calos não foi induzida em meio de cultura. A planta resultante deste bombardeamento (construção pAHC17CaneCPI-4) foi repicada a cada

30 dias intercalando-se meio com e sem geneticina. A figura 15 mostra a planta regenerada aos 6 meses após o bombardeamento.



Figura 15: Planta resultante do segundo bombardeamento com a construção pAHC17_CaneCPI-4 aos 6 meses após o bombardeamento.

4.3. Análise de integração do vetor pAHC17_CaneCPI-4 ao genoma de cana-de-açúcar

Após os eventos de biolística, o DNA exógeno introduzido via micropartículas poderá ou não estar integrado ao genoma da planta. Após inúmeras divisões celulares, a permanência do agente marcador de seleção caracterizará um elemento de transformação positiva. Caso contrário, o tecido que foi submetido ao processo de bombardeamento ao passar pelo processo de seleção química por antibióticos, não será viável, vindo a perecer no processo de regeneração.

O DNA genômico do evento de transformação do segundo ensaio de bombardeamentos com a construção pAHC17_CaneCPI_4 foi usado como molde para uma PCR para verificar a integração da CaneCPI-4 ao genoma da cana-de-açúcar. Foi observada uma banda no tamanho esperado de 520 pb, confirmando que a esse evento é um clone positivo (Figura 16).

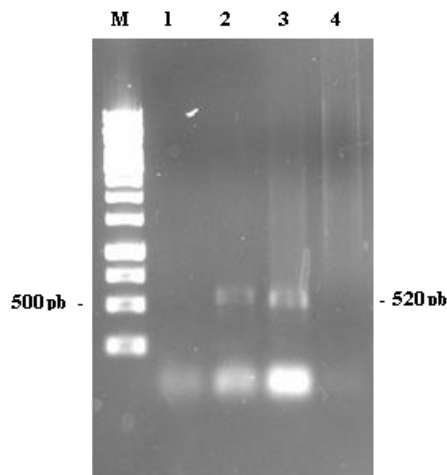


Figura 16: Análise da presença da CaneCPI-4 na planta regenerada. Gel de agarose 1% mostrando os produtos amplificados a partir de amostras de DNA de folhas de cana-de-açúcar. M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1: controle negativo da reação; 2: Controle positivo (construção pAHC17_CaneCPI-4); 3: Planta de cana-de-açúcar regenerada, transformada com a construção pAHC17_CaneCPI-4; 4: Planta de cana-de-açúcar não transformada.

4.4. Multiplicação *in vitro* da planta resultante do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4

A planta matriz resultante do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 foi multiplicada *in vitro*. A figura 17 mostra o processo de multiplicação do evento de transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4. Aproximadamente 10 meses após o início da fase de multiplicação *in vitro*, foi possível a obtenção de 14 plantas multiplicadas.



Figura 17: Processo de multiplicação *in vitro* da planta transformada com a construção pAHC17_CaneCPI-4.

4.5 Transferência das plantas transformadas com a construção pAHC17_CaneCPI-4 para vasos

As plantas transformadas com a construção pAHC17_CaneCPI-4 multiplicadas *in vitro* foram transferidas para vasos com cobertura plástica e mantidas dentro do laboratório para aclimatização por 30 dias. Após este período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, mantendo a cobertura plástica por 10 dias (Figura 18).

Em casa de vegetação, as plantas transformadas com a construção pAHC17_CaneCPI-4 foram multiplicadas (Figura 19), juntamente com as plantas selvagens de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280, no mesmo estágio.

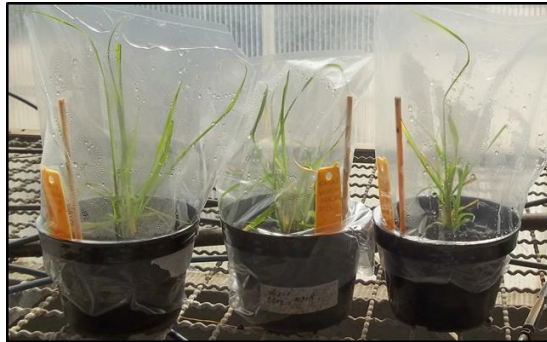


Figura 18: Plantas multiplicadas resultantes do segundo bombardeamento com a construção pAHC17_CaneCPI-4 em vasos com cobertura plástica em casa de vegetação



Figura 19: Plantas resultantes da transformação com a construção pAHC17_CaneCPI-4 em casa de vegetação.

4.6. Análise da expressão gênica e expressão proteica nas plantas transformadas por RT-qPCR

A expressão gênica da CaneCPI-4 foi avaliada em dois experimentos independentes em três plantas transgênicas e três plantas selvagens. A expressão gênica da CaneCPI-4 nas plantas transgênicas (T) e plantas selvagens (WT) não apresentou diferença significativa, correspondendo a 1 para as plantas selvagens e 0,94 para as plantas transgênicas com $p=0,057$ (Figura 20).

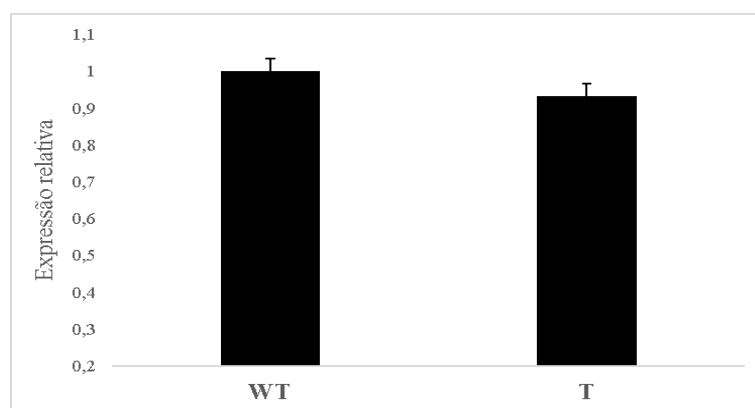


Figura 20: Gráfico de expressão gênica da CaneCPI-4 em plantas transgênicas (T) e selvagens (WT) de cana-de-açúcar

Como não foi detectado um aumento da expressão gênica da CaneCPI-4 nas plantas transgênicas pela análise de RT-qPCR, foi realizada uma nova RT-qPCR para avaliar a expressão gênica da CaneCPI-4 nas plantas transformadas. Entretanto, o resultado da figura 35 foi confirmado, não apresentando diferença significativa de expressão do transgene entre as plantas selvagens e transformadas.

O resultado do *western blot* mostrou que o anticorpo policlonal anti-CaneCPI-4 foi capaz de reconhecer a proteína CaneCPI-4 recombinante (Figura 21B, coluna 3), porém não foi capaz de reconhecer a mesma proteína na planta resultante da transformação com a construção pAHC17CaneCPI-4 e nas plantas selvagens (Figura 21B, colunas 1 e 2), indicando que a expressão basal da CaneCPI-4 é baixa na variedade SP80-3280.

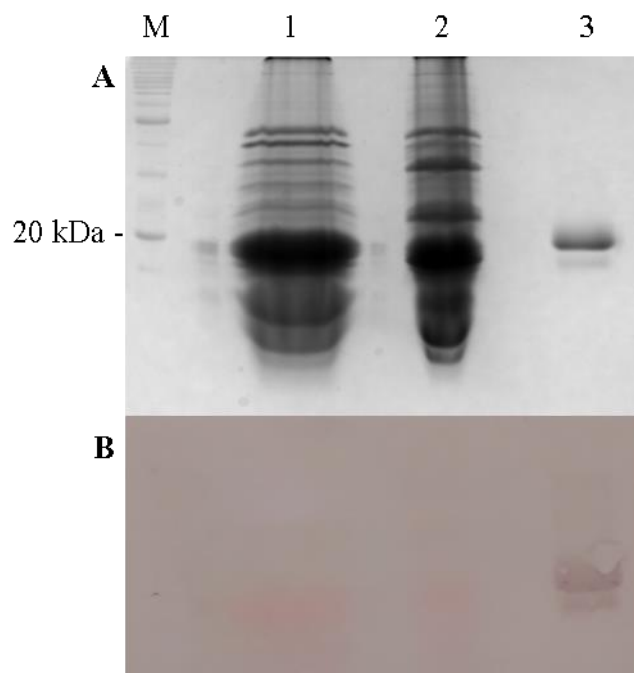


Figura 21: Imunodeteção da proteína CaneCPI-4. A: gel espelho, onde M: marcador de peso molecular Benchmark Invitrogen; 1: Extrato proteico de folhas de plantas selvagens de cana-de-açúcar; 2: Extrato proteico de folhas de plantas resultantes do evento de transformação com a construção pAHC17CaneCPI-4; 3: proteína CaneCPI-4 recombinante. B: ensaio de imunodeteção da proteína CaneCPI-4 realizado com as mesmas amostras da figura A.

Uma possível explicação para a ausência de expressão seria o silenciamento do transgene, nas plantas em fase de multiplicação.

O transgene pode ter integrado em uma região inacessível para transcrição ou pode ter sido silenciado por um mecanismo de silenciamento gênico transcricional ou pós-transcricional, como reportado em cana-de-açúcar transgênica transformada com os genes *uidA* and *albD* sob controle do promotor *Ubi-1* com ensaios de expressão de luciferase (Hanson et al., 1999). (Wei *et al.*, 2003) relataram que ocorreu silenciamento em plantas de cana-de-açúcar transgênica transformadas com o plasmídeo pAHC17 sob controle do promotor *Ubi-1*, utilizando ensaios de acúmulo de GUS. Além disso, os mesmos autores reportaram que plantas de cana-de-açúcar transformadas por biolística têm uma maior redução de expressão após a regeneração.

O silenciamento gênico evoluiu como um mecanismo de proteção da planta contra vírus e transposons (Baulcombe e English, 1996). A atividade de elementos transponíveis gera uma maior instabilidade do transgene, e também pode ser a causa do silenciamento. Foram identificados 68 elementos de transposição em cana-de-açúcar (De Araujo *et al.*,

2005). Além disso, a ativação de transposons é aumentada em condições de cultivo *in vitro* (Picelli, 2010).

4.7. Construção dos vetores de expressão pANIC5B_CaneCPI-4 e pANIC6B_CaneCPI-4

Devido à grande dificuldade de regeneração de plantas dos experimentos de transformação de cana-de-açúcar com a construção pAHC17_CaneCPI-4, buscamos novas alternativas para melhorar a eficiência de transformação e obter um maior número de transformantes. Dessa forma, passamos a utilizar os vetores pANIC5B e pANIC6B para aumentar a eficiência de transformação, pois o gene de interesse e o gene marcador de seleção estarão no mesmo cassete.

Foi realizada a amplificação da CaneCPI-4 por PCR juntamente à região correspondente aos adaptadores *attB1* e *attB2* para a recombinação. Foi observada banda de amplificação de tamanho esperado de 364 pb (Figura 22).

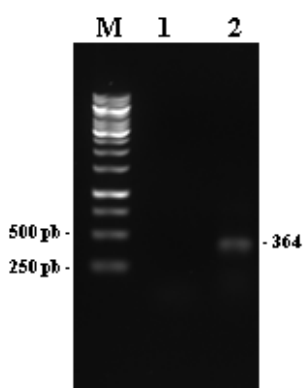


Figura 22: Amplificação da CaneCPI-4 contendo as regiões *attB1* e *attB2*. 1: controle negativo da reação, 2: amplificação CaneCPI-4 e M o marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

O produto de amplificação foi utilizado para uma reação BP de recombinação com o plasmídeo pDONR/Zeo, gerando a construção pDONR/ZeoCaneCPI-4. O DNA plasmidial foi purificado a partir de uma colônia recombinante e submetido à análise de restrição com a enzima *BsrG I* (Figura 23).

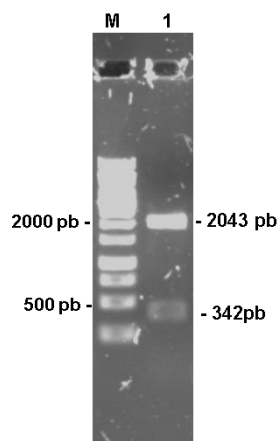


Figura 23: Análise de restrição do plasmídeo pDONR/ZeoCaneCPI_4. O padrão de bandas foi igual ao esperado, com a presença do fragmento correspondente à CaneCPI-4. M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

Além disso, foi realizada a clivagem do plasmídeo pDONR/Zeo antes da recombinação, mostrando as três bandas de tamanho esperado (Figura 24), produzidas pelo sítio de clivagem em ambas as regiões de recombinação *attP1* e *attP2* e no gene *ccdb*, demonstrando a diferença do padrão de bandas resultantes da clivagem com a enzima Bsp1407I (*BsrG I*) quando a reação de recombinação é eficiente ou não eficiente. O sequenciamento da construção pDONR/ZeoCaneCPI-4 confirmou a integridade e correta orientação do gene.

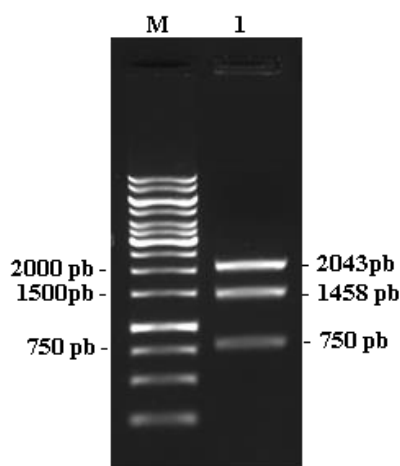


Figura 24: Análise de restrição do plasmídeo pDONR/Zeo. O padrão de bandas foi igual ao esperado, com a presença de três fragmentos de 790, 1458 e 2043 pb (coluna 1). M: marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

4.8. Transformação genética de cana-de-açúcar (variedade SP80-3280) via biolística com a construção pANIC5B_CaneCPI-4

Novos experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar foram realizados, utilizando uma nova construção pANIC5B_CaneCPI-4. Foi realizado o bombardeamento de calos de embriogênicos de cana-de-açúcar (10 placas) com o vetor pANIC5B_CaneCPI-4. Aos 30 dias após o bombardeamento foi possível observar o início de regeneração de plantas (Figura 25).



Figura 25: Seleção de calos resultantes da transformação de cana-de-açúcar com a construção pANIC5B_CaneCPI-4 em meio com higromicina.

Entretanto, 70 dias após o bombardeamento as plantas passaram a ter sintomas de intoxicação e, mesmo retirando o agente de seleção nesta fase, não foi possível a recuperação, de forma que todas as plantas morreram.

Dessa forma, novos experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 foram realizados com a construção pANIC5B_CaneCPI-4, com modificações na metodologia. Os calos bombardeados permaneceram em câmara escura por 7 dias após o bombardeamento e foram então transferidos para meio MS3K contendo 30 mg/L de higromicina e incubados em câmara escura para seleção. Foram realizadas 4 etapas de seleção (20 dias cada etapa), totalizando 80 dias de seleção em câmara escura (Figura 26).



Figura 26: Seleção de calos bombardeados com a construção pANIC5B_CaneCPI-4 em meio MS3K contendo higromicina em câmara escura

Após a etapa de seleção no escuro, os calos foram transferidos para meio de regeneração com higromicina e acondicionados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 27°C. As plantas foram repicadas a cada 15 dias em meio MRP contendo higromicina.

A figura 27 mostra a regeneração aos 70 dias após o bombardeamento, num total de 28 frascos com calos em regeneração de plantas, transformadas com a construção pANIC5B_CaneCPI-4.

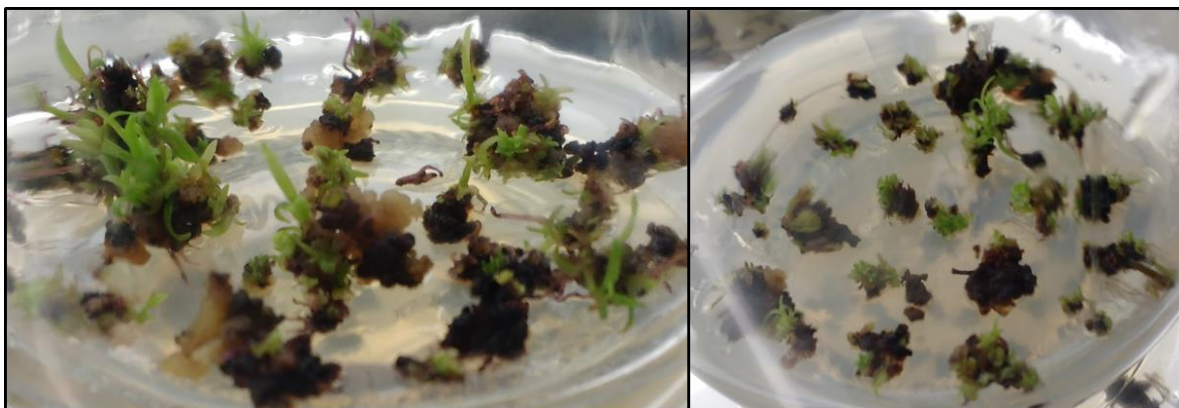


Figura 27: Regeneração das plantas a partir de calos bombardeados com a construção pANIC5B_CaneCPI-4.

Infelizmente, nas etapas seguintes de regeneração as plantas apresentaram sinais de oxidação e não foi possível obter plantas transgênicas a partir destes experimentos.

4.9. Transformação genética de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pANIC6BCaneCPI-4 e regeneração

Foram realizados 16 experimentos independentes de transformação de calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280, entre os meses de maio e julho de 2017, com as linhagens de *A. tumefaciens* LBA4404 e EHA105 transformadas com a construção pANIC6BCaneCPI-4.

Após o período de co-cultivo com *A. tumefaciens*, os calos foram transferidos para meio MS contendo higromicina e cefotaxima, para eliminar as bactérias e iniciar a seleção dos calos transformados. Esta seleção foi realizada em seis etapas, com intervalo de 15 dias. A figura 28 mostra as etapas de seleção de calos, desde os calos não transformados (Figura 28A) até os calos que foram transferidos para meio de regeneração após a seleção com higromicina (Figura 28F). Observou-se que um grande número de calos tornou-se inviável durante a seleção, demonstrando que o antibiótico higromicina foi eficiente para a seleção.

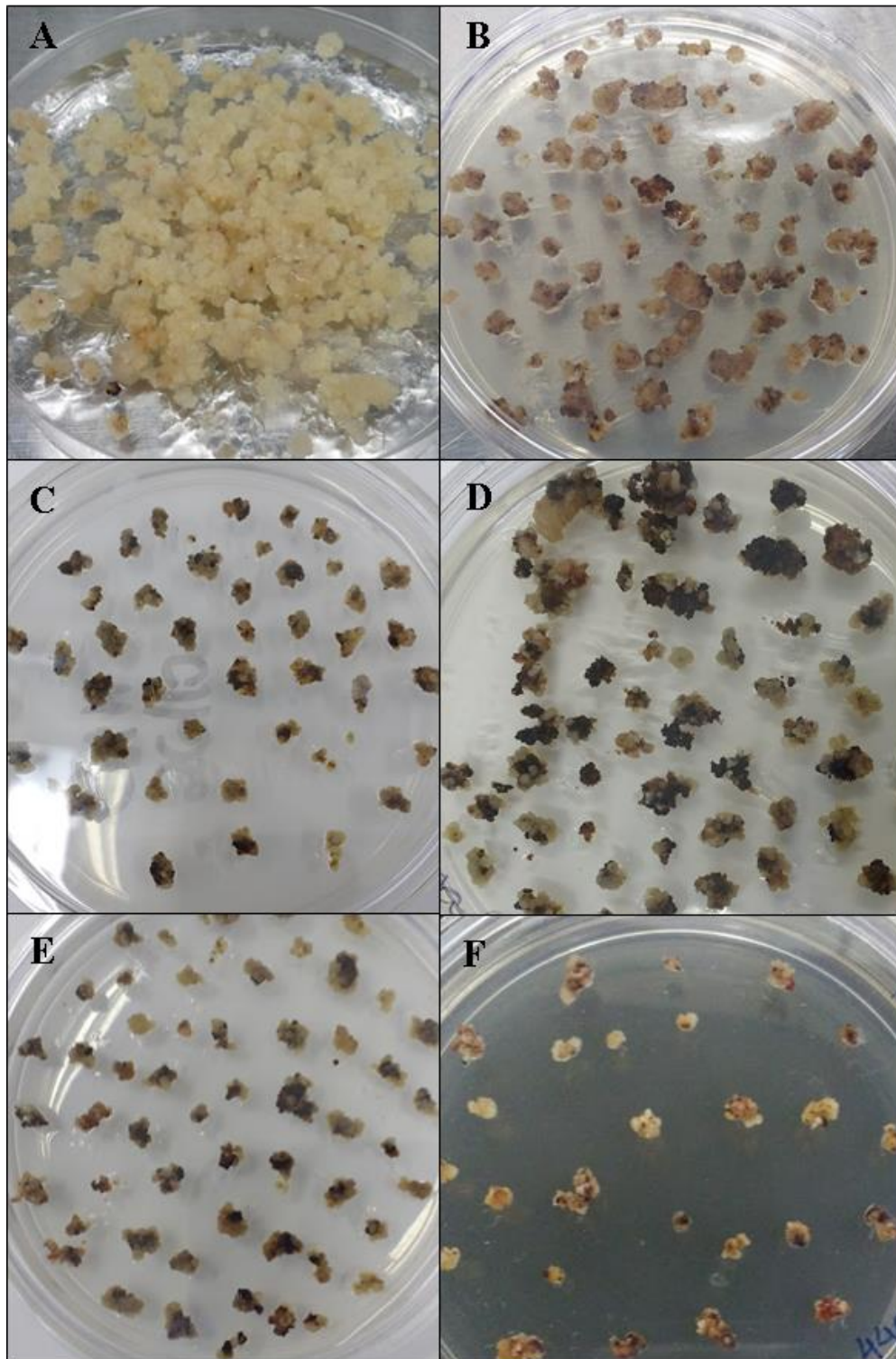


Figura 28: Etapas de seleção de calos transformados via *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pANIC6BCaneCPI-4. A: calos embriogênicos de cana-de-açúcar antes da transformação. B: Calos transformados ao final de 15 dias de seleção. C: Calos transformados ao final de 30 dias de seleção. D: Calos transformados ao final de 60 dias de seleção. E: Calos transformados ao final de 75 dias de seleção. F: calos transformados ao final de 90 dias de seleção.

