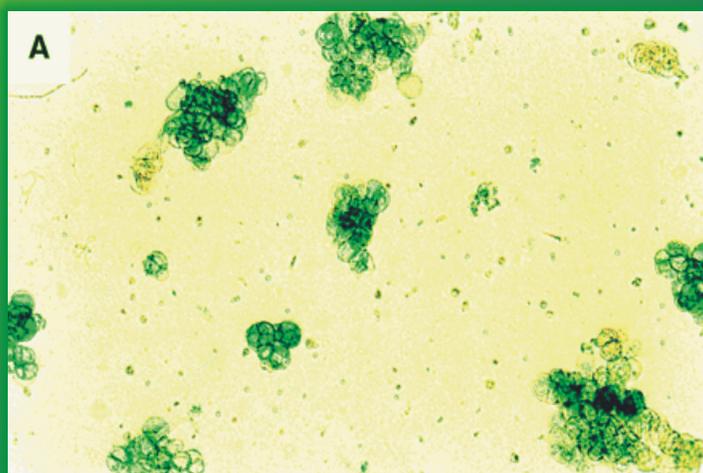


Potencial Biotecnológico das Cistatinas



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
Alexandre Kalil Pires
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa
Diretores Executivos

Embrapa Algodão

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral

Luiz Paulo de Carvalho
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Auxiliadora Lemos Barros
Chefe Adjunto de Administração

Ramiro Manoel Pinto Gomes Pereira
Chefe Adjunto de Comunicação, Negócio e Apoio



ISSN 0103-0205
Novembro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 109

Potencial Biotecnológico das Cistatinas

Márcia Soares Vidal

Campina Grande, PB
2003

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 315-4300
Fax: (83) 315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena Avelino Araújo
Márcia Barreto de Medeiros Nóbrega
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire
Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Márcia Soares Vidal
Tratamento das ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Foto da capa: Raimundo Estrela Sobrinho
Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

1ª Edição

1ª impressão (2003) 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB).

Potencial Biotecnológico das Cistatina por Márcia Soares Vidal. Campina Grande, 2003.

27p. (Embrapa Algodão. Documentos, 109).

1. Biotecnologia. I. Vidal, M.S. II. Título. III. Série.

CDD 660.6

© Embrapa 2003

Autores

Márcia Soares Vidal

D.Sc. Bióloga da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143,
Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB.

e-mail: mvidal@cnpa.embrapa.br

Apresentação

A descoberta e o conhecimento de proteínas que possam funcionar como inseticidas é um ponto importante para obtenção de plantas resistentes a pragas. Este documento vem dar luz no potencial emprego de inibidores de proteases no melhoramento genético vegetal, uma vez que tenta esclarecer o que são inibidores de proteases, sua função e exemplos na obtenção de plantas resistentes a doenças e pragas.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Potencial Biotecnológico das Cistatinas	11
1. Cistatinas: superfamília dos inibidores de protease à cisteína	11
2. Mecanismo de interação das cistatinas com proteases cisteínicas.....	12
3. Inibidores de proteases vegetais de origem vegetal	14
4. Mecanismo de interação das cistatinas de origem vegetal com proteases à cisteína.....	16
5. Potencial biotecnológico das cistatinas... ..	17
6. Referências Bibliográficas.....	19

Potencial Biotecnológico das Cistatinas

Márcia Soares Vida

1. Cistatinas: superfamília dos inibidores de protease à cisteína

Os inibidores de protease são importantes ferramentas utilizadas pela natureza para o controle da atividade de suas proteases-alvo. Os inibidores conhecidos e caracterizados são, na sua maioria, inibidores de protease serínica, porém nos últimos anos um grande número de inibidores de protease cisteínica tem sido isolados e caracterizados (BODE e HUBER, 1992).

Cistatina é o nome dado às proteínas inibidoras de proteases cisteínicas. O nome cistatina foi originalmente dado por Barrett (1987) a um inibidor de proteases cisteínicas do tipo papaína, isolado da clara do ovo de galinha. Desde então, esta tem sido a nomenclatura usada para as proteínas relacionadas a tal inibidor. Os inibidores de protease cisteínicas foram agrupados numa superfamília denominada cistatina, uma vez que a determinação da seqüência de aminoácidos e das propriedades bioquímicas desses inibidores tem mostrado relações, a níveis de estrutura e função, com o inibidor isolado da clara de ovo de galinha (BARRETT, 1987).

De acordo com o grau de homologia entre as proteínas, os membros da superfamília das cistatinas foram agrupados em três famílias: famílias 1, 2 e 3, conhecidas como estefinas, cistatinas e quinogênio, respectivamente (TURK e BODE, 1991; BARRETT, 1987). Todos os membros dessas três famílias são potentes inibidores de protease cisteínicas de caráter competitivo e reversível. As

estefinas são proteínas constituídas de uma única cadeia polipeptídica de baixo peso molecular e não apresentam pontes de enxofre. Os inibidores da família das cistatinas também são proteínas de baixo peso molecular, porém apresentam pontes de enxofre em sua cadeia polipeptídica. Os quininogênios mostram uma organização estrutural mais complexa, pois são compostos de três cadeias polipeptídicas, são glicosilados e apresentam pontes de enxofre.

2. Mecanismo de interação das cistatinas com proteases cisteínicas

A maioria das proteases que são alvo de inibição por cistatinas pertencem à superfamília da papaína (BARRET, 1987). Essas proteases apresentam um peso molecular de aproximadamente 25-kDa e grande homologia com a papaína.

