Carlos Felipe Tasso Filietaz

Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

Carlos Felipe Tasso Filietaz

Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Rios Lopes

Versão original

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Filietaz, Carlos Felipe Tasso.
Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases / Carlos Felipe Tasso Filietaz. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Adriana Rios Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Digestão de artrópodes vetores.

Versão do título para o inglês: Characterization of lipid digestion in hematophagous vectors and the physiological role of lipases.

Descritores: 1. Lipases 2. Arthropoda 3. Digestão 4. Enzimas 5. *Aedes aegypti* 6. *Amblyomma cajennense* I. Lopes, Adriana Rios II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0160/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Felipe Tasso Filietaz.

Título da Dissertação: Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases.

Orientador(a): Adriana Rios Lopes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **403/10** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lípases*" sob a responsabilidade de **Carlos Felipe Tasso Filietaz,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 21 de junho de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

A minha família pelo amor e carinho, que foram contribuição essencial em minha formação. Aos meus pais Carlos e Gilseres, a minha irmã Carla e a minha namorada Carla pela presença constante, apoio, conselhos, carinho, amor e principalmente por me ajudar a olhar sempre para o alto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Carlos e Gilseres, pelo apoio durante todo o período do mestrado, por estarem sempre do meu lado, pelas conversas, conselhos e principalmente por esse amor que eu posso sentir todos os dias.

A minha irmãzinha Carla, por ser minha amiga, por me aguentar todo dia eu sei que não é para qualquer um. Obrigado pelo carinho. Você é um grande presente.

A minha namorada Carla, minha companheira, amiga e auxiliadora. Obrigado linda pelo apoio, pelas longas conversas, pelos conselhos e por sempre estar presente. É muito bom saber que eu tenho o privilégio de dividir minha vida com uma pessoa tão especial como você. “O cordão de três dobras não se quebra tão depressa”.

A minha orientadora Adriana, por ser essa pessoa tão especial. Obrigado pela oportunidade de fazer parte dessa equipe, por poder aprender cada dia com esse exemplo de profissional, dedicado e cuidadoso. Agradeço também pelas conversas sinceras, pela preocupação com a formação dos seus alunos e por ser mais que uma orientadora, ser uma grande amiga.

Aos meus colegas de laboratório, Ciça, Felipe, Pedro, e aos que já passaram por ele, Antônio, Rodrigo, Carla e Ângela. Obrigado pelos bons momentos vividos nesse ambiente tão agradável para se trabalhar e por poder aprender mais com vocês.

A todos os funcionários e pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Biofísica, esse local que é quase uma segunda casa.

A Dra. Margareth de Lara Capurro-Guimarães, do Laboratório de Mosquitos geneticamente modificados, por fornecer os mosquitos, sem os quais o trabalho não poderia ser realizado. Agradeço a seus alunos Soraia e Danilo, pelo tempo e disponibilidade dispendidos me ajudando com os animais e pela amizade e bons momentos.

A Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi e a Dra. Simone Michaela Simons do Laboratório de Bioquímica e Biofísica e a Dra. Solange Lima-Netto e a Dra. Darci Moraes B. Battesti do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, por fornecer os carrapatos.

A pós-graduação no programa Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro e ao departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de estender os meus estudos em contato com os melhores profissionais da área.

A Capes pela bolsa concedida.

As agencias financiadoras que deram suporte ao laboratório nesse período: FAPESP, IFS e CNPq.

E a meu Deus, porque sem Ele nenhuma dessas pessoas importantes citadas aqui estariam em minha vida.

RESUMO

FILIETAZ, C. F. T. **Caracterização da digestão de lipídeos em vetores hematófagos e o papel fisiológico das lipases.** 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As lipases (3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis resultando na liberação de ácidos graxos. Pouco se sabe sobre a digestão de lipídeos em artrópodes. Mosquitos e carrapatos são os principais artrópodes vetores de doenças humanas. O objetivo desse trabalho foi estudar as enzimas envolvidas na digestão de lipídeos no mosquito *Aedes aegypti* na fase larval e adulta e no carrapato *Amblyomma cajennense*, vetores de Dengue e da Febre Maculosa Brasileira respectivamente. A caracterização enzimológica envolveu a identificação, determinação de propriedades gerais como massa molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e ao pH, especificidade frente a substratos distintos, o isolamento cromatográfico e o estudo da expressão das lipases digestivas possibilitando comparações entre as duas fases de desenvolvimento de *Ae. aegypti* e entre os dois vetores hematófagos. As lipases estudadas apresentaram pHs ótimos na faixa de 8,5 a 9,0 indicando que estas enzimas pertencem a família das lipases neutras. Estas lipases apresentam ampla faixa de estabilidade ao pH e são relativamente estáveis em altas temperaturas. A caracterização da atividade destas lipases com a utilização de diferentes substratos evidenciou que estas enzimas apresentam maior eficiência hidrolítica sobre substratos de cadeias carbônicas curtas como butirato e heptanoato. Contudo, estes resultados indicam que as enzimas envolvidas na digestão de lipídeos nas duas fases de desenvolvimento de *Aedes aegypti* são distintas. A enzima da fase larval apresenta uma maior afinidade por substratos de cadeias longas. Entretanto, a catálise desta reação é baixa resultando em uma baixa eficiência catalítica enquanto a lipase de adulto apresenta uma afinidade e velocidade de catálise menores quanto maior o substrato. Separações cromatográficas, efeito de pH e temperatura e efeitos de íons sobre a atividade destas lipases em estudo corroboram o dado de que as lipases das diferentes fases de desenvolvimento de *Aedes aegypti* são distintas. O estudo combinado do

genoma de *Aedes aegypti* e PCR semi quantitativo comprovaram a expressão diferencial destas enzimas indicando ainda tratar-se de uma família multigênica envolvida na expressão de lipases digestivas provavelmente reguladas pela dieta. Estudos de modelagem molecular mostram diferenças estruturais importantes entre as lipases de mamífero e artrópodes principalmente relacionadas à diferenças das regiões de regulação da atividade enzimática e de interação com cofatores como a colipase de mamíferos. A comparação dos modelos estruturais indica diferenças mesmo entre as lipases de diferentes espécies de artrópodes. Os dados obtidos neste trabalho bem como dados da literatura indicam que além da função digestiva e obtenção de ácidos graxos essenciais as lipases podem estar envolvidas em defesa contra patógenos, abrindo novas perspectivas para o estudo destas enzimas.

Palavras-chave: Lipase. Digestão. Enzimas. *Aedes aegypti*. *Amblyomma cajennense*.

.

ABSTRACT

FILIETAZ, C. F. T. **Characterization of lipid digestion in hematophagous vectors and the physiological role of lipases.** 2011. 99 p. Masters thesis (Biology of Host-Pathogen Relationship) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Lipases (EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of triacylglycerol releasing fat acids and glycerol as products of this reaction. There is little information about Arthropoda digestive lipase. Mosquitoes and ticks are the main vectors of human diseases. This work aimed to comprehend lipid digestion in the mosquito Aedes aegypti (larva and adult fed females) and in the tick Amblyomma cajennense, vectors of Dengue and Rock Mountain Spotted Fever respectively. Enzymatic characterization involved the identification of lipase activity, moleculas mass measurement, pH optimum, thermal and pH stability and substrate specificity with the use of different substates, chromatographic separation and lipase expression in different mosquitoes tissues. All these measures allowed the comparison of lipases between larva and adult female from Aedes aegypti and also the comparison of the two hematophagous vectors. Studied lipases presented pH optimum in a range between 8.5 and 9.0 suggesting that these enzymes belong to the neutral lipase family. These lipases are very stable to different pH and high temperatures. The use of different substrates revealed that these enzymes hydrolysis short substrates as butyrate and heptanoate more efficiently than larger ones. However, the analysis of enzyme affinity to distinct substrates and hydrolysis indicated that enzymes involved in lipid digestion from mosquitoes in both development stages are different. Larval lipase presents higher affinity to longer substrates. However, the catalysis is a slow step of this reaction resulting in a low catalytic efficiency. Adult lipase binds and hydrolysis smaller substrates better than the larger ones. Chromatographic separation, pH effects on lipase activity, temperature stability and ion activation corroborate the data suggesting that enzymes involved in lipid digestion in larvae and female mosquitoes are different. Studies of Aedes aegypti genome and semi-quantitative PCR also demonstrated differentially expressed lipases also indicating that lipases are products of a multigenic family which expression is probably regulated by diet. Molecular modelling of showed important differences between mammalian and Arthropoda lipases mainly in domains involved in activity control and binding to

cofactors as mammalian colipase. Comparison of Arthropoda lipase models indicated differences also between these lipases probably related to an early differentiation of lipase during evolution. Data on the present work and on literature point to additional functions to digestive lipase besides essential fat acids uptake, for example, as enzymes involved in defense against pathogens, opening new possibilities to lipase studies.

Keywords: Lipase. Digestion. Enzymes. *Aedes aegypti*. *Amblyomma cajennense*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - foto do carrapato *Amblyomma cajennense*..... 23

Figura 2 - foto da larva de quarto estádio (L4) do mosquito *Aedes aegypti*..... 25

Figura 3 - foto da fase adulta do mosquito *Aedes aegypti*..... 26

Figura 4 - representação esquemática do sistema digestório dos insetos..... 30

Figura 5 - representação esquemática do sistema digestório do carrapato *Amblyomma cajennense*..... 31

Figura 6 - representação esquemática do sistema digestório em larvas de *Aedes aegypti*..... 31

Figura 7 - representação esquemática do sistema digestório da fase adulta do mosquito *Aedes aegypti*..... 32

Figura 8 - foto das estruturas da lipase humana e colipase, estrutura fechada e aberta..... 34

Figura 9 - substratos derivados de 4-metilumbeliferona..... 40

Figura 10 - critérios de seleção para a escolha das sequências..... 49

Figura 11 - alinhamento das sequências escolhidas..... 50-51

Figura 12 - teste dos diferentes substratos em cromatografia de *Aedes aegypti* larva..... 58

Figura 13 - teste dos diferentes substratos em cromatografia de *Aedes aegypti* adulto..... 59

Figura 14 - efeito da presença de cálcio..... 61

Figura 15 - inativação térmica..... 62

Figura 16 - pH ótimo..... 65

Figura 17 - estabilidade ao pH..... 66

Figura 18 - estabilidade ao pH em *Aedes aegypti* adulto na presença de benzamidina..... 67

Figura 19 - Kms das lipases em preparações brutas..... 68

Figura 20 - marcha de isolamento da lipase de *Aedes aegypti* larva..... 71

Figura 21 – marcha de isolamento da lipase de *Aedes aegypti* adulto..... 72

Figura 22 - filtração em gel *Aedes aegypti* adulto..... 73

Figura 23 - cromatografia de troca iônica *Amblyomma cajennense*..... 73

Figura 24 - Kms da lipase parcialmente isolada de *Aedes aegypti* larva..... 77

Figura 25 - Kms da lipase parcialmente isolada de *Aedes aegypti* adulto..... 78

Figura 26 - transcrição dos mRNAs..... 79

Figura 27 - modelos moleculares das lipases de *Aedes aegypti*..... 81

Figura 28 - modelo molecular da lipase de *Ixodes scapularis*..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - iniciadores das sequências de lipase utilizadas..... 52
Tabela 2 - atividade absoluta e especifica com diferentes substratos em lipases presentes no sistema digestório dos animais em estudo..... 56
Tabela 3 - valores de Km das lipases digestivas em estudo..... 67
Tabela 4 - efeito da concentração de diferentes substratos na atividade das lipases digestivas em estudo..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - atividade absoluta

AA-C-As – carcaças de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue

AA-C-Sc – carcaças de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose

AA-I-As - intestino de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue

AA-I-Sc - intestino de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose

Ae - *Aedes aegypti*

AE - atividade especifica

AL-C - carcaças de larvas *Aedes aegypti*

AL-I - intestino de larvas *Aedes aegypti* larva

Asp - ácido aspártico

ATGL - triacilglicerol lipases de tecido adiposo

big-PI Predictor – "GPI Modification Site Prediction"

Ca^{+2} - cálcio

$CaCl_2$ – cloreto de cálcio

CO_2 – dióxido de carbono

Cys - cisteína

D - material dialisado

DAGs – diacilgliceróis

DENV - vírus da dengue

DMPTB - 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNTB - 5,5´ditiobis (2-nitro benzoic acid)

E-64 - N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ExPASy – "Expert Protein Analysis System"

FcR - receptores para a porção Fc das imunoglobulinas

FP – fosfolipídeos

g – aceleração da gravidade:

GDSL – família de serino esterases/lipases

GPI – glicosil-Phosfatidil-Inositol

H_20-DEPC – Água tratada com dietilpirocarbonato

HCl - ácido clorídrico

HEPES - ácido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico

His - histidina

kDa – kilo Dalton

K_M – constante de Michaelis-Menten

L4 - quarto estádio de desenvolvimento larval

Lid – tampa, estrutura presente na região N-terminal das lipases

M – molar

MES – ácido 2-N morfolin oetano sulfônico

$MgCl_2$ – cloreto de magnésio

µL - microlitro

mL – mililitro

mL/min – mililitro por minuto

µM - micromolar

mM – milimolar

MPSS – “Massively Parallel Signature Sequencing”

mRNA – RNA mensageiro

n - número de indivíduos (amostral)

NaCl - cloreto de sódio

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

nm – nanômetro

ºC – graus centígrados

p/v – peso por volume

PASA – “Program to Assemble Spliced Alignments”

pH – potencial hidrogeniônico

PMSF – “phenylmethylsulfonyl fluoride”

PR6 - proteína ribossomal 6

RNA - ácido ribonucleico

SD: material sem dialisar

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Ser - Serina

SOSUI – “Classification and Secundary Structure Prediction of Membrane Proteins”

$T_{1/2}$ – meia-vida

TAE: Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5

TAGs: Triacilgliceróis

TLCK - “tosyl-lysine-chloromethyl ketone”

TPCK – “tosyl-phenylalanine-chloromethyl ketone”

TRIS – hidroximetilaminometano

UV – radiação ultravioleta

V – volts

v/v - volume por volume

V_{MAX} – velocidade máxima da reação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 21
1.1 A importância do filo Arthropoda: benefícios e malefícios na interação homem-artrópode..... 21
1.2 *Amblyomma cajennense*: o vetor modelo Arachnida..... 22
1.3 *Aedes aegypti*: o vetor modelo Insecta..... 24
1.3.1 Febre amarela..... 27
1.3.2 Dengue..... 28
1.4 O sistema digestório em Artrópodes..... 28
1.5 Lipases..... 32
1.6 Lipases em artrópodes vetores e não vetores..... 34
2 OBJETIVOS..... 37
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 38
3.1 Manutenção dos animais e preparo das amostras..... 38
3.1.1 Aedes aegypti..... 38
3.1.2 Amblyomma cajennense..... 38
3.2 Ensaios enzimáticos de lipase e quantificação de proteína..... 39
3.2.1 Substratos fluorimétricos para detecção de lipase..... 39
3.2.2 Substrato colorimétrico para detecção de lipase..... 41
3.2.3 Determinação de proteína..... 41
3.3 Efeito da concentração de cálcio..... 42
3.4 Efeito da temperatura sobre a atividade de lipase..... 42
3.5 Efeito do pH sobre as diferentes atividades enzimáticas..... 42
3.5.1 pH ótimo..... 42
3.5.2 Estabilidade ao pH..... 43
3.6 Caracterização cinética das lipases..... 43
3.6.1 Efeito da concentração do substrato oleato em homogeneizado bruto de intestino médio..... 43
3.6.2 Diferentes substratos oleato, butirato, heptanoato e estearato em reunido ativo..... 44
3.7 Isolamento das lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Amblyomma cajennense*..... 45
3.7.1 Lipase de Aedes aegypti larva..... 45
3.7.2 Lipase de Aedes aegypti adulto..... 45

3.7.2.1 Filtração em gel..... 46
3.7.3 Lipase de Amblyomma cajennense..... 46
3.8 Seleção das sequências de lipase digestiva de *Aedes aegypti*..... 46
3.9 Extração de RNA total de intestino médio e carcaça..... 47
3.10 Síntese da fita de cDNA..... 52
3.11 Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)..... 53
3.12 Eletroforese de DNA em gel de agarose..... 53
3.13 Modelagem molecular das lipases digestivas expressas em *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Ixodes scapularis*..... 54
4 RESULTADOS..... 55
4.1 Lipases no sistema digestório de artrópodes vetores: propriedades gerais..... 55
4.2 Efeito da presença de íons sobre a atividade das lipases de *Aedes aegypti* larva, adulto e de *Amblyomma cajennense*..... 59
4.3 Efeito de temperatura sobre as lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e *Amblyomma cajennense*..... 60
4.4 Efeito do pH sobre a atividade de lipase..... 63
4.4.1 pH ótimo..... 63
4.4.2 Estabilidade ao pH..... 63
4.5 Efeito da concentração de oleato sobre a atividade de lipase presente em homogeneizados de intestino médio de larvas e adultos de *Aedes aegypti* e *Amblyomma cajennense*..... 64
4.6 Isolamento das lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Amblyomma cajennense*..... 69
4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos para *Aedes aegypti* larva e adulto com diferentes substratos..... 74
4.8 Análise das sequências de lipase expressas no intestino de *Aedes aegypti* nos diferentes estágios de desenvolvimento..... 75
4.9 Modelos moleculares preditos para as lipases digestivas de *Aedes aegypti* e *Amblyomma cajennense*..... 80
5 DISCUSSÃO..... 83
5.1 A digestão de lipídeos em artrópodes vetores..... 83
5.2 Especificidade das lipases de insetos e propriedades gerais..... 84
5.3 A expressão diferencial das lipases digestivas..... 88

6 CONCLUSÕES..... 90
REFERÊNCIAS*..... 91
ANEXO – Caracterização de Lipases em Arthropoda

1 INTRODUÇÃO

1.1 A importância do filo Arthropoda: benefícios e malefícios na interação homem-artrópode

Mais de 80% de todas as espécies descritas nos ecossistemas terrestres, de água doce e marinho são do filo Arthropoda, sendo o filo mais diverso quando comparado com qualquer outro táxon animal. Dentre a imensa gama de animais pertencentes a esse filo podemos citar aranhas, carrapatos, besouros, mosquitos, camarões dentre muitos outros animais. Nenhum outro grupo de invertebrados se aproxima da importância ecológica e econômica deste grupo.

Tamanha diversidade e representatividade em biomassa não poderia ser indiferente ao homem. Algumas espécies de artrópodes são essenciais para a manutenção da vida no ambiente terrestre pelo seu envolvimento em processos de polinização, aeração do solo, decomposição de resíduos e fertilização do solo. Consequentemente, estes processos são benéficos ao homem. Outros exemplos são o da nutrição direta (caranguejos, lagostas e camarões) ou de produtos como o mel e a seda (GRIMALDI e ENGEL, 2005; RESH e CARDÉ, 2009). Entretanto, muitas espécies de artrópodes são os principais vetores de doenças que afetam diretamente o homem. Os artrópodes também são vetores de doenças animais e vegetais. Além disso, praticamente 50% dos artrópodes são fitófagos sendo as principais pragas agrícolas com conseqüente perda de aproximadamente 37% da produção de alimentos em todo o mundo mesmo com a utilização de estratégias de controle (HAQ; ATIF; KHAN, 2007). Todos estes problemas levam a grandes investimentos, da ordem de bilhões de dólares anuais, em políticas de saúde pública e em estratégias de controle tornando os artrópodes problemas de saúde e política públicas e econômicos.

Os principais artrópodes vetores de doenças humanas são mosquitos (Insecta) e carrapatos (Arachnida) (PAROLA e RAOULT, 2001), o que levou a escolha dos dois animais modelo utilizados neste estudo: o mosquito *Aedes aegypti* e o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A ampla diversidade de espécies de artrópodes permitiu a colonização dos mais diversos nichos ecológicos. O sucesso desta ocupação certamente incluiu a

seleção de distintas adaptações em relação à dieta e digestão nestes animais. Portanto, um importante foco de estudo para a compreensão da fisiologia destes animais e da interação vetor – patógeno- hospedeiro é o sistema digestório dos vetores Arthropoda.

1.2 *Amblyomma cajennense*: o vetor modelo Arachnida

Os carrapatos estão distribuídos em praticamente todas as regiões do planeta e são responsáveis por uma grande variedade de doenças causadas por uma ampla gama de agentes patogênicos, que incluem protozoários, vírus, bactéria e fungos. Somado as infecções causadas por microorganismos, carrapatos podem causar paralisia, alergias e reações tóxicas severas em seus hospedeiros sendo que muitas dessas reações podem levar a morte. As perdas econômicas mundiais causadas por carrapatos apenas em criações de gado são estimadas em mais de 87 bilhões (RESH e CARDÉ, 2009).

O carrapato *Amblyomma cajennense* (Figura 1) está amplamente distribuído em áreas neotropicais do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, incluindo as Ilhas Caribenhas. Capivaras e antas são os hospedeiros primários do carrapato *Amblyomma cajennense* na América do Sul. Após a introdução dos cavalos na América Latina no período da colonização européia, o *Amblyomma cajennense* se tornou uma praga para estes animais, que se tornaram hospedeiros primários para todos os estágios do ciclo do parasita (LABRUNA et al., 2002).

O carrapato *Amblyomma cajennense* possui um ciclo trioxeno de desenvolvimento, ou seja, tem que se alimentar de pelo menos três hospedeiros para que possa completar o seu desenvolvimento. Sob condições naturais, o carrapato *Amblyomma cajennense* produz uma geração por ano (condições da região sudoeste). Entretanto, o ciclo de vida desta espécie pode variar de região para região e está associado ao comportamento de diapausa das larvas e temperatura do solo (LABRUNA et al., 2003).

O carrapato *Amblyomma cajennense* é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, que é o agente da Febre Maculosa Brasileira (DEL FIOL et al., 2010; BRASIL, 2010).

Figura 1 - Fêmea do carrapato *Amblyomma cajennense* na fase adulta de desenvolvimento, em (A) podemos observar o carrapato antes da alimentação sanguínea e em (B) podemos observar a fêmea de carrapato após este processo.
Fonte: A) Genesio, 2009; B) Policlínica veterinária de Cotia, 2011.