Ao final do período de seleção, calos de aproximadamente 40 placas de Petri foram transferidos para meio MRP. Somente após 60 dias em meio de regeneração foi possível observar o início de regeneração de plantas (Figura 29A).

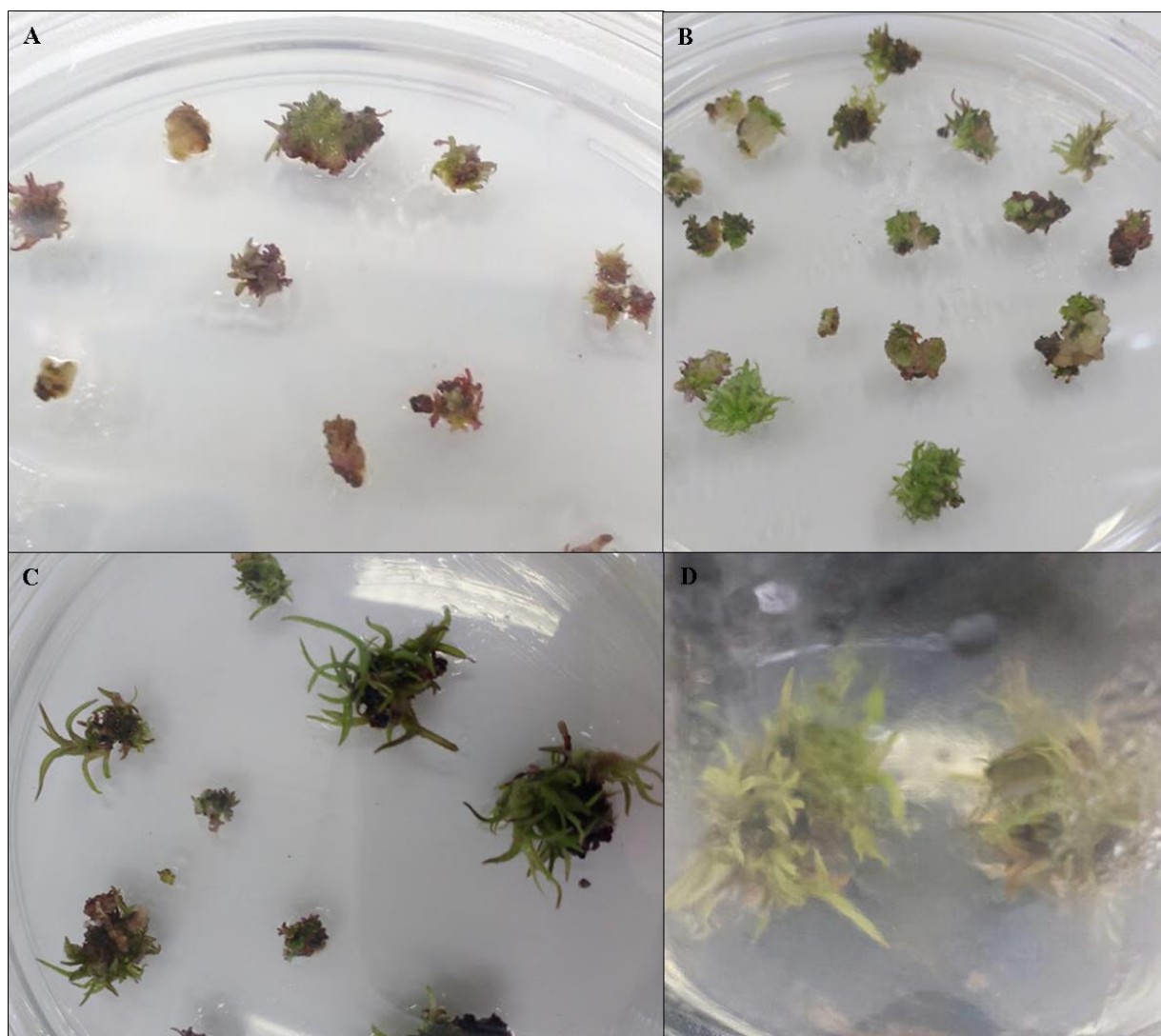


Figura 29: Etapas de regeneração das plantas transformada por *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pANIC6BCaneCPI-4. A: início da regeneração de plantas aos 60 dias em meio MRP; B: regeneração das plantas a 90 dias em meio MRP; C: regeneração de plantas aos 120 dias em meio MRP. D: atual fase de regeneração das plantas.

A regeneração de plantas transformadas com *A. tumefaciens* mostrou-se mais eficiente do que a regeneração de plantas transformadas por biolística (Figura 29B, C e D). As plantas apresentam-se mais saudáveis, com bom desenvolvimento, e não há plantas com fenótipo

alterado, como, por exemplo, as plantas albinas que observamos nos experimentos de transformação via biolística. Na data de 10/03/2018, temos no total 92 plantas em desenvolvimento.

Wei *et al.*, 2003 relataram que o método de introdução de transgenes em plantas, *Agrobacterium tumefaciens* ou biolística pode influenciar a frequência de silenciamento e que plantas de cana-de-açúcar transformadas por biolística têm uma maior tendência à redução de expressão do transgene após a regeneração. Melotto-Passarin, 2009 relatou que obteve uma eficiência maior na transformação de cana-de-açúcar via *Agrobacterium tumefaciens* do que via biolística.

Dessa forma, a eficiência na regeneração das plantas transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* e o bom desenvolvimento das plantas indicam uma maior probabilidade de que as plantas possuem o transgene inserido ao genoma.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar a avaliação da integração da CaneCPI-4 ao genoma das plantas de cana-de-açúcar regeneradas a partir da transformação via *Agrobacterium tumefaciens* com a construção pANIC6B_CaneCPI-4 por PCR e avaliação da expressão gênica por RT-qPCR e expressão proteica por *Western blot*. As plantas transgênicas com resultado positivo de integração do transgene serão multiplicadas e utilizadas em ensaio biológico onde larvas de *Migdolus fryanus* se alimentarão do rizoma de plantas transgênicas transformadas com a construção pANIC6BCaneCPI-4 e selvagem. Após, será realizada a extração de RNA do intestino de larvas e dos tecidos de cana-de-açúcar atacados, para avaliar o efeito do ataque das larvas na expressão gênica da CaneCPI-4 e a influência da superexpressão da cistatina frente às catepsinas digestivas do inseto utilizando RT-qPCR.

CAPÍTULO 2

Caracterização de cistatinas de *Citrus* e estudos de inibição com diferentes cisteíno-peptidases

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptidases

As peptidases (EC 3.4) são enzimas que promovem a hidrólise de ligações peptídicas. O banco de dados MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) é fonte de informações sobre peptidases e seus inibidores, classificando-os em famílias e clãs (Rawlings *et al.*, 2016). Estas enzimas estão presentes em plantas, animais, bactérias e fungos (Bugg, 2012).

De acordo com a reação catalisada, as peptidases podem ser classificadas em exopeptidases, endopeptidases ou ômega-peptidases. As exopeptidases hidrolisam as cadeias peptídicas tanto na extremidade N-terminal como C-terminal. As enzimas que atuam no N-terminal podem liberar um aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo e são chamadas de aminopeptidases, dipeptidil-aminopeptidases e tripeptidil-aminopeptidases, respectivamente. As carboxipeptidases atuam na extremidade C-terminal liberando um ou dois resíduos de aminoácidos e são chamadas de carboxipeptidases ou carboxidipeptidases, respectivamente. As endopeptidases clivam as regiões internas da cadeia peptídica, distante das extremidades terminais da proteína. Já as ômega-peptidases atuam frequentemente próximo das extremidades, entretanto não necessitam de um grupamento N- ou C-terminal livre no substrato (Rawlings *et al.*, 2016).

As peptidases podem também ser divididas em oito grupos tendo como base a natureza química do resíduo de aminoácido presente no sítio ativo podendo ser metalopeptidases, serino-peptidases, cisteíno-peptidases, aspartil-peptidases, treonino-peptidases, glutamil-peptidase, asparagil-peptidase e peptidases com mecanismo desconhecido. E ainda de acordo com sua estrutura molecular e homologia, onde o mecanismo de clivagem depende da sequência de aminoácidos e da estrutura tridimensional, são classificadas em famílias e clãs (Rawlings *et al.*, 2012).

As peptidases apresentam especificidade singular aos substratos, determinada pela capacidade de ligação dos aminoácidos do substrato aos subsítios do sítio catalítico da enzima. Dessa forma, (Schechter e Berger, 1967), propuseram um modelo de interação da papaína com o substrato, onde cada subsítio (designado pela letra S) do sítio ativo da enzima acomoda determinados resíduos de aminoácidos do substrato (designados pela letra P) e cada subsítio acomoda um único resíduo de aminoácido. A partir do ponto de clivagem do substrato, os resíduos de aminoácidos do substrato na direção N-terminal são denominados

P1, P2, P3, Pn e na direção C-terminal P1', P2', P3', Pn' e a partir do sítio ativo da enzima, os subsítios na direção N-terminal são denominados S1, S2, S3, Sn e na direção C-terminal, S1', S2', S3', Sn' (Figura 30). Este modelo foi posteriormente estendido para as demais peptidases.

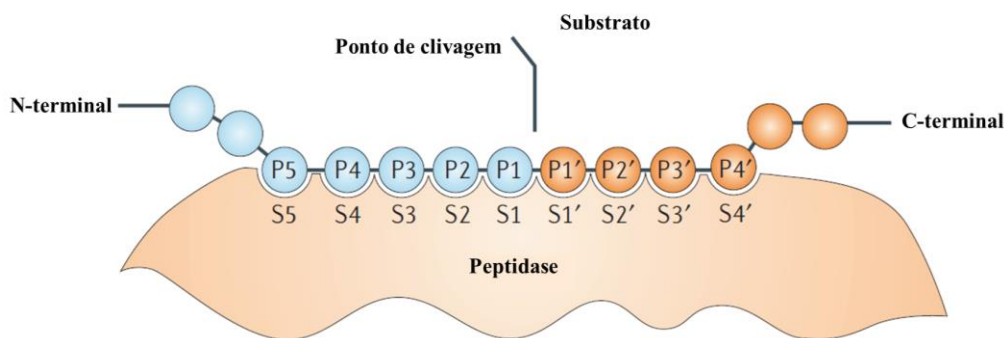


Figura 30: Esquema do modelo de interação peptidase-substrato de Schechter e Berger, 1967. Modificado de (Turk, 2006).

1.2. Cisteíno-peptidases

As cisteíno-peptidases são agrupadas em 118 famílias e 11 clãs. Cada família possui semelhança significativa na sequência de aminoácidos. Os clãs são divididos de acordo com a origem evolutiva, apresentando estruturas terciárias semelhantes, semelhança na ordem de resíduos do sítio catalítico ou motivos conservados em torno do sítio catalítico. Os clãs CA e CD possuem o maior número de cisteíno-peptidases. O clã CA é o maior e mais estudado das cisteíno-peptidases e inclui as catepsinas e papaína (Família C1: papaína-like) e o clã CD inclui legumaínas (Família C13: legumaína-like) (Rawlings *et al.*, 2016).

A papaína é uma cisteíno-peptidase amplamente estudada e considerada modelo nos estudos de inibição de cisteíno-peptidases. A família C1 inclui membros com propriedades semelhantes à papaína. As enzimas desta família possuem três regiões distintas: peptídeo sinal, pró-região e enzima madura. A estrutura destas proteínas compreende dois domínios, L (*left*) e R (*right*), de tamanho comparável, e o sítio ativo está localizado entre os domínios (Wiederanders, 2003) (Figura 31). A família C1 apresenta duas subfamílias C1A – subfamília da papaína e C1B- subfamília da bleomicina hidrolase. A subfamília C1A ainda é subdividida em catepsinas B-like e catepsinas L-like. O grupo das catepsinas L-like inclui as catepsinas O, H, L, K e S. As catepsinas H, L, K e S são estreitamente relacionadas (Rawlings *et al.*, 2016).

Os resíduos do sítio ativo das enzimas da família C1 foram identificados como cisteína e histidina, formando uma díade catalítica. Uma glicina auxilia na formação da fenda de oxianion e a asparagina orienta o anel imidazólico da histidina do sítio catalítico (Rawlings *et al.*, 2016). O mecanismo catalítico das cisteíno-peptidases da família C1 envolve a associação da enzima com o substrato, seguido pelo ataque nucleofílico do grupo tiol da cisteína do sítio ativo ao carbono carbonílico formando um intermediário tetraédrico. Em seguida, a histidina protonada do sítio ativo doa um próton ao nitrogênio da amida, ocorrendo a acilação da enzima, com a formação e liberação do primeiro produto da reação, o grupo amina $R'NH_2$. No passo seguinte, a acil-enzima interage com uma molécula de água, levando à formação do segundo subproduto ($RCOOH$) e à deacilação e liberação da enzima livre (Storer e Ménard, 1994).

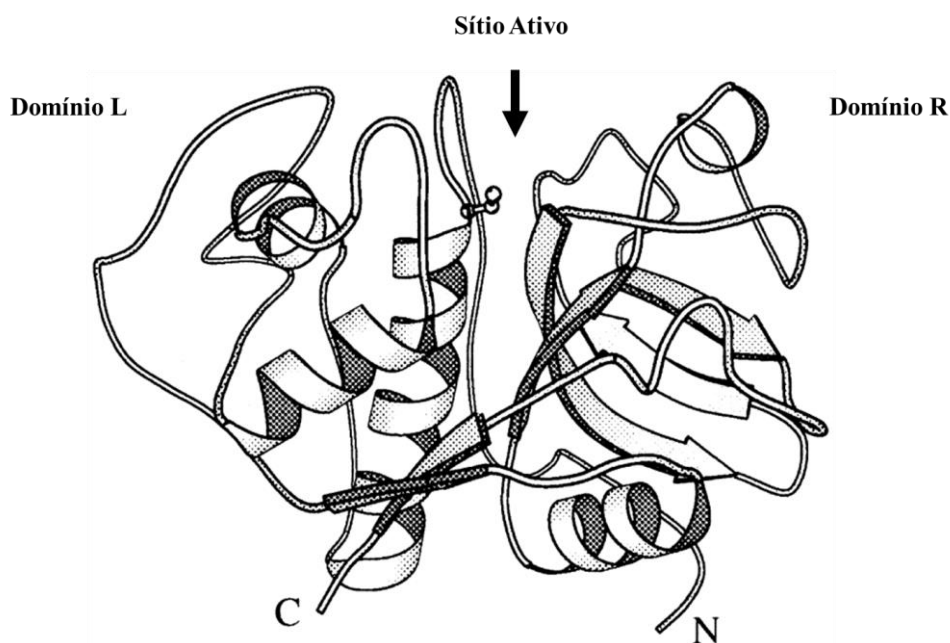


Figura 31: Estrutura tridimensional da papaína. Adaptado de (Fujishima *et al.*, 1997).

A família C13 apresenta os mesmos resíduos catalíticos da família C1, histidina seguida por uma cisteína. O mecanismo catalítico da legumaina humana envolve a ligação do oxigênio do grupo carbonila do resíduo P1 a fenda de oxianion trivalente formada pelos resíduos cisteína e histidina, e auxílio de uma glicina (Dall e Brandstetter, 2013). As enzimas desta classe possuem 4 regiões distintas: peptídeo sinal, dois pró-peptídeos (N-terminal e C-

terminal) e enzima madura (Müntz e Shutov, 2002). A estrutura das enzimas desta família assemelha-se à estrutura das enzimas da família das caspases (Dall e Brandstetter, 2016).

1.3. Catepsinas

O termo catepsina inclui as serino-, cisteíno- e aspartil-peptidases. Todas as cisteíno-peptidases lisossomais são conhecidas como catepsinas, embora o contrário não seja verdadeiro. As catepsinas da família das cisteíno-peptidases compreendem 11 enzimas (catepsinas B, C, H, F, K, L, O, S, V, W e Z) que são cruciais no processo de degradação protéica no ambiente ácido dos lisossomos. No entanto, algumas destas enzimas não são estritamente encontradas no lisossomo, podendo muitas delas acumular-se em diferentes organelas, frequentemente resultando em condições patológicas. Diante da importância do tema diversas revisões foram publicadas descrevendo a participação das catepsinas em diferentes processos fisiológicos e fisiopatológicos (Turk *et al.*, 2000; Lecaille *et al.*, 2002; Turk e Guncar, 2003; Vasiljeva *et al.*, 2007; Turk *et al.*, 2008).

Há relatos de que a superexpressão de catepsinas humanas está relacionada a processos patológicos como a progressão de tumores malignos, distrofia muscular, doença de Alzheimer, artrite reumatóide e osteoporose (Kramer *et al.*, 2017). Dessa forma, a utilização de cistatinas em ensaios de inibição *in vitro* e ensaios funcionais *in vivo* com catepsinas humanas gera informações que podem ser aplicadas na regressão de doenças.

1.3.1. Catepsina B humana

A catepsina B humana é sintetizada com peptídeo sinal, pró-região, enzima madura e uma extensão C-terminal de 6 resíduos, totalizando de 339 resíduos de aminoácidos. A enzima madura possui deleção do peptídeo sinal, pró-região e extensão C-terminal. A ativação da catepsina B ocorre nos lisossomos (Chan *et al.*, 1986). A catepsina B apresenta similaridade com a cisteíno-peptidase do tipo papaína e demais enzimas da família C1, porém apresenta características estruturais que a diferenciam: presença de um *loop* de oclusão de aproximadamente 20 aminoácidos que bloqueia a fenda do sítio ativo, ocupando os subsítios S1' e S2' da enzima (Musil *et al.*, 1991), atividade de endopeptidase e exopeptidase (Rawlings e Salvesen, 2013), além de ser a única enzima da família que aceita o resíduo de

arginina na posição P2 do substrato, devido à presença de uma glutamina no subsítio S2, tendo preferência por grandes resíduos hidrofóbicos na posição P2 do substrato (Hasnain *et al.*, 1993; Rawlings e Salvesen, 2013).

O *loop* de oclusão está relacionado à atividade de exopeptidase da catepsina B e estudos relatam que a ausência desta estrutura reduz a atividade de exopeptidase e aumenta a atividade de endopeptidase, respectivamente, (Illy *et al.*, 1997; Nägler *et al.*, 1997; Portaro *et al.*, 2000).

A catepsina B é geralmente encontrada nos lisossomos, relacionada ao *turnover* proteico e metabolismo da célula. Esta peptidase também está relacionada à artrite reumatoide progressão tumoral (Yan e Sloane, 2003) e altos níveis de catepsina B foram encontrados em vários tipos de câncer (Aggarwal e Sloane, 2014).