A cinética de interação entre as cistatinas e as proteases proteases-alvo caracteriza-se por uma reação bimolecular reversível e competitiva. No entanto, sua afinidade às enzimas alvo é tão alta que se torna difícil demonstrar o caráter reversível da interação desses inibidores ou a competição direta com os substratos (NICKLIN e BARRET, 1984; LINDAHL et al., 1988; BJÖRK et al., 1989).

O alinhamento de diversas seqüências de inibidores da superfamília das cistatinas, obtido através do programa *Prosite* (em <http://expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html>), permite localizar as regiões da cadeia de aminoácidos que se mantém conservadas nessas proteínas. A seqüência mais conservada dentre as cadeias de aminoácidos das cistatinas, está na região correspondente aos resíduos: PA - [GSTEQKRV] - Q - [LIVT] - [VAF] - [SAGQ] - G -x- [LIVMNK] - x(2) - [LIVMFY] - x - LIVMFYA] - PA - [DENQKRHSIV], considerada pelo programa como sendo a 'assinatura' característica das cistatinas. Nesta 'assinatura' está localizada a porção da cadeia, Q⁵³L⁵⁴V⁵⁵S⁵⁶G⁵⁷ (posição de aminoácidos correspondente à cistatina da clara de ovo de galinha), que forma uma das alças do inibidor responsáveis pela interação com o sítio catalítico da protease alvo (BODE & HUBER, 1992). Outra parte da molécula de importância funcional é a porção N-terminal que, apesar de apresentar uma variabilidade maior, possui um resíduo de glicina que se mantém altamente conservado entre as cistatinas (Gly⁹ na cistatina do ovo de galinha). Essas porções da cadeia levam à formação de um sítio de ligação equivalente ao substrato que permite uma forte ligação com a enzima, tornando seu sítio ativo inacessível ao substrato (BARRETT, 1987). Um resíduo de triptofano (Trp¹⁰⁴ na cistatina do ovo de galinha) foi identificado como sendo uma terceira porção da molécula que se integra ao sítio de ligação com a papaína (NYCANDER e BJÖRK, 1990).

A cinética de interação entre a cistatina do ovo de galinha e a papaína foi usada como modelo para a determinação do mecanismo de ação das cistatinas (NYCANDER e BJÖRK, 1990; LINDAHL et al., 1988; BJÖRK et al., 1989; NICKLIN e BARRETT, 1984). Com a determinação da estrutura terciária da cistatina do ovo de galinha, foi possível sugerir um modelo de interação com a papaína. Os dados revelaram a existência de duas alças e cinco fitas de folhas b antiparalelas (BODE e HUBER, 1992). A primeira alça é formada pela seqüência QLVSG, e a segunda alça compreende os aminoácidos Pro¹⁰³ e Trp¹⁰⁴. Essas duas estruturas em alça e o resíduo Gly⁹ da porção amino terminal, formam uma estrutura em forma de cunha, extremamente complementar ao sítio ativo da papaína. Esses resíduos são altamente conservados entre as cistatinas. A primeira e a segunda alças têm a forma e o tamanho apropriados para uma perfeita ligação com o sítio ativo da papaína, enquanto o resíduo de glicina, Gly⁹, interage com o subsítio S2 da papaína, de forma similar à ligação produzida pelo substrato (TURK e BODE, 1991; BODE e HUBER, 1992).

A inibição de protease cisteínicas pelas cistatinas não está relacionada a uma ligação direta entre o inibidor e o sítio tiol da enzima mas, sim, a um bloqueio físico, e não químico, do acesso ao sítio ativo pelo substrato (KORANT et al., 1987). Esta afirmativa baseia-se na incapacidade do complexo protease-inibidor permitir a ligação do 5-IAMF (5-iodoacetamidofluoresceína), um ligante específico de grupamentos tióis, ao sítio catalítico da protease complexada ao inibidor; e permitir a ligação de um ligante menor, o iodo acetato (KORANT et al., 1987).

Recentemente, vários estudos têm destacado a importância da porção amino-terminal na atividade e especificidade das cistatinas (AUERSWALD et al., 1994; BJORK et al., 1994; LINDAHL, et al., 1994; SHIBUYA, et al., 1995a e 1995b; HALL et al., 1995).

Estudos com variantes de cistatina C humana apresentando substituições dos resíduos Arg⁸, Leu⁹ e Val¹⁰ por resíduos de Gly, mostraram que a importância desses aminoácidos na atividade do inibidor varia para cada protease alvo (HALL et al., 1995). Lindahl et al. (1994), baseando-se em modelagem molecular por computador, construíram uma cistatina C mutada substituindo a Val¹⁰ por uma Arg e compararam sua atividade com o inibidor selvagem. Esta mutação elevou o K_i em 15 vezes para a catepsina B, e em 12.000 vezes para a papaína, mostrando que esta única substituição de aminoácidos afeta, de forma diferente, a especificidade do inibidor para as duas proteases-alvo. Sendo assim, a especificidade das cistatinas por diferentes proteases cisteínicas é parcialmente determinada por resíduos de aminoácidos da porção amino-terminal da molécula.

Hall et al. (1995) destacam que o conhecimento do mecanismo de interação entre a cistatina e a enzima alvo permitirá desenvolver uma metodologia na engenharia de proteínas para a produção de inibidores específicos para proteases fisiologicamente importantes. A obtenção de inibidores específicos permitirá o estudo individual da função de proteases à cisteína em determinado sistema biológico, tendo ainda como vantagem sobre os inibidores sintéticos (não protéicos), a possibilidade de serem utilizados para produção de animais transgênicos.