A febre maculosa brasileira é causada por uma bactéria gram negativa *Rickettsia rickettsii*, a qual é um parasita intracelular obrigatório alojando-se no citoplasma dos seus hospedeiros vertebrados e invertebrados que a transmitem. A febre maculosa ocorre em países ocidentais, particularmente nos Estados Unidos, Canadá, México, Panamá, Costa Rica, Argentina, Colômbia e Brasil. No Brasil a maioria dos casos se concentra na região Sudeste, com casos esparsos no sul do Brasil. A maior prevalência coincide com a presença do principal vetor, o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A transmissão da *Rickettsia* se dá pela picada do carrapato em qualquer uma das fases do desenvolvimento (larva, ninfa e adulto). O carrapato transmite o microorganismo por meio de suas glândulas salivares. Após entrar na célula do hospedeiro humano, o microorganismo alcança o citoplasma onde se multiplica por fissão binária com tempo de replicação de aproximadamente 10 minutos. Com a penetração nas células endoteliais humanas, ocorre uma resposta inflamatória aguda, mediada pela produção de citocinas, resultando em aumento de permeabilidade vascular.

O estado de São Paulo corresponde sozinho por 45,1% de todos os casos notificados no país (1997 a 2009). A taxa de mortalidade no Brasil, de 20 a 30%, é considerada alta. A alta taxa de mortalidade está intimamente associada à dificuldade de realização do diagnóstico, o que leva a descoberta tardia da doença dificultando o tratamento (DEL FIOL et al., 2010).

1.3 *Aedes aegypti*: o vetor modelo Insecta

O principal problema relacionado à manutenção de populações do mosquito *Aedes aegypti*, se deve ao fato de ele ser o vetor de duas arboviroses de grande importância em saúde pública: a febre amarela e a dengue.

Acredita-se que o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 2 e Figura 3) tenha migrado para o continente americano da região oeste do continente africano por volta dos séculos XVI ao XVIII a bordo de navios negreiros, e tendo nos dias de hoje uma ampla distribuição geográfica (LOUNIBOS, 2002).

O mosquito está intimamente associado com a presença humana tanto pelas condições necessárias para a sua reprodução favorecidas no ambiente peridomiciliar pela urbanização desordenada e políticas de infraestrutura e

saneamento básico como por ser o homem o seu hospedeiro preferencial (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001).

As fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* têm como principal fonte protéica a alimentação sanguínea, que é necessária para o processo de oogênise (desenvolvimento do ovo), bem como para ser utilizada como fonte de energia para o vôo. A fêmea adulta pode se alimentar de múltiplos hospedeiros humanos durante um único ciclo gonotrófico (FORATTINI, 2002). A contaminação de um destes hospedeiros levará à contaminação do mosquito dado que este arbovírus entra no mosquito com a alimentação de sangue, portanto através do intestino médio. O vírus inicialmente replica nas células epiteliais constituintes do intestino médio e após este processo há um processo de dispersão por outros tecidos do inseto inclusive as glândulas salivares. Após a replicação viral nas glândulas salivares e a conseqüente contaminação da saliva destes animais é que as partículas virais serão injetadas em um novo hospedeiro (STEINERT e LEVASHINA, 2011).

Figura 2 – Larva do mosquito *Aedes aegypti*, no quarto estádio de desenvolvimento (L4). Fonte: Wikipedia, 2008.

Figura 3 – Fêmea do mosquito *Aedes aegypti* na fase adulta de desenvolvimento. (A) Fêmea deste mosquito antes da alimentação sanguínea e (B) fêmea durante o processo de alimentação sanguínea já parcialmente ingurgitada.
Fonte: A) De Freitas, 2009; B) Jornal do Pontal, 2009.

O mosquito *Aedes aegypti* não necessita de grandes coleções de água para sua reprodução, colocando seus ovos em qualquer recipiente que contenha água limpa. Os ovos são colocados nas paredes de recipientes que possam acumular água e são resistentes a dessecação, podendo permanecer viáveis por meses até eclodirem quando submersos em água (FORATTINI, 2002).

1.3.1 Febre amarela

O vírus causador da febre amarela é um flavivirus (Flaviridae: Flavivirus), provavelmente de origem africana como indicado por estudos filogenéticos, sendo que a disseminação deste vírus no continente americano ocorreu durante o comércio de escravos, no início do século XVI (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007).

Até o início do século XX ocorreram muitas epidemias de febre amarela em cidades da América do Norte e do Sul, associadas ao mosquito *Aedes aegypti*. Neste período houve uma intensa campanha de erradicação do mosquito, com o amplo uso de DDT, o que fez com que a doença desaparecesse dos centros urbanos (KYLE e HARRIS, 2008). Com a descontinuidade das medidas de controle o mosquito reemergiu resultando no reaparecimento do ciclo zoonótico da febre amarela, culminando na re-emergência dos casos de dengue nesse mesmo período na América do Sul. A expansão epidêmica do vírus na Ásia e nas Américas, e a re-emergência dos mosquitos em centros urbanos podem aumentar as chances do estabelecimento de um ciclo endêmico permanente (MUTEBI et al., 2004; WEAVER e REISEN, 2010).

A cepa africana ainda mantém a capacidade de desenvolver seu ciclo em centros urbanos e, consequentemente, gerar epidemias, o que resulta em dezenas de milhares de casos notificados anualmente no continente africano (BRYANT; HOLMES; BARRETT, 2007). As epidemias africanas ainda ocorrem apesar da existência de uma vacina efetiva (17DD), desenvolvida em 1937 (MONATH, 1988).

1.3.2 Dengue

A dengue é, dentre as doenças transmitidas por artrópodes, a mais comum no mundo (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2009). Essa doença é endêmica em mais de 100 países em regiões como a África, as Américas, o Leste Europeu, o Sudeste Ásiatico e o Oeste do Pacífico. Existem quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV) e cada um desses sorotipos pode causar os sintomas da doença que vão desde a febre de dengue acompanhada de fraqueza, dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue (World Health Organization, 2010).

A infecção por um sorotipo confere a imunidade contra o mesmo, mas não contra os outros sorotipos. Tem sido observado que uma segunda infecção por um sorotipo heterólogo é um fator de risco para o desenvolvimento da dengue hemorrágica que pode levar ao choque de dengue (KYLE e HARRIS, 2008). Acredita-se que os anticorpos gerados em uma primeira infecção direcionam as partículas do vírus para células que carregam receptores Fc (FcR), dentre essas células estão monócitos, macrófagos e células dendríticas, que são alvos naturais para o vírus. Como a ligação anticorpo-vírus é de baixa afinidade, o vírus não é inativado, portanto, esse direcionamento por FcR promove um aumento da infecção dessas células, resultando em uma ativação extensiva de células T e consequentemente na liberação de altos níveis de citocinas e mediadores químicos. Essa liberação leva a um dano no endotélio celular e extravasamento do plasma (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A dengue infecta 50 a 100 milhões de indivíduos anualmente (WHO, 2011). Tem sido observado um grande crescimento do número de pacientes que tem apresentado a forma mais severa da doença a dengue hemorrágica e o choque de dengue que tem uma estimativa de 500,000 casos anuais.

1.4 O sistema digestório em Artrópodes

O tubo digestivo dos artrópodes pode ser dividido em três regiões: Intestino anterior, médio e posterior (Figura 4). O intestino anterior e o posterior são derivados da ectoderme sendo revestidos de epiderme e cutícula. Somente a porção média do sistema digestório tem origem endodérmica. Na maioria dos insetos o intestino médio é revestido por uma membrana quitino-proteíca denominada de membrana

peritrófica. A presença de membrana peritrófica também já foi descrita em carrapatos. No entanto, não existem informações suficientes para a compreensão do papel fisiológico da membrana peritrófica nestes animais (COONS e ALBERTI, 1999; RUDZINSKA et al., 1982). O intestino anterior é responsável pela ingestão, armazenamento e processamento inicial do alimento prévio a digestão química. O intestino médio tem como funções a secreção de enzimas, a hidrólise e a absorção do alimento ingerido, absorção e secreção de água. O intestino posterior é responsável pela formação e armazenamento de fezes e pela reabsorção de água (TERRA e FERREIRA, 1994). O intestino constitui a primeira barreira de defesa contra a invasão de patógenos, essa barreira pode ser física (invasão das células epiteliais) ou química devido à presença das enzimas digestivas e da presença de inibidores enzimáticos (BATON e RANFORD-CARTWRIGHT, 2007). A compreensão deste sistema tem auxiliado no desenvolvimento de estratégias de controle. Encontramos na literatura diversas estratégias de controle que tem o sistema digestório como alvo: uso de toxinas como as de *Bacillus thurigiensis* (SOBERÓN et al., 2007), uso de RNA de interferência (GU et al., 2011), uso de inibidores enzimáticos, hormônios de crescimento para intervir na fisiologia do animal e viroses direcionadas ao estágio larval (GORDON e WATERHOUSE, 2007; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010; SPERANÇA e CAPURRO, 2007). Muitos patógenos se alojam nas células intestinais ou tem que passar por elas em algum momento para penetrar no animal, ficando dessa forma expostos às enzimas digestivas. As enzimas têm um papel fundamental no processo de digestão, o que é refletido na extensa literatura bioquímica encontrada para hidrolases digestivas (TERRA e FERREIRA, 2005). O grupo das hidrolases mais estudado é o das enzimas proteolíticas e seus inibidores. Contudo, pouco se sabe sobre a digestão de lipídeos em artrópodes e sobre as características das lipases digestivas presentes nos animais estudados.

O intestino de carrapatos da família Ixodidae (Figura 5) é composto por células complexas, possuindo diferentes organelas e diversas inclusões citoplasmáticas que refletem a atividade multifuncional do intestino médio desses animais, caracterizada por funções como armazenamento de alimento, regulação de água e íons, excreção e nutrição (COONS e ALBERTI, 1999). O intestino médio das fêmeas de *Amblyomma cajennense* sofrem grandes mudanças durante o período de alimentação. Apesar da intensa mudança estudos indicam que que algumas células

permanecem intactas (organelas preservadas) e existe a evidência de secreção de vesículas, o que provavelmente esta ligado a secreção de enzimas (CAPERUCCI; BECHARA; MATHIAS, 2010).

O intestino médio de *Aedes aegypti* larva (Figura 6) consiste em um simples tubo com uma camada única composta por células colunares, que possuem microvilosidades e citoplasma com presença abundante de mitocôndrias. Sua estrutura e função não difere muito de outros culicideos (CLARK et al., 2005). Em fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* o intestino médio (Figura 7) é revestido de uma membrana peritrófica do tipo 1, que modula a digestão do sangue e protege o epitélio de danos físicos e químicos (KATO et al., 2008).

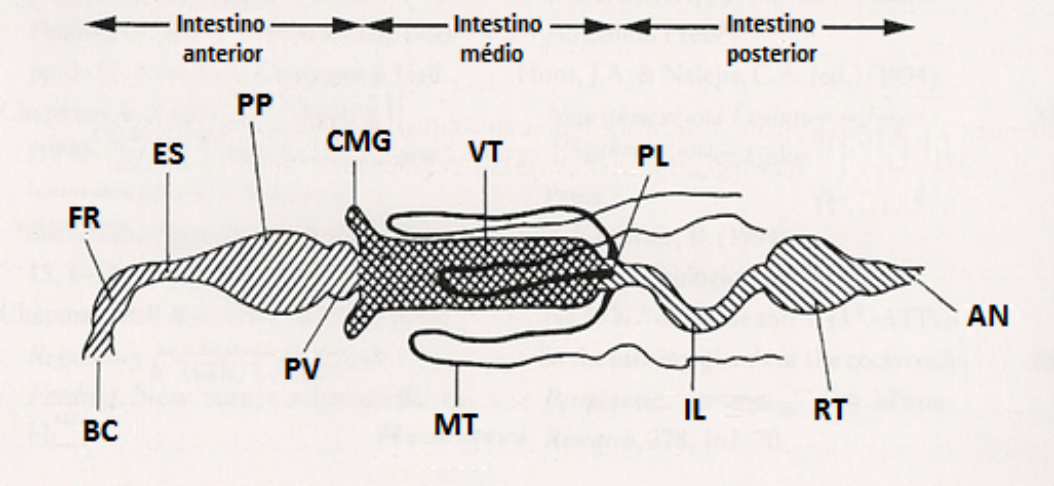


Figura 4 – Representação esquemática do sistema digestório dos insetos: (BC) Boca, (FR) Faringe, (ES) Esôfago, (PP) Papo, (PV) Proventrículo, (CMG) Ceco do Intestino médio, (VT) Ventrículo, (MT) Túbulos de Malpighi, (PL) Piloro, (IL) Íleo, (RT) Reto e (AN) Ânus. Diagrama mostrando as subdivisões em um inseto generalizado. Fonte: Chapman (1998).

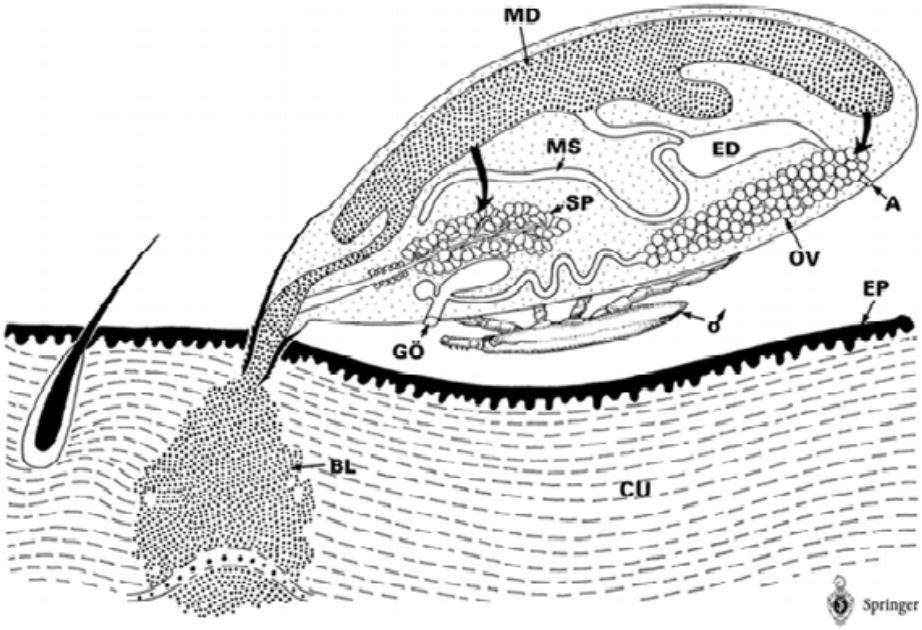


Figura 5 – Canal alimentar *Ixodes*. Representação do canal alimentar dos carrapatos: (BL) Lesão; (CU) Cutis; (EP) Epiderme; (GO) Abertura genital; (OV) Ovário; (SP) Glândula salivar; (MD) Intestino médio; (MS) Túbulos de Malphigui; (ED) Intestino posterior. Diagrama mostrando as subdivisões em carrapatos.
Fonte: Mehlhorn (2001).

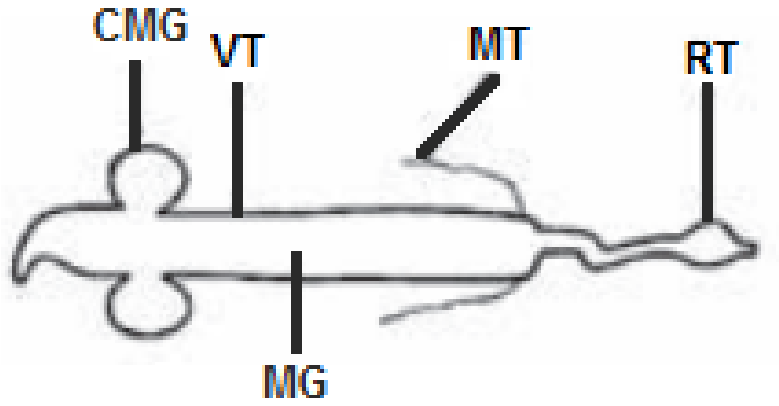


Figura 6 – Representação esquemática do sistema digestório de larvas de *Aedes aegypti*: (CMG) Ceco do Intestino médio, (VT) Ventrículo, (MT) Túbulos de Malpighi, (MG) Intestino médio e (RT) Reto.
Fonte: Resh e Cardé (2009).

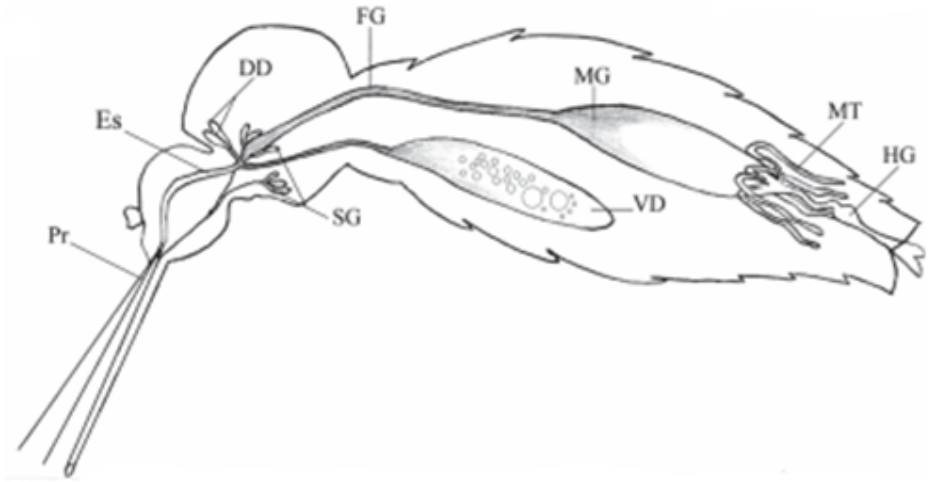


Figura 7 – Representação esquemática do sistema digestório de adultos de *Aedes aegypti*: (DD) Diverticulos, (FG) Intestino anterior, (HG) Intestino posterior, (MG) Intestino médio, (MT) Túbulos de Malpighi, (ES) Esôfago, (Pr) Probóscide, (SG) Glândula salivar e (VD) Ventrículo ventral.
Fonte: Gusmão (2007).

1.5 Lipases

Lipídeos apresentam uma série de papéis no metabolismo e estrutura celulares como a composição de membranas, fonte e manutenção energética e precursores para síntese de hormônios e outras moléculas. Em insetos, os lipídeos são acumulados no corpo gorduroso e estão envolvidos na metamorfose, reprodução, vôo e produção de hidrocarbonetos cuticulares que são precursores da síntese de feromônios (ARRESE e SOULAGES, 2010; HAHN e DENLINGER, 2007; HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009). Assim como os insetos os carrapatos apresentam grandes reservas de lipídeos no corpo gorduroso (COONS e ALBERTI, 1999).

Os ácidos graxos poli-insaturados, essenciais para muitos artrópodes, são obtidos exclusivamente da digestão dos lipídeos da dieta (CANAVOSO et al., 2001). O principal componente lipídico presente na dieta são os triacilgliceróis (TAG), que são também a principal forma de armazenamento de ácidos graxos em insetos e aracnídeos (ARRESE et al., 2001). Após a alimentação os TAGs são hidrolisados no lúmen do intestino médio, os produtos da digestão são absorvidos e utilizados para a síntese de lipídeos como TAGs, diacilgliceróis (DAGs) e fosfolipídios (FP) (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004).

Lipases (EC 3.1.1.3.) são triacilglicerol hidrolases que clivam ligações ester carboxílicas gerando glicerol e ácidos graxos. Outros produtos como diacilgliceróis, galactolipídeos e fosfolipídeos também podem ser formados, evidenciando assim o papel da lipase como enzima chave no processamento de lipídeos. Em mamíferos, vários passos podem ser distintos no processamento de lipídeos ingeridos na dieta incluindo a emulsificação destas moléculas, hidrólise e formação de micelas e finalmente a absorção pelos enterócitos. A emulsificação dos lipídeos tem início com a lipase lingual e gástrica (MILED et al., 2000; MU e PORSGAARD, 2005). A hidrólise deste substrato é continuada no duodeno pela lipase pancreática ativada na presença da colipase. A formação de micelas e absorção pelos enterócitos ocorre ainda no duodeno.

Todas as lipases pertencem ao grupo estrutural das α/β hidrolases e estão subdivididas em 6 famílias definidas por suas estruturas primárias já descritas. Estas são as lipases neutras, ácidas, lipase2, lipase3, GDSL e lipases sensíveis a hormônio (DEREWENDA, 1994; HOLMQUIST, 2000). Todas as seis famílias apresentam o mesmo mecanismo de reação em dois passos com base em uma tríade catalítica. A serina reativa essencial para a catálise encontra-se em uma sequência compartilhada por todas as lipases: Gly-X-Ser-X-Gly. Além do resíduo de Ser 152 (numeração da lipase pancreática humana) catalítico, estão também envolvidos neste processo dois outros resíduos constituintes da tríade catalítica: um resíduo de His (His 263) e um resíduo de Asp (Asp 176). A estrutura por difração de raio X da lipase pancreática humana (WINKLER; D'ARCY; HUNZIKER, 1990) revelou que estas enzimas apresentam dois domínios: um grande domínio N-terminal (resíduos 1-336) e um domínio pequeno C-terminal (resíduos 337-449) (Figura 8). O domínio N-terminal pertence ao grupo estrutural das α/β hidrolases e contém o sítio ativo com a tríade catalítica. Esta tríade catalítica é quimicamente análoga à tríade originariamente descrita em serino-endopeptidases como quimotripsina, mas é estruturalmente distinta. A atividade da lipase pancreática em mamíferos é dependente de um cofator protéico, a colipase. O domínio C-terminal da lipase apresenta uma estrutura em sanduícheβ o qual é importante para a ligação à colipase. Na ausência de micelas, o sítio ativo das lipases é coberto por uma alça denominada "lid" (tampa). Entretanto, na presença de micelas, a tampa sofre uma reorganização estrutural que expõem o sítio ativo da enzima formando uma

superfície hidrofóbica na entrada do sítio ativo. Esse padrão hidrofóbico é importante para a ligação da colipase (THOMAS et al., 2005).