1.3.2. Catepsina K humana

A catepsina K atua exclusivamente como endopeptidase, com preferência de resíduos hidrofóbicos não aromáticos como leucina, isoleucina, metionina e valina na posição P2 do substrato. A principal característica que a diferencia das demais catepsinas é a preferência pelo resíduo de prolina na posição P2. A catepsina K é sintetizada contendo peptídeo sinal (15 aa), proregião (99 aa) e enzima madura (215 aa). Apresenta 59,5% de identidade com a catepsina L humana, 57,7% com a catepsina S e somente 26,5% com a catepsina B humana (Rawlings e Salvesen, 2013).

A catepsina K humana é uma cisteíno-peptidase lisossomal do tipo papaína-*like* expressa em altos níveis em osteoclastos (Brömme *et al.*, 1996). A expressão da Catepsina K é observada, além dos osteoclastos, em diversos outros tipos celulares tais como epitélio pulmonar embrionário, fibroblastos da pele, macrófagos e adipócitos brancos (Duong, 2012).

A catepsina K é uma das principais enzimas de degradação da matriz óssea (Duong, 2012). Esse processo de degradação exacerbado, gerado pela desregulação da expressão da catepsina K leva a uma osteopatia denominada osteoporose. A principal característica da osteoporose é a perda óssea mediada pelos osteoclastos e a insuficiente reconstrução da matriz óssea pelos osteoblastos, gerando ossos frágeis (Brömme e Lecaille, 2009). Além disso, há relatos do envolvimento da catepsina K em processos de desenvolvimento de tumores, apresentando superexpressão em tumores ósseos, sarcomas, carcinoma, glioma, melanoma entre outros (Verbovšek *et al.*, 2015).

O uso de inibidores cisteíno-peptidases é avaliado como um novo tratamento para osteopatias, incluindo a osteoporose (Duong, 2012); (Mukherjee e Chattopadhyay, 2016); (Ohmae *et al.*, 2017).

1.3.3. Catepsina L humana

A catepsina L possui majoritariamente atividade de endopeptidase, com preferência de aminoácidos aromáticos na posição P2 do substrato. A catepsina L é sintetizada como preproenzima de 333 aminoácidos (Rawlings e Salvesen, 2013).

A superexpressão da catepsina L está relacionada à patogênese da aterosclerose e também à aneurisma da aorta abdominal (Liu *et al.*, 2006). Além disso, a catepsina L está relacionada à angiogênese tumoral do câncer de mama, e a inibição da atividade enzimática pelo inibidor KGP94 demonstrou uma significativa redução das propriedades angiogênicas (Sudhan *et al.*, 2016).

1.3.4. Catepsina S humana

A catepsina S é uma endopeptidase que não apresenta atividade de exopeptidase detectada. Possui preferência por aminoácidos ramificados na posição P2 e P1' do substrato, de forma similar à catepsina K e L e é sintetizada como uma preproenzima de 331 aminoácidos (Rawlings e Salvesen, 2013).

A catepsina S apresenta atividade colagenolítica e elastinolítica (Xin *et al.*, 1992). Além disso, está envolvida em diversas doenças degenerativas como o Alzheimer (Munger *et al.*, 1995). Estudos realizados por (Taleb *et al.*, 2006) mostraram que a catepsina S degrada vários componentes da matriz extracelular, é produzida em células adiposas humanas e está associada à obesidade. (Sevenich *et al.*, 2014) reportaram que a expressão da catepsina S está relacionada ao aumento da metástase de câncer de mama para câncer no cérebro e que a inibição desta catepsina ao longo da doença pode evitar a metástase. Além disso, a atividade da catepsina S aumenta com a progressão da doença renal crônica, de forma que pode ser alvo terapêutico para prevenir complicações cardiovasculares decorrentes da doença (Steubl *et al.*, 2017).

1.4. Legumaínas de plantas

Legumaínas são também chamadas de enzimas de processamento vacuolar (Hara-Nishimura *et al.*, 1991). São sintetizadas no retículo endoplasmático, como precursor inativo, e transportadas até os vacúolos onde ocorre a ativação pela clivagem dos pró-peptídeos (Hiraiwa *et al.*, 1999); (Kuroyanagi *et al.*, 2002). Legumaínas estão relacionadas com a mobilização de proteínas de reserva durante a germinação de sementes, senescência, condições de estresse e morte celular programada em resposta ao ataque de patógenos (Müntz e Shutov, 2002); (Zakharov *et al.*, 2004). Além disso, as legumaínas também atuam na ativação de proenzimas da família das papaínas (Okamoto e Minamikawa, 1999); Müntz e Shutov, 2002). A CaneLeg, legumaína de cana-de-açúcar, possui 488 aa, contendo peptídeo sinal e propeptídeos C-terminal e N-terminal e está relacionada à resposta da cana-de-açúcar ao estresse mediado por ABA (ácido abscísico) (Santos-Silva *et al.*, 2012).

1.5. Cistatinas

As cistatinas são inibidores *tight-binding* e competitivos da atividade de cisteíno-peptidases, principalmente da família da papaína (Barrett *et al.*, 1986; Barrett, 1987). O nome cistatina foi dado originalmente por Barret (1981) a um inibidor de cisteíno-peptidase isolado da clara do ovo de galinha.

As cistatinas atuam como pseudosubstratos, bloqueando o acesso do substrato ao sítio ativo de cisteíno-peptidases (Turk e Bode, 1991). A superfamília de cistatinas compartilham três domínios conservados: presença de uma glicina conservada na região N-terminal, QxVxG no *loop* central e prolina-triptofano (PW) ou leucina-triptofano (LW). Os dois últimos se localizam no primeiro e segundo *loop* entre as folhas β da estrutura terciária (Bode *et al.*, 1988) (Turk e Bode, 1991) (Figura 32). Os domínios C-terminal e central interagem com o sítio ativo e N-terminal não interage, porém contribui para a ligação da cistatina à peptidase (Turk *et al.*, 1997).

A estrutura das cistatinas é composta principalmente por cinco folhas β antiparalelas organizadas ao redor uma α -hélice central de cinco voltas e da α -hélice e um segmento de geometria α -helicoidal parcial (Turk e Bode, 1991 Benchabane *et al.*, 2010) (Figura 32).

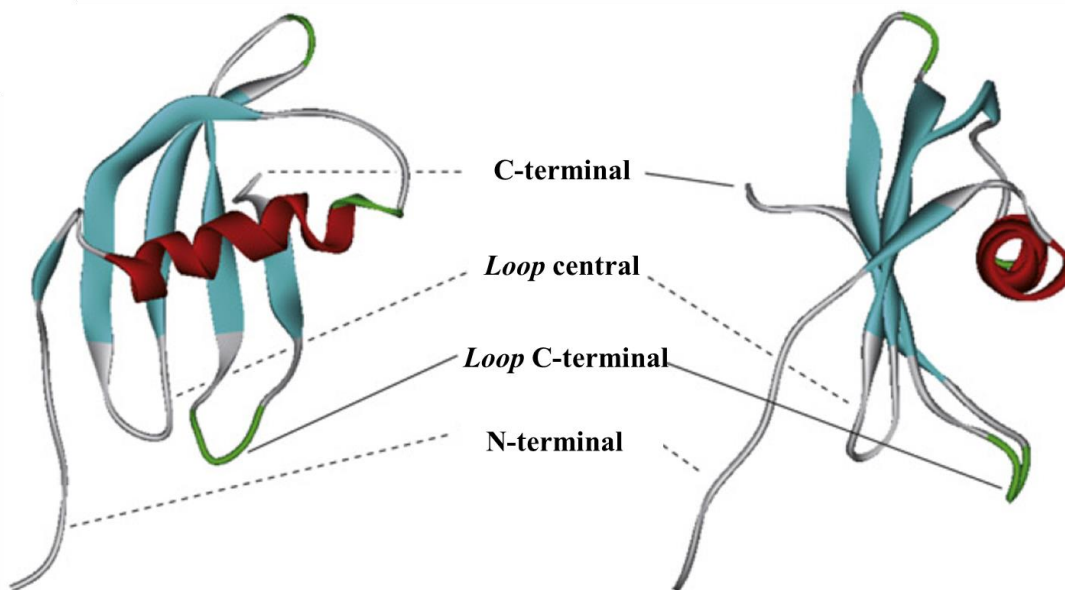


Figura 32: Modelo estrutural da orizacistatina. Adaptado de Benchabane *et al.*, 2010.

Os domínios e estrutura conservados entre cistatinas de animais e plantas sugere um mecanismo de inibição conservado de cistatinas de plantas e animais (Benchabane *et al.*, 2010). A inibição se dá pela interação entre as três regiões conservadas das cistatinas e a cisteíno-peptidase. A glicina da região N-terminal interage com o subsítio S2 em uma conformação que não permite a clivagem e os domínios QxVxG e W interagem com os subsítios S1' e S2' da enzima (Turk e Bode, 1991; Benchabane *et al.*, 2010).

As cistatinas são agrupadas em três famílias de origem animal e uma de origem vegetal, que foi descrita, posteriormente às demais, por (Margis *et al.*, 1998). A primeira é a das estefinas, contendo proteínas de aproximadamente 11 kDa e que se distinguem das demais pela ausência de ligações dissulfeto. As proteínas da família das cistatinas possuem aproximadamente 13 kDa e apresentam duas pontes dissulfeto na região C-terminal. A terceira é a dos cininogênios, cujas proteínas exibem cadeia simples, com nove ligações dissulfeto e elevada massa molecular (60 a 120 kDa) (Turk e Bode, 1991; Benchabane *et al.*, 2010). A família das fitocistatinas (cistatinas de plantas) possui proteínas que podem apresentar massa molecular de até 87 kDa (Siqueira-Júnior *et al.*, 2002).

1.6. Fitocistatinas

Fitocistatinas estão relacionadas com a regulação de peptidases tanto endógenas, participando de processos relacionados à morte celular programada, senescência, crescimento e desenvolvimento da planta, maturação de sementes, tolerância a estresse biótico e abiótico (Benchabane *et al.*, 2010) (Kunert *et al.*, 2015) quanto exógenas, por meio da inibição de cisteíno-peptidases de insetos, nematoides e outros patógenos (Benchabane *et al.*, 2010) (Martinez *et al.*, 2016).

As fitocistatinas geralmente apresentam a sequência ([LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-X-[EDQV]-[HYFQ]-N que as diferencia dos outros grupos de cistatinas (Margis *et al.*, 1998). Estão divididas em três grupos, de acordo com a massa molecular e relação evolutiva. O grupo I apresenta cistatinas de baixa massa molecular – 12-16 kDa, com apenas um domínio inibitório do tipo cistatina, que inibem a atividade de cisteíno-peptidases da família C1A. O grupo II apresenta proteínas de aproximadamente 23 kDa, que possuem uma extensão da região carboxi-terminal e são capazes de inibir peptidases da família das legumainas (C13). O grupo III compreende proteínas de aproximadamente 80 kDa, denominadas multicistatinas, caracterizadas por domínios inibitórios do tipo cistatina repetidos (Margis *et al.*, 1998; Margis-Pinheiro *et al.*, 2008).

As cistatinas de plantas são a segunda classe de inibidores naturais de peptidases mais estudadas e têm sido caracterizadas a partir de várias espécies de plantas, incluindo arroz - *Oryza sativa* L. japônica (Abe *et al.*, 1987), soja - *Glycine max* (Misaka *et al.*, 1996), batata - *Solanum tuberosum* (Waldron *et al.*, 1993), milho – *Zea mays* (Abe *et al.*, 1995), abacate - *Persea americana* Mill (Kimura *et al.*, 1995), girassol - *Helianthus annuus* (Kouzuma *et al.*, 1996), cenoura - *Daucus carota* L. (Ojima *et al.*, 1997), trigo - *Triticum aestivum* (Kuroda *et al.*, 2001), castanha - *Castanea dentata* (Connors *et al.*, 2002), maçã - *Malus domestica*/var. Royal Gala (Ryan *et al.*, 2003), morango – *Fragaria xananassa* cv. Elsanta (Martinez *et al.*, 2005), arabidopsis - *Arabidopsis thaliana* (Hwang *et al.*, 2009), abacaxi - *Ananas comosus* (Irene *et al.*, 2012), cevada (Martinez *et al.*, 2009), cana-de-açúcar (Soares-Costa *et al.*, 2002); (Gianotti *et al.*, 2006); (Gianotti *et al.*, 2008); (Santiago *et al.*, 2017), dentre outras.

1.6. *Citrus*

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, ordem Sapindales, é nativo do sudeste da Ásia. No Brasil, as espécies cítricas foram trazidas pelos portugueses, provavelmente a partir de 1530 (Donadio *et al.*, 2005).

A citricultura brasileira é uma das mais importantes atividades agrícolas para a economia nacional. O Brasil é hoje o maior produtor de laranja do mundo e o maior exportador de suco de laranja (USDA, 2018). A área de cultivo de laranja estimada da safra 2017/2018 é de 415 232 ha e produção de aproximadamente 385,2 milhões de caixas, de 40,8 kg cada (Fundecitrus, 2017). No Brasil, o estado de São Paulo e nos EUA, o estado da Flórida, compreendem as regiões de destaque mundial na produção de laranja (Neves et al., 2010).

As frutas cítricas têm um papel de destaque na agricultura mundial, tendo o maior volume de produção entre as frutas cultivadas. Mas apesar de o Brasil liderar a produção de *Citrus* no mercado mundial, os pomares de *Citrus* são constantemente atacados por diversas pragas e patógenos, que causam sérios danos às plantas e, conseqüentemente, uma queda na produtividade vem ocorrendo nos últimos anos em função destes. Pode-se citar a Gomose, causada pelo fungo *Phytophthora* spp (Graham et al., 1998), tristeza dos *Citrus* causada pelo vírus CTV (Bar-Joseph et al., 1989), Cancro Cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* (Graham et al., 2004), Clorose Variegada dos *Citrus* (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, disseminada pelas cigarras da família *Cicadellidae* (Lee et al., 1993) e o Huanglongbing (HLB) ou Greening, que é uma doença bacteriana recente no continente americano (Bové, 2006), porém tornou-se a mais preocupante, devido à velocidade de disseminação e ausência de medidas eficientes de controle (Bové, 2006).

No âmbito científico, as pesquisas têm se voltado cada vez mais para o sequenciamento do genoma de espécies de *Citrus* (Xu et al., 2013; Jiao et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2014) a fim de gerar dados que possam ser utilizados para o controle de doenças, melhoramento de características de interesse para o setor comercial e pesquisa básica. Estes dados estão incluídos na plataforma Phytozome 12 e na plataforma *Citrus sinensis* Annotation Project. A plataforma Phytozome, por exemplo, possui mais de 300 sequências de cistatinas de plantas e 706 sequências de cisteíno-peptidases da família C1 (Van Wyk et al., 2016).

2. OBJETIVOS

Caracterização de cistatinas de *Citrus* por meio da expressão, purificação e estudos de inibição in vitro de cisteíno-peptidases, com os seguintes objetivos específicos:

- Identificação de sequências que codificam cistatinas de *Citrus*;
- Amplificação das ORFs das cistatinas;

- Clonagem no vetor de expressão pET28a;
- Expressão das proteínas em células de *Escherichia coli*;
- Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade;
- Ensaio de inibição de cisteíno-peptidases por cistatinas de *Citrus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análises *in silico* das sequências das cistatinas de *Citrus*

A partir dos dados de sequenciamento do genoma depositados em bancos de dados da plataforma *Citrus sinensis* Annotation Project (<http://Citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>), College of Horticulture and Forestry Science & Center for Bioinformatics, Huazhong Agricultural University e também dados depositados na plataforma Phytozome 12 (<http://www.phytozome.net/>), *Department of Energy's Joint Genome Institute and the Center for Integrative Genomics* foram realizadas buscas para a identificação de cistatinas de *Citrus*. As buscas foram realizadas utilizando a palavra-chave *cystatin*, selecionando-se as espécies *Citrus clementina* e *Citrus sinensis*. Os critérios utilizados para a seleção das sequências foram: presença de códon de iniciação e códon de terminação e a presença de três regiões características das cistatinas: glicina-glicina conservados na região N-terminal, QxVxG no *loop* central e prolina- triptofano conservado na região C-terminal (Bode *et al.*, 1988); (Turk e Bode, 1991). Foram escolhidas cinco cistatinas para caracterização, que correspondem às sequências de aminoácidos que apresentam menor identidade comparando-se as cistatinas identificadas. Além disso, foram realizadas análises de peptídeo sinal utilizando o programa SignalP 4.1 (Nielsen, 2017) e a predição de massa molecular foi realizada utilizando o programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). O alinhamento entre as sequências das cistatinas foi realizado utilizando o programa Multalin, com os parâmetros de valor máximo de consenso de 90% e valor mínimo de consenso de 50% (Corpet, 1988). O índice de identidade entre aminoácidos das sequências das cistatinas caracterizadas e sequências de cistatinas de outras plantas foi avaliado utilizando a ferramenta BLASTP (Altschul *et al.*, 1997).

3.2. Extração de RNA de folhas de *Citrus* e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de folhas de *Citrus clementina* utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, por uma etapa adicional de lavagem do RNA com etanol 70%. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio a partir do padrão do RNA ribossomal, ou seja, a presença das bandas 28S e 18S e ausência de rastros de degradação. A pureza foi verificada pela leitura em espectrofotômetro Nanodrop – 1000 (Thermo Fisher Scientific) considerando as razões 260/280 e 260/230. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) e 100 pmol de oligodT20V de acordo com as instruções do fabricante.

3.3. Amplificação das ORFs que codificam cistatinas de *Citrus* e clonagem em vetor de propagação

Os fragmentos de cDNA que codificam as cistatinas de *Citrus clementina* *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* sem a presença da região codante do peptídeo sinal foram amplificadas por PCR. Sítios de restrição para as enzimas *Nde* I e *Eco*RI ou *Nde* I e *Not* I foram inseridos nos *primers* (Tabela 4). A PCR foi realizada em volume final de 50 µl utilizando 5 µL de cDNA, 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, tampão de reação 1x, 10 pmol de cada *primer* e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific). A ciclagem utilizada foi de [1x] 94 °C por 3 min, [35x] 1 min a 94 °C, 1 min a 48-50°C, 1 min a 72°C e [1x] 10 min a 72 °C.

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados para amplificar a região gênica das ORFs de *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3*.

<i>CclemCPI-1 Forward</i>	5' CATATGTATGATCGTTTAGTGGGAGGG 3'
<i>CclemCPI-1 Reverse</i>	5' GCGGCCGCTCACTCGGAAGGGGCAA 3'
<i>CclemCPI-2 Forward</i>	5' CATATGGGCGACCGTAAAGGAACG 3'
<i>CclemCPI-2 Reverse</i>	5' GAATTCCTATTTAACAAAAGGCTTAAACG 3'
<i>CclemCPI-3 Forward</i>	5' CATATGGCCCGTACAGACGCCG 3'
<i>CclemCPI-3 Reverse</i>	5' GAATTCTCACTCTTGATCTTGTGCA 3'

Os produtos de amplificação correspondentes ao tamanho esperado de cada cistatina foram purificados com o kit *Wizard Sv Gel* e *PCR Clean Up System* (Promega) e clonados no

vetor pGEM-T Easy (Promega). A reação de ligação (pGEM-T + ORF) contou com 55 ng de plasmídeo pGEM-T, 1U da enzima T4 DNA ligase, tampão da enzima 1x, 50 ng de DNA, em volume final de 10 µl. A reação foi mantida durante 16 horas a 4°C. A reação de ligação foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5-α (Sambrook e Russell, 2001). Os clones bacterianos contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB ágar, 100 µg/mL do antibiótico ampicilina, 0,4 mM de IPTG e 20 mg/mL de X-Gal. A partir dos clones bacterianos recombinantes selecionados seguiu-se com a purificação do DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001).

3.3.1- Obtenção das ORFS das cistatinas de *Citrus sinensis* *CsinCPI-1* e *CsinCPI-2*

As ORFs codantes para as cistatinas de *Citrus sinensis* *CsinCPI-1* e *CsinCPI-2* foram sintetizadas pela empresa Epoch Life Science e clonadas em vetor pBluescript II SK sem a região codante para o peptídeo sinal.

3.4. Construção do vetor de expressão

As construções pGEM-T_*CclemCPI-2*, pGEM-T_*CclemCPI-3*, pBluescript*CsinCPI-1* e pBluescript*CsinCPI-2* foram digeridas com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco* RI (Reação: plasmídeo (4 µg); enzima *Nde* I (10 U); *Eco* RI (10 U); tampão O (1x), em volume final de 50 µL e incubação a 37°C por 4 horas e a construção pGEM-T_*CclemCPI-1* digerida com as enzimas *Not* I e *Eco* RI (Reação: pGEM-T_*CclemCPI-1* (4 µg); enzima *Not* I (10 U); enzima *Eco* RI (10 U); tampão O (1x), em volume final de 50 µL e incubação a 37°C por 4 horas para liberação dos fragmentos de interesse correspondentes às cistatinas e posterior clonagem direcional no vetor de expressão pET28a, previamente digerido com as mesmas enzimas.