3. Inibidores de proteases vegetais de origem vegetal

Inibidores de protease serínicas são amplamente encontrados entre os vegetais, alguns expressos constitutivamente e outros induzidos por lesão foliar (FOSKET, 1994). Diversas plantas, como a batata e o tomate, sintetizam esses inibidores de protease em resposta ao ataque de insetos. A presença destes inibidores nas folhas pode levar os insetos herbívoros à morte, por má nutrição, em consequência da inibição de suas proteases digestivas (FOSKET, 1994; BROADWAY, 1996). Vários desses inibidores de protease serínica já foram isolados, com o objetivo de elucidar seu papel no mecanismo de proteção das plantas ao ataque de insetos e outros patógenos (LANDERGREN, 1996). Muitos estudos têm sido direcionados à elucidação da via de transdução de sinal para a síntese desses inibidores (FOSKET, 1994); e diferentes indutores da expressão de inibidores de protease já foram identificados, incluindo hormônios vegetais, como o ácido abscísico, porém os mais efetivos são: a sistemina, um pequeno peptídeo constituído de dezoito aminoácidos; e oligossacarídeos produzidos pela degradação da parede celular e derivados da degradação da pectina por enzimas induzidas em resposta à lesão (FOSKET, 1994). Outro indutor da expressão de inibidores de protease é o metil-jasmonato, um composto volátil (um metil-éster) derivado do ácido jasmônico e produzido pelas plantas em resposta a estímulos externos, como ataque por patógenos ou insetos (FOSKET, 1994; CREELMAN & MULLET, 1995; BOTELLA et al., 1996).

Diversos cereais, como arroz, soja, milho e cevada, contêm inibidores de proteases. O papel desses inibidores, em termos de importância fisiológica durante o desenvolvimento e a germinação de sementes, ainda não é bem conhecido (LIANG et al., 1991). O estágio inicial de crescimento após a germinação das sementes é altamente dependente da eficiência de utilização dos nutrientes estocados durante o desenvolvimento das sementes. Muitos tipos de proteases estão envolvidos no processo de degradação protéica nas sementes e a presença de inibidores de protease estaria relacionada ao controle da atividade destas enzimas. Em cevada foi observado que, dentre estas, as proteases

cisteínicas são o grupos mais importantes, sendo responsáveis por 90% do total da atividade proteolítica (MIKKONEN et al., 1996).

Todos esses dados sugerem a importância dos inibidores de protease produzidos pelos vegetais, como fatores de defesa da planta ao ataque por insetos e como responsáveis pelo controle da degradação proteica.

As primeiras cistatinas de origem vegetal a serem clonadas e caracterizadas, foram a orizacistatina I (ABE et al., 1987) e a orizacistatina II (KONDO et al., 1990), ambas expressas em semente de arroz. Esses inibidores são diferentes em dois aspectos: na especificidade em relação a diferentes proteases e no padrão de expressão de seus mRNAs no estágio de maturação das sementes de arroz. A orizacistatina I inibe a papaína mais efetivamente (K_i 3.0×10^{-8} M) que a catepsina H (K_i 0.79×10^{-6} M), enquanto a orizacistatina II inibe a catepsina H (K_i 1.0×10^{-8} M) melhor que a papaína (K_i 0.83×10^{-6} M). O mRNA para orizacistatina I tem seu nível de expressão máxima duas semanas após o florescimento e não é detectado em sementes já amadurecidas. Por sua vez, o mRNA para orizacistatina II é constantemente expresso durante os estágios de maturação e é claramente detectado em sementes já amadurecidas. Acredita-se que essas duas orizacistatinas estejam envolvidas na regulação da atividade proteolítica causada por diferentes proteases (KONDO et al., 1990). Foi demonstrado que as orizacistatinas são capazes de inibir as orizaínas α , β e γ (WATANABE et al., 1991).

A análise comparativa da seqüência de aminoácidos dessas cistatinas com as cistatinas animais, mostrou grande similaridade com os membros da família 2 (cistatinas) (KONDO et al., 1990 e ABE et al., 1987). No entanto, por não apresentarem pontes de enxofre, foram classificadas como membros da família 1 (estefina) (TURK e BODE, 1991).

Foram encontradas diferenças entre a estrutura dos genes de cistatinas de origem animal e as orizacistatinas I e II (KONDO et al., 1991). Tanto as cistatinas de origem animal quanto as orizacistatinas, apresentam dois íntrons e três exons. Nos genes de origem animal o primeiro íntron está localizado entre a seqüência nucleotídica correspondente aos aminoácidos Q e V localizados na série QXVXG (Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly), altamente conservada entre os membros da superfamília das cistatinas; o segundo íntron está localizado próximo à seqüência nucleotídica correspondente aos aminoácidos da região C-terminal da proteína. No caso das orizacistatinas I e II o primeiro íntron está localizado antes da seqüência de nucleotídios correspondente aos aminoácidos QVVAG. Tanto na orizacistatina I quanto na orizacistatina II este primeiro íntron se encontra entre os aminoácidos

A e N, enquanto o segundo íntron está na região não codante da proteína. Essas diferenças levaram à proposição da criação de uma quarta família de cistatinas, chamada fitocistatina.