A ligação da colipase ao domínio C-terminal amplia a plataforma hidrofóbica, auxiliando na ligação ao substrato. Além disso, a colipase forma três pontes de hidrogênio com a tampa estabilizando-a na posição que mantém a enzima ativa. As informações correntes disponíveis na literatura estão principalmente baseadas em lipases de mamíferos.

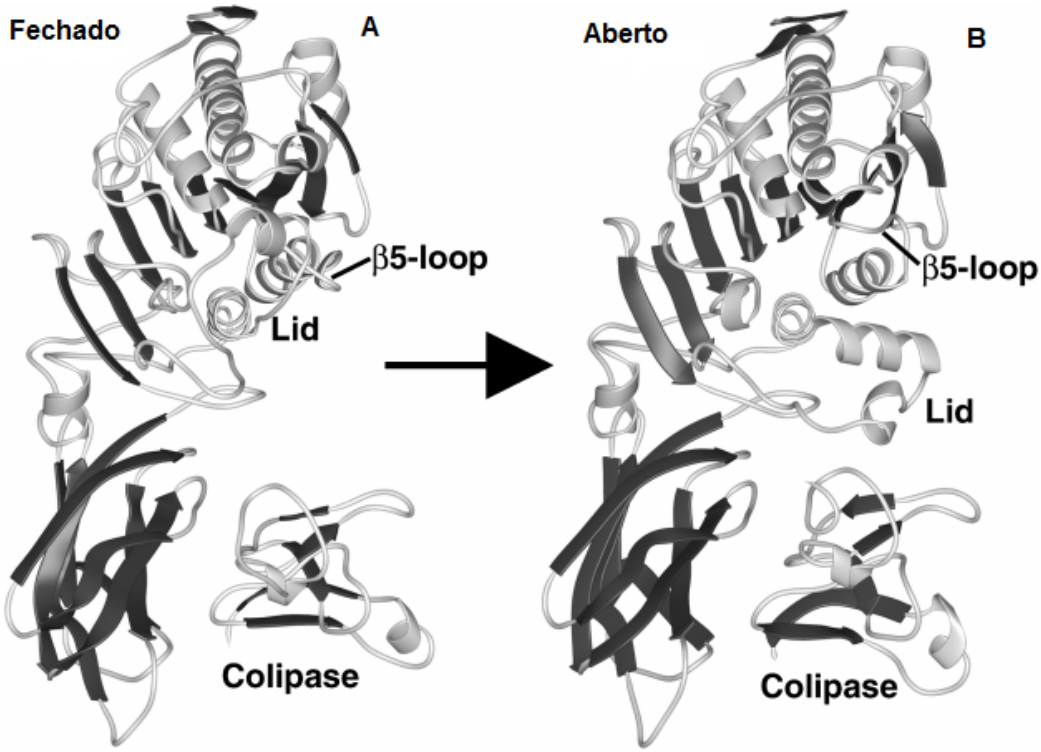


Figura 8 – Estrutura do complexo lipase pancreática humana e colipase em duas diferentes conformações: A) conformação fechada e B) conformação aberta. A porção globular, domínio N-terminal contém a lid (tampa) e a alça β5, a alça β9 não está indicada. A colipase se liga ao domínio C-terminal.
Fonte: Lowe, 2002.

1.6 Lipases em artrópodes vetores e não vetores

O conhecimento sobre as lipases digestivas de invertebrados é bastante reduzido quando comparado ao estudo das lipases presentes em vertebrados. A atividade de lipase já foi medida em preparações brutas em algumas espécies de

artrópodes como *Homarus americanus* (Crustacea) (BROCKERHOFF; HOYLE; HWANG, 1970), *Locusta migratoria* (Orthoptera) (WEINTRAUB e TIETZ, 1973), *Aedes aegypti* (Diptera) (GEERING e FREYVOGEL, 1975), *Periplaneta americana* (BOLLADE; PARIS; MOULINS, 1970; HOFFMAN e DOWNER, 1979), *Manduca sexta* (TSUSHIDA e WELLS, 1988), *Drosophila melanogaster* (Diptera) (SMITH et al., 1994), *Spilosoma obliqua* (Lepidoptera) (ANWAR e SALEEMUDDIN 1997), *Rhodnius prolixus* Hemiptera (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007), *Lymantria dispar* (Lepidoptera) (MRDAKOVIC et al., 2008), *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera) (CHRISTELLER et al., 2010), *Hermetia illucens* (Diptera) (KIM et al., 2011) e *Neohelice granulata* (Crustacea) (PINONI; IRIBARNE; LÓPEZ MAÑANES, 2011). Algumas lipases presentes em artrópodes foram detectadas e isoladas, como é o caso das lipases presentes no intestino de *Periplaneta americana* e *Locusta migratoria* (MALE e STOREY, 1981), da lipase presente no suco digestivo da mariposa *Bombyx mori* (Lepidoptera) que apresentou uma forte atividade antiviral (PONNUVEL et al., 2003), da lipase do escorpião *Scorpio maurus* que foi purificada a partir do hepatopâncreas deste animal assim como a lipase do caranguejo *Carcinus mediterraneus* (Crustacea) (CHERIF et al., 2007).

Recentemente Horne et al. (2009) compilaram dados dos genomas de *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori* e *Tribolium castaneum* e realizaram um estudo comparativo das seis famílias de lipases nestas espécies de insetos holometábolos. Os autores observaram que os insetos não apresentam lipase do tipo 2, apresentam poucas copias de Lipase3, GDSL e lipase sensível a hormônio e apresentam um maior número de cópias de lipases ácidas e neutras. Outra verificação foi a de que muitas cópias das lipases tanto ácidas quanto neutras não apresentam a tríade catalítica e, portanto, não apresentam atividade lipolítica provavelmente estas proteínas estão relacionadas a outras funções como ligação a lipídeos e reserva de energia durante o desenvolvimento. Além disso, foi possível observar diferenças estruturais dentre as lipases neutras de insetos e as lipases neutras de mamíferos. Através das análises estruturais combinadas a estudos de caracterização de especificidade sobre diferentes substratos realizados com lipases de mamíferos foi possível indicar papeis fisiológicos para as diferentes lipases encontradas nos insetos. Estes estudos, no entanto, analisaram apenas as sequencias das lipases de alguns artrópodes sem os dados enzimológicos.

Os resultados enzimológicos e de análise de sequencias apresentados nesta dissertação colaboram com a compreensão do processo digestivo de lipídeos em outros dois artrópodes: o mosquito *Aedes aegypti* e o carrapato *Amblyomma cajennense* sendo ainda complementados com a análise do genoma de *Ixodes scapularis* quanto à presença de lipase.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo das enzimas envolvidas na digestão de lipídeos de dois vetores Arthropoda: o mosquito *Aedes aegypti*, que foi caracterizado tanto na fase larval quanto na fase adulta e o carrapato *Amblyomma cajennense*. A caracterização enzimológica destas lipases envolveu a identificação, a determinação de propriedades gerais como massa molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e ao pH, especificidade frente a substratos distintos, o isolamento cromatográfico e a expressão de lipases digestivas possibilitando comparações entre as duas fases de desenvolvimento de *Aedes aegypti* e entre os dois vetores hematófagos; mosquito e carrapato. A análise das sequencias de lipases disponíveis nos genomas e experimentos de microarranjo de *Aedes aegypti* bem como a análise do genoma de *Ixodes scapularis* possibilitaram uma análise estrutural destas enzimas e inferências quanto à importância destas enzimas para o processo digestivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos animais e preparo das amostras

3.1.1 *Aedes aegypti*

As larvas e fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* foram fornecidos pela Dra. Margareth de Lara Capurro-Guimarães do laboratório de mosquitos geneticamente modificados do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após a eclosão dos ovos, as larvas de *Aedes aegypti* são alimentadas com ração de peixe (TetraMin) até atingirem o quarto estádio de desenvolvimento (L4), a ração é composta por grânulos enriquecidos com nutrientes e vitamina C, fazem parte de sua composição básica ácido cítrico, arroz integral, farelo de aveia, gérmen de trigo, farelo de soja, farinha de algas marinhas, de camarão e de peixe, levedura inativada e outros. As larvas de estádio 4 foram isoladas em uma placa de Petri e colocadas sobre o gelo para anestesiar os animais, os quais foram submetidos a dissecção sob estereomicroscópio em solução NaCl 0,9% gelada permitindo assim o isolamento dos intestinos médios.

As fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* foram dissecadas 15 horas após a alimentação sanguínea para a obtenção do intestino médio como descrito por Geering e Freyvogel (1975). As fêmeas adultas alimentadas foram anestesiadas com dióxido de carbono (CO_2), mantidas no gelo em uma placa de Petri e dissecadas sob estereomicroscópio em solução NaCl 0,9% gelada permitindo assim o isolamento dos intestinos médios. As amostras foram mantidas a – 20 ºC até a sua utilização. Cada lote continha aproximadamente 100 animais. Os intestinos de *Aedes aegypti* larva e adulto foram homogeneizados em água ultrafiltrada (MilliQ) (Millipore, Billerica, Massachusetts, United States) gelada utilizando um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Os homogeneizados de intestino médio de larvas e fêmeas adultas de *Aedes aegypti* foram utilizados como fonte de atividade enzimática.

3.1.2 *Amblyomma cajennense*

As fêmeas adultas do carrapato *Amblyomma cajennense* foram fornecidas pela Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi do laboratório de bioquímica e biofísica e

pela Dra. Solange Lima-Netto e Dra. Darci Moraes B. Battesti do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Estes animais foram alimentados em fêmeas do coelho-europeu *Oryctolagus cuniculus,* o carrapato é deixado no coelho até a queda (fêmeas ingurgitadas) que ocorre em um período de uma semana a 10 dias. O peso mínimo dos coelhos usados para a alimentação é de 2,5 quilogramas. As fêmeas ingurgitadas foram coladas em uma placa de Petri, anestesiadas na geladeira por 30 minutos e dissecadas permitindo assim o isolamento do intestino médio. O intestino médio de *Amblyomma cajennense* foi isolado, transferido para um microtúbulo e armazenado a – 20 °C até sua utilização. Foram utilizados no máximo dois animais em cada lote. Os intestinos de *Amblyomma cajennense* foram homogeneizados em água ultrafiltrada (Milli Q) gelada com a utilização de homogeneizadores do tipo Potter-Elvehjem ou em tampão acetato 0,1 M pH 3,5. Após a homogeneização ácida esta preparação é centrifugada a 16.000 x g por 20 minutos a 4 °C. A porção solúvel foi então utilizada como fonte de enzima.

3.2 Ensaios enzimáticos de lipase e quantificação de proteína

3.2.1 Substratos fluorimétricos para detecção de lipase

Diversos métodos de quantificação de atividade de lipase estão descritos na literatura, dentre eles podemos citar: métodos em meio sólido, por titulação, turbidimetria, espectroscopia (fotometria, fluorimetria, infravermelho), cromatografia, radioatividade, imunoquímica e microscopia (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Muitas destas técnicas possuem limitações como baixa sensibilidade, especificidade, dependência de emulsificadores dentre outras.

Foi feita a padronização do ensaio de lipase utilizando 4-metilumbeliferil Oleato como substrato, para simplificar chamaremos este substrato de oleato (JACKS e KIRCHER, 1967). O substrato oleato 2,0 mM foi dissolvido em acetonitrila e diluído 10 vezes, antes do uso em tampão Tris-HCL 0,1 M pH 8,5 contendo E-64 10 μM para o ensaio. Foi adicionado a essa mistura o detergente TRITON X-100 0,1%, sendo que essa mistura foi chamada de mistura padrão. Para realização dos testes de especificidade em relação ao substrato além de 4-Metilumbeliferil Oleato (oleato - 18 carbonos com uma insaturação no carbono 9) também foram utilizados: 4-Metilumbeliferil Butirato (butirato – 4 carbonos), 4-Metilumbeliferil Heptanoato

(heptanoato – 7 carbonos) e 4-Metilumbeliferil Estearato (estearato – 18 carbonos sem insaturações), os quais apresentam distinção no comprimento da cadeia carbônica e na presença ou ausência de insaturações (Figura 9). Os diferentes substratos também foram utilizados mantendo as condições da mistura padrão. Para verificar a presença da lipase digestiva, o homogeneizado dos animais foi incubado na presença dos substratos em condições de pH adequadas para a atividade da enzima e com os controles (branco de substrato e branco de enzima).

A hidrólise enzimática destes substratos leva a produção de metilumbeliferona, que foi medida em espectrofluorímetro Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, California, United States) com comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 460 nm. Uma curva padrão utilizando metilumbeliferona em pH idêntico ao de ensaio foi utilizada, o que permitiu o cálculo da atividade enzimática em U, sendo que um U equivale a 1,0 µmol de produto formado por minuto.

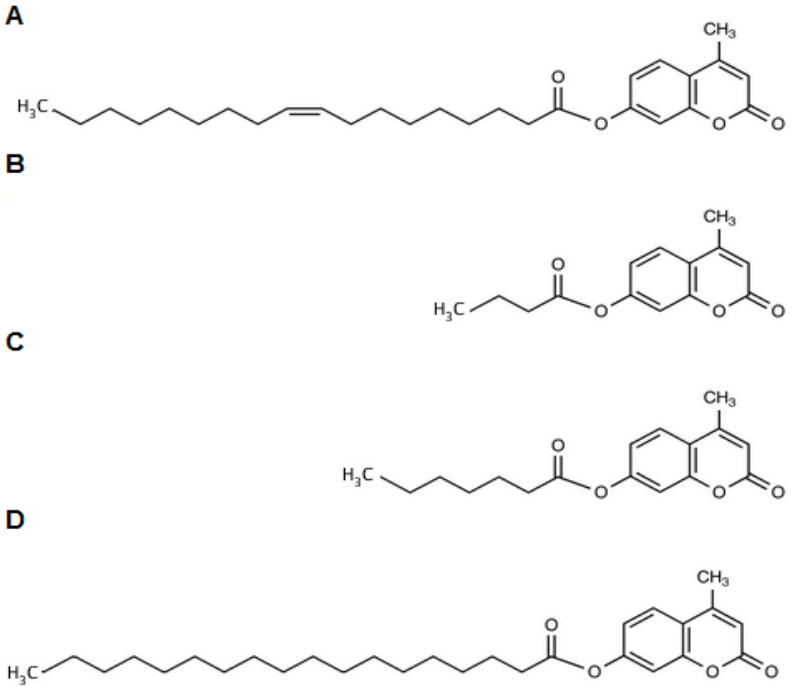


Figura 9 – Substratos derivados de 4-metilumbeliferona, utilizados para a medida da atividade enzimática de lipase. A) 4-Metilumbeliferil Oleato, 18 carbonos com uma insaturação no carbono 9; B) 4-Metilumbeliferil Butirato, 4 carbonos; C) 4-Metilumbeliferil Heptanoato, 7 carbonos; D) 4-Metilumbeliferil Estearato, 18 carbonos sem insaturações.
Fonte: Chemical Book, 2008.

3.2.2 Substrato colorimétrico para detecção de lipase

Choi et al. (2003) otimizaram um ensaio para lipases descrito por Kurooka e colaboradores (1977). O ensaio colorimétrico de lipases utiliza 5,5´ditiobis (2-nitro benzoic acid) – DNTB, reagente de Ellman e 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB). Grupos tiol livres que são gerados pela hidrólise de DMPTB por lipases reduzem o DNTB o qual fica amarelo quando reduzido. Este método é mais simples e mais sensível quando comparado aos métodos que utilizam titulação e são estruturalmente mais semelhantes aos TAGs do que os p-nitrofenil esteres que são comumente utilizados para ensaios colorimétricos. No entanto, a sua utilização era limitada pelas reações não específicas dos substratos do tipo tio-esteres ou do DTNB. O problema foi parcialmente resolvido pela adição de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) o qual pode suprimir a hidrólise de DMPTB por esterases não específicas. No entanto, para o ensaio de materiais brutos um erro significativo era observado em comparação com os dados obtidos pelo método de titulação. A otimização do método de DMPTB-DTNB para microplacas consiste basicamente do uso de um branco sem DMPTB a fim de medir reações não especificas do DTNB principalmente para amostras brutas. Uma solução estoque de DTNB 40 mM foi preparada em isobutanol. Uma solução estoque DMPTB 10 mM foi dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2 contendo Triton X-100 6%. As duas soluções estoques foram aliquotadas e mantidas a -20 °C até utilização. Uma mistura para os ensaios foi montada da seguinte maneira: 4,0 μL de DMPTB 10 mM, 4,0 uL de DTNB 40 mM, 0,4 uL de EDTA 0,2 M, 1,0 uL Triton X-100 10%, 9,0 uL tampão Tris-HCl 1M pH 7,5, 1,0 uL de PMSF 5 mM, 1,8 uL de E-64 1,0 mM e 158,8 uL.de água MilliQ. Os controles de enzima e substratos foram realizados em todos os ensaios.

3.2.3 Determinação de proteína

A quantificação de proteína das diferentes amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Smith e colaboradores (1985) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.3 Efeito da concentração de cálcio

Homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva, adulto e *Amblyomma cajennense* foram diluídas e previamente dialisadas em pelo menos 100 volumes de água ultrafiltrada (Milli Q) a 4 ºC. Foram preparadas diferentes misturas derivadas da mistura padrão para o substrato oleato, onde foram adicionadas diferentes concentrações de cloreto de cálcio (0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM e 2,0 mM). As diferentes concentrações de cloreto de cálcio foram baseadas em experimentos encontrados na literatura para lipase de *Rhodnius prolixus* (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). Foram feitos dois controles: o primeiro controle consiste no ensaio da amostra do homogeneizado sem dialisar (SD) e o segundo controle consiste no ensaio da amostra do homogeneizado após a dialise (D), os dois controles foram feitos sem a adição de cloreto de cálcio ao substrato.

3.4 Efeito da temperatura sobre a atividade de lipase

Homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva, adulto e *Amblyomma cajennense* foram diluídos em tampão Tris-HCL 0,1 M pH 8,5. A amostra de *Aedes aegypti* larva foi incubada a 60 °C e as amostras de *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense* foram incubadas a 55 ºC por um período de duas horas em banho com recirculação, sendo retiradas alíquotas de 100 µL em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100 e 120) para realização do ensaio de atividade remanescente. O controle do ensaio foi feito em uma alíquota de 100 µL retirada da diluição antes da incubação nas diferentes temperaturas. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando oleato como substrato.

3.5 Efeito do pH sobre as diferentes atividades enzimáticas

3.5.1 pH ótimo

O efeito do pH sobre a atividade de lipases em *Aedes aegypti* larva, fêmeas adultas e *Amblyomma cajennense* foi avaliado com a utilização dos seguintes tampões com variações de 0,5 unidade de pH, HEPES 1,0 M (pH 7,5 - 8,0); Tris 1,0

M (pH 8,0 – 9,0); Glicina-NaOH 1,0 M (pH 9,0 – 10,0). O pH dos tampões foi ajustado a 30 °C, mesma temperatura dos ensaios enzimáticos.

3.5.2 Estabilidade ao pH

Foram realizados experimentos para verificar a estabilidade ao pH das lipases de *Aedes aegypti* larva, adulto e *Amblyomma cajennense*. Para estes testes foram utilizados os seguintes tampões (2,0 M) Glicina-HCL (pH 3,0; 3,5), (2,0 M) Acetato de Sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5), (1,0 M) Piperazina (pH 5,5; 6,0; 6,5), (1,0 M) HEPES (pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0), (1,0 M) Tris (pH 8,0; 8,5; 9,0), (2,0 M) Glicina-NaOH (pH 9,0; 9,5; 10,0), (1,0 M) Fosfato dibasico (pH 11,0; 12,0). A enzima foi diluída em água (diluição de 2 vezes) e colocada junto ao tampão (diluição 20 vezes), os tampões foram diluídos para uma concentração final de 20 mM. As amostras nos diferentes pHs foram incubadas por duas horas a 4 °C e 30 °C para *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense* e a 4 °C e 37 °C para *Aedes aegypti* larva. A atividade remanescente foi medida utilizando oleato.

O experimento de estabilidade foi repetido para *Aedes aegypti* adulto com a adição do inibidor benzamidina. Benzamidina é um inibidor competitivo simples de tripsina, a qual é a peptidase majoritária em intestino médio de adultos de *Aedes aegypti* (GRAF e BRIEGEL, 1985). Este experimento teve por objetivo verificar se a perda se estabilidade em pHs mais alcalinos estava relacionado a proteólise. Foram utilizados os mesmos tampões nas mesmas concentrações de diluição citadas anteriormente. Uma solução de benzamidina 2,5 mM foi adicionada ao homogeneizado de intestino médio de *Aedes aegypti*. O experimento foi repetido como descrito acima

3.6 Caracterização cinética das lipases

3.6.1 Efeito da concentração do substrato oleato em homogeneizado bruto de intestino médio

Para verificar o efeito da concentração do substrato oleato sobre a atividade das lipases estudadas foram utilizadas diferentes concentrações de substrato, em ensaios utilizando como fonte de atividade enzimática os homogeneizados brutos

dos intestinos médios dos animais estudados. Para *Aedes aegypti* larva foram utilizadas 12 diferentes concentrações de substrato (7,5; 15; 30; 40; 50; 60; 80; 100; 125; 150; 175 e 200 μM), para *Aedes aegypti* adulto 20 concentrações (5; 7,5; 9; 11; 13; 15; 19; 22; 27; 32; 39; 47; 56; 67; 80; 100; 125; 150; 175 e 200 μM) e para *Amblyomma cajennense* 16 concentrações (7,5; 9; 11; 13; 15; 19; 22; 27; 32; 39; 47; 56; 67; 80; 100 e 125 μM). Os valores de Km (valores e desvios) foram obtidos com a utilização do programa Enzfitter (Biosoft, Great Shelford Cambridge, England). O pH utilizado para estes ensaios foi 8,5 que é o valor de melhor relação pH ótimo/hidrólise espontânea do substrato para cada uma das enzimas caracterizadas.

3.6.2 Diferentes substratos oleato, butirato, heptanoato e estearato em reunido ativo

Para verificar o efeito da concentração dos diferentes substratos oleato, butirato, heptanoato e estearato sobre a atividade das lipases estudadas foram utilizadas diferentes concentrações dos substratos. As fontes de atividade enzimática utilizadas foram reunidos ativos provenientes da eluição de cromatografias de troca aniônica em coluna Hitrap Q, realizadas a partir de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva e adulto.