O vetor de expressão pET28a (Novagen) têm sido utilizado de forma eficiente para a expressão de cistatinas em células de *E. coli* (Soares-Costa *et al.*, 2002) Gianotti (Gianotti *et al.*, 2006) (Santiago *et al.*, 2017). Dessa forma, este vetor foi utilizado para subclonar o cDNA das cistatinas de *Citrus* em fusão com uma cauda que codifica para seis resíduos de histidina da porção N-terminal, que será importante para o posterior processo de purificação das cistatinas recombinantes por cromatografia de afinidade em resina contendo níquel.

A reação de ligação (pET28a + ORF) contou com 70 ng de plasmídeo pET28a, 50 ng de fragmento, 1U de T4 DNA ligase, tampão da enzima 1x, em volume final de 10 µL e

incubação por 16 h a 4 °C. A reação de ligação foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α (Sambrook e Russell, 2001). Os clones bacterianos contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB ágar e 25 μ g/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado pelo método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001).

As construções pET28a_ *Csin*CPI-1, pET28a_ *Csin*CPI-2, pET28a_ *Cclem*CPI-1, pET28a_ *Cclem*CPI-2 e pET28a_ *Cclem*CPI-3 foram sequenciadas no MegaBACE 1000 com o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare). Os plasmídeos recombinantes foram então utilizados para transformar células quimiocompetentes de *E. coli*, linhagem Rosetta DE3, de acordo com (Sambrook e Russell, 2001). Os clones bacterianos foram selecionados em placas de Petri contendo meio LB ágar com adição de 25 μ g/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol.

3.5. Expressão das cistatinas recombinantes em células de *E. coli*

O sistema de expressão pET é um sistema eficiente para a expressão de proteínas em *E. coli*. Os genes de interesse são clonados sob controle transcricional do promotor do bacteriófago T7. A cepa Rosetta DE3 (Novagen) possui em seu genoma o fragmento DE3 que codifica a RNA polimerase do bacteriófago T7, e a sua expressão é induzida por IPTG. Dessa forma, as moléculas de RNA polimerase ligam-se ao promotor T7, ativando a expressão do gene de interesse. Além disso, a cepa Rosetta DE3 possui um plasmídeo que fornece tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA que são raramente utilizados em *E. coli* aumentando o nível de expressão das proteínas de interesse, em especial as proteínas eucarióticas (Novagen, 2003).

Os clones de *E. coli* Rosetta DE3 contendo o vetor de expressão (pET28a + ORF) foram cultivados em 7,5 mL de meio LB líquido contendo 25 μ g/mL dos antibióticos cloranfenicol e canamicina, com incubação a 37 °C, 200 rpm, por 16 horas. Após, foi realizada uma diluição 1:100 em 500 mL de meio LB líquido contendo 25 μ g/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol. A cultura foi incubada sob agitação de 200 rpm a 37°C até atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0,4 - 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Neste momento, foi retirada uma alíquota de 1 mL da cultura, caracterizando a amostra controle sem induzir. Em seguida, acrescentou-se IPTG (Isopropyl β -D-1-

thiogalactopyranoside) para uma concentração final de 0,4 mM e a cultura foi novamente incubada a 37°C, 200 rpm. Após 4 horas de indução, uma alíquota de 1 mL foi retirada, caracterizando a amostra induzida e as células foram coletadas por centrifugação a 7800 rpm por 10 minutos. As amostras correspondentes ao controle sem indução e amostra induzida foram analisadas em SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3.6. Lise bacteriana e teste de solubilidade

Para a lise do precipitado bacteriano foi ressuspenso em 25 mL de tampão de lise pH 8,0 (NaCl 100mM, NaH₂PO₄ 50 mM e Tris-base 10 mM). A amostra foi submetida à lise celular por sonicação, com seis pulsos com duração de 1 minuto e intervalos de pausa de 30 segundos, em amplitude de 20% em sonicador Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific). A separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado) do lisado foi realizada por centrifugação a 7800 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi filtrado em membranas com poro de 0,44 µm (Millipore). As amostras correspondentes ao precipitado e sobrenadante foram analisadas em SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3.7. Purificação das cistatinas recombinantes

A purificação das proteínas de interesse foi realizada em um único passo em cromatografia de afinidade ao níquel. Na cromatografia de afinidade utiliza-se uma matriz contendo um ligante metálico que interage especificamente com a proteína de interesse, de forma que esta se ligue à coluna num primeiro momento, enquanto as demais proteínas são eluídas. Posteriormente, a proteína alvo é eluída da matriz por meio de alteração no pH, força iônica, ou pelo uso de um competidor (Porath *et al.*, 1975; Winzerling *et al.*, 1992).

Como ressaltado anteriormente, as proteínas foram expressas em fusão com a cauda de histidinas do vetor pET28a, para permitir a imobilização da proteína recombinante em resina contendo níquel (Ni²⁺), por meio da alta afinidade da histidina por este íon. Dessa forma, as proteínas de interesse permaneceram imobilizadas, ligadas aos íons de Ni²⁺ e as demais proteínas foram eluídas. A eluição da proteína de interesse foi realizada pela adição do competidor imidazol em concentrações crescentes.

O sobrenadante do lisado celular filtrado foi passado por uma coluna contendo 3 mL de resina de níquel Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com 9 mL de tampão de lise pH 8,0 (NaCl 100mM, NaH₂PO₄ 50 mM e Tris-base 10 mM). A resina foi então lavada com 9

mL de tampão de lise pH 8,0 e seguiu-se com a eluição das proteínas em 3 mL de tampão de lise pH 8,0 contendo concentrações crescentes de imidazol – 2x: 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM e 3x: 1 M. As frações eluídas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 15%, segundo Laemmli, 1970.

As frações contendo as proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas em membranas *SnakeSkin Dialysis Tubing* (Thermo Fisher Scientific) de 3500 MWCO em tampão PBS pH 7,4 a 4 °C. A concentração das proteínas purificadas foi determinada utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

3.8. Ensaio de inibição de atividade de cisteíno-peptidases utilizando as cistatinas de *Citrus*

Os ensaios de inibição de cisteíno-peptidases por cistatinas foram realizados no Laboratório de Enzimologia, no Departamento de Biofísica da UNIFESP, em colaboração com a Profa. Dra. Adriana Karaoglanovic Carmona, Prof. Dr. Ivarne Luís dos Santos Tersariol e da aluna de doutorado Taíse Fernanda da Silva Ferrara.

As cistatinas de *Citrus* recombinantes foram utilizadas em ensaios de inibição de atividade enzimática de catepsinas humanas *in vitro*. As enzimas utilizadas no ensaio foram: catepsina B (EC 3.4.22.1) - R&D Systems, catepsina L (EC 3.4.22.15) - R&D Systems, catepsina K (EC 3.4.22.38) - Sigma-Aldrich e catepsina S (EC 3.4.22.27) - R&D Systems. As enzimas descritas estão relacionadas a diversos processos fisiológicos e doenças, como reabsorção da matriz óssea e remodelação óssea, *turnover* proteico, câncer, artrite reumatoide, osteoporose, aterosclerose, doença de Alzheimer, entre outros (Drake *et al.*, 1996); (Schechter e Ziv, 2011); (Pišlar e Kos, 2014); (Kos *et al.*, 2014) (Panwar *et al.*, 2016). Além disso, o potencial inibitório das cistatinas de *Citrus* foi avaliado também na inibição da atividade enzimática das enzimas papaína (Sigma-Aldrich) e *CaneLeg*, uma cisteíno-peptidase de cana-de-açúcar (Santos-Silva *et al.*, 2012).

A atividade enzimática foi determinada pela hidrólise do substrato fluorescentes Z-Phe-Arg-AMC (Calbiochem) para as catepsinas B, L, S, K e papaína e o substrato Z-Ala-Ala-Asn-AMC (Calbiochem) para a enzima *CaneLeg*. O ensaio foi monitorado utilizando espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301PC para medir a emissão de fluorescência após hidrólise dos substratos em comprimentos de onda de excitação setado em 380 nm e comprimento de onda de emissão setado em 460 nm. A concentração molar das enzimas

(catepsinas B, K, L, S e papaína) foi determinada por titulação do sítio ativo, utilizando o inibidor irreversível E-64 (Barrett et al., 1982). A concentração molar da enzima *CaneLeg* foi determinada por titulação do sítio ativo utilizando o inibidor de cisteíno-peptidase de *Citrus CclemCPI-3*.

Os ensaios foram realizados em cubetas de quartzo contendo enzima (catepsina B (318,84 nM), catepsina L (1,69 µM), catepsina K (266,91 nM), catepsina S (0,40 µM), papaína (51,24 nM), 5 mM de DTT, tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 EDTA 2,5 mM e NaCl 100 mM em volume final de 1ml. A atividade da cisteíno-peptidase *CaneLeg* foi ensaiada com 3,57 nM de enzima, 5 mM de DTT, tampão citrato-fosfato pH 6,5 (Na₂HPO₄ 138.5 mM e ácido cítrico 61.5 mM), em volume final de 1mL. Foi realizada incubação de enzima, DTT e tampão por 5 min a 37°C e, então, o substrato adicionado.

Após a leitura da velocidade inicial de hidrólise (v_o), concentrações crescentes de inibidores de cisteíno-peptidases foram adicionadas e a atividade na presença de inibidor (v_i) foi determinada. A construção do gráfico $v_i/v_o = [I]/K_{iapp}$ (regressão não-linear) e $(v_o/v_i)-1 = [I]/K_{iapp}$ (regressão linear) utilizando a equação de Morrison (Morrison, 1969) no programa GraFit (Leatherbarrow, 2001) foi realizada para o cálculo da constante de inibição aparente (K_{iapp}). O valor de K_i foi então obtido a partir da equação $K_i = K_{iapp}/(1+[S_0]/K_M)$ onde os seguintes valores de K_M foram utilizados para corrigir o valor de K_i para competição pelo substrato: 23 µM catepsina B (Cotrin et al., 2004), 3,525 µM catepsina L (Ren et al., 2012), 17,84 µM catepsina K (Ren et al., 2012), 20,8 µM catepsina S (Brömme et al., 1993), 65 µM papaína (Zucker et al., 1985) e 11,69 µM *CaneLeg* (Santos-Silva et al., 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

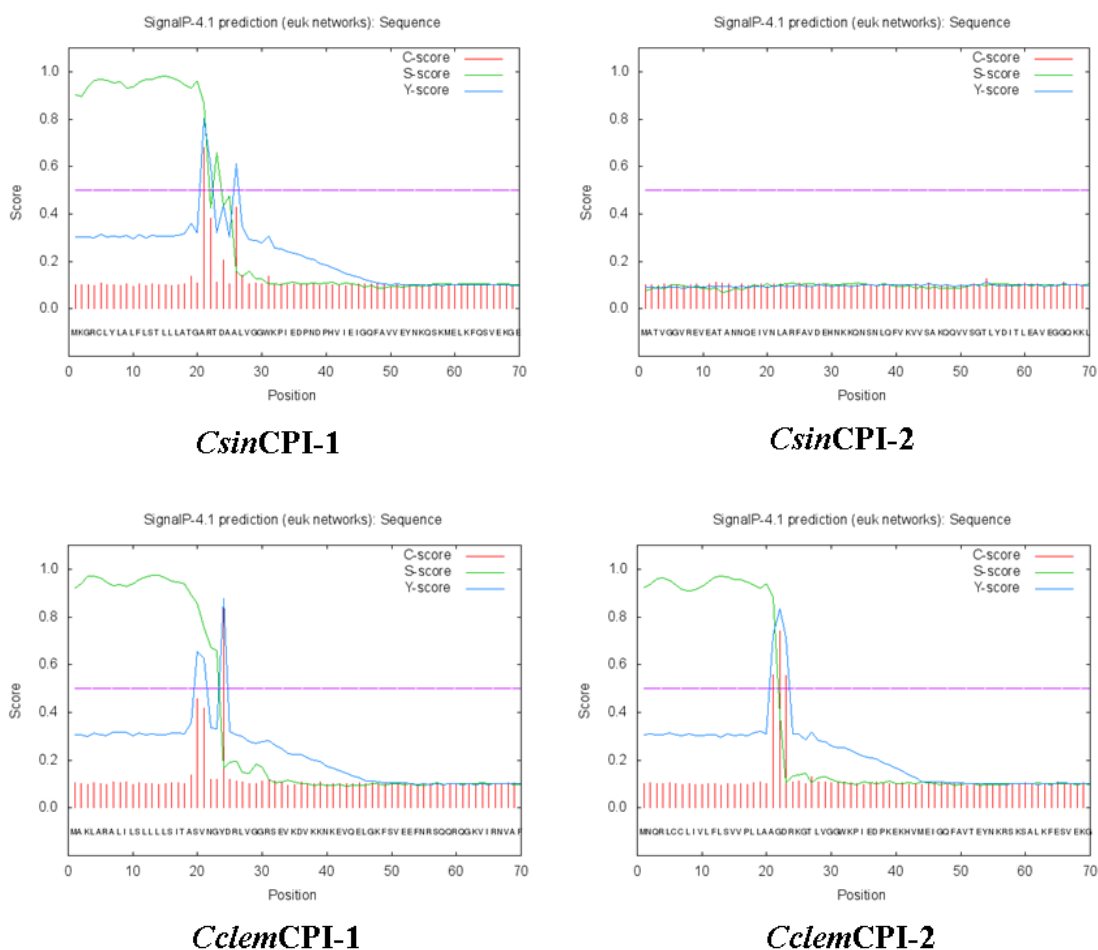
4.1. Análise *in silico* das sequências de cistatinas de *Citrus*

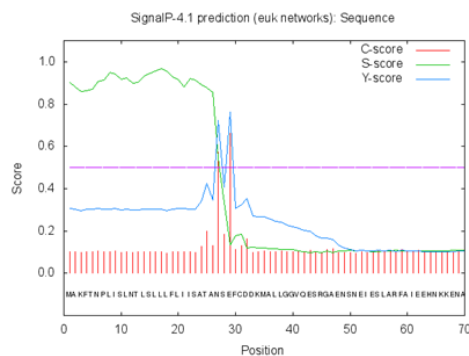
Foram identificadas 31 sequências de prováveis cistatinas entre *Citrus clementina* e *Citrus sinensis* a partir do banco de dados Phytozome e *Citrus* Hzau. A partir destes dados, foram selecionadas 5 sequências codificando diferentes cistatinas (Tabela 5) para a realização da expressão heteróloga e ensaios de inibição da atividade de cisteíno-peptidases. A tabela 5 mostra o número de acesso de cada proteína, resíduos de aminoácidos, massa molecular estimado pelo programa ProtParam e características do peptídeo sinal (resíduos de aminoácidos e região de clivagem).

Tabela 5: Características das seqüências de cistatinas de *Citrus*

Accession number	Nome	Peptídeo sinal	Número de aa	Massa Molecular (kDa)
XM_006475427.2	<i>CsinCPI-1</i>	20 aa (ATG-AR)	94	10,51
orange1.lg034261m (Phytozome)	<i>CsinCPI-2</i>	-	99	11,18
XM_006420987.1	<i>CclemCPI-1</i>	23 aa (VNG-YD)	130	12,30
XM_006449814.1	<i>CclemCPI-2</i>	21 aa (LAA-GD)	97	11,07
XM_006432305.1	<i>CclemCPI-3</i>	28 aa (ANS-EF)	207	23,38

A análise realizada utilizando o programa SignalP mostrou a presença de uma região altamente hidrofóbica na região N-terminal características de peptídeo sinal em todas as cistatinas, exceto *CsinCPI-2* (Figura 33). Dessa forma a região codante do peptídeo sinal foi excluída no momento da amplificação das ORFs.





CclemCPI-3

Figura 33: Peptídeos sinais identificados nas sequências das cistatinas CsinCPI-1, CclemCPI-1, CclemCPI-2 e CclemCPI-3. Os gráficos gerados com o programa SignalP mostram a presença de sequências com características de peptídeos sinais. O provável sítio de clivagem do peptídeo sinal é mostrado no pico vermelho. A região do peptídeo sinal, altamente hidrofóbica é mostrada em verde no gráfico.

A figura 34 mostra o alinhamento entre as sequências de aminoácidos das cistatinas de *Citrus* deste estudo, com ausência da região correspondente ao peptídeo sinal, destacando as regiões inibitórias das cistatinas e a região característica de fitocistatinas.

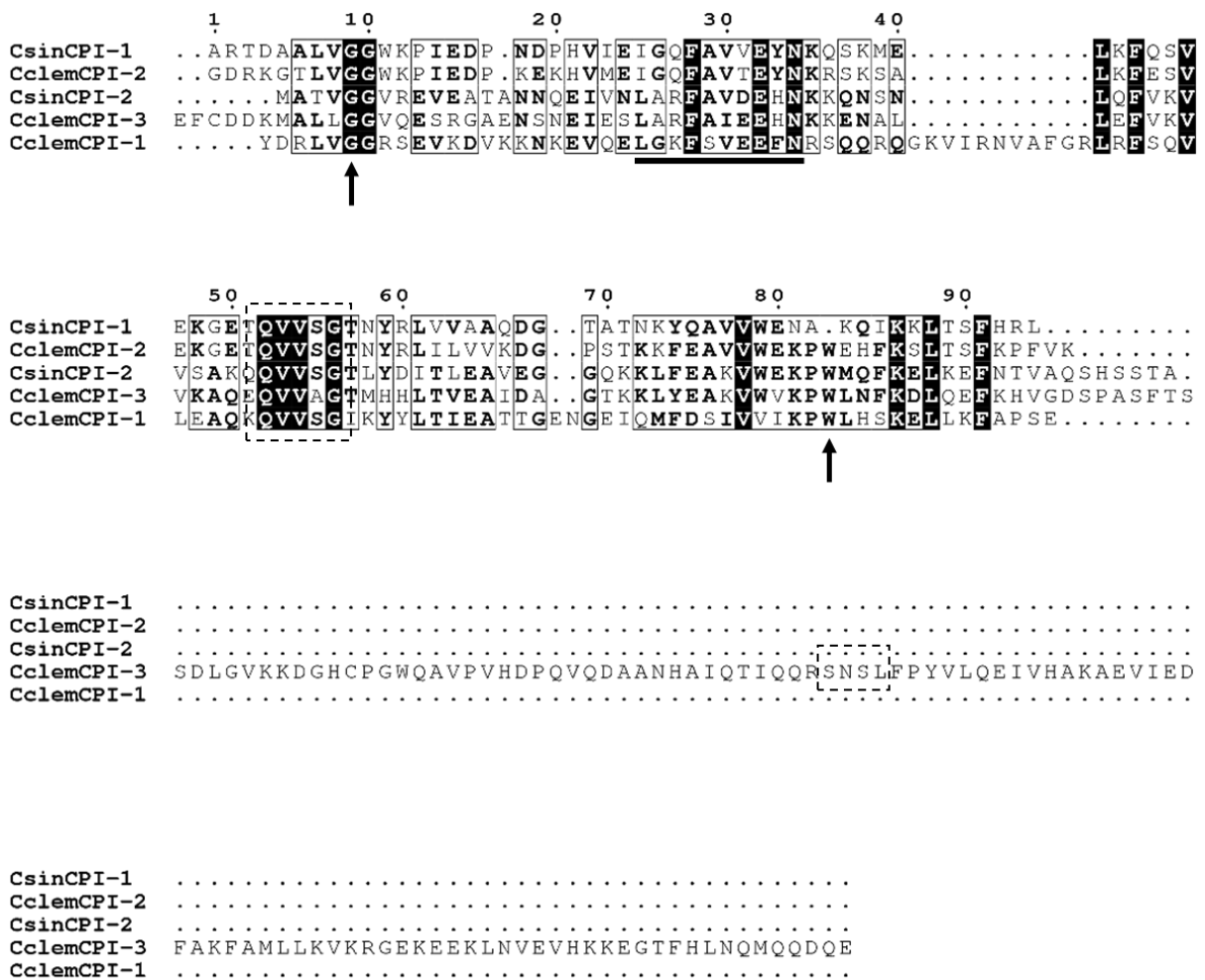


Figura 34: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das cistatinas *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3*. As regiões destacadas pelas caixas pontilhadas e as setas indicam os domínios inibitórios G, W e QVVxG das cistatinas e também o domínio SNSL de inibição de legumaínas que algumas cistatinas com extensão da região C-terminal possuem. A região sublinhada indica o motivo característico de fitocistatinas [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N.