Posteriormente, foram caracterizadas duas novas fitocistatinas que merecem destaque por apresentarem características peculiares, a cistatina do mamoeiro (SONG et al., 1995) e a 'multicistatina' da batata (WALSH e STRICKLAND, 1993). A cistatina do mamoeiro apresenta um resíduo de cisteína em sua cadeia de aminoácidos, que não é encontrado em outras cistatinas vegetais. A cistatina-B humana e a de rato também apresentam um resíduo de cisteína que permite a formação de pontes de sulfeto entre duas moléculas do inibidor. As formas diméricas da cistatina-B são inativas e podem ser convertidas em monômeros ativos, em condições redutoras. No mamoeiro, esta dimerização reversível pode ser um mecanismo de controle da atividade desta cistatina uma vez que no látex o inibidor encontra um meio oxidante e se torna inativo. A "multicistatina" encontrada na batata possui peso molecular de 85-kDa e é expressa em altos níveis,, tanto na folha quanto no tubérculo. Esta "multicistatina" pode ligar-se a oito moléculas de papaína simultaneamente. O tratamento com tripsina leva à formação de cinco fragmentos com 10-kDa de peso molecular e a um fragmento com 32-kDa. Todos esses fragmentos mantêm a atividade de inibidores de protease cisteínica e apresentam alguma similaridade na seqüência de aminoácidos.

4. Mecanismo de interação das cistatinas de origem vegetal com proteases à cisteína

Como já mencionado, as cistatinas de origem vegetal (fitocistatinas) apresentam alto grau de homologia com a cistatina da clara do ovo de galinha e mantêm conservados: a seqüência QXVXG (Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly) na porção central da cadeia, o resíduo Gly na porção N-terminal e o resíduo Trp na porção C-terminal. Sendo assim, a interação desses inibidores com a papaína deve seguir o modelo proposto para a cistatina do ovo de galinha (ABE et al., 1988).

Foi demonstrado que a deleção de 21 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal, incluindo o resíduo de Gly⁵, da molécula de orizacistatina I, não interfere na atividade de inibição da papaína (ABE et al., 1988). A deleção, em particular do resíduo de Gly⁵, também não alterou a atividade do inibidor. Tais resultados sugerem que no caso das fitocistatinas o resíduo de glicina na porção N-terminal da molécula é desnecessário para a atividade desses inibidores, apesar de ter sido postulado como peptídio envolvido, diretamente na interação entre a cistatina do ovo de galinha e a papaína. Neste mesmo trabalho foi também

demonstrado que uma deleção maior envolvendo 38 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal causou uma perda total na atividade do inibidor. A comparação entre seqüências de diversas fitocistatinas indica que esta deleção de 38 resíduos de aminoácidos leva à perda uma seqüência altamente conservada entre as fitocistatinas, representada pelos aminoácidos Leu-Ala-Arg-Fen-Ala-Val (LARFAV). A importância de tal consenso de aminoácidos para a atividade das fitocistatinas ainda não foi mencionada nem questionada.

Apesar de ter sido demonstrado que os aminoácidos da porção N-terminal da molécula não são essenciais para a atividade do inibidor, observa-se que entre as fitocistatinas esta região se mantém conservada. Arai et al. (1991) sugerem que a conservação dos resíduos Gln⁵, Pro⁸³ - Trp⁸⁴ e Gln⁵³ - X - Val⁵⁵ - X - Gly⁵⁷ (numeração relativa a orizacistatina) entre as fitocistatinas possibilita um espectro maior de ação como inibidores de protease à cisteína, ou seja, se a Gly⁵ não é essencial para a inibição da papaína, a mesma pode permitir a ação sobre outras proteases à cisteína atuando como um co-fator e favorecendo a ligação ao sítio ativo dessas enzimas. Outra possibilidade é que essas três regiões estejam envolvidas na manutenção de uma estrutura conformacional estável e que resista à ação de outras proteases, que não as enzimas-alvo.

Com relação às fitocistatinas, a manutenção da atividade da orizacistatina I após a deleção de 21 aminoácidos da porção aminoterminal, e a ausência total de atividade quando esta deleção se estendeu a 38 aminoácidos, incluindo o consenso LARFAV (ABE et al., 1988); sugerem a importância da conservação desses resíduos de aminoácidos para a interação do inibidor ao sítio ativo da papaína.

5. Potencial biotecnológico das cistatinas

A expressão de inibidores de proteases em vegetais representa um mecanismo de defesa contra o ataque de diversos patógenos, como fungos, vírus e insetos herbívoros (FOSKET, 1994). Lorito et al. (1994) mostraram que inibidores de protease vegetais suprimem a germinação de esporos de duas espécies de fungos fitopatogênicos (*Fusarium solani* e *Botrytis cinerea*). A razão desta atividade anti-fúngica é desconhecida. Os autores sugerem a inibição de enzimas essenciais ao desenvolvimento do fungo.

A inibição de proteases digestivas de insetos herbívoros tem sido o principal foco dos trabalhos recentes. Uma grande evidência do papel de inibidores de protease na defesa ao ataque por insetos foi a redução da resistência a larvas de *Manduca sexta* em plantas transgênicas de tomate expressando o gene da sistemina em orientação antisense (CARDENA et al., 1993). Nas plantas

transgênicas a taxa de crescimento das larvas foi superior à do obtido nas plantas selvagens.