Para a caracterização do efeito dos substratos no reunido ativo de *Aedes aegypti* larva e adulto foram utilizadas 23 diferentes concentrações de cada um dos substratos (5; 7,5; 9; 11; 13; 15; 19; 22; 27; 32; 39; 47; 56; 67; 80; 100;125; 150; 175; 200; 300; 400 e 500 μM). Os valores de Km (valores e desvios) foram obtidos com a utilização do programa Enzfitter (Biosoft). O pH utilizado para estes ensaios foi 8,5 que é o valor de melhor relação pH ótimo/hidrólise espontânea do substrato para cada uma das enzimas caracterizadas.

3.7 Isolamento das lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Ambyoma cajennense*

3.7.1 Lipase de Aedes aegypti larva

Amostras de homogeneizados de intestinos médios de *Aedes aegypti* larva foram aplicadas a colunas de troca aniônica Hitrap Q (1,0 mL) (GE) utilizadas em sistema FPLC (Pharmacia) equilibrada com tampão Piperazina 50 mM pH 9,0. Após a lavagem da coluna com 5,0 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna a eluição foi feita com 25 mL de um gradiente linear de NaCl de 0 – 1,0 M e posteriormente lavada 5,0 mL de tampão Piperazina 50 mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e frações de 1,0 mL foram coletadas. As frações ativas sobre oleato de *Aedes aegypti* adulto foram reunidas e aplicadas a uma coluna Hitrap desalting equilibrada em tampão Piperazina 50 mM pH 9,0 para retirar o sal. Estas amostras foram submetidas a uma cromatografia de troca aniônica em coluna Resource Q equilibrada com Piperazina 50 mM pH 9,0. Após a lavagem da coluna com 5,0 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna, a eluição foi feita com 25 mL em um gradiente linear de NaCl de 0 – 1,0 M e posteriormente lavada 5,0 mL de tampão Piperazina 50 mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e frações de 0,5 mL foram coletadas.

3.7.2 Lipase de Aedes aegypti adulto

Amostras de homogeneizados de intestinos médios de *Aedes aegypti* adulto foram aplicadas a colunas de troca aniônica Hitrap Q (1,0 mL) (FPLC Pharmacia) equilibrada com tampão Tris 20 mM pH 7,0. Após a lavagem da coluna com 5,0 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna a eluição foi feita com 25 mL de um gradiente linear de NaCl de 0 – 1,0 M e posteriormente lavada 5,0 mL de tampão Tris 20 mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e frações de 1,0 mL foram coletadas. As frações ativas sobre oleato de *Aedes aegypti* adulto foram reunidas e aplicadas a uma coluna Hitrap desalting equilibrada em tampão Tris-HCL 20 mM pH 7,0 para retirar o sal. Estas amostras foram submetidas a uma cromatografia de troca aniônica em coluna Resource Q equilibrada com Tris-HCL 20 mM pH 7,0. Após a lavagem da coluna com 5,0 mL do mesmo tampão utilizado para

equilibrar a coluna, a eluição foi feita com 25 mL em um gradiente linear de NaCl de 0 – 1,0 M e posteriormente lavada 5,0 mL de tampão Tris 20 mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e as frações de 0,5 mL foram coletadas.

3.7.2.1 Filtração em gel

Uma das estratégias de separação testada foi uma cromatografia de filtração em gel. O reunido ativo para lipase de *Aedes aegypti* adulto proveniente das frações obtidas após uma cromatografia de troca aniônica em coluna Hitrap Q foi aplicado em uma coluna Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia, Suécia) equilibrada em tampão Tris 20 mM pH 7,0 . As frações foram ensaiadas com o substrato oleato. Os seguintes padrões de massa molecular foram utilizados: lisozima (14 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa) e tiroglobulina (669 kDa).

3.7.3 Lipase de Amblyomma cajennense

Para *Amblyomma cajennense* foram utilizadas diferentes estratégias de separação de proteínas por cromatografia, precipitação por pH, precipitação por sulfato de amônio, cromatografias hidrofóbicas e cromatografias de troca catiônica e iônica. As cromatografias de troca aniônica em colunas Hitrap Q apresentaram os melhores resultados. A coluna HitrapQ (1,0 mL) (GE) utilizando sistema FPLC (Pharmacia) foi equilibrada com tampão Tris 20 mM pH 7,0. Após a lavagem da coluna com 5,0 mL do mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna a eluição foi feita com 25 mL de um gradiente linear de NaCl de 0 – 1,0 M e posteriormente lavada 5,0 mL de tampão Tris 20 mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e frações de 1,0 mL foram coletadas.

3.8 Seleção das sequências de lipase digestiva de *Aedes aegypti*

No genoma do mosquito *Aedes aegypti* foi possível encontrar 72 sequências anotadas como lipase (NENE et al., 2007) .Os números de acesso disponíveis no trabalho foram utilizados para obter as sequências no banco de dados do NCBI. Estas 72 sequências foram analisadas para identificar as possíveis lipases

digestivas (Figura 10). As 72 sequências foram alinhadas com a lipase pancreática humana (NP_000927).

Através desse alinhamento foi possível identificar 35 sequências que possuíam os resíduos componentes da tríade catalítica: Ser152, Asp176 e His263 (nomenclatura usada para a lipase pancreática humana). As sequências que não apresentaram esses resíduos foram eliminadas da análise. Posteriormente, as 35 sequências foram testadas através de ferramentas do Expasy (http://expasy.org/) quanto a presença de peptídeo sinal para secreção (SignalIP 3,0 Server) ou presença de ancora GPI (big-PI Predictor) e a ausência de alça transmembrana (SOSUI), Das 35 sequências testadas 13 não apresentaram peptídeo sinal, portanto não são secretadas resultando em 22 sequências que continuaram a ser analisadas nesse processo. Nene e colaboradores também realizaram análises de expressão das sequências caracterizadas através de ferramentas de bioinformática (MPSS e PASA) e através de experimentos de microarranjos A análise destes resultados permitiu a seleção de 17 sequências candidatas à lipases digestivas expressas em *Aedes aegypti*. Foi feito um Blastp com as 17 sequências contra um banco de dados de proteínas (SwissProt), as sequências que obtiveram alta identidade com sequências descritas como lipases digestivas de insetos na literatura foram selecionadas, reduzindo o seu número para 11. Através da análise dos dados do microarranjo comparativo entre larvas e fêmeas descritas para *Aedes aegypti* (NENE et al., 2007) foi possível observar quais sequências foram expressas em larvas e fêmeas adultas e quais foram expressas em machos e fêmeas adultas. Desta forma, selecionamos 8 sequências para testes de amplificação por RT-PCR. Na Figura 11 podem ser vista as 8 sequências em estudo alinhadas com a sequência da lipase pancreática humana e na tabela 1 podemos observar os iniciadores desenhados a partir destas 8 sequências.

3.9 Extração de RNA total de intestino médio e carcaça

Para a extração de RNA total foram utilizados os seguintes materiais: intestino médio de larvas L4 de *Aedes aegypti* (AL-I), carcaça de larvas L4 de *Aedes aegypti* (AL-C), intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (AA-I-Sa), carcaça de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (AA-C-Sa), intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas

com sacarose (AA-I-Sc) e carcaça de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose (AA-C-Sc). Foram dissecados 50 animais para cada condição mencionada. Os animais foram dissecados em uma solução (NaCl 0,9%) preparada em H_2O-DEPC, esse cuidado foi tomado com o intuito de evitar a ação de RNases. Durante a dissecção foi possível obter o intestino médio dos animais e suas respectivas carcaças que foram armazenados em microtúbulos de 0,5 mL que estavam mergulhados em banho de gelo-seco e etanol, para o congelamento imediato, as amostras foram estocadas a -80 ˚C até a sua utilização.

Os intestinos médios e as respectivas carcaças foram homogeneizadas em com auxilio de seringas (1,0 e 2,0 mL) em 1,0 mL de TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, United States) permaneceu por 5 minutos a temperatura ambiente com o objetivo de permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A amostra foi então centrifugada (11,000 xg; 10 minutos; 4 ˚C) e foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio ao sobrenadante coletado após a centrifugação. A mistura sobrenadante/clorofórmio foi agitada por inversão e deixado na bancada a temperatura ambiente por 3 minutos. A amostra foi novamente submetida a centrifugação a 11,000 xg por 15 minutos a 4 °C para a separação de duas fases: uma inferior vermelha (orgânica) e outra superior e incolor (aquosa) onde se encontra o RNA total. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 0,25 mL de isopropanol e 0,25 mL da solução de precipitação (1,2 M NaCl e 0,8 M de citrato trissódico dissolvidos em água DEPC. Este material foi deixado a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugado (12.000 xg; 10 min; 4 ˚C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,0 mL de etanol 75 % (v/v). Após a adição do etanol o material foi centrifugado a 12.000 xg por 15 min a 4 ˚C. O sobrenadante foi removido, e a lavagem foi repetida mais uma vez. Em seguida este material foi seco sob fluxo de ar em uma capela e, finalmente, o RNA total dissolvido em 100 µl de H_20-DEPC. O grau de pureza e a quantidade de RNA da amostra foi avaliada através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm (NanoVue - GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).

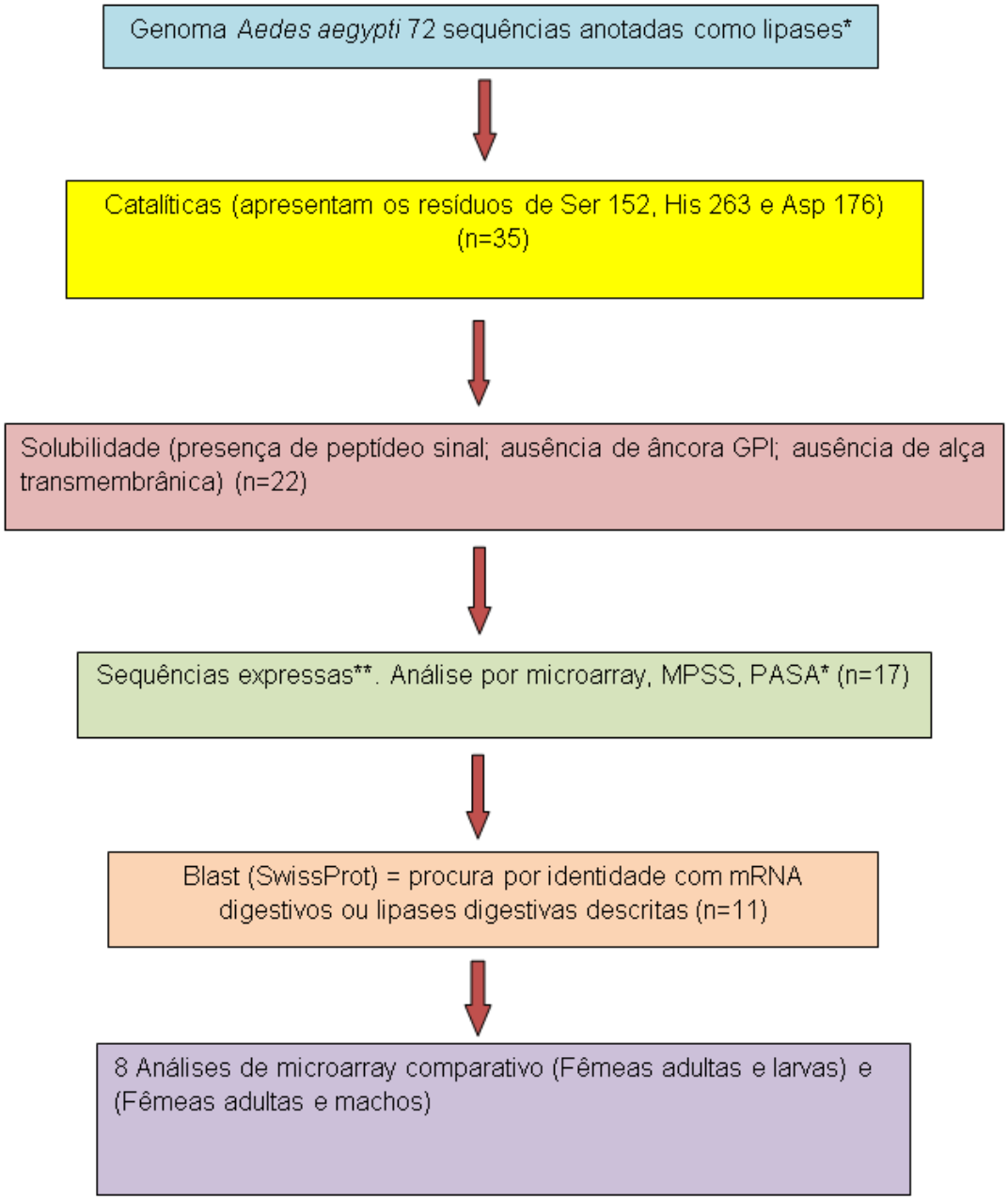


Figura 10 – Critérios de seleção utilizados para análise das sequências anotadas como lipase a partir do genoma do mosquito *Aedes aegypti*. ** Foram consideradas sequências expressas as que apresentaram índice 1 em algum dos métodos avaliados.
Fonte: Nene et al., 2007.

```
AE007051    MKLTAALALLICCLAVGHCQGPEDPEPWKKVSDPTDPEPWKRVSDPTDPEPWKKVSDPTD 60
AE007070    MKATAALVLLVCYLAVGYCQDPE------------------------------------ 23
AE007044    MRLLALFLSVAVAVAVALPIEELGPESVPFEEYGQEHIPNEEIGEEFIPNE--------- 51
AE007055    ---MVQFPVLLITLSLAFEVHSS------------------------------------ 20
AE007068    MIGVVIFLVALRSAGLTALAENH------------------------------------ 23
AE008222    MGLLGWLQVSLSWALVSCAVN-------------------------------------- 21
PancrHum    LLLGAVAGSEVCYDRLGCFSDDS------------------------------------ 23
AE001057    ---MKILLTILVLALLGDRAFAG------------------------------------ 20
AE002911    ------------------------------------------------------------

AE007051    PEPWKKVSDPTDPEPWKRASDPTDPEPWQEVTDPTDPEPWKKVSDPIEPEPWALIPDGAG 120
AE007070    ------------------------------------------------EPEPWALIPDGAG 36
AE007044    ----------------------------DEGIEHIPYEDEGIEHMPVEQSPWSLVPDGNG 83
AE007055    ----------------------------------------------YAENRRLQLVRDIDG 35
AE007068    ------------------------------------------------DDHAWQVTYDDGG 36
AE008222    ---------------------------------------------WIHLQEIDNNINGCD 36
PancrHum    ---------------------------------------------------PWAGIVER-- 31
AE001057    ---------------------------------------------LLNIFTADTDYNAAQ 35
AE002911    ------------------------------------------------------------

AE007051    HLHIVNINPVNIPEGEDEIEPLFNPE-TDVVFRMYTRRNP-LHEQLIRWDDPSSISNSNF 178
AE007070    HMHMVNINPVNVPEGEDEIEPLFNPE-SDVVFRLYTRRNP-VHEQLIRWDDASSISNSNF 94
AE007044    HLHLVNTDPYNLA-GQEEPEAYFNAD-TQTIFRLFTRANRNTNGHVIQLGNAGSLG-SFW 140
AE007055    TQQLVNPNPYRVL--NAHLERSFNAQ-SDIIFRLYTRKNP-EKHQILKPNDTSSILNSNF 91
AE007068    HLHMISRDPYAAN-LFDQPAPKFDPE-YDTRFYLYTPTNPEMPHQIWN-NYENSVIYSAF 93
AE008222    SQYRQHMIDHVLRKSNPKSLPVFEPSSINVTFYLLTSSNQ-NTSTKLTTGDIRSLRKSSF 95
PancrHum    ----------------PLKVLPWSPSTINTRFLLYTNESP--NNYQIVTADSSTIRSSNF 73
AE001057    LMDSLFGALANGTKVILNGGSTGNPLSVDITFWCGNRNNP----NLVQTMLDDSSLTSKI 91
AE002911    -------------------IRSGGTSNQTVLLLLVLATIT------FVAGRAVRRTVDNS 35
                                         .      :                         .

AE007051    NPANPTRFLIHGWVEGEDATLHWVIKDHYMRV-GDFNVINVDWGAGAQTINYIAARNRVG 237
AE007070    NPANPTRFLIHGWVEGQDATLHWVIKDHYMRV-GDFNVINVDWGAGAQTINYIAARNRVG 153
AE007044    NGGRQTRLIIHGWNNNGGSPVNTQIRNAYLDR-GDFNVITVDWGAGAQNPNYLTARNHIN 199
AE007055    NADLPTRFLIHGWNQNGESDILIELRRSYLSV-EDFNVIGVDWGEGALTINYVMARKRVE 150
AE007068    NASYPTRFVIHGWGGDINSPINRRIRTELFSV-GKFNIIFVDWSNGN-DVFYPNSRRLVY 151
AE008222    NSSNPTRIIVHGFCNCHLSEFCVTTRQKLLEHPQQYNVITMSWPSGKWILSYWTARWRIV 155
PancrHum    RTDRKTRFIIHGYIDKGEENWLANMCEALLQV-ESVNCICVDWKGGS-RALYTQATQNIR 131
AE001057    STSKPLVFIIHGWMDNRSRNWIKDMTTDYFKY-FDTNLCVVDWGNLA-IFGYYMAFNHTF 149
AE002911    DRSRTEDYITQYEINTERYRVTTDDGYQLIVY----RLLPQVPAQGAVLIQHGIRQSSAG 91
                    : :                   :      .              :

AE007051    GVGMIVSRVIDTIRATTGQSLDMINVVGFSLGGHAAGNAGKGQN-GLLNSVIALDPAGPL 296
AE007070    GVGMIVSRVIDVIRATTGQSLDMINVVGFSLGGHAAGNAGKGQN-GQLNSVIALDPAGPL 212
AE007044    AVGATVARFVDFLNQSGGMSFNNVYITGHSLGGHTAGIAGKRVTRGRLHSVIALDPALPL 259
AE007055    SVGLVTSQLIDTLVDASGVILDSIYVIGHSLGAHVAGIVGKHQR-GQLNTIVGLDPAGPL 209
AE007068    PVGIATSNLIDFLVRVKYLRRQDVVVIGHSLGAHAAGNVGKGQG-GRLPVIIGLDPALPF 210
AE008222    PASQILAKFIDFLHSDGGMKLQDLYLVGHSLGAHLSGLAGKLVTSGKVGTIVGLDPAKPE 215
PancrHum    VVGAEVAYFVDALQSQLGYSPSNVHIIGHSLGSHVAGEAGRRTN-GNIGRITGLDPAEPC 190
AE001057    TVAKYLSQFISSVSSK-GIAMKDITLVGHSMGAQIAGNAGSALG-GQLGAIYGLDPASPL 207
AE002911    WLNLEKNLPMQLLEAGMEVWLGNSRASPESAG-HLTFSNDSSQFWDFSFHEIGFYDLAAM 150
                     :. :                * * : :   .     .      .:    .

AE007051    FSQ----GQADILSASDAIYTEAIYTNAG------NLAFDAPLAQANFYPNYGRS-QPGC 345
AE007070    FSQ----GQADILTANDAIYTEAIYTNAG------NLAFDVPLAQANFYPNGGRS-QPGC 261
AE007044    FSIN---APNERVAPTDANYVEVIHTNAG------LLGFDLPIGQADFYPNGGRS-QPGC 309
AE007055    FSL----NSSDILNQNHAQYVEMVSTGAR------LLGTYEPLGDANFYPNGGLE-QAGC 258
```

```
AE007068    FAM----DSVDRIKDTDAEYVEVIHTNGG------VLGFMEPLGDADFYPNWGRI-QPGC 259
AE008222    FDVG---KPDERLAITDASYVEVIHTNGK------RLGLYEPIGHSDFYPNGGVN-QPGC 265
PancrHum    FQGT---PELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAPIIPNLGFGMSQTVGHLDFFPNGGVE-MPGC 246
AE001057    YMMPLDIGTAKRLDKTDAKYVQMIITSRC------FWGVCIADGHENFYPNNGMVPQPNC 261
AE002911    IDAA--------LEISQRKQLHLIAYSEG------ASAALTLLSERPEYNAKITS----- 191
                        :  ..    . :  .          .     ..   :

AE007051    -------------------ITSICAHNRVNELFAESVSTANHFIAMECADYNEILNGGCS 386
AE007070    -------------------ITSTCAHMRVNELFAESVSTANHFISMECANYNEILAGTCS 302
AE007044    G----------------VDVAGTCAHSRAWEFFAESVRTG-RFNSVRCANYDQILNNNCV 352
AE007055    G----------------LDLFGICAHARSWIYFAETVTNGKGFRGIKCAMIEDLEGETCN 302
AE007068    G----------------VDIDGGCAHGRAVDLYVESISSRVGFVGRQCSSFQDIRNGICT 303
AE008222    LP---------------WWFGASCAHGRAWELYAESIESKLGFWSTLCSSLDKVRDTGCR 310
PancrHum    QKNIISQIVDINGIWEGTRDFAACNHLRSYKYYIDSILNPTGFAGFSCSSYNTFSSNNCF 306
AE001057    A-------------------IPLFSNAEVAEPILCSHVHAHTLFRLALNPSNVYMGNTCP 302
AE002911    -----------------VNLLAPAAFMANSQFKLLPKETGVQLIEYDLLDHGDFTSRTEA 234
                                                .      :

AE007051    SVG-----PYAKMGGEPSNRGLGVRGVYYLRTNAQSPFARG------------------- 422
AE007070    SVG-----PYAKMGGEPSNRGLGVRGVYYLRTNAQSPFARG------------------- 338
AE007044    SSG-----PNRNMGGEPSNIGIAS-GVYHLTTNAGSPFARG------------------- 387
AE007055    LSGL----PNVWMGGEPSNHERGVKGIFMVHTNSEAPFAKD------------------- 339
AE007068    DTG-----FSASMGGEPTNRGSRVQGIFYFPTANGRPFVNEC----------------- 340
AE008222    SPK-----AKLKMGGDP--IIQKGSGILTVQTNAKAPYASCADKL--------------- 348
PancrHum    PCASGGCPQMGHYADRFSGKTNELFQQFYLNTGDASNFSRWRYQIAVTLSGRKVTGHVLV 366
AE001057    ACLFG----LLGKKSKMGVYSSRIAGDYYLSTGIWPPYTI------------------- 338
AE002911    ASN-------------------VYPMVVEDIVAKSKQIEE------------------- 255


AE007051    ------------------------------------------------------------
AE007070    ------------------------------------------------------------
AE007044    ------------------------------------------------------------
AE007055    ------------------------------------------------------------
AE007068    ------------------------------------------------------------
AE008222    ------------------------------------------------------------
PancrHum    SLYGSGGTSKQYEIYKGSLQPGTSYVNQIDSDVDVGDIEKVKFIWYNNIINPTLPKVGAS 426
AE001057    ------------------------------------------------------------
AE002911    ------------------------------------------------------------


AE007051    -------------------------------
AE007070    -------------------------------
AE007044    -------------------------------
AE007055    -------------------------------
AE007068    -------------------------------
AE008222    -------------------------------
PancrHum    SIQVTRNDGRVFNFCSQDTVREDILLTLTPC 457
AE001057    -------------------------------
AE002911    -------------------------------
```

Figura 11 – Alinhamento das sequências de lipase obtidas do genoma do mosquito *Aedes aegypti* com a sequência da lipase pancreática humana. As 8 sequências do mosquito foram previamente selecionadas como possivelmente lipases secretadas, que apresentam similiaridade com lipases já expressas e descritas (Blastp contra banco do SWISS PROT). Em amarelo está representada uma região altamente conservada em lipases composta pelos resíduos Gly-X-Ser-X-Gly, onde encontramos a Ser catalítica.