A análise da identidade de sequências de aminoácidos entre cistatinas *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* no programa BLASTP mostrou que as proteínas apresentam identidade máxima de 68% (Tabela 6)

Tabela 6: Análise de identidade entre as sequências de aminoácidos das cistatinas de *Citrus*.

Identidade	<i>CsinCPI-1</i>	<i>CsinCPI-2</i>	<i>CclemCPI-1</i>	<i>CclemCPI-2</i>	<i>CclemCPI-3</i>
<i>CsinCPI-1</i>	100%	36%	32%	68%	37%
<i>CsinCPI-2</i>	36%	100%	37%	41%	56%
<i>CclemCPI-1</i>	32%	37%	100%	34%	32%
<i>CclemCPI-2</i>	68%	41%	34%	100%	38%
<i>CclemCPI-3</i>	37%	56%	32%	38%	100%

A análise da identidade de sequências de aminoácidos das cistatinas *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* no programa BLASTP mostrou que as proteínas apresentam identidade de 59% a 77% com sequências de aminoácidos de cistatinas de outras plantas disponíveis no banco de dados do NCBI e as sequências de maior identidade estão listadas nas tabelas 7, 8, 9, 10 e 11.

Tabela 7: Identidade entre a sequência de aminoácidos de *CsinCPI-1* e cistatinas de outras plantas

Organismo	Identidade	Genbank accession number
<i>Manihot esculenta</i>	62%	XP_021622544.1
<i>Juglans regia</i>	65%	XP_018838679.1
<i>Durio zibethinus</i>	66%	XP_022721053.1
<i>Aquilegia coerulea</i>	60%	PIA38365.1

Tabela 8: Identidade entre a sequência de aminoácidos de *CsinCPI-2* e cistatinas de outras plantas

Organismo	Identidade	Genbank accession number
<i>Trema orientalis</i>	65%	POO01509.1
<i>Boehmeria nivea</i>	67%	ALG38347.1
<i>Manihot esculenta</i>	62%	XP_021604509.1
<i>Parasponia andersonii</i>	64%	PON74094.1

Tabela 9: Identidade entre a sequência de aminoácidos de *ClemCPI-1* e cistatinas de outras plantas

Organismo	Identidade	Genbank accession number
<i>Trema orientalis</i>	69%	PON95535.1
<i>Parasponia andersonii</i>	68%	PON33441.1
<i>Cephalotus follicularis</i>	65%	GAV64583.1
<i>Morus notabilis</i>	59%	XP_010101112.1

Tabela 10: Identidade entre a sequência de aminoácidos de *ClemCPI-2* e cistatinas de outras plantas

Organismo	Identidade	Genbank accession number
<i>Morus alba</i>	65%	AJD79055.1
<i>Momordica charantia</i>	70%	XP_022142402.1
<i>Morus notabilis</i>	63%	XP_010094696.1
<i>Juglans regia</i>	63%	XP_018838679.1

Tabela 11: Identidade entre a sequência de aminoácidos de *ClemCPI-3* e cistatinas de outras plantas

Organismo	Identidade	Genbank accession number
<i>Quercus suber</i>	77%	POE70821.1
<i>Tarenaya hassleriana</i>	77%	XP_010520100.1
<i>Corchorus olitorius</i>	77%	OMO86051.1
<i>Cicer arietinum</i>	76%	XP_004511090.1

Para uma melhor análise das características da sequência de aminoácidos das cistatinas de *Citrus* foi realizado um alinhamento dessas proteínas com outras cistatinas de plantas. Verificou-se uma alta similaridade entre os domínios conservados de cistatinas e o motivo característico das fitocistatinas - [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N (Figura 35).

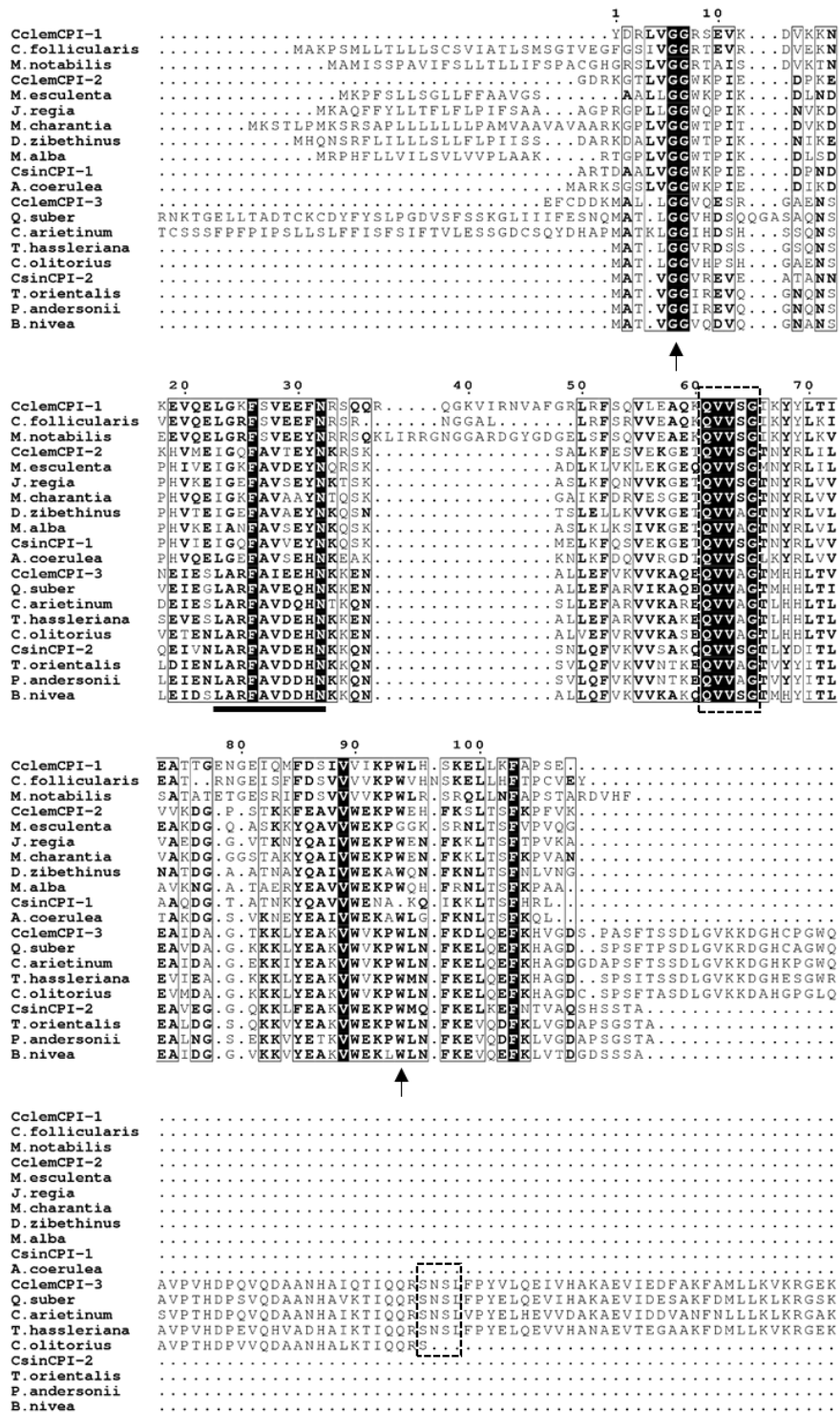


Figura 35: Alinhamento da sequência de aminoácidos das cistatinas *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *ClemCPI-1*, *ClemCPI-2* e *ClemCPI-3* com sequências de aminoácidos de cistatinas de outras plantas. As regiões destacadas pelas caixas pontilhadas e as setas indicam o domínio inibitório G, W e QVVxG das cistatinas e também o domínio NSL de inibição de legumainas que algumas cistatinas com extensão da região C-terminal possuem. A região sublinhada indica o motivo característico de fitocistatinas [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N.

4.2. Análise de pureza e integridade do RNA extraído de folhas de *Citrus clementina*

O RNA total isolado a partir de folhas de *Citrus clementina* mostrou-se íntegro, como pode-se observar na figura, com a presença de bandas de RNA ribossomal 28S e 18S bem definidas e ausência de rastros de degradação (Figura 36) e puro, com razões $260/280 = 2,00$ e $260/230 = 1,86$.

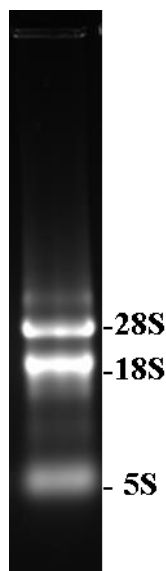


Figura 36: Análise de integridade do RNA total isolado de folhas de *Citrus clementina* por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

4.3. Amplificação das ORFs que codificam as cistatinas de *Citrus clementina*

As ORFs correspondentes às cistatinas de *Citrus clementina* foram obtidas por PCR e a análise dos produtos de amplificação mostrou a presença de bandas de tamanho esperado de 324, 294 e 624 pb, correspondentes à *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* (Figura 37).

4.4. Ensaios de expressão heteróloga e purificação das cistatinas recombinantes

As cistatinas de *Citrus* foram expressas de forma recombinante em células de *E. coli* linhagem Rosetta (DE3) e purificadas por cromatografia de afinidade. As análises de expressão e purificação foram realizadas em SDS-PAGE 15% (Laemmli, 1970) (Figura 38).

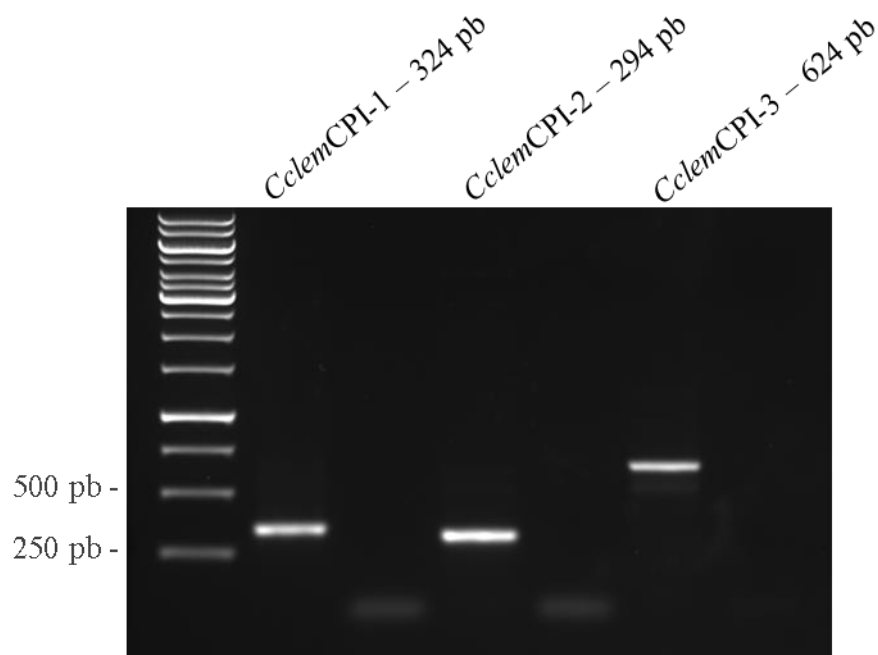


Figura 37: Amplificação das ORFs das cistatinas de Citrus. M: marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen) 1: amplificação do fragmento de 324 pb correspondente a ORF *CclemCPI-1*, 2: Controle de amplificação negativo, 3: amplificação do fragmento de 294 pb correspondente a ORF *CclemCPI-2*, 4: Controle de amplificação negativo, 5: amplificação do fragmento de 624 pb correspondente a ORF *CclemCPI-3*, 6: Controle de amplificação negativo.

Na figura 38 é possível visualizar a presença de bandas de tamanho esperado correspondentes às cistatinas de *Citrus*. Em 38A a banda de 12.54 kDa correspondente a proteína *CsinCPI-1*, 38B a banda de 13.34 kDa correspondente a proteína *CsinCPI-2*, 38C a banda de 14.33 kDa correspondente a proteína *CclemCPI-1*, 38D a banda de 13.09 kDa correspondente a proteína *CclemCPI-2*, 38E a banda de 25.41 kDa correspondente a proteína *CclemCPI-3*. Após o teste de solubilidade resultante da lise bacteriana foi possível verificar que as cistatinas *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* se encontram majoritariamente na fração celular solúvel (Figura 38A, 38B, 38D e 38E), exceto a proteína *CclemCPI-1*, como observado na figura 38C, coluna 3, a maior parte da proteína está presente na fração correspondente ao precipitado. O rendimento total das proteínas após a purificação em mg por litro de cultura, foi de 4,74 mg/L (*CsinCPI-1*), 9,6 mg/L (*CsinCPI-2*), 0,42 mg/L (*CclemCPI-1*), 7,71 mg/L (*CclemCPI-2*) e 1,8 mg/L (*CclemCPI-3*).

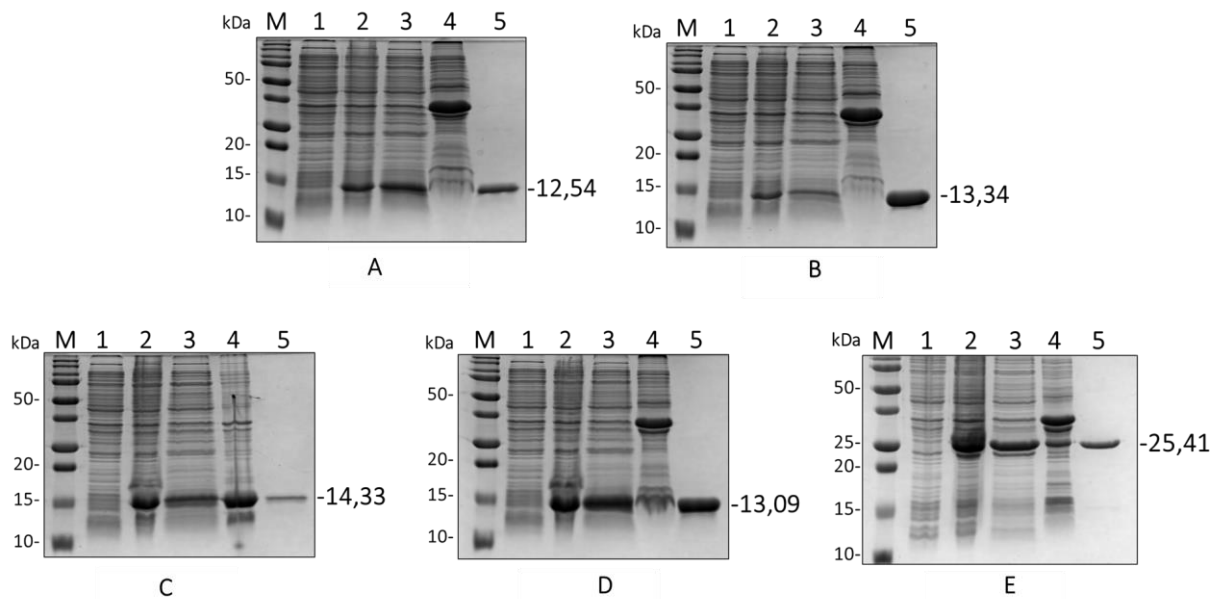


Figura 38: Análise da expressão recombinante das cistatinas de *Citrus* em células de *E.coli* e purificação. SDS-PAGE 15% das células de *E.coli* linhagem Rosetta (DE3) transformadas com as construções pET28a-CsinCPI-1(A), pET28a-CsinCPI-2(B), pET28a-CclemCPI-1(C), pET28a-CclemCPI-2(D) e pET28a-CclemCPI-3(E). A coluna (1) nas imagens (A, B, C, D e E) corresponde à cultura não induzida, sem a adição de IPTG, coluna (2) corresponde à cultura induzida, após a adição de IPTG, coluna (3) precipitado celular correspondente à fração solúvel e coluna (4) correspondente a fração insolúvel e coluna (5) frações purificadas M: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards – BioRad;

4.5. Titulação do sítio ativo das enzimas

A concentração molar das enzimas utilizadas nos ensaios de inibição com cistatinas foi de determinada por titulação do sítio ativo utilizando E-64. Utilizou-se, nos ensaios, 318,84 nM (catepsina B), 1,69 μ M (catepsina L), 266,91 nM (catepsina K), 0,40 μ M (catepsina S), 51,24 nM (papaína) e 3,57 nM (CaneLeg) (Figura 39 - anexo). A titulação do sítio ativo da *CaneLeg* foi realizada utilizando inibidor *CclemCPI-3* pois esta cistatina apresenta o domínio de inibição de legumainas SNSL na região C-terminal estendida. Além disso, o inibidor E-64 não é capaz de inibir enzimas da família C13 – das legumainas (Rawlings *et al.*, 2016).

4.6. Avaliação do potencial inibitório das cistatinas de *Citrus*

A determinação da atividade inibitória das cistatinas recombinantes de *Citrus* foi realizada a partir de ensaios de inibição de atividade de cisteíno-peptidases *in vitro*. Assim, as enzimas utilizadas para verificar o potencial inibitório das cistatinas foram as catepsinas humanas B, K, L, S, papaína e *CaneLeg*, uma cisteíno-peptidase de cana-de-açúcar, produzida em *Pichia pastoris* e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Flavio Henrique Silva da UFSCar

(Santos-Silva *et al.*, 2012). Diante da análise dos resultados, observou-se que o potencial inibitório de cada cistatina se difere de acordo com cada enzima testada (Tabela 12).

Tabela 12: Inibição da atividade enzimática da CaneLeg, catepsinas humanas B, K, L, S e papaína por cistatinas de *Citrus*

ni: não foi observada inibição na concentração de 5 mM de inibidor

Inibidor/Enzima	K _i (nM)					CaneLeg
	Catepsina B	Catepsina K	Catepsina L	Catepsina S	Papaína	
<i>CsinCPI-1</i>	230 (±28,5)	0,10 (±0,009)	0,0281 (±0,002)	8,23 (±0,17)	0,85 (±0,07)	Ni
<i>CsinCPI-2</i>	Ni	5,15 (±0,46)	0,0181 (±0,002)	0,11 (±0,005)	0,24 (±0,026)	Ni
<i>CclemCPI-1</i>	0,42 (±0,048)	0,20 (±0,008)	0,19 (±0,008)	0,29 (±0,031)	1,29 (±0,082)	Ni
<i>CclemCPI-2</i>	1,07 (±0,06)	0,0098 (±0,0004)	0,00608 (±0,0001)	0,36 (±0,01)	0,15 (±0,006)	Ni
<i>CclemCPI-3</i>	Ni	6,74 (±0,18)	0,10 (±0,004)	0,56 (±0,02)	2,42 (±0,138)	0,12 (±0,008w)

As cistatinas *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* foram capazes de inibir eficientemente a enzima papaína, que é uma enzima modelo para estudos de inibição de cisteíno-peptidases (Figura 40 - anexo), com valores de K_i de 0,85 nM, 0,24 nM, 1,29 nM, 0,15 nM e 2,42 nM, respectivamente. A capacidade inibitória das cistatinas de *Citrus* testadas com as peptidases da família das papaínas e legumaínas indicam que as cistatinas de *Citrus* recombinantes foram produzidas em sua conformação correta e comprovam que são inibidores de cisteíno-peptidases.

As cistatinas de *Citrus* mostraram alta afinidade pela catepsina L como se pode observar nos gráficos de K_{iapp} (Figura 41 - anexo) e valores de K_i na tabela 12, com K_i de 28,1 pM (*CsinCPI-1*), 18,1 pM (*CsinCPI-2*), 0,19 nM (*CclemCPI-1*), 6 pM (*CclemCPI-2*) e 0,10 nM (*CclemCPI-3*), sendo *CclemCPI-2* o inibidor mais potente contra esta enzima.

As cistatinas de *Citrus* mostraram alta afinidade pela catepsina K como se pode observar nos gráficos de K_{iapp} (Figura 42 - anexo) e valores de K_i na tabela 12, com K_i de 0,10 nM (*CsinCPI-1*), 5,15 nM (*CsinCPI-2*), 0,20 nM (*CclemCPI-1*), 0,98 pM (*CclemCPI-2*) e 6,74 nM (*CclemCPI-3*), sendo *CclemCPI-2* o inibidor mais potente contra esta enzima.

As cistatinas de *Citrus* mostraram alta afinidade pela catepsina S como se pode observar nos gráficos de K_{iapp} (Figura 43 - anexo) e valores de K_i na tabela 12, com K_i de 8,23 nM (*CsinCPI-1*), 0,11 nM (*CsinCPI-2*), 0,29 nM (*CclemCPI-1*), 0,36 nM (*CclemCPI-2*) e 0,56 nM (*CclemCPI-3*), sendo *CsinCPI-2* o inibidor mais potente contra esta enzima.