Em geral, as classes de proteases encontradas no sistema digestivo desses insetos são do tipo serina, predominante em lepidópteros, e do tipo cisteína, predominante em coleópteros e hemípteros (BRODWAY, 1996; WOLFSON e MURDOCK, 1990). O sucesso evolutivo dos coleópteros e dos hemípteros talvez seja, em parte, devido à evolução para uma protease digestiva alternativa, permitindo-lhes viver em ambientes ricos em inibidores de proteases à serina (MASOUD et al., 1993). Sendo assim, a produção de plantas transgênicas expressando inibidores de protease cisteínica foi sugerida como estratégia para obtenção de resistência ao ataque desses insetos (MASOUD et al., 1993). Liang et al. (1991) mostraram que a orizacistatina é capaz de inibir proteases digestivas de coleópteros. Em batata, a multicistatina (formada por oito cadeias de cistatinas) inibe o desenvolvimento de larvas de *Diabrotica* (ORR et al., 1994). Plantas transgênicas de tabaco expressando a orizacistatina I, constitutivamente, sob controle do promotor 35S do CaMV, não apresentaram nenhuma anormalidade no desenvolvimento (MASOUD et al., 1993).

A transformação de plantas com genes de inibidores de protease à cisteína é uma boa estratégia para obtenção de plantas resistentes ao ataque de insetos, uma vez que outros animais não utilizam proteases à cisteína para a digestão (LIANG et al., 1991).

Muitas espécies virais expressam suas proteínas funcionais sob a forma de uma poliproteína. A maturação dessas proteínas ocorre após a clivagem específica desta poliproteína estando este processo diretamente relacionado com a replicação viral. Enquanto alguns vírus utilizam proteases do hospedeiro, outros expressam suas próprias proteases. Desta forma, os inibidores de protease representam potentes agentes antivirais (KORANT et al., 1987). Vários trabalhos usando inibidores de proteases como agente antiviral, têm sido realizados. Ebina e Tsukada (1991) mostraram que o E64 diminui a replicação dos rotavírus, causadores de uma diarreia severa em crianças. Bjork et al. (1990) mostraram que a cistatina C humana bloqueia a replicação do vírus da herpes *in vitro*; e McQuade et al. (1990) mostraram que um inibidor de protease sintético impede a maturação da partícula *in vitro*. A atividade antiviral da orizacistatina também já foi demonstrada (KONDO et al., 1992). O poliovírus, um membro da família picornaviridae, teve sua replicação inibida em células Vero crescidas em meio contendo a orizacistatina. Aoki et al. (1995) mostraram que a orizacistatina I é um potente antiviral contra o vírus da herpes (Herpes Simplex Virus), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (em ratos infectados com o HSV) e não apresenta toxicidade em dosagens terapêuticas.

6. Referências Bibliográficas

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUSUKI, K.; ARAI S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 16793-16797, 1987.

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; ARAI, S.; SUSUKI, K. The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 7655-7659, 1988.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. **Europe Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 933-937, 1992.

ABE, M.; ABE, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 59, p. 756-758, 1995.

ABE, M.; ABE, K.; IWABUCHI, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. corn cystatin i expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. **Journal of Biochemistry**, v.116, p.488-492, 1994.

ABRAHAMSON, M. Cystatins. **Methods in Enzimology** seção II, cap. 49, p. 685-700, 1994.

ABRAHAMSON, M.; GRUBB, A. Increased body temperature accelerates aggregation of the [leu-68] - gln mutant cystatin c, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 1416-1420, 1994.

- AL-HASHIMI, I.; DICKINSON, D. P.; LEVINE, M. J. Purification, molecular cloning, and sequencing of salivary cystatin as-i. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 9381-9387, 1988.
- AMEISEN, J.C. The origin of programmed cell death. **Science**, v. 272, p. 1278-1279, 1996.
- AOKI, H.; AKAIKE, T.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S.; OKAMURA, R. I.; NEGI, A.; MAEDA, H. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial Agents & Chemotherapy**, v. 39, p. 846-849, 1995.
- ARAI, S.; WATANABE, H.; KONDO, H.; EMORI, Y.; ABE, K. Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central cln-val-val-ala-gly region conserved among cystatin superfamily members. **Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 294-298, 1991.
- AUERSWALD, E.A.; NAGLER, D.K.; ASSFALGMACHLEIDT, I.; STUBBS, M.T.; MACHLEIDT, W.; FRITZ, H. Hairpin loop mutations of chicken cystatin have different effects on the inhibition of cathepsin B, cathepsin I and papain. **FEBS Letters**, v. 361, p. 179-184, 1995.
- AUERSWALD, E.A.; NAGLER, D.K.; SCHULZE, A.J.; ENGH, R.A.; GENENGER, G.; MACHLEIDT, W.; FRITZ, H. Production, inhibitory activity, folding and conformational analysis of an N-terminal and an internal deletion variant of chicken cystatin. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 407-415, 1994.
- BARKA, T.; NOEN, H. Expression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C mRNA in rat eye. **The Anatomical Record**, v. 239, p. 343-348, 1994.
- BARRETT, A.. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. **TIBS**, v. 12, p. 193-196, 1987.
- BARRETT, A.. Classification of peptidases. **Methods in Enzimology**, v. 244, p. 1-18, 1994.
- BENCHEKROUN, A.; MICHAUD, D.; NGUYENQUOC, B.; OVERNEY, S.; DESJARDINS, Y.; YELLE, S. Synthesis of active oryzacystatin i in transgenic potato plants. **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 585-588, 1995.