Tabela 1 – Iniciadores das sequências de lipase encontradas no genoma do mosquito *Aedes aegypti*. Foram obtidos 8 pares de Iniciadores de sequências descritas como lipases que possivelmente são expressas no sistema digestório do mosquito *Aedes aegypti*.

Nome do Iniciador	Iniciadores *Aedes aegypti*
PR6	Forward: 5' – ATT ACA TTG CCG TCA AGG AG- 3' Reverse: 5' – GAC CAA CTC GCT GAT GAT GA- 3'
Ae001057	Forward: 5' – ATG AAA ATT TTA CTA ACA – 3' Reverse: 5' – TTA GAT AGT ATA TGG TGG – 3'
Ae002911	Forward: 5' – GAT TCG ATC AGG AGG GAC – 3' Reverse: 5' – TTC CTC TAT TTG TTT GGA – 3'
Ae007044	Forward: 5' – ATG AGA CTA CTC GCG TTG – 3' Reverse: 5' – TAT AAA ATT TAT CAC ATA – 3'
Ae007051	Forward: 5' – ATG AAA CTC ACT GCT GCA – 3' Reverse: 5' – CTA GCC TCT GGC AAA CGG – 3'
Ae007055	Forward: 5' – ATG GTT CAG TTC CCA GTA – 3' Reverse: 5' – CAT GTG ACA ACA ATT TAT – 3'
Ae007068	Forward: 5' – ATT TAT CGT AAG ATA CAA – 3' Reverse: 5' – TCA ACA CTC ATT AAC AAA – 3'
Ae007070	Forward: 5' – ATT AAA CAT GAA AGC TAC – 3' Reverse: 5' – CTA GCC TCT GGC GAA CGG – 3'
Ae008222	Forward: 5' – CCT GTT GCT GGT AGC ACA – 3' Reverse: 5' – TTA AAG CTT GTC AGC ACA – 3'

3.10 Síntese da fita de cDNA

Para sintetizar a primeira fita de cDNA a partir do mRNA extraído foi usado o Kit "SuperScrip First strand synthesis system for RT" (Invitrogen). Foram utilizados 5 mg do RNA total, e este foi misturado a dNTPmix 10 mM e oligo(dT) 0,5 mg. A seguir a amostra foi incubada a 75 ˚C por 10 minutos e foi adicionado a amostra Rtbuffer 10X, $MgCl_2$ 25 mM, DTT 0,1 M e 1 unidade de RNAseOUT (inibidor recombinante de RNAse). A seguir a amostra foi incubada a 42 ˚C por 2 minutos. Foram adicionadas 50 unidades de Super Script II RT (transcriptase reversa) e a amostra foi incubada

novamente a 42 ˚C por 90 minutos, para que a enzima transcrevesse o mRNA a DNA. Para finalizar a reação a amostra foi incubada a 70 ˚C por 15 minutos, e a seguir foi adicionada 1 unidade de RNAseH (para destruir o mRNA) e a amostra foi incubada por 20 minutos a 37 ˚C.

3.11 Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)

Para as reações de PCR utilizamos a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), em reações de 50 µL contendo oligonucleotideos 2 mM, dNTPs 0,2 mM (para cada nucleotídeo), Tampão da Taq platinum DNA polimerse, $MgCl_2$ 1,5 mM e DNA molde em concentração variável. As reações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad, California, E.U.A.) com desnaturação inicial por 2 minutos (RT-PCR). Em seguida foram realizados mais 30 ciclos como descrito a seguir: 30 segundos a 94 ˚C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 45 segundos em uma temperatura de pareamento dos iniciadores (escolhida de acordo com os iniciadores usados) e finalmente, 2 minutos a 72 ^{o}C para elongamento da fita complementar de DNA. A reação foi parada em 20 cliclos e 25 ciclos onde foram retiradas aliquotas de 15 µL, os 20 µL restantes completaram os 30 ciclos. Para o iniciador Ae001057 foi feito um RT-PCR com 35 ciclos, para otimizar a banda obtida. Para o cálculo da temperatura de pareamento dos iniciadores foi utilizada a seguinte equação: T_1(˚C)= 2(A+T) + 4(G+C).

3.12 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de potencial de 80 V.

Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 mg/ml) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

3.13 Modelagem molecular das lipases digestivas expressas em *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Ixodes scapularis*

As sequências amplificadas (AAEL 007051 e AAEL 007055) foram submetidas a modelagem através do Swiss Model (ARNOLD et al., 2006; KIEFER et al., 2009; PEITSCH, 1995) usando a triacilglicerol lipase de cavalo (PDB 1HPL) (BOURNE et al., 1994) como modelo. A escolha se deu pelo índice de identidade com as lipases em estudo (acima de 30%), pelos índices de identidade serem semelhantes aos verificados em relação a lipase pancreática humana e por está estrutura não ser um co-cristal com a colipase o que dificultaria a análise dos modelos.

Amblyomma cajennense não teve ainda seu genoma determinado e nenhum estudo de transcriptoma de seu intestino médio foi ainda realizado. Com o intuito de identificar possíveis lipases digestivas em carrapatos do grupo Ixodidae foi realizado um Blast utilizando-se como sequencia modelo as lipases digestivas amplificadas de *Aedes aegypti* deste trabalho no genoma de Ixodes scapularis. As modelagens seguiram os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

4 RESULTADOS

4.1 Lipases em sistema digestório de artrópodes vetores: propriedades gerais

Através dos dados de atividade obtidos com os diferentes substratos e as respectivas medidas de proteína de cada lote, foi possível calcular a atividade absoluta (mU/animal) e a atividade especifica (mU/mg), encontradas nos homogeneizados de intestino médio dos animais modelo. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

A lipase de *Aedes aegypti* larva apresentou maior atividade sobre os substratos butirato e heptanoato apresentando baixas atividades sobre oleato e estearato que são os substratos de cadeia mais longa. Esta enzima também foi capaz de hidrolisar DMPTB, mimetizando um triacilglicerídeo. Já a lipase de *Aedes aegypti* adulto tem maior atividade sobre heptanoato e butirato e esta enzima apresentou a menor atividade sobre DMPTB dentre as lipases estudadas. As lipases de carrapato apresentaram as maiores atividades. Entretanto, isto provavelmente está relacionado ao tratamento diferenciado que as preparações receberam. Os homogeneizados de *Aedes aegypti* larva e adulto indicavam a ocorrência de autólise. Desta forma, as preparações foram tratadas com TPCK (tosyl-phenylalanine-chloromethyl ketone) e TLCK (tosyl-lysine-chloromethyl ketone) modificadores químicos de quimotripsina e tripsina respectivamente (SALVESEN e NAGASE, 2001). Não há claramente na literatura indicação de que estes modificadores poderiam afetar a atividade de lipases. Entretanto, verificamos que há uma perda de aproximadamente 3x para a lipase de *Aedes aegypti* larva e de cerca de 40x para a lipase de *Aedes aegypti* adulto após a adição destes modificadores.

Tabela 2 – Atividades absoluta e especifica de lipase, medida com diferentes substratos, nos homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva e adulto e em homogeneizados de *Amblyomma cajennense*.

	Aedes aegypti (larva)		*Aedes aegypti* (adulto)		*Amblyomma cajennense*	
Substrato	AA ** (mU/animal)	AE (mU/mg)	AA (mU/animal)	AE (mU/mg)	AA (mU/animal)	AE (mU/mg)
oleato***	2,5 ± 0,4	41 ± 4,7	0,6 ± 0,06	3,4 ± 1,5	504 ± 100	9,6 ± 1,1
butirato*	211± 106	3803 ± 1600	30 ± 4	186 ± 75	13545 ± 2900	260 ± 45
heptanoato*	160 ± 57	3671 ± 1660	39 ± 5	246 ± 100	14000 ± 2000	284 ± 56
estearato*	≥0,22	≥3,7	≥0,07	≥1,0	168 ± 43	3,1 ± 0,5
DMPTB	3,0 ± 0,1	66 ± 3,0	0,4 ±0,05	3,0 ± 0,08	293 ± 21	6,0 ± 0,3

* Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em diferentes lotes de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense* e de duas medidas independentes em lotes de homogeneizado de *Aedes aegypti* larva. Os homogeneizados de *Aedes aegypti* adulto e larva utilizados para estas medidas contém TLCK e TPCK. As medidas sobre oleato utilizando homogeneizados de intestinos médios de *Aedes aegypti* larva em água resultam em uma atividade absoluta de 7,0 mU/animal e uma atividade específica de 117 mU/animal e para *Aedes aegypti* adulto os homogeneizados em água apresentam uma atividade absoluta de 26 mU/animal e uma atividade específica de 130 mU/mg.

** AA: atividade absoluta. AE: atividade específica.

*** Estas são médias e desvios de quatro medidas independentes em diferentes lotes de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva e adulto e seis medidas independentes em lotes de homogeneizado de *Amblyomma cajennense*.

Estes dados poderiam evidenciar um artefato nas medidas de atividade, sugerindo que a atividade sobre os substratos fluorescentes seria a atividade esterásica das peptidases digestivas. No entanto, o tratamento dos homogeneizados com outros inibidores destas enzimas, como benzamidina, resultaram no aumento da atividade de lipase, provavelmente por redução da proteólise e aumento da estabilidade da lipase. Por outro lado, a tríade catalítica das lipases é composta pelos mesmos resíduos das serino peptidases, sendo que as clorometil cetonas alquilam o resíduo de histidina do sítio ativo podendo então ocorrer uma modificação semelhante no resíduo de histidina do sítio ativo das lipases.

Assim como as lipases de *Aedes aegypti* apresentaram a maior atividade sobre butirato e heptanoato a lipase de *Amblyomma cajennense* também foi mais ativa sobre estes substratos. No entanto, as razões de hidrólise entre os substratos para as diferentes lipases foi bastante distinto. A lipase de *Aedes aegypti* larva apresenta as seguintes razões: butirato/oleato = 85x; heptanoato/oleato = 64x (as razões sobre estearato não foram calculadas em virtude das baixas atividades). Estas mesmas razões para a lipase de *Aedes aegypti* adulto são 50 e 65x, respectivamente e para a lipase de *Ambyomma cajennense* são de 27x, 28x e 0,3x (incluindo a razão estearato/oleato). As maiores atividades específicas foram medidas em *Aedes aegypti* larva para todos os substratos. No entanto, tem se discutido a validade desta comparação tendo como valor de referencia a quantidade de proteína da amostra em quantidades de tecido amostral tão distinto como é o caso de *Aedes aegypti* e *Amblyomma cajennense*. Desta forma, estes dados não serão discutidos e as comparações de especificidade serão realizadas apenas em relação aos diferentes substratos utilizados em um único modelo animal.

A comparação das medidas de atividade de lipase encontrada com os diferentes substratos derivados de 4-metilumbeliferona permitiu observar a diferença de especificidade das lipases digestivas em estudo. As razões obtidas de hidrólise mostram proporções distintas de hidrólise dos substratos, indicando que as lipases atuantes na digestão na fase larval e adulta podem ser distintas. Os dois substratos (butirato e heptanoato) melhor hidrolisados possuem cadeias carbônicas curtas, 4 e 7 carbonos respectivamente (4C e 7C) indicando que as lipases digestivas dos animais estudados hidrolisam preferencialmente substratos de cadeia carbônica curta.

Foram feitas medidas de atividade com os substratos oleato, butirato, heptanoato e estearato também com as lipases parcialmente purificadas de *Aedes aegypti* larva (Figura 12) e *Aedes aegypti* adulto (Figura 13) nas frações obtidas após cromatografia de troca iônica. Estes ensaios demonstraram que as atividades sobre os diferentes substratos foram verificadas nas mesmas frações, indicando tratar-se de uma única enzima clivando todos os substratos. Ensaios posteriores de frações provenientes de cromatografias foram feitos apenas com oleato apenas pela maior disponibilidade deste substrato.

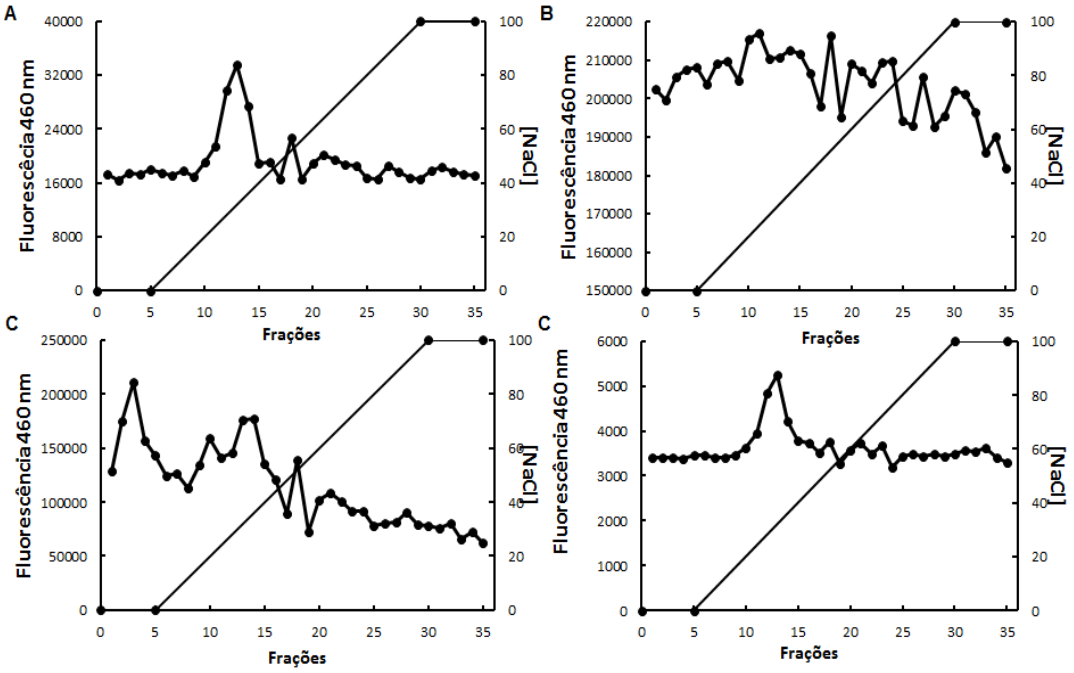


Figura 12 - Cromatografia de troca aniônica em coluna Hitrap Q a partir de homogeneizado de intestinos médios de *Aedes aegypti* larva. A atividade de lipase foi medida nas frações obtidas na cromatografia utilizando diferentes substratos (A) oleato, (B) butirato, (C) heptanoato e (D) estearato.

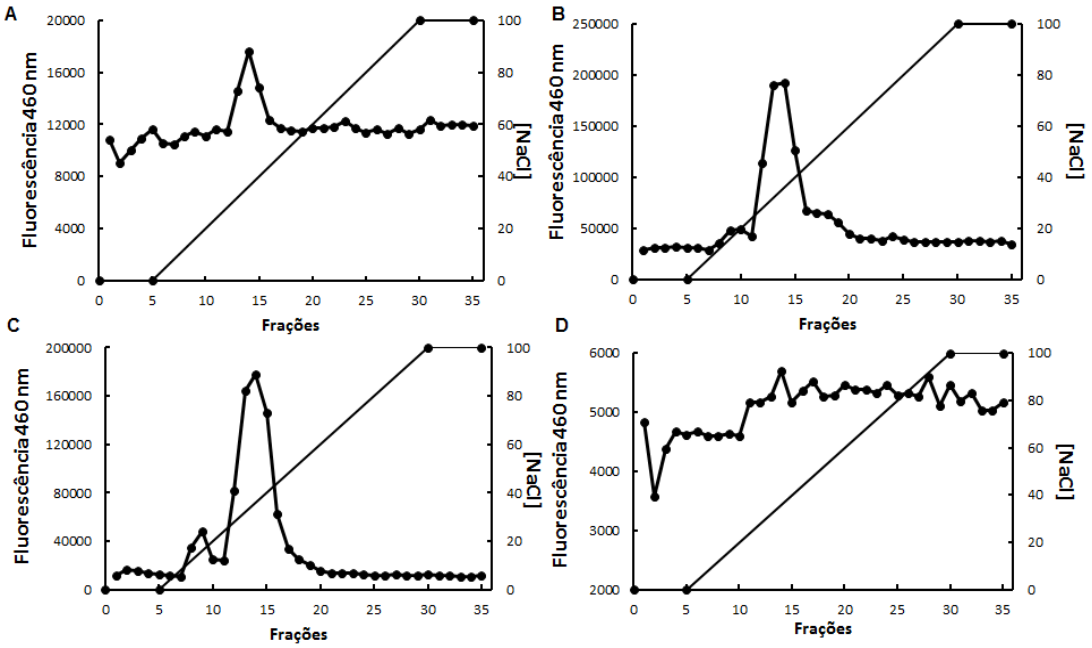


Figura 13 - Cromatografia de troca iônica aniônica em homogeneizado de intestino médio de *Aedes aegypti* adulto. A atividade de lipase foi medida nas frações obtidas na cromatografia, as frações foram ensaiadas com diferentes substratos (A) MU-Oleato, (B) MU-Butirato, (C) MU-Heptanoato e (D) MU-Estearato.

4.2 Efeito da presença de íons sobre a atividade das lipases de *Aedes aegypti* larva, adulto e de *Amblyomma cajennense*

Como pode ser visto na literatura, muitas lipases são ativadas na presença de Ca^{+2}, incluindo a lipase pancreática humana a qual é ativada por este íon mesmo na ausência de colipase (KIMURA et al., 1982; MICKEL et al., 1989). Os resultados indicam diferenças de comportamento entre as lipases em estudo.

A lipase de *Aedes aegypti* larva apresentou uma perda de atividade se compararmos o controle sem diálise e o controle dialisado, indicando que há na preparação inicial algum ativador/estabilizador da enzima, ou ainda que houve proteólise durante a diálise. Não houve um padrão claro de ativação pela adição de cálcio às condições padrão de ensaio (Figura 14 A). A lipase de *Aedes aegypti* adulto apresenta uma ativação de 1,5 vezes na concentração 1,5 mM de cálcio (Figura 14 B) e a lipase de *Amblyomma cajennense* apresenta uma ativação de 1,9 vezes em 1,0 mM e 1,5 mM de cálcio (Figura 14 C). As lipases de *Aedes aegypti* na fase larval e adulta mostraram um comportamento distinto em relação ao efeito do

cálcio na atividade da enzima, sendo que a lipase de *Aedes aegypti* larva não apresenta um padrão claro de ativação por cálcio enquanto a lipase de *Aedes aegypti* adulto mostrou um comportamento parecido com a lipase de *Rhodnius prolixus* que sofre uma ativação de 1,5 vezes nas concentrações de 1,0 mM e 1,5 mM de cloreto de cálcio (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). Esse comportamento evidencia a diferença das enzimas encontradas nas duas fases de desenvolvimento, larvas e mosquitos adultos e corrobora os dados obtidos nas medidas de atividade e nas separações cromatográficas. O comportamento das lipases dos vetores hematófagos *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense*, se mostrou parecido em relação ao efeito de cálcio, ambas sofreram uma pequena ativação na faixa de concentração de cálcio de 1,0 mM e 1,5.

4.3 Efeito de temperatura sobre as lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e *Amblyomma cajennense*

Através de experimentos de inativação térmica foi possível determinar a temperatura de inativação para a lipases dos animais estudados. A lipase de *Aedes aegypti* larva apresentou uma meia vida de 42 minutos a 60 °C (Figura 15 A), a lipase de *Aedes aegypti* adulto apresentou uma meia vida de 46 minutos a 55 °C (Figura 15 B) e a lipase digestiva do carrapato *Amblyomma cajennense* apresentou uma meia vida de 25 minutos a 55 °C (Figura 15 C).

Pudemos observar pelos dados obtidos que as lipases das larvas e fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* apresentam uma alta resistência a temperaturas elevadas. As diferentes temperaturas de inativação indicam formas distintas de lipases nas diferentes fases de desenvolvimento do animal. A lipase de *Amblyomma cajennense* mostra um comportamento bastante distinto de inativação térmica, se mostrando menos resistente à temperatura quando comparada a lipase de *Aedes aegypti* na fase larval e adulta.