A inibição da atividade da catepsina B foi restrita aos inibidores *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CsinCPI-1* (Figura 44 - anexo) e valores de K_i na tabela 12, com K_i de 0,42 nM, 1,07 nM e 230 nM, sendo que *CclemCPI-3* e *CsinCPI-2* não inibem a atividade desta enzima.

Essa capacidade inibitória restrita das cistatinas frente à catepsina B é explicada pela presença de um *loop* de oclusão que bloqueia a fenda do sítio ativo desta enzima (Musil *et al.*, 1991), que reflete em valores altos de K_i para a maior parte das cistatinas. A inibição da catepsina B por cistatinas ocorre em duas etapas, onde a interação inicial ocorre com a ligação da região N-terminal, gerando uma mudança conformacional onde o *loop* de oclusão é deslocado pelo inibidor, desobstruindo o sítio ativo, para que ocorra a inibição (Nycander *et al.*, 1998; Pavlova *et al.*, 2000). A importância da região N-terminal das fitocistatinas no mecanismo de inibição de cisteíno-peptidases foi confirmada pelos estudos de (Urwin *et al.*, 1995; Doi-Kawano *et al.*, 1998; Valadares *et al.*, 2010). Dessa forma, infere-se que os resíduos da região N-terminal das cistatinas de *Citrus* sejam responsáveis pela diferença no potencial de inibição da catepsina B, e no caso das cistatinas *CsinCPI-2* e *CclemCPI-2*, a região N-terminal não é capaz de deslocar o *loop* de oclusão e, conseqüentemente, não ocorre inibição da catepsina B.

A proteína *CaneLeg*, uma legumaina de cana-de-açúcar foi inibida somente pela cistatina *CclemCPI-3* (Figura 45), com K_i de 0,12 nM (tabela 12).

As legumainas pertencem à família de cisteíno-peptidases C13, distinta da família das papaínas. A atividade dessas enzimas é inibida por um domínio SNSL presente na região C-terminal estendida de algumas cistatinas (Martinez *et al.*, 2007; Christoff *et al.*, 2016). A cistatina *CclemCPI-3*, possui o domínio SNSL (Figura 34). Vale ressaltar que o domínio SNSL é ausente nas demais cistatinas de *Citrus* aqui testadas, o que indica uma provável seletividade deste domínio em *CclemCPI-3* para enzimas da família das legumainas.

A proteína *CclemCPI-3* é a única cistatina de *Citrus* caracterizada que apresenta um resíduo de alanina no *loop* QVVAG. (Van Wyk *et al.*, 2016) analisaram um grande número de sequências de cistatinas e identificaram que o resíduo de alanina (A) possui frequência de 59% e o resíduo de serina (S) apresenta frequência de 28,4%. A cistatina *CclemCPI-3* não apresenta inibição da atividade da catepsina B, porém inibiu as catepsinas L, K, S e papaína (família C1 - papaína) na ordem de nanomolar. As fitocistatinas de cevada do grupo II e a cistatina de arroz OcXII apresentam o domínio SNSL na região C-terminal estendida e também são capazes de inibir enzimas da família da papaína e legumaína (Martinez *et al.*, 2007; Christoff *et al.*, 2016). Esse resultado indica que esta cistatina é bifuncional, capaz de modular a atividade tanto das peptidases da família das papaínas, com a presença dos domínios G, QVVAG e PW, quanto das enzimas da família das legumaínas, com a presença do domínio SNSL.

Em arroz, a cistatina OcXII apresenta bifuncionalidade contra legumaínas e papaínas, da mesma forma como o inibidor *CclemCPI-3* deste trabalho. A OcXII foi silenciada em arroz e os efeitos avaliados. Christoff *et al.*, 2016 observou que as plantas silenciadas apresentam maior atividade de legumaínas e papaínas-like, resultando em um crescimento inicial acelerado de plântulas. (Hwang *et al.*, 2009) realizaram o silenciamento da cistatina AtCYS6, que possui a região C-terminal estendida e também observaram um leve aumento na taxa de germinação de sementes de *Arabidopsis*. Por outro lado, a superexpressão desta cistatina gerou atraso na germinação de sementes e no crescimento de *Arabidopsis* (Hong *et al.*, 2007; 2008; Hwang *et al.*, 2009). Além disso, (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2007) reportaram que fitocistatinas com extensão da região C-terminal estão envolvidas no processo de germinação de sementes e (Christoff e Margis, 2014) reportaram uma notável expressão da OcXII durante a germinação de sementes de arroz. Dessa forma, estudos futuros podem ser direcionados para ensaios funcionais da cistatina *CclemCPI-3*, para verificar se há relação deste inibidor com a germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Citrus*, como foi observado em arroz e *Arabidopsis*. Dentre o total de sequências de cistatinas de *Citrus*, outras oito sequências possuem extensão da região C-terminal (dados não mostrados), além de *CclemCPI-3*, indicando a importante função destes inibidores bifuncionais em *Citrus*.

Apesar do resíduo de tritptofano (W) característico da porção C-terminal das cistatinas ser um dos resíduos mais conservados (presente em 92% das sequências de cistatinas) (Wyk *et al.*, 2016) a proteína *CsinCPI-1* não apresenta este resíduo (Figura 34). Entretanto, *CsinCPI-1* apresentou K_i de 28,1 pM, 8,23 nM e 0,1 nM para as catepsinas L, S e K,

respectivamente, mostrando que a ausência deste domínio na região C-terminal não influenciou a atividade inibitória desta cistatina. (Martinez *et al.*, 2009) também identificaram a ausência deste resíduo na cistatina HvCPI-11 de cevada e observaram que a ausência não influenciou a atividade inibitória deste inibidor, que apresentou K_i na ordem de nanomolar para catepsinas L-like de cevada.

A proteína *CclemCPI-2* mostrou ser a cistatina de *Citrus* com maior potencial inibitório contra as enzimas testadas (Tabela 12). Observa-se que este inibidor compartilha os mesmos resíduos dos domínios característicos da superfamília das cistatinas (GG, QVVSG e PW) com as cistatinas *CclemCPI-1* e *CsinCPI-2* (Figura 34). Dessa forma, observa-se que a diferença entre o potencial inibitório entre as três cistatinas relaciona-se a aminoácidos presentes nas regiões hipervariáveis.

Nos resultados dos testes de inibição realizados com as cistatinas recombinantes de *Citrus* apresentados na tabela 12, foi observado um perfil de inibição para as catepsinas semelhante aquele identificado para as catepsinas B, K, L e S humanas com cistatinas de plantas (Kondo *et al.*, 1990; Oliva *et al.*, 2004; Van Wyk *et al.*, 2011; Valadares *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2017), porém com constantes de inibição mais baixas, na ordem de picolomolar para alguns inibidores. A tabela 12 indica os valores de K_i determinados para cada inibidor/cisteíno-peptidase. *CclemCPI-2* é o inibidor de *Citrus* mais potente contra a catepsina K, L e papaína ($K_i = 0,98$ pM; 6,08 pM e 0,15 nM, respectivamente). O inibidor *CclemCPI-1* é a cistatina de *Citrus* mais potente para a catepsina B ($K_i = 0,42$ nM) e *CsinCPI-2* é a cistatina de *Citrus* mais potente contra a catepsina S ($K_i = 0,11$ nM). Além disso, o inibidor *CclemCPI-3* inibiu eficientemente a atividade da *CaneLeg* ($K_i = 0,12$ nM), mostrando ser um inibidor bifuncional, regulando tanto a atividade de enzimas da família das papaínas quanto da família das legumaínas. Dessa forma, observa-se que as cistatinas de *Citrus* podem ser utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas na área da saúde, que envolvem o descontrole de uma determinada catepsina. Por exemplo, estudos iniciais com o inibidor *CsinCPI-2* indicam que esta cistatina apresenta efeito anti-inflamatório e pro-osteogênico, tendo o potencial de induzir a diferenciação de células osteoblásticas, podendo ser utilizado futuramente no controle de doenças inflamatórias e também em doenças ósseas (Leguizamón *et al.*, 2017).

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados de expressão das cistatinas de *Citrus* de forma solúvel em células de *E. coli* e inibição da atividade de cisteíno-peptidases com constante de inibição na ordem de nanomolar, observa-se que há uma série de novos estudos que podem ser realizados, visando a aplicação biotecnológica das cistatinas e melhor entendimento da interação cistatinas/cisteíno-peptidases. Dessa forma, como perspectivas futuras podemos citar:

- Ensaios funcionais utilizando as cistatinas de *Citrus* para verificar *in vivo* o efeito das cistatinas e a viabilidade da utilização destas proteínas como possíveis fármacos.
- Análise das sequências de cistatinas de *Citrus* utilizando ferramentas de bioinformática, para inferir relações evolutivas.
- Ensaios *in vitro* de inibição de catepsinas B e L- like do inseto *Diaphorina citri* utilizando as cistatinas de *Citrus*, a fim de selecionar o inibidor com maior afinidade para estas enzimas para o posterior desenvolvimento de plantas transgênicas de *Citrus* visando o controle de doenças destrutivas como o Huanglonbing.
- Estudos de interação proteína-ligante para identificar as regiões das cistatinas que contribuem para a inibição mais eficiente de cisteíno-peptidases.

II. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As proteínas inibidoras de cisteíno-peptidases de *Citrus* *CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3* foram expressas eficientemente em células de *E. coli*, de forma solúvel e pura;
- Somente inibidores *CsinCPI-1*, *CclemCPI-1* e *CclemCPI-2* foram capazes de inibir a catepsina B humana, possivelmente por características da região N-terminal que permitem o deslocamento do *loop* de oclusão;
- A papaína, cisteíno-peptidase modelo de estudos de inibição, teve sua atividade eficientemente inibida pelas cistatinas caracterizadas neste estudo (*CsinCPI-1*, *CsinCPI-2*, *CclemCPI-1*, *CclemCPI-2* e *CclemCPI-3*), apresentando K_i na ordem de nanomolar com valores muito próximos para todos os inibidores testados;
- A cistatina *CclemCPI-1* não possui o resíduo de W C-terminal característico da superfamília das cistatinas, entretanto, essa cistatina inibiu eficientemente a catepsina L e papaína, demonstrando que este resíduo não é essencial para a atividade inibitória desta cistatina;
- Somente o inibidor *CclemCPI-3* foi capaz de inibir a legumaína (*CaneLeg*). Isso se deve à presença de um domínio SNSL contido na região C-terminal estendida desta cistatina. Além disso, este inibidor também foi capaz de inibir eficientemente catepsinas L, K, S e papaína, o que demonstra sua bifuncionalidade, capaz de regular cisteíno-peptidases tanto da família C1- papaína-*like* quanto da família C13 – legumaína-*like*;
- A aplicação das cistatinas de *Citrus* na saúde pode ser direcionada à doenças que envolvem a superexpressão catepsina S - utilizando o inibidor *CsinCPI-2*, catepsina B – utilizando o inibidor *CclemCPI-1* e catepsina K – utilizando o inibidor *CclemCPI-2*;
- A transformação genética de cana-de-açúcar por biolística gerou poucos eventos de transformação;

- A transformação genética de cana-de-açúcar por *Agrobacterium tumefaciens* tem se mostrado mais eficiente, com um maior número de plantas transformadas, resultando em 92 plantas com bom desenvolvimento no presente momento.

III. REFERÊNCIAS

- AADEL, H. et al. Agrobacterium-mediated transformation of mature embryo tissues of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. **Cereal Research Communications**, p. 1-11, 2017.
- ABE, K. et al. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **J Biol Chem**, v. 262, n. 35, p. 16793-7, 1987.
- ABE, M. et al. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 4, p. 756-8, 1995.
- AGGARWAL, N.; SLOANE, B. F. Cathepsin B: multiple roles in cancer. **Proteomics Clin Appl**, v. 8, n. 5-6, p. 427-37, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, 1997.
- ARENCIBIA, Ariel et al. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 4, p. 247-255, 1997.
- ARENCIBIA, Ariel D. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, v. 7, n. 3, p. 213-222, 1998.
- ARENCIBIA, Ariel D. et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum* hybrid) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, v. 8, n. 5, p. 349-360, 1999.
- ARRIGONI, E. DE B.; DINARDO, L. L.; TERÁN, F. O. Aplicação de *Neoplectana carpocapsae* Weiser, 1955 em condições de campo para controle de *Mgdolus* spp (Coleóptera, Cerambycidae). **Nemat. Brasileira**, vol X, p. 181-189, 1986.
- BARRETT, Alan J. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, p. 771-778, 1981.
- BARRETT, Alan J. et al. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochemical Journal**, v. 201, n. 1, p. 189-198, 1982.
- BARRETT, Alan J. et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. **Biochemical Journal**, v. 236, n. 1, p. 312, 1986.
- BARRETT, Alan J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 193-196, 1987.

BAR-JOSEPH, Moshe; MARCUS, Ruth; LEE, Richard F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, n. 1, p. 291-316, 1989.

BASNAYAKE, Shiromani WV; MOYLE, Richard; BIRCH, Robert G. Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. **Plant cell reports**, v. 30, n. 3, p. 439-448, 2011.

BAULCOMBE, David C.; ENGLISH, James J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 7, n. 2, p. 173-180, 1996.

BELINTANI, N. G. et al. Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. **Biologia plantarum**, v. 56, n. 1, p. 71-77, 2012.

BENTO, J. M. S. et al. **Migdolus: biologia, comportamento e controle**. Fundacao Cargill, 1992.

BENTO, J.M.S. ; ARRIGONI, E.B. ; STINGEL, E. . *Migdolus: Uma ameaça constante para a cana-de-açúcar*. In: A.S. Pinto. (Org.). *Controle de Pragas da Cana de Açúcar*. 1 ed. Sertãozinho: **Biocontrol**, v. 1, p. 43-47, 2006.

BENCHABANE, M. et al. Plant cystatins. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1657-66, 2010.

BIZZO, Waldir Antonio et al. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 589-603, 2014.

BODE, W. et al. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. **EMBO J**, v. 7, n. 8, p. 2593-9, 1988.

BOWER, Robert et al. High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 3, p. 239-249, 1996.

BOVÉ, Joseph M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of plant pathology**, p. 7-37, 2006.

BRÖMME, D. et al. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. **J Biol Chem**, v. 268, n. 7, p. 4832-8, 1993.

BRÖMME, D.; LECAILLE, F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 18, n. 5, p. 585-600, 2009.

BRÖMME, D. et al. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. **J Biol Chem**, v. 271, n. 4, p. 2126-32, 1996.

BUGG, T. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2012.

CAO, S. L. et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of corn (Zea mays L.) multiple shoots. **Biotechnol Biotechnol Equip**, v. 28, n. 2, p. 208-216, 2014.

CARRILLO, Laura et al. A barley cysteine-proteinase inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic Arabidopsis plants. **Transgenic research**, v. 20, n. 2, p. 305-319, 2011.

CHAN, S. J. et al. Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse procathepsin B cDNAs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 20, p. 7721-5, 1986.

CHAKRABORTY, M. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of commercially elite rice restorer line using nptII gene as a plant selection marker. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 1, p. 51-60, 2016.

CHE, P. et al. Developing a flexible, high-efficiency Agrobacterium-mediated sorghum transformation system with broad application. **Plant Biotechnol J**, 2018.

CHRISTENSEN, Alan H.; QUAIL, Peter H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic research**, v. 5, n. 3, p. 213-218, 1996.

CHRISTOFF, A. P.; MARGIS, R. The diversity of rice phytolectins. **Mol Genet Genomics**, v. 289, n. 6, p. 1321-30, 2014.

CHRISTOFF, A. P. et al. Rice bifunctional phytolectin is a dual modulator of legumain and papain-like proteases. **Plant Mol Biol**, v. 92, n. 1-2, p. 193-207, 2016.

CINGEL, A. et al. Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development. **Insect Sci**, v. 24, n. 5, p. 768-780, 2017.

CINGEL, A. et al. Growth and development of Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata*, on potato plants expressing the oryzacystatin II proteinase inhibitor. **Transgenic Res**, v. 24, n. 4, p. 729-40, 2015.

CONAB, Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. V. 4 - SAFRA 2017/18 N.3 - Terceiro levantamento, 2017
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_08_09_08_38_cana_dezembro_novo.pdf

CONNORS, B. J. et al. Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). **Planta**, v. 215, n. 3, p. 510-4, 2002.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.

COTRIN, S. S. et al. Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. **Anal Biochem**, v. 335, n. 2, p. 244-52, 2004.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 8, p. 883-901, 2005.

DINARDO-MIRANDA, Leila Luci; DE VASCONCELLOS, Antonio Carlos Machado; DE ANDRADE LANDELL, Marcos Guimarães (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Instituto Agrônômico, 2008.

DALL, E.; BRANDSTETTER, H. Mechanistic and structural studies on legumain explain its zymogenicity, distinct activation pathways, and regulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 27, p. 10940-5, 2013.

DALL, E. et al., . Structure and function of legumain in health and disease. **Biochimie**, v. 122, p. 126-50, 2016.

DE ARAUJO, P. G. et al. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **Plant J**, v. 44, n. 5, p. 707-17, 2005.

D'HONT, Angélique et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221-225, 1998.

DOI-KAWANO, K. et al. Molecular cloning, functional expression, and mutagenesis of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from sunflower seeds. **J Biochem**, v. 124, n. 5, p. 911-6, 1998.

DONADIO, Luiz Carlos; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. **Mattos Junior D, De Negre JD, Pio RM, Pompeu Junior J (eds.) Citros. Instituto Agrônômico e Fundag, Campinas**, p. 1-18, 2005.

DRAKE, F. H. et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. **J Biol Chem**, v. 271, n. 21, p. 12511-6, 1996.

DUONG, L. T. Therapeutic inhibition of cathepsin K-reducing bone resorption while maintaining bone formation. **Bonekey Rep**, v. 1, p. 67, 2012.

ENRÍQUEZ-OBREGÓN, Gil A. et al. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Planta**, v. 206, n. 1, p. 20-27, 1998.

FALCO, Maria Cristina; SILVA-FILHO, Marcio C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

- FERRARA, T. F. et al. Characterization of a Recombinant Cathepsin B-Like Cysteine Peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae): A Putative Target for Control of Citrus Huanglongbing. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145132, 2015.
- FONSECA, F. P. et al. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (Sl-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 42, n. 1, p. 58-69, 2012.
- FOUAD, W. M. et al. Generation of transgenic energy cane plants with integration of minimal transgene expression cassette. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 5, p. 407-13, 2015.
- FUJISHIMA, A. et al. The crystal structure of human cathepsin L complexed with E-64. **FEBS Lett**, v. 407, n. 1, p. 47-50, 1997.
- GALLO-MEAGHER, M.; IRVINE, J. E. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the bar gene. **Crop Science**, v. 36, n. 5, p. 1367-1374, 1996.
- GAO, Shiwu et al. Transgenic sugarcane with a cry1Ac gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0153929, 2016.
- GATEHOUSE, Angharad MR et al. Presence and partial characterisation of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 39, n. 3, p. 279-286, 1985.
- GIANOTTI, A. et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr Purif**, v. 47, n. 2, p. 483-9, 2006.
- GIANOTTI, A. et al. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biol Chem**, v. 389, n. 4, p. 447-53, 2008.
- GRAHAM, J. H. et al. Characterization of *Phytophthora* spp. causing outbreaks of citrus brown rot in Florida. **Phytopathology**, v. 88, n. 7, p. 724-729, 1998.
- GRAHAM, James H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.
- GROENEWALD, J. H.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Res**, v. 17, n. 1, p. 85-92, 2008.
- GONÇALVES, Marcos Cesar et al. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. **Functional plant science and biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 108-116, 2012.

GUERZONI, Julia Tufino Silva et al. Stress-induced Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confers tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2309-2319, 2014.

HANSOM, S. et al. Regulation of transgene expression in sugarcane. In: **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** 1999. p. 278-290.

HARA-NISHIMURA, I.; INOUE, K.; NISHIMURA, M. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. **FEBS Lett**, v. 294, n. 1-2, p. 89-93, 1991.

HARTLEY, James L.; TEMPLE, Gary F.; BRASCH, Michael A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome research**, v. 10, n. 11, p. 1788-1795, 2000.

HASNAIN, S. et al. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. Importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. **J Biol Chem**, v. 268, n. 1, p. 235-40, 1993.

HIRAIWA, N.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. **FEBS Lett**, v. 447, n. 2-3, p. 213-6, 1999.

HONG, Joon Ki et al. Over-expression of Chinese cabbage phytoalexin 1 retards seed germination in Arabidopsis. **Plant science**, v. 172, n. 3, p. 556-563, 2007.