BERTI, P. J.; STORER, A. C. Local pH-Dependent Conformational Changes Leading to Proteolytic Susceptibility of Cystatin C. **Biochemical Journal**, v. 302, p.411-416, 1994.

BJORK, I.; ALRIKSSON, E.; YLINENJÄRVI, K. Kinetics of binding of chicken cystatin to papain. **Biochemistry**, v. 28, p. 1568-1573, 1989.

BJÖRK, L.; GRUBB, A.; KJELLÉN, L. Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of *Herpes simplex virus*. **Journal of Virology**, v. 64, p.: 941-943, 1990.

BJORK, I.; POL, E.; RAUBSEGALL, E.; ABRAHAMSON, M.; ROWAN, A.D.; MORT, J.S. Differential changes in the association and dissociation rate constants for binding of cystatins to target proteinases occurring on N-terminal truncation of the inhibitors indicate that the interaction mechanism varies with different enzymes. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 219-225, 1994.

BJORK, I., BRIEDITIS, I.; ABRAHAMSON, M. Probing the functional role of the N-terminal region of cystatins by equilibrium and kinetic studies of the binding of Gly-11 variants of recombinant human cystatin c to target proteinases. **Biochemical Journal**, v. 306, p. 513-518, 1995.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 433-551, 1992.

BRZIN, J.; POPOVIC, T.; KOTNIK, M.; TURK, V. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. **Biochemical and Biophysical research Communications**, v. 118, p. 103-109, 1984.

BRZIN, J.; POPOVIC, T.; KOSOROK, M.D.; KOTNIK, M.; TURK, V. Inhibitors of cysteine proteinases from potato. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 233-238, 1988.

BRODWAY, M.R. Dietary inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 32, p. 39-53, 1996.

BOTELLA, M.A.; XU, Y.; PRABHA, T.N.; ZHAO, Y.; NARASIMHAN, M.L.; WILSON, K.A.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.112, p.1201-1210, 1996.

- CALKINS, C.C.; SLOANE, B.F. Mammalian cysteine protease inhibitors - biochemical properties and possible roles in tumor progression. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 71-80, 1995.
- CARDENA, M. O.; MCGURL, B.; RYAN, C. A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 8273-8276, 1993.
- CHAPMAN JR., H.; REILLY JR., A. J. J.; YEE, R.; GRUBB, A. Identification of cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, as a major secretory product of human alveolar macrophages *in vitro*. **American Review of Respiratory Disease**, v.141, p. 698-705, 1990.
- COLELLA, R.; SAKAGUCHI, Y.; NAGASE, H.; BIRD, J.W.C. Chicken Egg Whit Cystatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, p. 17164-17169, 1989.
- COLELLA, R.; KAPLAN, I.; MOWER, G.D. Localisation of cystatin mRNA in chicken brain by *in situ* hybridisation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 42, p. 1487-1491, 1994.
- CREELMAN, A. R.; MULLET, J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 4114-4119, 1995.
- DIECKMANN, T.; MITSCHANG, L.; HOFMANN, M.; KOS, J.; TURK, V.; AUERSWALD, E. A.; JAENICKE, R.; OSCHKINAT, H. The structures of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. **Journal of Molecular Biology**, v.234, p. 1048-1059, 1993.
- DANON, A.; DELORME, V.; MAILHAC, N.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: a common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 647-655, 2000.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKY, D. R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7347-7351, 1980.
- EBINA, T.; TSUKADA, K. Protease Inhibitors Prevent The development of Human Rotavirus-Induced Diarrhea in Suckling Mice. **Microbiology and**

Immunology, v. 35, p. 583-588, 1991.

ENGH, R.A.; DIECKMANN, T.; BODE, W.; AUERSWALD, E.A.; TURK, V.; HUBER, R.; OSCHKINAT, H. Conformational variability of chicken cystatin - comparison of structures determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 1060-1069, 1993.

FREIJE, J. P.; BALBIN, M.; ABRAHAMSON, M.; VELASCO, G.; DALBOGE, H.; GRUBB A.; OTIN, C. L. Human cystatin D - cDNA cloning, characterisation of the *Escherichia coli* expressed inhibitor, and identification of the native protein in saliva. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 15737-15744, 1993.

FIGURSKI, S. H.; HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RKS dependent on a plasmid function provided in *trans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 1648-1652, 1979.

FOSKET, D. E. Plant Growth and Development: a Molecular Approach. *Academic Press*, 1994

GARCIA-CALVO, M., PETERSON, E.P.; LEITING, B.; RUEL, R.; NICHOLSON, D.W.; THORBERRY, N.A. Inhibition of human caspase by peptide-based and macromolecular inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 15, p.32608-32613, 1988.

HALL, A.; HAKANSSON, K.; MANSON, R.W.; GRUBB, A. Structural Basis for the Biological Specificity of Cystatin C - Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5115-5121, 1995.

HIRASHIKI, I.; OGATA, F.; YOSHIDA, N.; MAKISUMI, S.; ITO, A. Purification and complex formation analysis of a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. **Journal of Biochemistry**, v. 108, p. 604-608, 1990.

HOPKINS, W.. Introduction of Plant Physiology. *John Wiley & Sons, Inc.*, 1995

IRIE, K.; HOSOYAMA, H.; TAKEUCHI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, H.; ABE, M.; ABE, K.; ARAI, S. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 149-157, 1996.