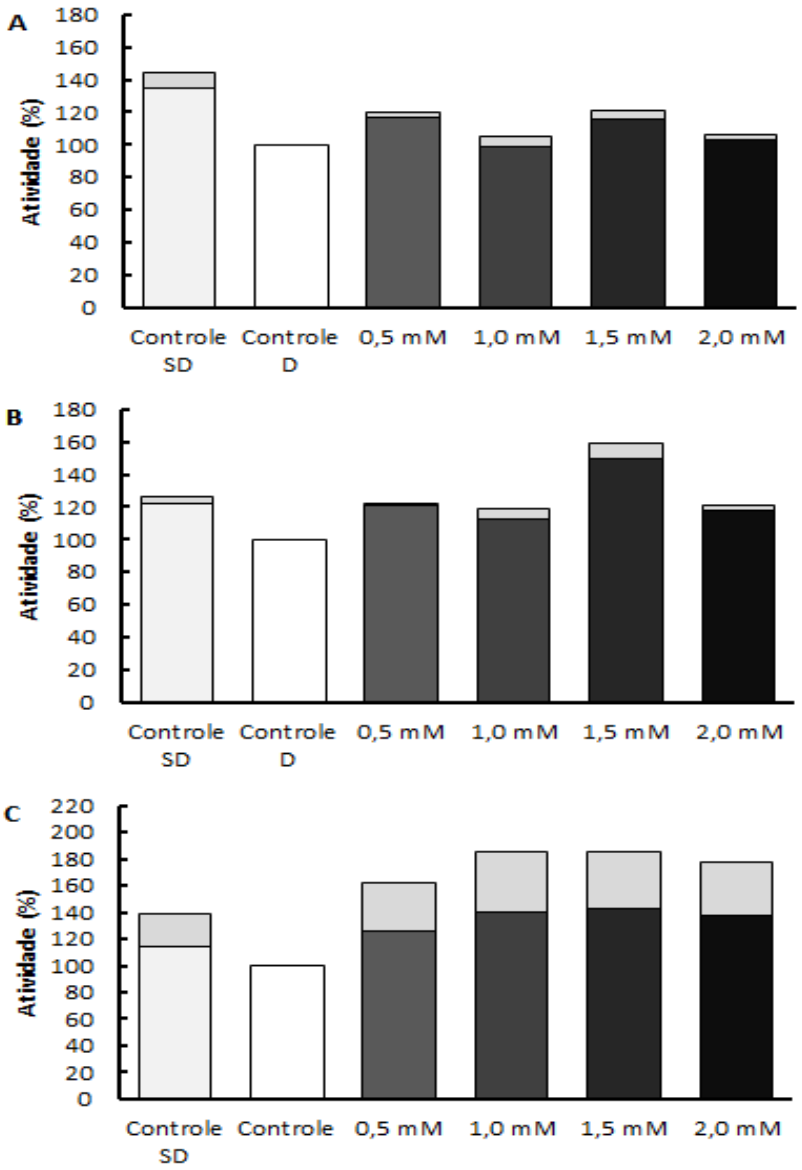


Figura 14 - Efeito da presença de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) sobre a atividade da lipase digestiva presente em homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva (A), *Aedes aegypti* adulto (B) e (C) *Amblyomma cajennense* (C). Foram utilizados dois controles, sem adição $CaCl_2$: O primeiro consiste na amostra do homogeneizado diluida sem dialisar (SD); o segundo consiste na amostra do homogeneizado diluida após dialise (D). Os valores representados nos gráficos são médias e as colunas empilhadas acima dos gráficos os seus respectivos desvios. *Aedes aegypti* larva (n=3), *Aedes aegypti* adulto (n=2) e *Amblyomma cajennense* (*n*=2).

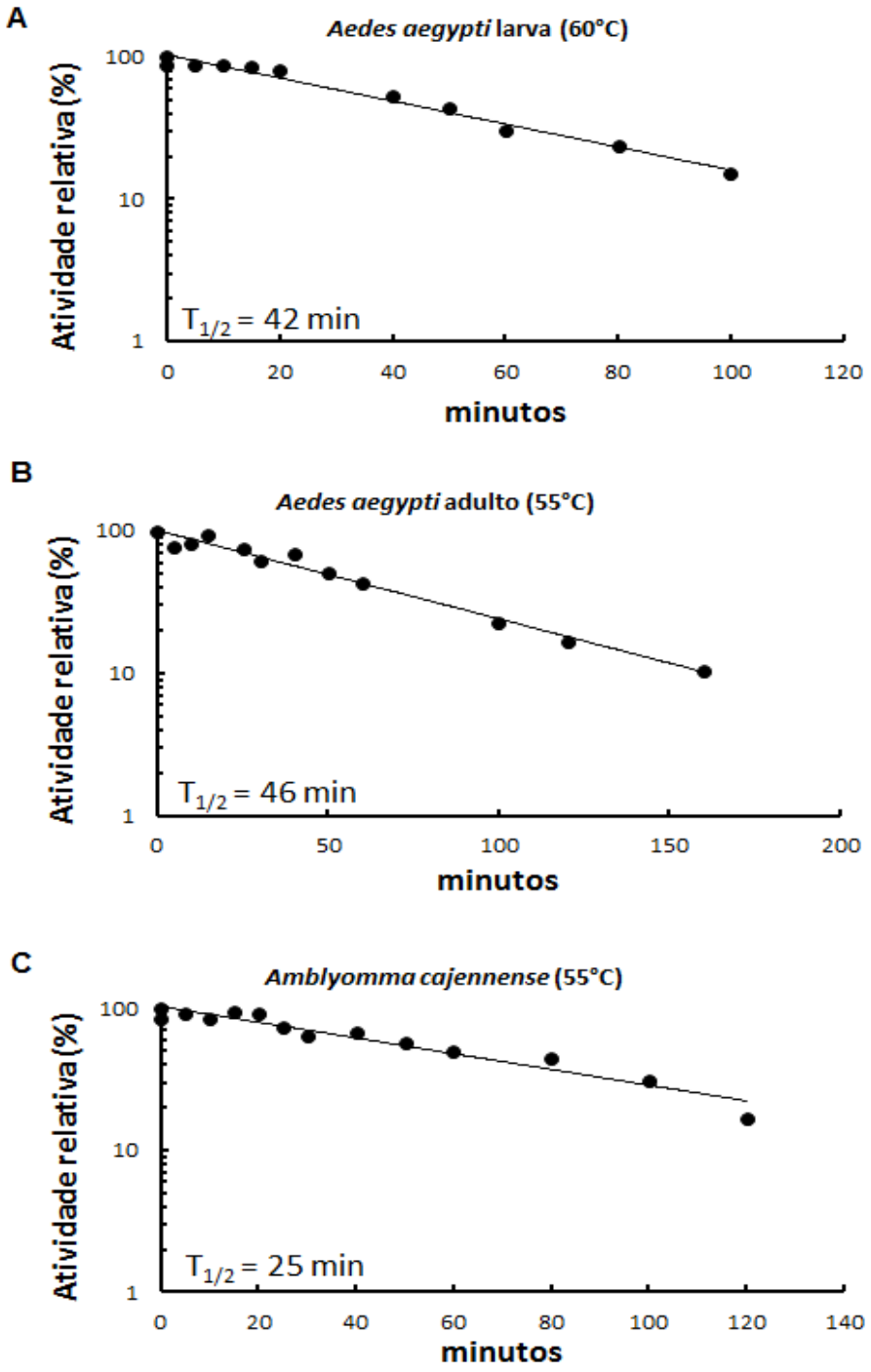


Figura 15 - Estabilidade térmica da atividade de lipase presente em homogeneizados de intestino médio de (A) *Aedes aegypti* larva a 60 ˚C , (B) *Aedes aegypti* adulto a 55 ˚C e (C) *Amblyomma cajennense* a 55 ˚C. A atividade remanescente foi medida utilizando oleato como substrato. n=3 para todas as lipases estudadas.

4.4 Efeito do pH sobre a atividade de lipase

4.4.1 pH ótimo

O pH ótimo das lipases digestivas de *Aedes aegypti* larva, adulto e de *Amblyomma cajennense* está em uma faixa de pH de 8,5 a 9,0,sendo 8,5 a 9,0 para *Aedes aegypti* larva, para *Aedes aegypti* adulto pH 9,0 e para *Amblyomma cajennense* pH 9,0 (Figura 16 A, B e C). A partir da determinação do pH ótimo das enzimas, ficou estabelecido que o pH utilizado em todos os ensaios posteriores (incluindo os de medida de atividade) seria o pH 8,5. O tampão escolhido como padrão foi o Tris 20 mM pH 8,5. Os valores encontrados permitiram a comparação com o pH ótimo de outras lipases digestivas descritas em mamíferos e em outros artrópodes encontradas na literatura (vide item 5.2.). As lipases dos animais estudados podem ser classificadas como pertencentes ao grupo das lipases neutras. Nesta família está incluída a lipase pancreática humana. A lipase pancreática humana apresenta um pH ótimo entre 8,0 e 10,0 dependendo do substrato utilizado (TIETZ et al., 1993).

4.4.2 Estabilidade ao pH

A estabilidade das lipases digestivas a diferentes condições de pH foi determinada para amostras de larvas e fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti* e para fêmeas adultas de *Amblyomma cajennense*. A lipase de *Aedes aegypti* larva a 4 °C apresentou 70% de atividade a partir do pH 5,5 e se manteve com atividade estável até o pH 12,0. Nos mesmos testes realizados a 37 °C a lipase de *Aedes aegypti* larva apresentou 70% da atividade a partir do pH 8,0 permanecendo estável até o pH 12,0, a faixa de pH de 5,5 a 8,0 apresentou atividade abaixo dos 70% (Figura 17 A e 17 B) o que pode ocorrer devido a presença de peptidases digestivas do tipo tripsinas e quimotripsinas cujo o pH ótimo está nesta faixa de pH (GRAF e BRIEGEL, 1989). Para *Aedes aegypti* adulto foi encontrada a 4 °C e a 30 °C uma ampla faixa de estabilidade que vai do pH 3,0 ao 11,0, com uma ligeira queda em pHs mais alcalinos (Figura 17 C e 17 D). O efeito de perda de atividade em pHs mais alcalinos possivelmente também se deve a presença de peptidases do tipo tripsina e quimotripsina, enzimas ativas nesta faixa de pH nos animais adultos (GRAF e

BRIEGEL, 1889). A perda da atividade em pHs mais alcalinos foi observada nas lipases digestivas da barata *Periplaneta americana* e nas mariposas *Diatraea saccharallis* e *Spodoptera frugiperda* (FILIETAZ e LOPES, 2010). Para testar esta hipótese o experimento de estabilidade ao pH foi repetido com homogeneizados de intestinos médios de fêmeas adultas de *Aedes aegypti,* na presença de um inibidor de tripsina (benzamidina), que foi adicionado ao homogeneizado do animal. As condições de ensaio foram idênticas ao experimento inicial (materiais e métodos). A faixa de estabilidade encontrada no experimento feito na presença do inibidor benzamidina foi do pH 3,0 a 12,0 se mantendo estável nas faixas ácidas e alcalinas (Figura 18).

Foi possível comparar a diferença das lipases encontradas em larvas e fêmeas adultas de *Aedes aegypti* em relação ao perfil de estabilidade e verificar a ação de peptidases digestivas em determinados pHs, a atividade dessas enzimas estaria interferindo na estabilidade das lipases digestivas.

Para *Amblyomma cajennense* foi encontrada a 4 °C e a 30 °C uma faixa bastante ampla de estabilidade, acima dos 60%, que vai do pH 3,0 a 11,0 (Figura 17 E e 17 F). Essa faixa ampla de estabilidade indica um comportamento enzimático parecido ao encontrado para a lipase de *Aedes aegypti* adulto.

4.5 Efeito da concentração de oleato sobre a atividade de lipase presente em homogeneizados de intestino médio de larvas e adultos de *Aedes aegypti* e *Amblyomma cajennense*

Esse experimento possibilitou uma primeira determinação da especificidade da enzima pelo substrato oleato. Os valores de Km encontrados para a lipase de *Aedes aegypti* larva foi de 22,0 µM ± 3,3 µM. A lipase de *Aedes aegypti* adulto apresentou um Km de 96,0 µM ± 14,0 µM e para *Amblyomma cajennense* 7,0 µM ± 0,6 µM (Tabela 3). Os plotes de Lineweaver-Burk obtidos bem como as curvas de Michaelis-Menten podem ser observadas na Figura 19.

A lipase de *Amblyomma cajennense* e de *Aedes aegypti* larva parecem se ligar mais eficientemente ao substrato oleato. O experimento indica diferença de comportamento em relação ao substrato para as lipases encontradas no sistema digestório de *Aedes aegypti* nas duas fases de desenvolvimento e a diferença de especificidade entre as lipases presentes nos vetores hematófagos.

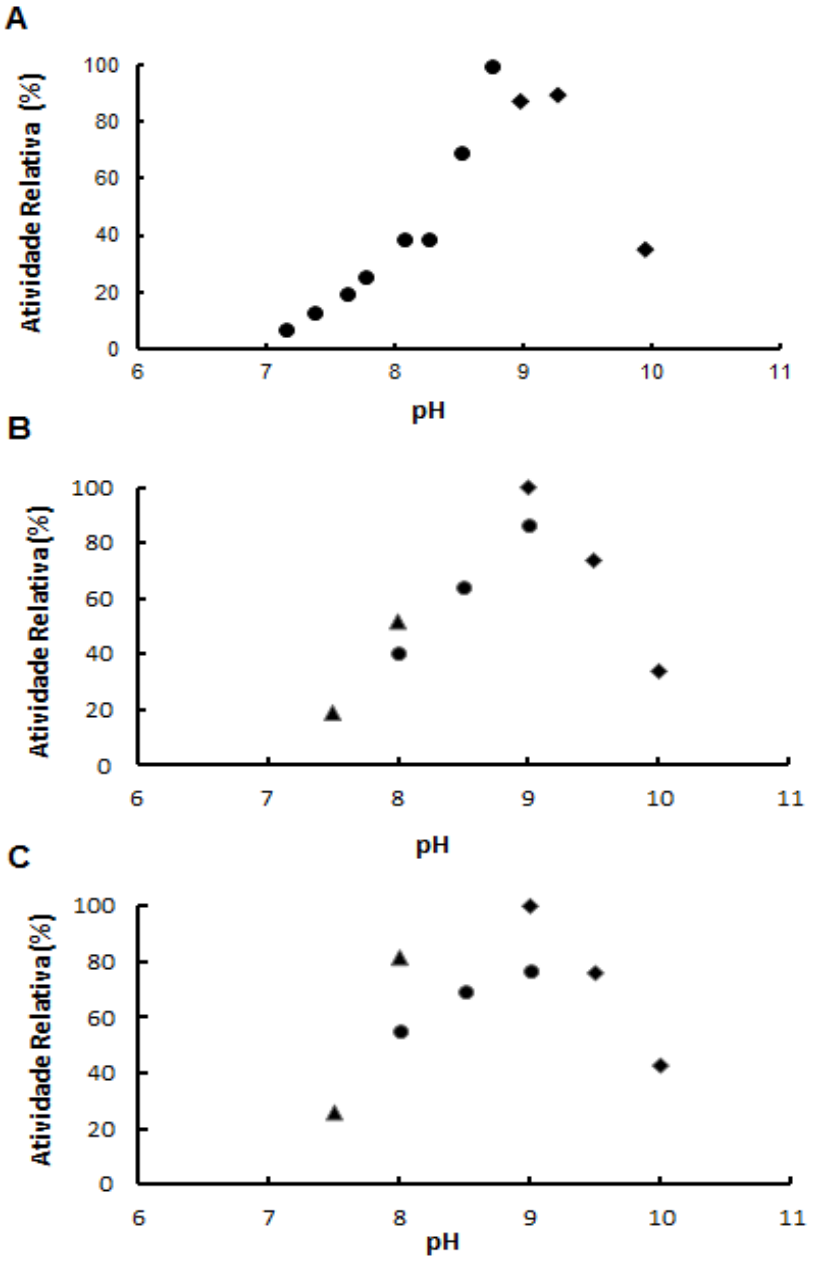


Figura 16 - Efeito do pH sobre as atividades de lipase utilizando oleato como substrato. Efeito medido em homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva (A), *Aedes aegypti* adulto (B) e *Amblyomma cajennense* (C). Tampões: HEPES pH 7,5 - 8,0 ▲; Tris pH 8,0 -9,0 ●; Glicina -NaOH pH 9,0 - 10 ♦. *Aedes aegypti* larva (n= 1), *Aedes aegypti* adulto (n= 2) e *Amblyomma cajennense* (n= 1).

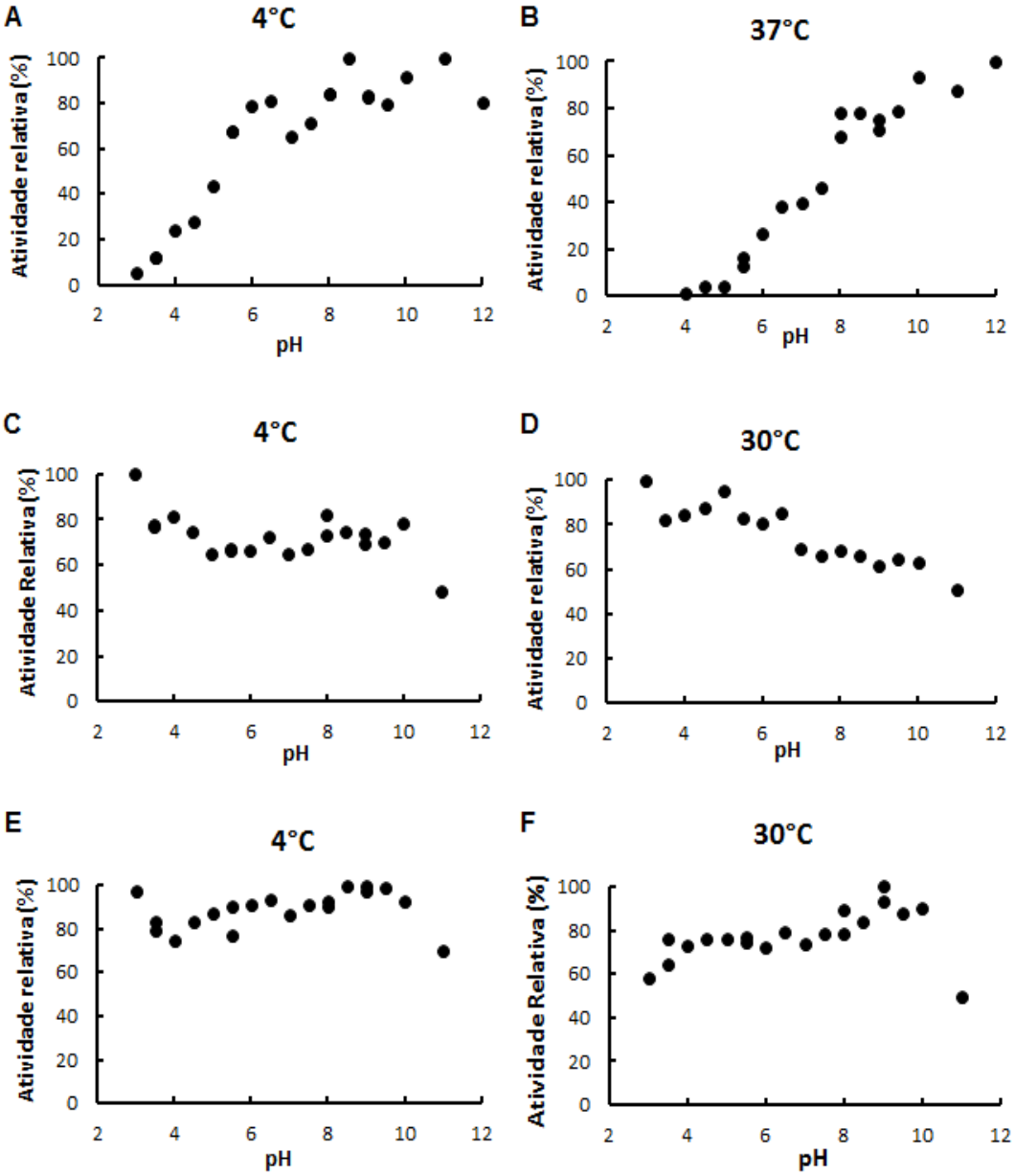


Figura 17 - Estabilidade ao pH a 4 ºC e 37 ºC para a atividade de lipase digestiva de *Aedes aegypti* larva (A e B) ; a 4 ºC e 30 ºC para as atividades de lipase digestiva de *Aedes aegypti* adulto (C e D) e *Amblyomma cajennense* (E e F) (detalhes experimentais em materiais e métodos). *Aedes aegypti* larva (n= 3), *Aedes aegypti* adulto (n= 3) e *Amblyomma cajennense* (n= 2)

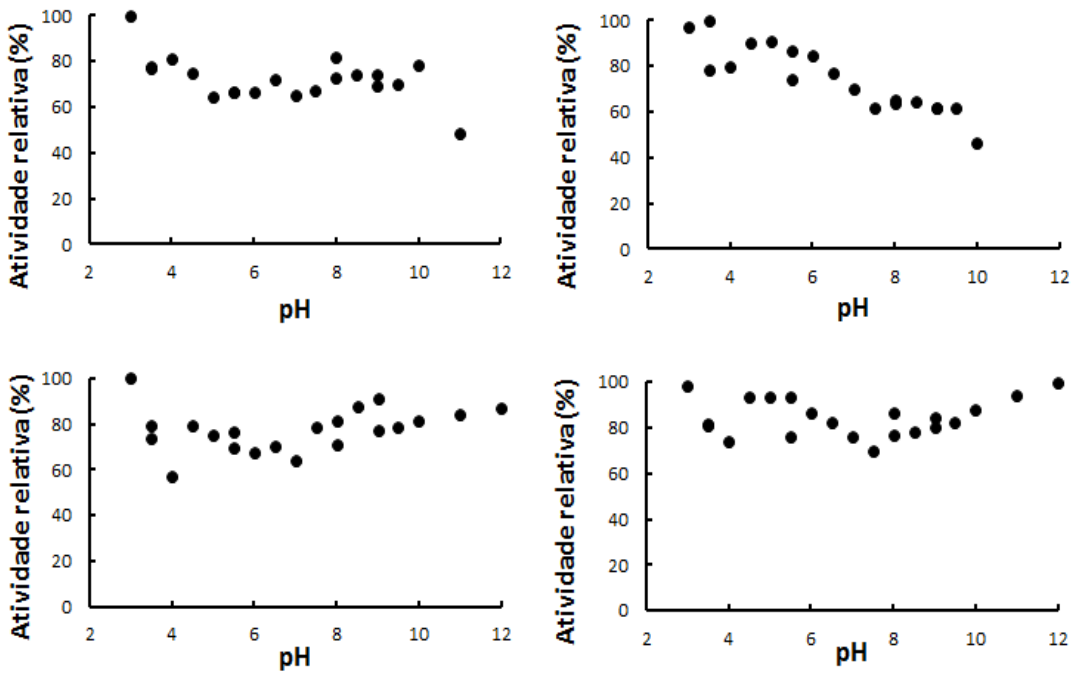


Figura 18 - Estabilidade ao pH em diferentes temperaturas (4 ºC e 30 ºC) para as atividades de lipase digestiva de *Aedes aegypti* adulto em condições padrão de ensaio (A e B) e atividade de lipase digestiva de *Aedes aegypti* adulto na presença do inibidor benzamidina nos ensaios (C e D) (detalhes experimentais em materiais e métodos).