HWANG, J. E. et al. Regulation of seed germination and seedling growth by an Arabidopsis phytoalexin isoform, AtCYS6. **Plant Cell Rep**, v. 28, n. 11, p. 1623-32, 2009.

ILLY, C. et al. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. **J Biol Chem**, v. 272, n. 2, p. 1197-202, 1997.

IRENE, D. et al. Solution structure of a phytoalexin from Ananas comosus and its molecular interaction with papain. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e47865, 2012.

ISAAA, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: n. 52, 2016
<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>

ISHIDA, Y. et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. **Methods Mol Biol**, v. 1223, p. 189-98, 2015.

JAIN, M. et al. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) plants. **Plant Cell Rep**, v. 26, n. 5, p. 581-90, 2007.

JIAO, W. B. et al. Genome-wide characterization and expression analysis of genetic variants in sweet orange. **Plant J**, v. 75, n. 6, p. 954-64, 2013.

JOYCE, P. et al. Selection system and co-cultivation medium are important determinants of *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane. **Plant Cell Rep**, v. 29, n. 2, p. 173-83, 2010.

KIMURA, M. et al. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 12, p. 2328-9, 1995.

KRISHNAN, S. Radhesh; MOHAN, Chakravarthi. Methods of Sugarcane Transformation. In: **Sugarcane Biotechnology: Challenges and Prospects**. Springer, Cham, 2017. p. 51-60.

KONDO, H. et al. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. **J Biol Chem**, v. 265, n. 26, p. 15832-7, 1990.

KOS, J.; MITROVIĆ, A.; MIRKOVIĆ, B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. **Future Med Chem**, v. 6, n. 11, p. 1355-71, 2014.

KOUZUMA, Y. et al. Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, Sca and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **J Biochem**, v. 119, n. 6, p. 1106-13, 1996.

KRAMER, L.; TURK, D.; TURK, B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 10, p. 873-898, 2017.

KUNERT, K. J. et al. Potential use of phytocystatins in crop improvement, with a particular focus on legumes. **J Exp Bot**, v. 66, n. 12, p. 3559-70, 2015.

KURODA, M. et al. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 65, n. 1, p. 22-8, 2001.

KUROYANAGI, M.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. Activation of Arabidopsis vacuolar processing enzyme by self-catalytic removal of an auto-inhibitory domain of the C-terminal propeptide. **Plant Cell Physiol**, v. 43, n. 2, p. 143-51, 2002.

LACORTE, C. et al. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. **Manual de transformação genética de plantas**, v. 1, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAWO, Nora C.; WÄCKERS, Felix L.; ROMEIS, Jörg. Indian Bt cotton varieties do not affect the performance of cotton aphids. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4804, 2009.

LEAL, W. S. et al. Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N-(2' S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. **Experientia**, v. 50, n. 9, p. 853-856, 1994.

LEE, R. F. et al. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 2, p. 123-125, 1993.

LECAILLE, F. et al. Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. **Biochemistry**, v. 41, n. 26, p. 8447-54, 2002.

LEGUIZAMÓN, N. D. P.; NOGUEIRA, A. V. B.; CAMPOS, M. M. L.; RODRIGUES, E. M. SCHNEIDER, V. V. K., FARIA, G.; ... & CIRELLI, J. J. A. BR 006 E POSTER IN BASIC RESEARCH.

LI, Yunhe; ROMEIS, Jörg. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. **Biological control**, v. 53, n. 3, p. 337-344, 2010.

LIU, J. et al. Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Insect Mol Biol**, v. 15, n. 6, p. 823-34, 2006.

MACHADO, L. A. et al. Controle de *Migdolus Fryanus* na Cultura da Cana-Deaçúcar com Nematóides Entomopatogênicos. **Campinas-SP: Fapesp e Bio controle**.

MCQUALTER, R. B. et al. Production and evaluation of transgenic sugarcane containing a Fiji disease virus (FDV) genome segment S9-derived synthetic resistance gene. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 2, p. 139-145, 2004.

MANICKAVASAGAM, M. et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. **Plant Cell Rep**, v. 23, n. 3, p. 134-43, 2004.

MANN, D. G. et al. Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. **Plant Biotechnol J**, v. 10, n. 2, p. 226-36, 2012.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch Biochem Biophys**, v. 359, n. 1, p. 24-30, 1998.

MARGIS-PINHEIRO, M. et al. Molecular evolution and diversification of plant cysteine proteinase inhibitors: new insights after the poplar genome. **Mol Phylogenet Evol**, v. 49, n. 1, p. 349-55, 2008.

MARTINEZ, M. et al. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. **J Exp Bot**, v. 56, n. 417, p. 1821-9, 2005.

MARTINEZ, M. et al. Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. **Plant Physiol**, v. 151, n. 3, p. 1531-45, 2009.

MARTINEZ, M. et al. Carboxy terminal extended phytocystatins are bifunctional inhibitors of papain and legumain cysteine proteinases. **FEBS Lett**, v. 581, n. 16, p. 2914-8, 2007.

MARTINEZ, M. et al. Phytocystatins: Defense Proteins against Phytophagous Insects and Acari. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 10, 2016.

MELOTTO-PASSARIN, Danila Montewka. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e Agrobacterium tumefaciens visando estudar o mecanismo de morte celular programada**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MIGUEL, Mariana Cardoso et al. **Produção recombinante e caracterização de duas cistatinas de cana-de-açúcar**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos.

MISAKA, T. et al. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **Eur J Biochem**, v. 240, n. 3, p. 609-14, 1996.

MORRISON, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. **Biochim Biophys Acta**, v. 185, n. 2, p. 269-86, 1969.

MUKHERJEE, K.; CHATTOPADHYAY, N. Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy. **Biochem Pharmacol**, v. 117, p. 10-9, 10 2016.

MUNGER, J. S. et al. Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. **Biochem J**, v. 311 (Pt 1), p. 299-305, 1995.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUSIL, D. et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. **EMBO J**, v. 10, n. 9, p. 2321-30, 1991.

MÜNTZ, K.; SHUTOV, A. D. Legumains and their functions in plants. **Trends Plant Sci**, v. 7, n. 8, p. 340-4, 2002.

MURDOCK, L. L. et al. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 87, n. 4, p. 783-787, 1987.

NAKAYAMA, D. G. et al. A transcriptomic survey of *Migdolus fryanus* (sugarcane rhizome borer) larvae. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173059, 2017.

NAYYAR, S. et al. Red rot resistant transgenic sugarcane developed through expression of β -1,3-glucanase gene. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179723, 2017.

NIELSEN, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. **Methods Mol Biol**, v. 1611, p. 59-73, 2017.

NOVAGEN, pET System Manual, TB055 10th Edition, 2003.

NYCANDER, M. et al. Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. **FEBS Lett**, v. 422, n. 1, p. 61-4, 1998.

NÄGLER, D. K. et al. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. **Biochemistry**, v. 36, n. 41, p. 12608-15, 1997.

NUNES, D. B. O estado da arte sobre Migdolus spp.(Coleoptera: Cerambycidae). O estado do conhecimento sobre Migdolus, p. 5-10, 1996.

OHMAE, S. et al. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. **Sci Rep**, v. 7, p. 41710, 2017.

OJIMA, A. et al. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Mol Biol**, v. 34, n. 1, p. 99-109, 1997.

OKAMOTO, T.; MINAMIKAWA, T. Molecular cloning and characterization of Vigna mungo processing enzyme 1 (VmPE-1), an asparaginyl endopeptidase possibly involved in post-translational processing of a vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP). **Plant Mol Biol**, v. 39, n. 1, p. 63-73, 1999.

OLIVA, M. L. et al. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 320, n. 4, p. 1082-6, 2004.

PANWAR, P. et al. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 2, p. 396-410, 2016..

PAVLOVA, A. et al. Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110. **FEBS Lett**, v. 487, n. 2, p. 156-60, 2000.

PETRASOVITS, L. A. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate production in transgenic sugarcane. **Plant Biotechnol J**, v. 10, n. 5, p. 569-78, 2012.

PICELLI, Eduardo da Cruz Maduro. **Cultura de tecidos e transformação genética com o gene Ddm1 no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PIŠLAR, A.; KOS, J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 2, p. 1017-30, 2014.

PORATH, J. et al. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, n. 5536, p. 598-9, 1975.

PORTARO, F. C. et al. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. **Biochem J**, v. 347 Pt 1, p. 123-9, 2000.

RAMIRO, D. A. et al. Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnol J**, v. 14, n. 9, p. 1826-37, 2016..

RASOOLIZADEH, A. et al. Single substitutions to closely related amino acids contribute to the functional diversification of an insect-inducible, positively selected plant cystatin. **FEBS J**, v. 283, n. 7, p. 1323-35, 2016.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D343-50, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D343-50, 2016.

RAWLINGS, N. D. E.; SALVESEN, G. E. **Handbook of proteolytic enzymes**. Third edition. Amsterdam: Elsevier, 2013.

REDDY, S. Samara Shekar et al. Production of transgenic local rice cultivars (*Oryza sativa* L.) for improved drought tolerance using *Agrobacterium* mediated transformation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.

REIS, Emerson Moreira; MARGIS, Rogério. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genetics and molecular biology**, v. 24, n. 1-4, p. 291-296, 2001.

REN, G. et al. Coronin 3 promotes gastric cancer metastasis via the up-regulation of MMP-9 and cathepsin K. **Mol Cancer**, v. 11, p. 67, 2012.

RIBEIRO, C. W. et al. Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnol Prog**, v. 24, n. 5, p. 1060-6, 2008.

RYAN, S. N.; MCMANUS, M. T.; LAING, W. A. Identification and characterisation of proteinase inhibitors and their genes from seeds of apple (*Malus domestica*). **J Biochem**, v. 134, n. 1, p. 31-42, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. I.

SANFORD, John C. The biolistic process. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 12, p. 299-302, 1988.

SANTIAGO, A. C. et al. A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **J Dent Res**, v. 96, n. 9, p. 1051-1057, 2017.

SANTOS-SILVA, L. K. et al. Recombinant expression and biochemical characterization of sugarcane legumain. **Plant Physiol Biochem**, v. 57, p. 181-92, 2012.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 27, n. 2, p. 157-62, 1967.

SCHECHTER, I.; ZIV, E. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display β -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biol Chem**, v. 392, n. 6, p. 555-69, 2011.

SCHNEIDER, V. K. et al. Transgenic sugarcane overexpressing CaneCPI-1 negatively affects the growth and development of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Plant Cell Rep**, v. 36, n. 1, p. 193-201, 2017.

SEVENICH, L. et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. **Nat Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 876-88, 2014.

SIDDIQUI, Azad Alam et al. Isolation and purification of phytocystatin from almond: Biochemical, biophysical, and immunological characterization. **Cogent Biology**, v. 2, n. 1, p. 1262489, 2016.

SNYMAN, S. J. et al. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: Effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. **Plant Cell Rep**, v. 25, n. 10, p. 1016-23, 2006.

SOARES-COSTA, A. et al. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 296, n. 5, p. 1194-9, 2002.

SOARES-COSTA, A. et al. Digestive physiology and characterization of digestive cathepsin L-like proteinase from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **J Insect Physiol**, v. 57, n. 4, p. 462-8, 2011.

SOARES-COSTA, A.; SCHNEIDER, V. K.; NAKAYAMA, D. G.; ARENCIBIA, A. D.; HENRIQUE-SILVA, F. Plantas transgênicas fundamentos, métodos de produção e aplicações. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. 1ed.: Editora Blucher, 2017, p. 649-674.

STEUBL, D. et al. Circulating cathepsin-S levels correlate with GFR decline and sTNFR1 and sTNFR2 levels in mice and humans. **Sci Rep**, v. 7, p. 43538, 2017.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods Enzymol**, v. 244, p. 486-500, 1994.

SUDHAN, D. R. et al. Cathepsin L in tumor angiogenesis and its therapeutic intervention by the small molecule inhibitor KGP94. **Clin Exp Metastasis**, v. 33, n. 5, p. 461-73, 2016.

SUN, F. F. et al. Industrially relevant hydrolyzability and fermentability of sugarcane bagasse improved effectively by glycerol organosolv pretreatment. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, p. 59, 2016.

TALEB, S. et al. Weight loss reduces adipose tissue cathepsin S and its circulating levels in morbidly obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 3, p. 1042-7, 2006.

TAPARIA, Yogesh; GALLO, Maria; ALTPETER, Fredy. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 111, n. 2, p. 131-141, 2012.

TERÁN, F.O.; NOVARETTI, W.R.T.; KASTEN JUNIOR, P. Migdolus sp. e insetos associados. In: **Reunião Técnica Agrônômica “Pragas Da Cultura Da Cana-de-Açúcar”**. (Copersucar) p.25-31, 1983.

TERÁN, F.O.; NOVARETTI, W.R.T.; KASTEN JUNIOR, P.; ARRIGONI, E.B. MATOS, C.A.O. Migdolus sp. e insetos associados. In: **II Seminário de Tecnologia Agrônômica**, Resumos. Piracicaba: Centro de Tecnologia Copersucar, p.313-326, 1984.

TERRA, Walter R.; FERREIRA, Clélia. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, Walter R.; CRISTOFOLETTI, Plinio T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 4, p. 725-730, 1996.

TINGAY, Sonia et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1369-1376, 1997.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 9, p. 785-99, 2006.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 98-111, 2000.

TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol Chem**, v. 378, n. 3-4, p. 141-50, 1997 1997.

TURK, D.; GUNCAR, G. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 59, n. Pt 2, p. 203-13, 2003.

TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett**, v. 285, n. 2, p. 213-9, 1991.

TURK, V.; STOKA, V.; TURK, D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. **Front Biosci**, v. 13, p. 5406-20, 2008.

URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J.; MCPHERSON, M. J. Involvement of the NH₂-terminal region of oryzacystatin-I in cysteine proteinase inhibition. **Protein Eng**, v. 8, n. 12, p. 1303-7, 1995.

USDA, Citrus: World Markets and, 2018
Trade <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>

VALADARES, N. F. et al. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **BMC Struct Biol**, v. 10, p. 30, 2010.

VALDÉS-RODRÍGUEZ, S. et al. Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. **Plant Physiol Biochem**, v. 45, n. 10-11, p. 790-8, 2007.

VALDÉS-RODRÍGUEZ, Silvia et al. Multifunctional amaranth cystatin inhibits endogenous and digestive insect cysteine endopeptidases: A potential tool to prevent proteolysis and for the control of insect pests. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 634-641, 2015.

VAN SLUYS, M. A. Agrobacterium: um vetor natural para transformação em plantas. **TORRES, AC; CALDAS, LS; BUSO, JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, SPI**, p. 737-759, 1999.

VAN WYK, Stefan George et al. Improving the inhibitory potency of papaya cystatin, using site-directed mutagenesis. 2011. Tese de Doutorado. University of Pretoria.

VAN WYK, S. G. et al. Review: The future of cystatin engineering. **Plant Sci**, v. 246, p. 119-27, 2016.

VASILJEVA, O. et al. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. **Curr Pharm Des**, v. 13, n. 4, p. 387-403, 2007.

VERBOVŠEK, U.; VAN NOORDEN, C. J.; LAH, T. T. Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. **Semin Cancer Biol**, v. 35, p. 71-84, 2015.

VORSTER, Juan et al. Positive selection of digestive Cys proteases in herbivorous Coleoptera. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 65, p. 10-19, 2015.

WALDRON, C. et al. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Mol Biol**, v. 23, n. 4, p. 801-12, 1993.

WANG, J. et al. Citrus sinensis annotation project (CAP): a comprehensive database for sweet orange genome. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87723, 2014.

WANG, Futao et al. Single and binary adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions using sugarcane cellulose-based adsorbent. **Bioresource technology**, v. 241, p. 482-490, 2017.

WANG, M. L. et al. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. **Transgenic Res**, v. 14, n. 2, p. 167-78, 2005.

WEI, H. et al. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **J Plant Physiol**, v. 160, n. 10, p. 1241-51, 2003.

WENG, L. X. et al. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified cry1Ac provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Res**, v. 20, n. 4, p. 759-72, 2011.

WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 3, p. 691-713, 2003.

WINZERLING, Joy J.; BERNA, Patrick; PORATH, Jerker. How to use immobilized metal ion affinity chromatography. **Methods**, v. 4, n. 1, p. 4-13, 1992.

WU, G. A. et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 7, p. 656-62, 2014.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 44, n. 3, p. 235-240, 1987.

WU, Luguang; BIRCH, Robert G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant biotechnology journal**, v. 5, n. 1, p. 109-117, 2007.

XIN, X. Q.; GUNESEKERA, B.; MASON, R. W. The specificity and elastinolytic activities of bovine cathepsins S and H. **Arch Biochem Biophys**, v. 299, n. 2, p. 334-9, 1992.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nat Genet**, v. 45, n. 1, p. 59-66, 2013.

YAN, S.; SLOANE, B. F. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. **Biol Chem**, v. 384, n. 6, p. 845-54, 2003.

ZAKHAROV, A. et al. A comparative study of the role of the major proteinases of germinated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds in the degradation of their storage proteins. **J Exp Bot**, v. 55, n. 406, p. 2241-9, 2004.

ZUCKER, S. et al. The proteolytic activities of chymopapain, papain, and papaya proteinase III. **Biochim Biophys Acta**, v. 828, n. 2, p. 196-204, 1985.

IV. ANEXOS

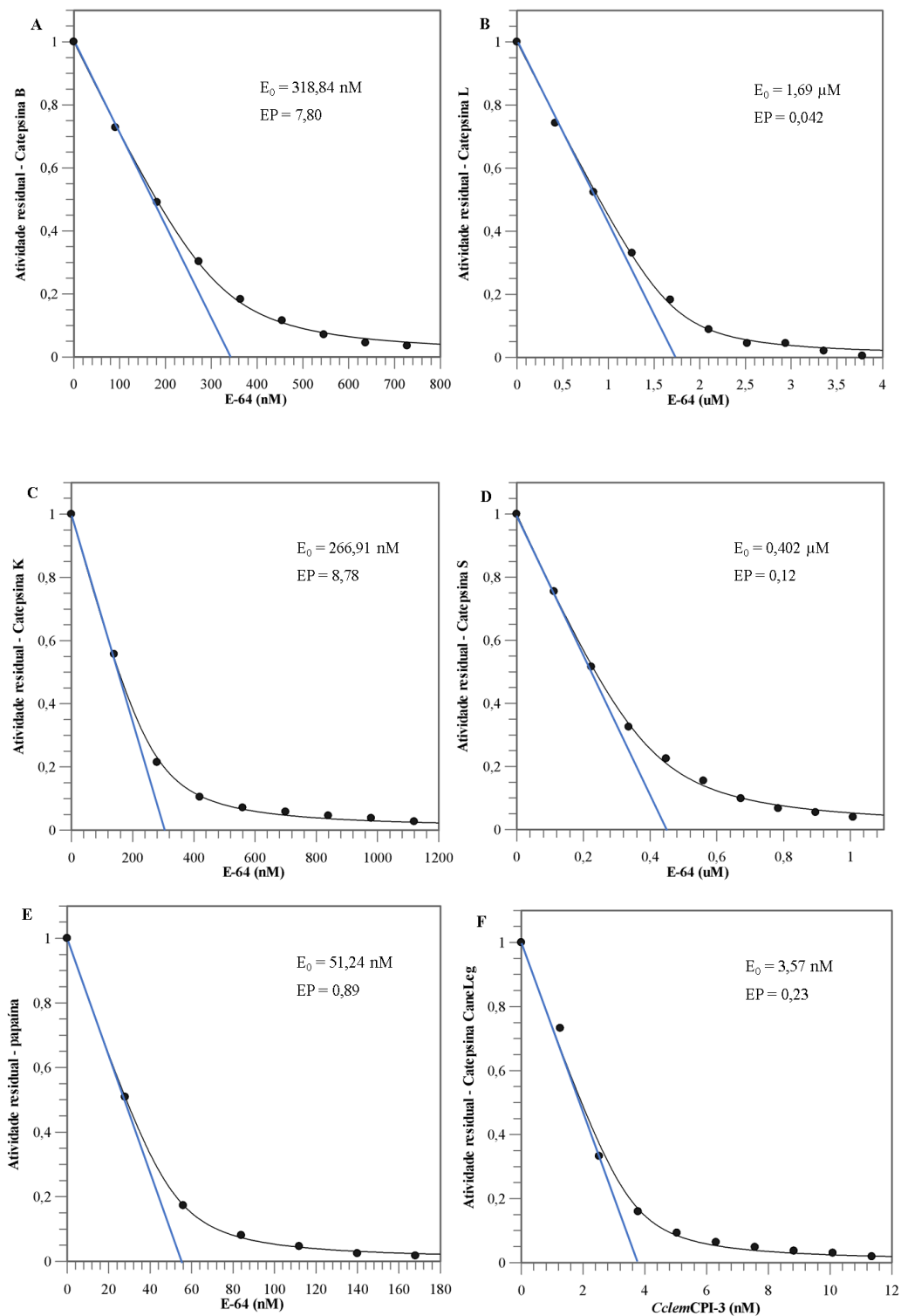


Figura 39: Titulação das catepsinas B, K, L, S, papaína e CaneLeg utilizadas nos ensaios de inibição com cistatinas. A: Titulação do sítio ativo da catepsina B com E-64; B: Titulação do sítio ativo da catepsina L com E-64; C: Titulação do sítio ativo da catepsina K com E-64; D: Titulação do sítio ativo da catepsina S com E-64; E: Titulação do sítio ativo da papaína com E-64. F: Titulação do sítio ativo da legumaina com CclemCPI-3.