IRVINE, J.W.; COOMBS, G.H.; NORTH, M.J. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors of parasitic protozoa. **FEMS Microbiology Letters** v. 96, p. 67-72, 1992.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors i and ii in transgenic tobacco plants: effects on natural defence against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 9871-9875, 1989.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 8041-8045, 1995.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Brazilian Journal of Cancer**, V. 414, p. 239-257, 1972.

KONDO H.; ABE, K.; NISHINURA, I.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Two Distinct Cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15832-15837, 1990.

KONDO H.; ABE, K.; EMORI, Y.; ARAI, S. Gene organisation of oryzacystatin-ii, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-i but different from those of animal cystatins. **FEBS Letters**, v. 278, p. 87-90, 1991.

KONDO, H.; IJIRI, S.; ABE, K.; MAEDA, H.; ARAI, S. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected vero cells. **FEBS Letters**, v. 299, p. 48-50, 1992.

KORANT, B.; TOWATARI, T.; KELLEY, M.; BRZIN, J.; LENARCIC, B.; TURK, V. Interactions between a viral protease and cystatins. **Biological Chemistry Hoppe-Seller**, v. 369, p. 281-286, 1987.

LABER, K.; KRIEGLSTEIN, A.; HENSCHEN, J.; KOS, V.; TURK, R.; HUBER, W. The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. **FEBS Letters**, v. 248, p. 162-168, 1989.

LANDERGREN, U. Combattinh inhibitor-insensitive proteases of insect pests. **TIBTECH**, v. 14, p. 331-333, 1996.

LEVY, E.; OTIN, C.L.; GHISO, J.; GELTNER, D.; FRANGIONE, B. Stroke in icelandic patients with hereditary amyloid angiopathy is related to a mutation in the cystatin C gene, an inhibitor of cysteine proteases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 1771-1778, 1989.

LIANG, C.; BROKHART, G.; FENG, G.H.; REECK, G.R.; KRAMER, K.J. Inhibition of digestive proteinases of stored grain coleoptera by oryzacystatin, a proteinase inhibitor from rice seed. **FEBS Letters**, v. 278, p. 139142, 1991.

LINDAHL, P.; ALRIKSSON, E.; JÖURNVALL, H.; BJÖRK, I. Interaction of the cysteine Proteinase Inhibitor Chicken Cystatin with Papain. **Biochemistry**, v. 27, p. 5074-5082, 1988.

LINDAHL, P.; NYCANDER, M.; YLINENJÄRVI, K.; POL, E.; BJÖRK, I. Characterisation By Rapid-Kinetic and Equilibrium Methods of the Interaction Between N-Terminal Truncated Forms of Chicken Cystatin and the Cysteine Proteinases Papain and Actinidin. **Biochemistry Journal**, v. 286, p. 165-171, 1992.

LINDAHL, P.; RIPOLL, D.; ABRAHAMSON, M.; MORT, J. S.; STORER, A. C. Evidence for the interaction of valine-10 in cystatin-c with the s2 subsite of cathepsin-B. **Biochemistry**, v. 33, p. 4384-4392, 1994.

LORITO, M.; BRODWAY, M.; HAYES, C. K.; WOO, S. L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D. L.; HARMAN, G. E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, p. 525-527, 1994.

MACHLEIDT, W.; NAGLER, D.K.; ASSFALGMACHLEIDT, I.; STUBBS, M.T.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E.A. Temporary inhibition of papain by hairpin loop mutants of chicken cystatin. **FEBS Letters**, v. 361, p. 185-190, 1995.

MASOUD, S.A.; JOHNSON, L.B.; WHITE, F.F.; REECK G.R. Expression of a cysteine roteinase inhibitor (oryzacistatin - i) in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 21, p. 655-663, 1993.

MARTIN, J.R.; JERALA, R.; KROON-ZITKO, L.; ZEROVNIK, E.; TURK, V.; WALTHO, J.P. Structural characterisation of human stefin a in solution and implications for binding to cysteine proteinases. **Europe Journal**, v. 225, p.

1181-1194, 1994.

MICHAEL, T.; WILSON, A. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 3134-3141, 1993.

MICHAUD, D.; CANTIN, L.; VRAIN, T.C. Carboxy-Terminal truncation of oryzacystatin ii by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. **Archives of Biochemistry & Biophysics**, v. 322, p. 469-474, 1995.

MIKKONEN, A.; PORALI, I.; CERCOS, M.; HO, T. D. A major cysteine proteinase, epb, in germinating barley seeds: structure of two intronless genes and regulation of expression. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 239-254, 1996.

MITTLER, R.; SIMON, L.; LAM, E. Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **Journal of Cell Science**, v. 13, p. 1333-1344, 1997.

NICKLIN, H.J.M.; BARRETT, A.J. Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase i by egg-white cystatin. **Biochemistry Journal**, v. 223, p. 245-253, 1984.

NYCANDER, M.; BJÖRK, I. Evidence by chemical modification that tryptophan-104 of the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin is located in or near the proteinase-binding site. **Biochemical Journal**, v. 271, -p. 281-284, 1990.

ORR, G.L.; STRICKLAND, J.A.; WALSH, T.A. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. **Journal of Insect Physiology**, v. 40, p. 893-900, 1994.

POL, E.; OLSSON, S.L.; ESTRADA, S.; PRASTHOFER, T.W.; BJORK, I. Characterisation by spectroscopic, kinetic and equilibrium methods of the interaction between recombinant human cystatin a (stefin A) and cysteine proteinases. **Biochemical Journal**, v. 311, p. 275-282, 1995.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, J. Families of serine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 19-60, 1994.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, J. Families of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 461-485, 1994.