Tabela 3 – Valores de Km obtidos para as lipases digestivas sobre o substrato MU-Oleato.*

Animal	Valores de Km**
Aedes aegypti (larva)	22,0 µM ± 2,3 µM
Aedes aegypti (adulto)	96,0 µM ± 14,0 µM
Amblyomma cajennense	7,0 µM ± 0,6 µM

* Fonte de enzima: homogeneizados brutos de intestino médio de *Aedes aegypti* larva, *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense*.
**Estas medidas são médias e desvios de três medidas independentes em diferentes lotes de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva, *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense*.

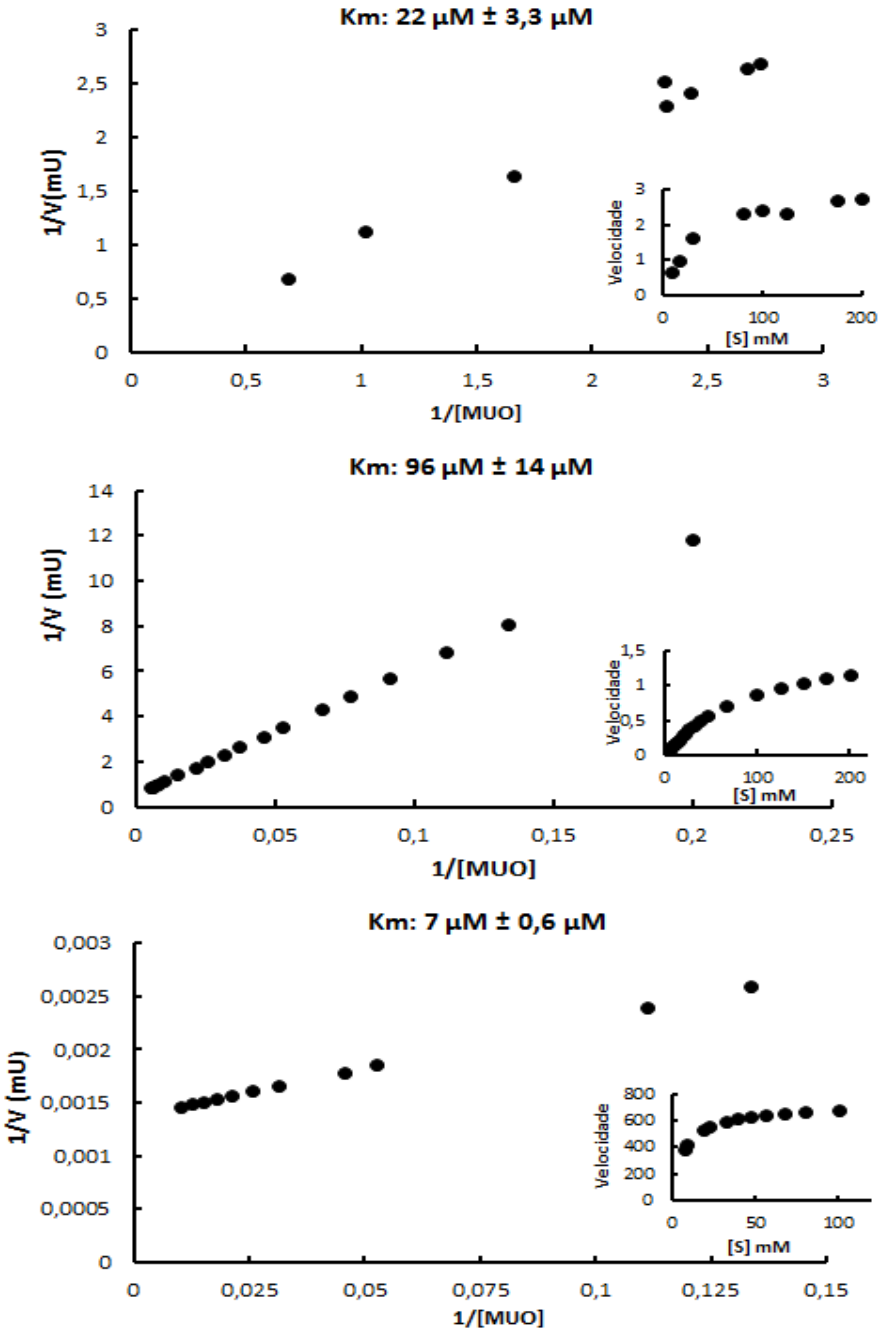


Figura 19 - Efeito da concentração de substrato MU-Oleato (mM) sobre a atividade de lipase em homogeneizados de intestino médio de (A) *Aedes aegypti* larva, (B) *Aedes aegypti* adulto e (C) *Amblyomma cajennense*. As figuras são plotes de Lineweaver-Burk a partir dos dados obtidos. Os gráficos inseridos são as curvas de Michaelis-Menten.

4.6 Isolamento das lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Ambyomma cajennense*

Diferentes passos cromatográficos foram testados com o objetivo de purificar as lipases presentes no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti* larva e adulto e do carrapato *Amblyomma cajennense.* Alguns passos cromatográficos se mostraram eficientes e podem ser utilizados para o isolamento das lipases em uma marcha de purificação.

Para obtenção dos melhores passos cromatográficos para a lipase presente em material bruto de *Aedes aegypti* larva foram testadas colunas de interação hidrofóbica, de troca iônica catiônica e de troca iônica aniônica. A cromatografia em coluna de troca iônica aniônica (Hitrap Q) foi a que apresentou melhores resultados sendo obtido um pico único de atividade eluído na faixa de 48% do gradiente (NaCl 0,48 M) e com uma recuperação de 160% (Figura 20 A). O reunido ativo para a atividade de lipase foi submetido a um segundo passo cromatográfico em uma segunda coluna de troca iônica aniônica (Resource Q). Após este passo cromatográfico foi obtido um pico único de atividade eluído na presença de NaCl 0,2 M com uma recuperação de 50% (Figura 20 B). A análise destas proteínas em SDS-PAGE demonstrou um isolamento apenas parcial com pouca quantidade de proteína. Amostras de homogeneizado de intestinos médios de *Aedes aegypti* adulto foram diluídas e aplicadas a uma coluna de troca iônica aniônica (Hitrap Q). Frações com atividade sobre oleato foram eluídas em uma faixa de gradiente entre NaCl 0,32 a 0,52 M com recuperação de 260% (Figura 21 A). Apesar de um perfil indicando a presença de mais de uma lipase nesta primeira cromatografia, esta separação não se repete em uma coluna de maior resolução. O reunido ativo de lipase foi submetido a um segundo passo cromatográfico em uma coluna de troca iônica (Resourse Q), resultando na eluição de uma única atividade sobre oleato (NaCl 0,32 M) com recuperação de 105% (Figura 21 B). A análise por SDS-PAGE destas amostras apresentou os mesmos resultados discutidos anteriormente para a lipase de *Aedes aegypti* na fase larval.

Ainda para a lipase digestiva de *Aedes aegypti* adulto as amostras foram submetidas a uma filtração em gel corroborando os dados de uma única forma da enzima com uma massa molecular de 110 kDa (Figura 22). O peso encontrado se mostrou distinto do observado para a lipase pancreática humana (50 kDa)

(CARRIÈRE et al., 2000) e da lipase encontrada no sistema digestório do escorpião *Scorpio maurus* que apresenta uma massa molecular de 50 kDa (ZOUARI et al., 2005). Este valor também é distinto do valor teórico calculado a partir das sequencias codificadoras das lipases do intestino médio de *Aedes aegypti* larva (46 kDa) e adulto (37 kDa) como será apresentado adiante. Essa alta massa molecular pode sugerir um processo de oligomerização nas condições em que a cromatografia foi realizada.

Várias cromatografias foram testadas para isolar a lipase de *Amblyomma cajennense*; cromatografias de troca iônica catiônica e de interação hidrofóbica foram testadas nas mais diversas condições. Entretanto, não foi possível obter uma boa recuperação da atividade de lipase após estes processos. O homogeneizado bruto de *Amblyomma cajennense* foi submetido a uma precipitação ácida a qual teve uma recuperação de 47% de atividade e um enriquecimento de 2 vezes. Posteriormente, o sobrenadante desta precipitação foi aplicado a uma cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Hitrap Q, sendo eluída em dois picos de atividade, o primeiro com 20% e o segundo com 90% de recuperação (Figura 23). No entanto, há perda de atividade desta enzima em qualquer passo posterior testado não sendo possível ainda estabelecer uma marcha de purificação para a lipase de carrapato.

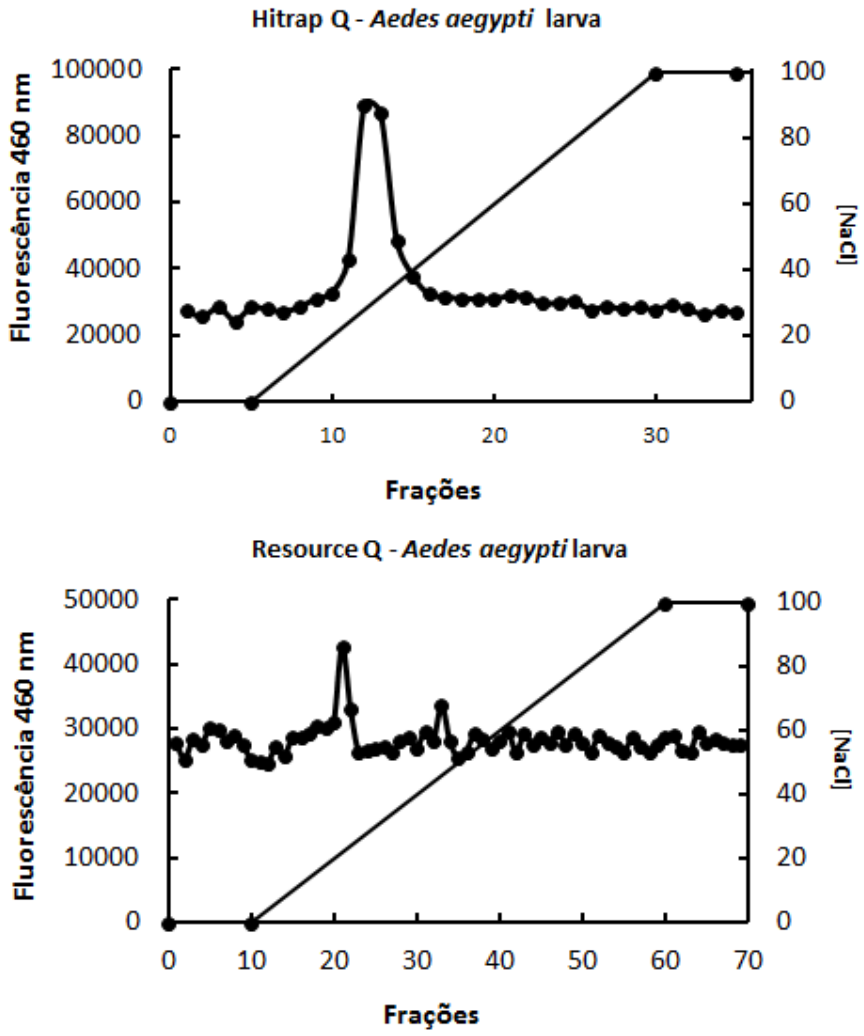


Figura 20 - Passos cromatográficos utilizados para purificação parcial da lipase presente no intestino médio *de Aedes aegypti* larva. Cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Hitrap Q (A). Material aplicado: homogeneizado bruto; cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Resource Q (B). Material aplicado: reunido ativo.

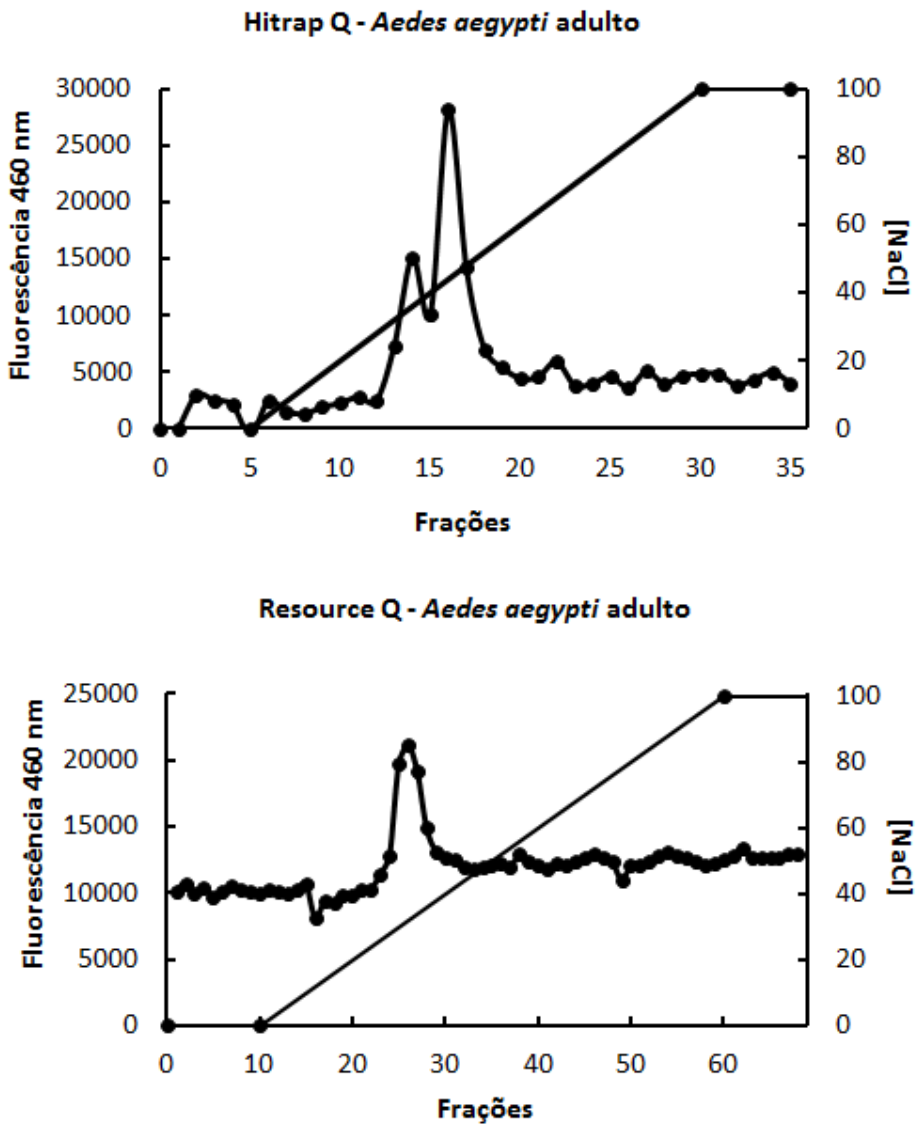


Figura 21 - Passos cromatográficos utilizados para purificação parcial da lipase presente no intestino médio de *Aedes aegypti* adulto. Cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Hitrap Q (A), material aplicado homogeneizado bruto; cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Resource Q (B), material aplicado reunido ativo.

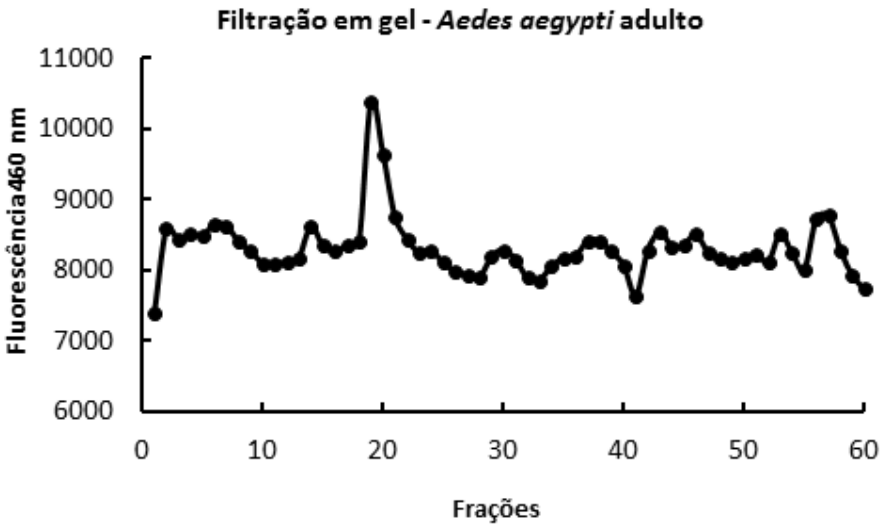


Figura 22 – Cromatografia utilizada para determinação da massa molecular da lipase presente no intestino médio de *Aedes aegypti.* Cromatografia de filtração em gel em coluna Superdex 75 10/300 GL (Pharmacia, Suécia), o material aplicado foi o reunido ativo proveniente de uma cromatografia de troca iônica (Hitrap Q).

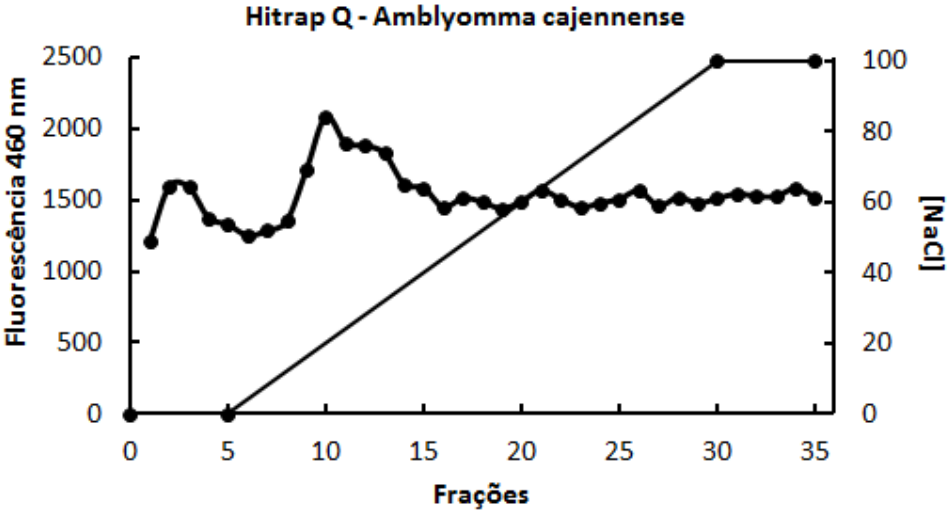


Figura 23 - Cromatografia utilizada para purificação parcial da lipase presente no intestino médio de *Amblyomma cajennense*. Cromatografia de troca iônica aniônica em coluna Hitrap Q, o material aplicado foi o homogeneizado bruto do intestino médio.

4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos para *Aedes aegypti* larva e adulto com diferentes substratos

Os experimentos para verificar o efeito da concentração dos substratos em reunidos ativos possibilitaram a determinação da afinidade da enzima pelo substrato através da determinação dos valores de Km. Os valores de Km encontrados para *Aedes aegypti* larva com os diferentes substratos foram: para oleato 112 µM ± 17 µM, butirato 506 µM ± 48 µM, heptanoato 329 µM ± 32 µM e estearato 57 µM ± 4 µM. Os valores de Km encontrados para *Aedes aegypti* adulto com os diferentes substratos foram: oleato 121 µM ± 46,0 µM, butirato 92 µM ± 10 µM e heptanoato 86 µM ± 16 µM (Tabela 4). Não foi possível mensurar a hidrólise do substrato Estearato nos reunidos ativos de *Aedes aegypti* larva e adulto. Os plotes de Lineweaver-Burk bem como as curvas de Michaelis-Menten de *Aedes aegypti* larva podem ser observados na Figura 24 e os plotes de *Aedes aegypti* adulto podem ser observados na Figura 25.

Os valores de Km encontrados para oleato em reunido ativo permitiriam uma comparação com os valores de Km encontrados nos homogeneizados brutos. No entanto, as amostras de homogeneizados utilizadas para a primeira determinação não continham TLCK e TPCK, enquanto as amostras utilizadas nas marchas de purificação contêm os inibidores. Os dados obtidos indicam que a presença de TLCK e TPCK está levando a uma alteração do Km desta enzima. Entretanto ainda é possível uma comparação entre os diferentes substratos para esta preparação.

A lipase de *Aedes aegypti* larva apresenta maior afinidade sobre estearato, entretanto apresenta a menor eficiência catalítica sobre este substrato. A baixa eficiência está relacionada à baixa velocidade da reação e não à ligação ao substrato. A enzima apresenta um aumento de afinidade com o aumento da cadeia carbônica do substrato. O inverso ocorre com a velocidade. Os parâmetros cinéticos permitiram observar algumas diferenças entre as lipases das duas fases de desenvolvimento de *Aedes aegypti* caracterizadas. A diferença mais significativa observada foi a diferença de eficiência catalítica. A lipase de *Aedes aegypti* larva apresenta maior eficiência hidrolítica sobre butirato enquanto a lipase de *Aedes aegypti* adulto apresenta maior eficiência catalítica sobre heptanoato. O aumento da eficiência sobre heptanoato está diretamente relacionada à catálise e não a ligação, dado que não há diferença significativa de afinidade entre butirato e heptanoato, o

que não ocorre para a lipase de *Aedes aegypti* larva para a qual há uma diferença de 1,5x entre os valores de Km. A lipase de *Aedes aegypti* adulto não hidrolisou estearato nas condições experimentais testadas. Outra diferença é uma afinidade menor quanto maior a cadeia carbônica do substrato observada para a lipase de *Aedes aegypti* adulto. A baixa eficiência catalítica sobre oleato para esta enzima está relacionada tanto a uma baixa afinidade quanto a uma baixa velocidade de catálise.