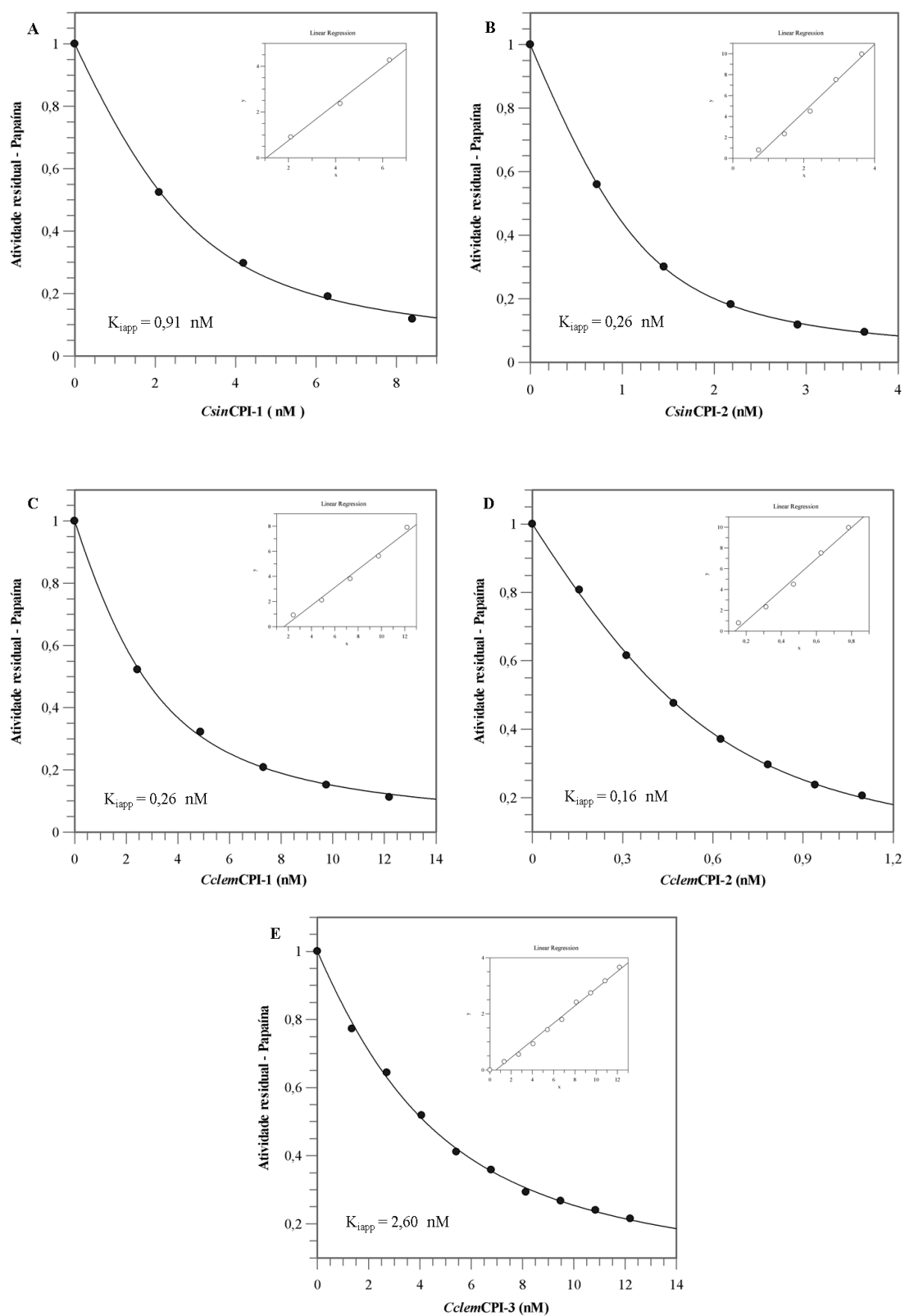


Figura 40: Inibição da atividade da papaína pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da papaína por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da papaína por *CsinCPI-2*; inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da papaína por *CclemCPI-3*.

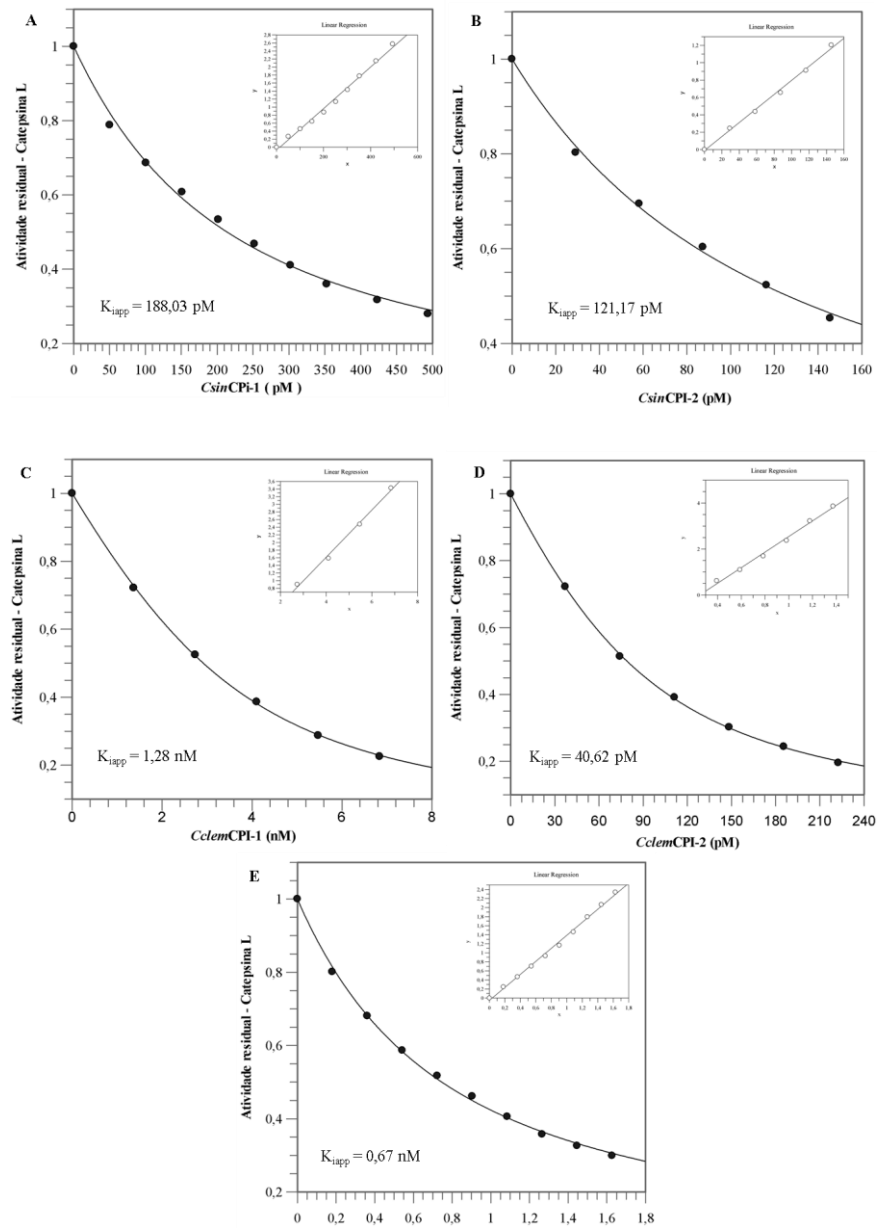


Figura 41: Inibição da atividade da catepsina L humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_0 = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_0 – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina L por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina L por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina L por *CclemCPI-3*.

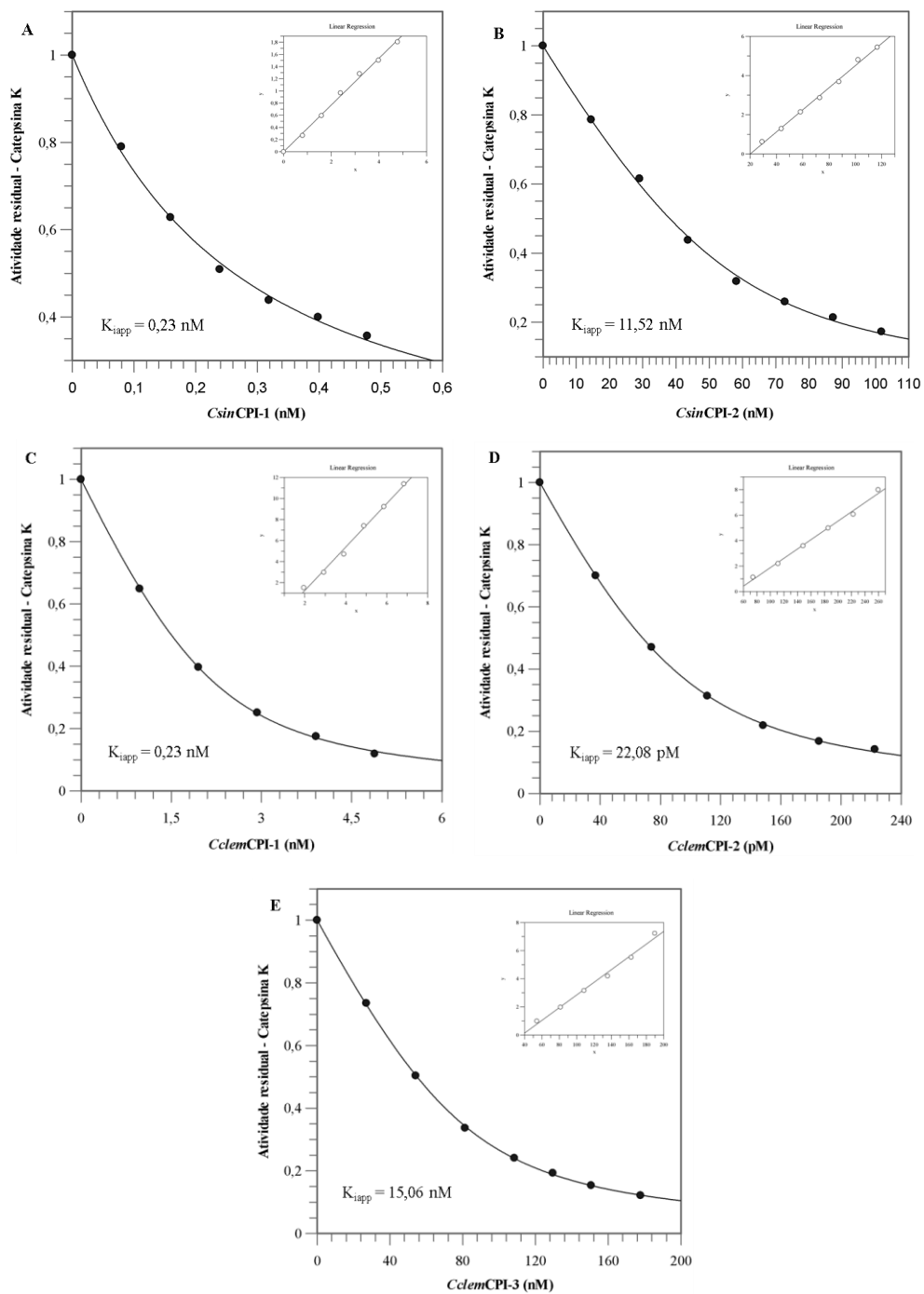


Figura 42: Inibição da atividade da catepsina K humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina K por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina K por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina K por *CclemCPI-3*.

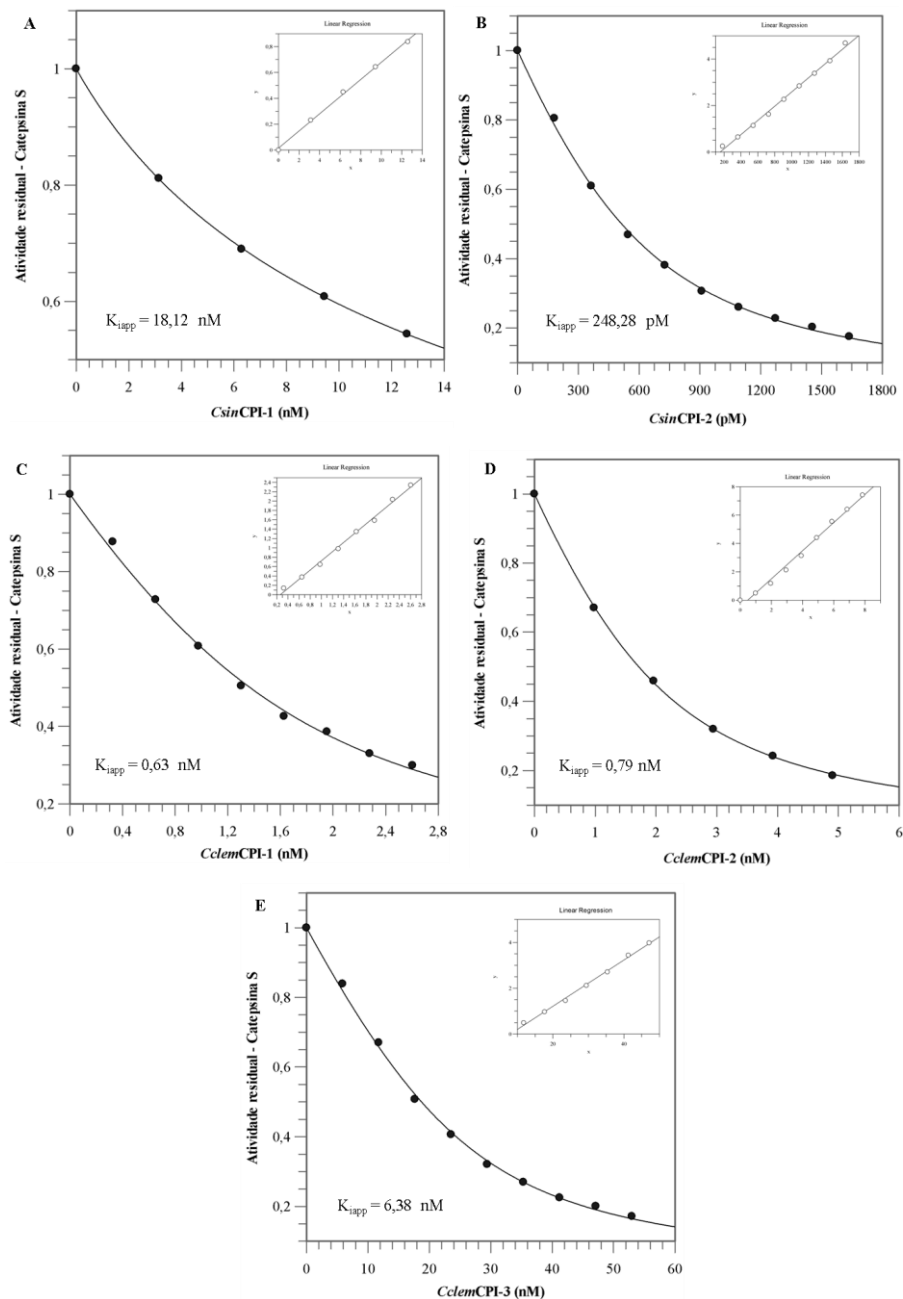


Figura 43: Inibição da atividade da catepsina S humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor. A: inibição da atividade da catepsina S por *CsinCPI-1*; B: inibição da atividade da catepsina S por *CsinCPI-2*; C: inibição da atividade da catepsina S por *CclemCPI-1*; D: inibição da atividade da catepsina S por *CclemCPI-2*; E: inibição da atividade da catepsina S por *CclemCPI-3*.

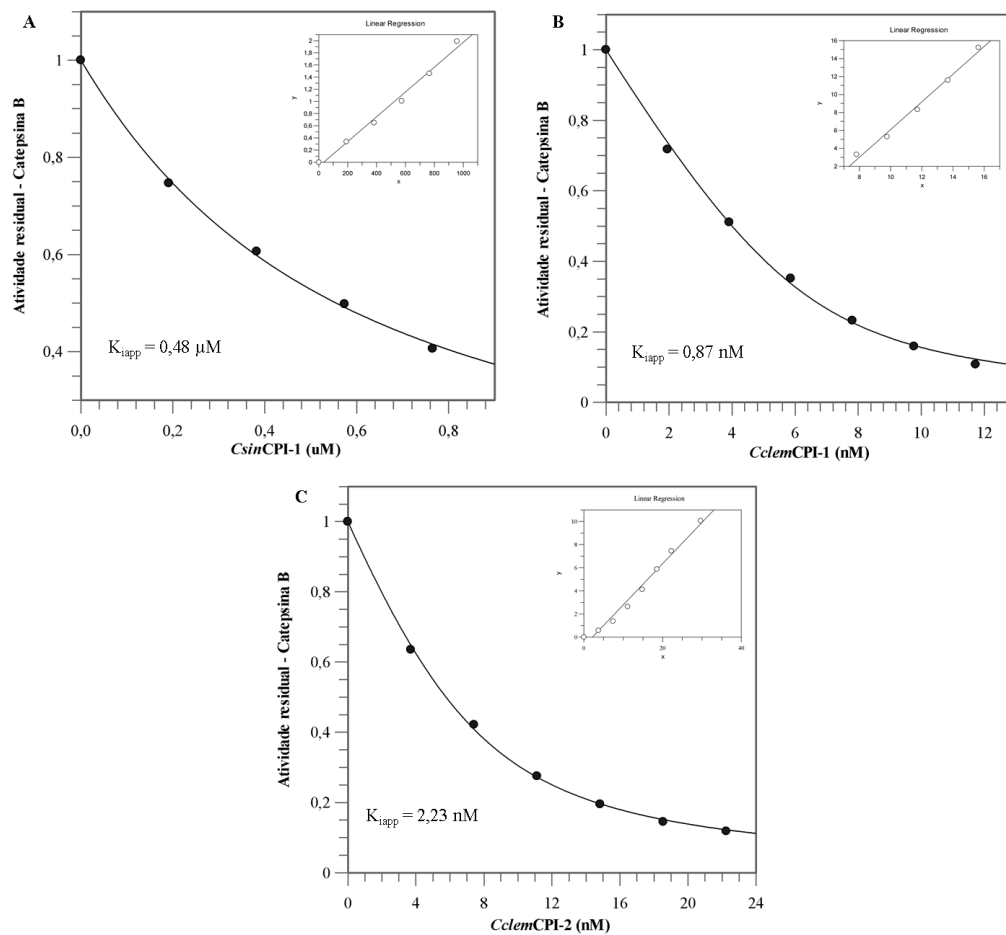


Figura 44: Inibição da atividade da catepsina B humana pelas cistatinas de *Citrus*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor.

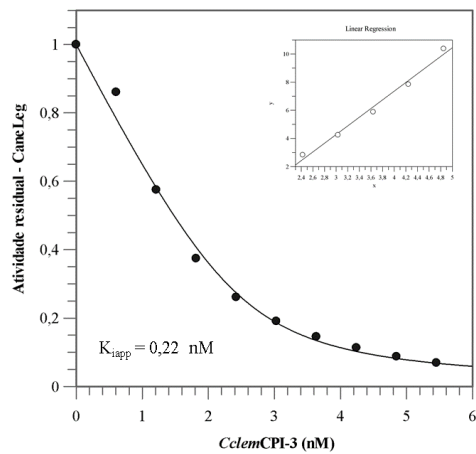


Figura 45: Inibição da atividade da *CaneLeg* pela cistatina *CclemCPI-3*. Os gráficos de K_{iapp} foram obtidos plotando-se $v_i/v_o = [I]$, onde v_i – velocidade na presença de inibidor, v_o – velocidade na ausência de inibidor.