SAITOH, E.; ISEMURA, S.; SANADA, K.; KIM, H.; SMITHIES, H.; MAEDA, N.

Cystatin superfamily. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 191-197, 1988.

SAITOH, E.; ISEMURA, S. production of human salivary type cysteine proteinase inhibitors(cystatins) by an *Escherichia coli* system and partial characterisation of recombinant cystatin S and its mutant ([117-Arginine-] Tryptophan). **Journal of Biochemistry**, v. 116, p. 399-405, 1994.

SHIBUYA, K., KAJI H.; ITOH, T.; OHYAMA, Y.; TSUJIKAMI A., TATE, S.; TAKEDA A., KUMAGAI I., HIRAO I., MIURA K., INAGAKI, F.; SAMEJIMA, T. Human cystatin A is inactivated by engineered truncation - the NH₂-terminal region of the cysteine proteinase inhibitor is essential for expression of its inhibitory activity. **Biochemistry**, v. 34, p. 12185-12192, 1995a.

SHIBUYA, K.; KAJI, H.; OHYAMA, Y.; TATE, S.; KAINOSHO, INAGAKI, F.; SAMEJIMA, T. Significance of the highly conserved Gly-4 residue in human cystatin A. **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 635-642, 1995b.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 121, p. 431-443, 1999.

SONG, I.; TAYLOR, M.; BAKER, K.; BATEMAN, RC. Inhibition of cysteine proteinases by carica papaya cystatin produced in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 162, p. 221-224, 1995.

STOKA, V.; NYCANDER, M.; LENARCIC, B.; LABRIOLA, C.; CAZZULO, J. J.; BJORK, I.; TURK V. Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. **FEBS Letters**, v. 370, p. 101-104, 1995.

STORER, A.C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods in Enzimology**, v. , p. 486-499, 1994.

TATE, S.; USHIODA, T.; UTSUNOMIYATATE, N.; SHIBUYA, K.; OHYAMA, Y.; NAKANO, Y.; KAJI, H.; INAGAKI, F.; SAMEJIMA, T.; KAINOSHO, M. Solution Structure of a Human Cystatin a Variant, Cystatin A (2-98) M65L, by NMR Spectroscopy - a Possible Role of the Interactions Between the N- and C-Termini to Maintain The Inhibitory Active Form of Cystatin A. **Biochemistry**, v. 34, p. 14637-14648, 1995.

TURK B.; RITONJA, A.; BJÖRK, I.; STOKA, V.; DOLENC, I.; TURK, V.

Identification of bovine Stefin A, a Novel Protein Inhibitor of Cysteine Proteinases. **FEBS Letters**, v. 360, p. 101-105, 1995.

TURK, V.; BRZIN, J.; LONGER, M.; RITONJA, A.; EROPKIN, M. Protein Inhibitors of Cysteine Proteinases - Amino-acid Sequence of Cystatin from Chicken Egg White. **Hoppe-Seyler's Z. Physiology Chemistry**, v. 364, p. 1487-1496, 1983.

TURK, V.; BODE, W. The Cystatin: Protein Inhibitors of Cysteine Proteinases. **FEBS Letters**, v. 285, p. 213-219, 1991.

TURK, B.; BIETH, J. G.; BJORK, I.; DOLENC, I.; TURK, D.; CIMERMAN, N.; KOS, J.; COLIC, A.; STOKA, V.; TURK, V. Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 225-230, 1995.

URWIN, P.E.; ATKINSON, H.J.; WALLER, D.A.; MCPHERSON, M.J. Engineered Oryzacystatin-I Expressed in Transgenic Hairy Roots Confers Resistance to *Globodera Pallida*. **Plant Journal**, v. 8, p. 121-131, 1995.

WANG, M.; HOEKSTRA, S.; VAN BERGEN, S.; LAMERS, G.E.M.; OPPEDIJK, B.J.; VAN DER HEIJDEN, M.W.; DE PRIESTER, W.; SCHILPEROORT, R.A. Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 489-501, 1999.

WALDRON, C.; WEGRICH, L.M.; MERLO, P.A.O.; WALSH, T. A. Characterisation of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an 8-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 801-812, 1993.

WALSH, T. A.; STRICKLAND, J. A. Proteolysis of the 85 - kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains.

Plant Physiology, v. 103, p. 1227-1234, 1993.

WATANABE, H.; ABE, K.; EMORI, Y.; HOSOYAMA, H.; ARAI, S. Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 16897-16902, 1991.

WEISEL, J. W.; NAGASWAMI, C.; WOODHEAD, J. L.; DELA CADENA, R. A.; PAGE, J. D.; COLMAN, R. W. The shape of high molecular weight kininogen. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 269, p. 10100-10106, 1994.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L.. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 1089- 1102, 1990.

WOOD, N.T. 2001. Apoptosis: a way of life for plants? **Trends in Plant science**. V. 6. issue 10.

XU, F.X.; CHYE, M.L. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. **Plant Journal**, v. 1, p.321-327, 1999.

YAMAMOTO, C.; MATSUMOTO, K.; OHISHI, H.; ISHIDA, T.; INOUE, M.; KITAMURA, K.; MIZUNO, H. Refined X-ray structure of papain E-64-C complex at 2.1-Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 14771-14777, 1991.

Embrapa

Algodão



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



GOVERNO FEDERAL