4.8 Análise das sequências de lipase expressas no intestino de *Aedes aegypti* nos diferentes estágios de desenvolvimento

No genoma do mosquito *Aedes aegypti* 72 sequências foram anotadas como lipases (NENE et al., 2010). Estas 72 sequências foram analisadas como descrito nos itens citados na Figura 10 (materiais e métodos; item 3.9.). Através desta análise foi possível selecionar 8 possíveis lipases que poderiam ser expressas no sistema digestório dos animais estudados. Essas 8 sequências foram utilizadas para desenhar iniciadores (Tabela 1) (materiais e métodos, item 3.9.). A expressão de lipase em diferentes tecidos (carcaça e intestino médio) das larvas e de fêmeas adultas alimentadas em sangue e sacarose foi verificada com a utilização dos iniciadores descritos anteriormente em RT-PCR semi-quantitativo com o objetivo de encontrar lipases expressas exclusivamente no intestino médio destes animais.

Estes experimentos permitiram a identificação de duas lipases expressas no sistema digestório de *Aedes aegypti*: as lipases AAEL 007051 e AAEL 007055. O experimento também possibilitou verificar diferenças de expressão de lipases nas fases de desenvolvimento de *Aedes aegypti*, larva e adulto e em relação ao tipo de alimentação na fase adulta: sacarose e sangue.

Os resultados obtidos mostraram que 2 pares de iniciadores se mostraram eficientes na amplificação da lipase presente no intestino médio do animal estudado. O iniciador AAEL 007051 permitiu a amplificação de uma lipase de intestino médio de *Aedes aegypti* larva (AL-I) e o iniciador AAE 007055 amplificou uma sequência que codifica uma lipase em intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (AA-I-Sa) e sacarose (AA-I-Sc) (Figura 26).

Tabela 4 – Efeito da concentração de diferentes substratos sobre a atividade de lipases digestiva de *Aedes aegypti*. *

	***Aedes aegypti* (larva)**			***Aedes aegypti* (adulto)**		
	Km (μM)	Vmáx (mU)	Vmáx/Km (min^{-1})	Km (μM)	Vmáx (mU)	Vmáx/Km
Substratos						
butirato	506 ± 95	208 ± 38	0,4 ± 0,1	92 ± 1,0	29 ± 1,0	0,32 ± 0,01
heptanoato	329 ± 6,0	77 ± 9,0	0,20 ± 0,03	86 ± 5,0	40 ± 3,5	0,47 ± 0,06
oleato	112 ± 3,0	3,0 ± 0,2	0,030 ± 0,004	147 ± 27	0,7 ± 0,1	0,005 ± 0,001
estearato	57 ± 4,0	0,3 ± 0,01	0,006 ± 0,001	NH **	NH **	NH **

* Estas medidas são médias e desvios de duas medidas independentes em diferentes reunidos ativos com atividade para lipase de *Aedes aegypti* larva e *Aedes aegypti* adulto.
** Não foi observada hidrólise pela atividade de lipase quando estearato foi utilizado como substrato.

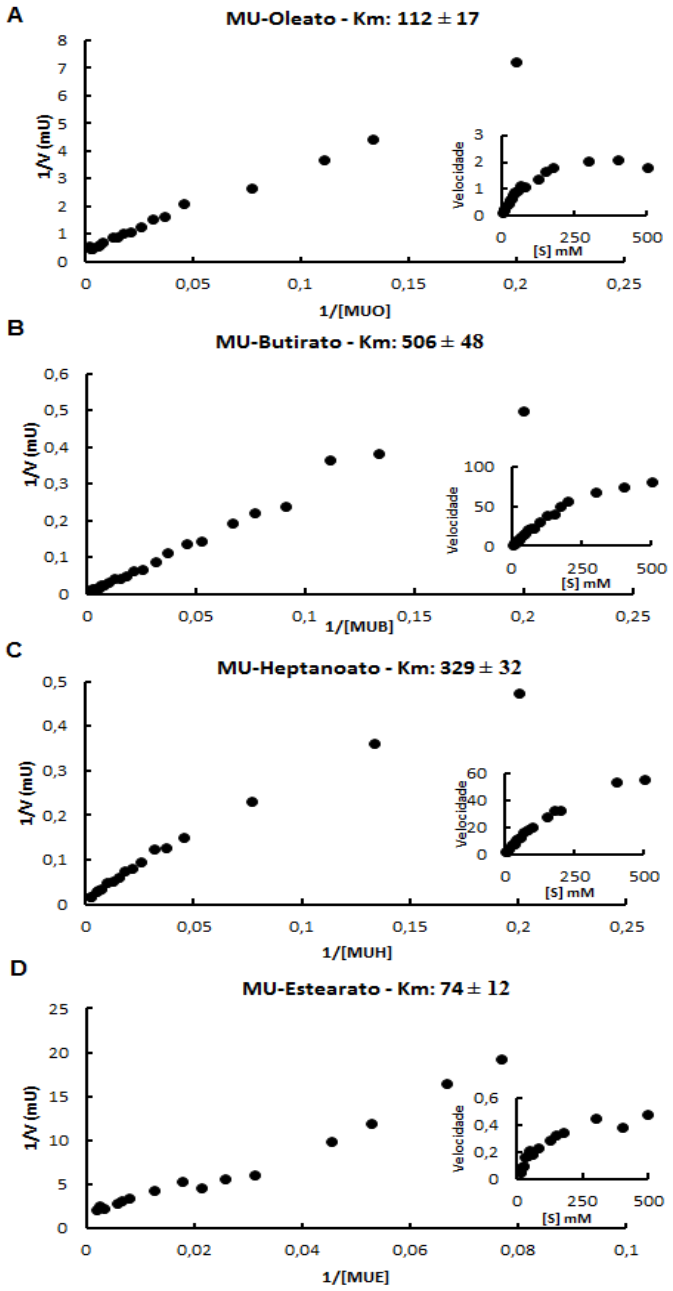


Figura 24 - Efeito da concentração de diferentes substratos sobre a atividade de lipase digestiva de *Aedes aegypti* larva. (A) oleato, (B) butirato, heptanoato e estearato. A fonte de enzima utilizada para estes experimentos foram reunidos ativos sobre oleato como substrato provenientes da eluição de cromatografias de troca aniônica realizados a partir de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* larva. As figuras são plotes de Lineweaver-Burk a partir dos dados obtidos. Os gráficos inseridos são as curvas de Michaelis-Menten.

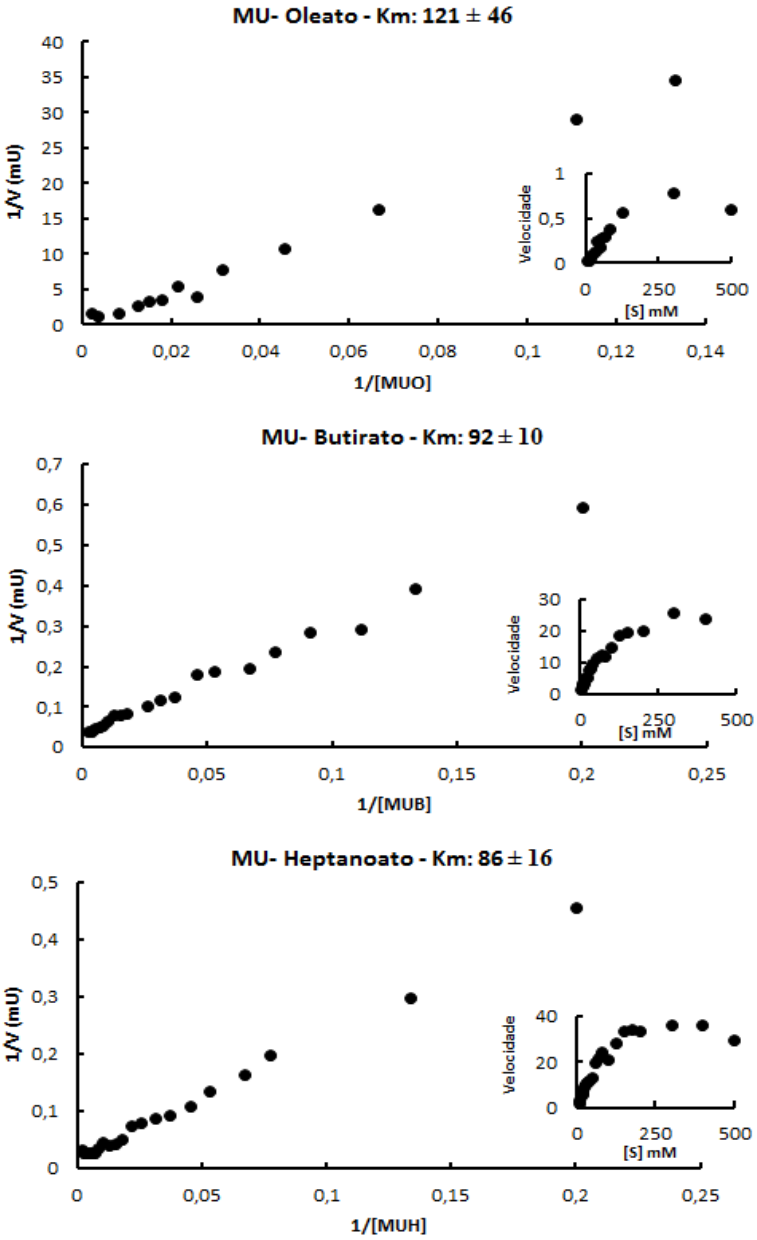


Figura 25 - Efeito da concentração de diferentes substratos sobre a atividade de lipase digestiva de *Aedes aegypti* adulto. (A) oleato, (B) butirato e heptanoato. A fonte de enzima utilizada para estes experimentos foram reunidos ativos sobre oleato como substrato provenientes da eluição de cromatografias de troca aniônica realizados a partir de homogeneizados de intestino médio de *Aedes aegypti* adulto. As figuras são plotes de Lineweaver-Burk a partir dos dados obtidos. Os gráficos inseridos são as curvas de Michaelis-Menten.

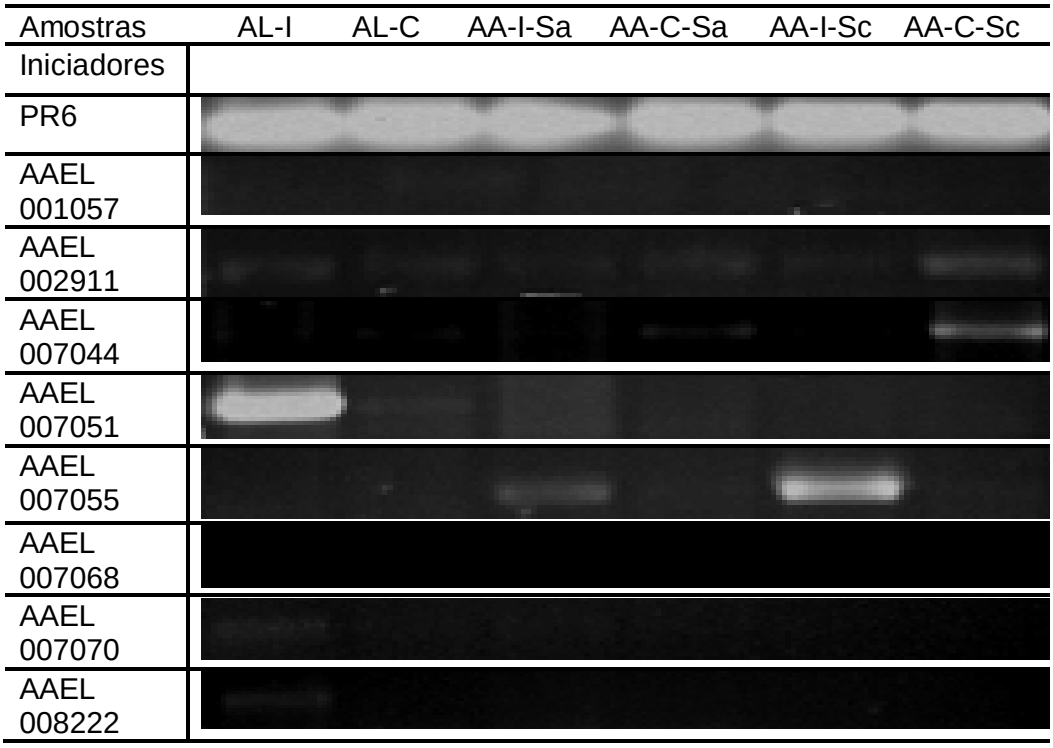


Figura 26 - Transcrição dos mRNAs correspondentes a sequências selecionadas (Tabela 3) em intestino médio de larvas L4 de *Aedes aegypti* (AL-I), em carcaça de larvas de *Aedes aegypti* (AL-C), em intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (AA-I-Sa), em carcaça de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sangue (AA-C-Sa), em intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose (AA-I-Sc) e em carcaça de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* alimentadas com sacarose (AA-C-Sc) mostradas através de RT-PCR semiquantitativo.

4.9 Modelos moleculares preditos para as lipases digestivas de *Aedes aegypti* e *Ixodes scapularis*

A modelagem molecular das lipases expressas e envolvidas no processo digestivo de lipídeos em *Aedes aegypti* permite observar possíveis predições de diferenças estruturais nestas moléculas. Como não foi feito um estudo semelhante para identificação da lipase digestiva em *Amblyomma cajennense* e não há genomas nem transcriptomas do intestino deste carrapato disponíveis, fizemos uma busca utilizando as sequências de *Aedes aegypti* amplificadas descritas no item anterior no genoma de *Ixodes scapularis* (LAWSON et al., 2009; ZEE et al., 2007). A sequência com maior identidade foi utilizada para os estudos de modelos.

As sequências de *Aedes aegypti* e *Amblyomma cajennense* apresentam regiões previamente conhecidas em outras lipases, como a região da alça β9 e da alça β5. Também foi possível evidenciar a ausência da região lid (tampa) bem como do domínio C-terminal, que é bem conhecido como um sítio de ligação a colipase. Os modelos moleculares das lipases de *Aedes aegypti* podem ser vistos na Figura 27 e o de *Ixodes scapularis* pode ser visto na Figura 28. A região da alça β9 e β5 em *Aedes aegypti* são menores do que as encontradas para lipase pancreática humana (LOWE, 2002), o que pode estar relacionado com a ausência da região lid (tampa) que na enzima humana se liga a alça β9 e β5 expondo dessa forma o sítio ativo da enzima. Para *Ixodes scapularis* pudemos observar que a região β9 tem aproximadamente o mesmo tamanho da encontrada na lipase pancreática humana, essa característica evidencia uma diferença importante entre as possíveis lipases digestivas dos vetores hematófagos em questão.

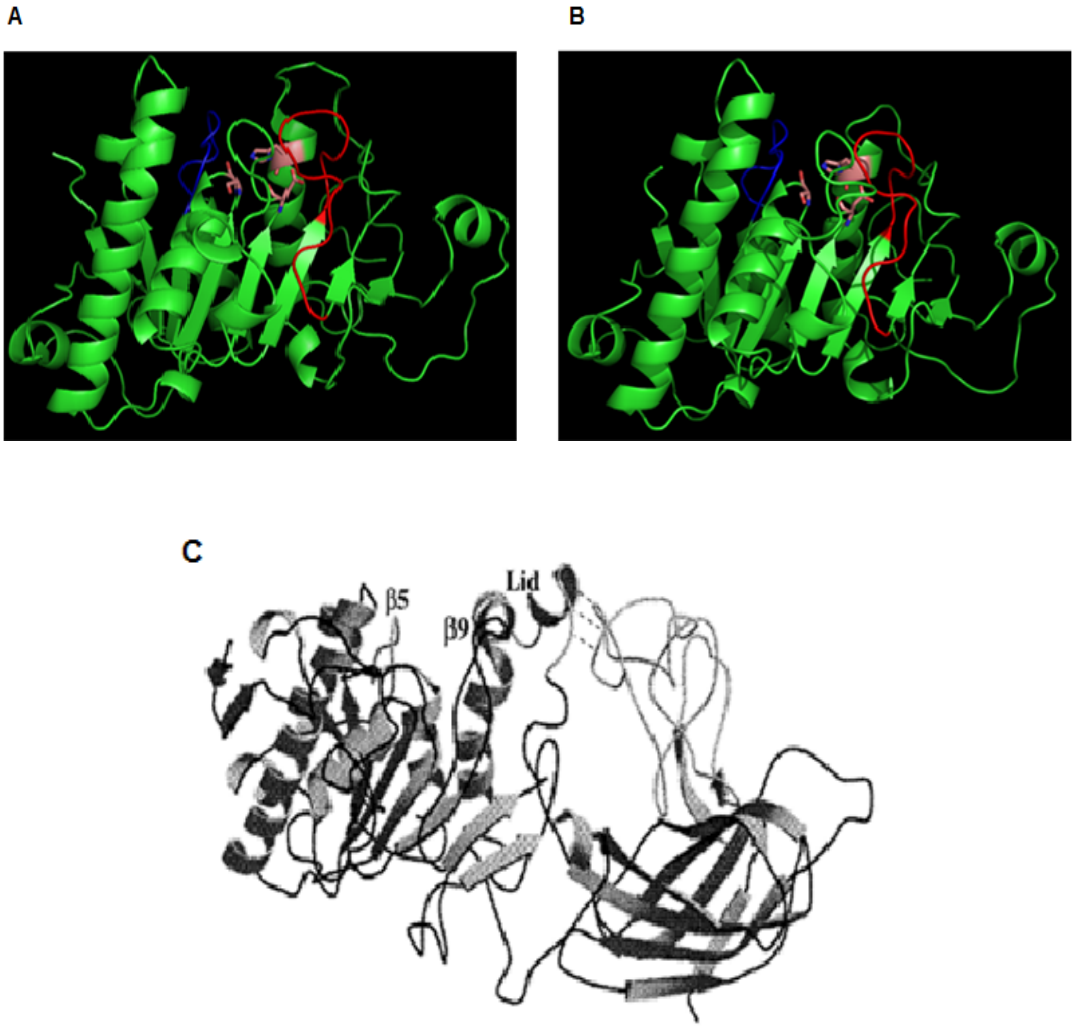


Figura 27 - Modelos moleculares das lipases digestivas de *Aedes aegypti*. Região destacada em vermelho: alça β9 e região destacada em azul região da alça β5. Modelo da lipase expressa na fêmea adulta (AAE 007055) (A) e durante a fase larval (AAE 007051) (B). Estrutura da lipase pancreática humana na sua forma aberta (CÀRRIERE et al., 1998) (C). Os modelos ressaltam a ausência da região lid (tampa) e do domínio C-terminal de ligação à colipase.

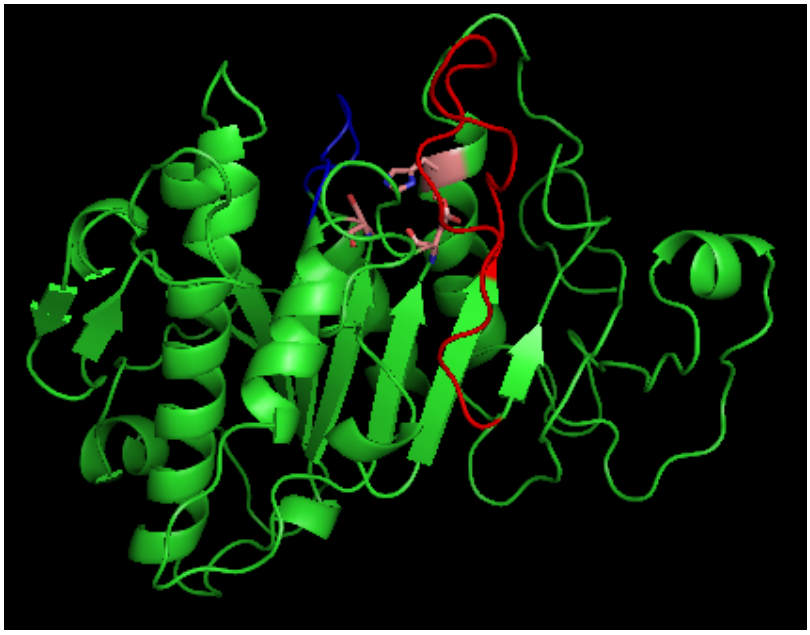


Figura 28 - Modelo molecular de uma sequência de lipases digestiva de *Ixodes scapularis*. O modelo ressalta a ausência da região lid (tampa) e do domínio C-terminal de ligação à colipase e índica as diferenças observadas entre a lipase de *Aedes aegypti* e de *Ixodes scapularis* por exemplo em relação à alça β9 que é maior e mais semelhante à esta mesma região da lipase pancreática humana.

5 DISCUSSÃO

5.1 A digestão de lipídeos em artrópodes vetores

Encontramos na literatura alguns trabalhos que demonstram a atividade de lipase digestiva em diversas espécies de artrópodes, mas o estudo das lipases digestivas é escasso quando comparado ao número de trabalhos que descrevem outras enzimas digestivas nestes animais. A atividade de lipase já foi detectada e isolada do intestino de *Periplaneta americana* e *Locusta migratoria* (MALE e STOREY, 1981), no intestino médio de *Bombyx mori* (PONNUVEL et al., 2003), no hepatopâncreas de *Scorpio maurus* (ZOUARI et al., 2005) e no hepatopâncreas de *Carcinus mediterraneus* (Crustacea) (CHERIF et al., 2007). A atividade em preparações brutas foi medida em algumas espécies como *Homarus americanus* (Crustacea) (BROCKERHOFF; HOYLE; HWANG, 1970), *Locusta migratoria* (WEINTRAUB e TIETZ, 1973), *Aedes aegypti* (GEERING e FREYVOGEL, 1975), *Periplaneta americana* (BOLLADE; PARIS; MOULINS, 1970; HOFFMAN e DOWNER, 1979), *Manduca sexta* (TSUSHIDA e WELLS, 1988), *Drosophila melanogaster* (Diptera) (SMITH et al., 1994), *Spilosoma obliqua* (ANWAR e SALEEMUDDIN, 1997), *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007), *Lymantria dispar* (Lepidoptera) (MRDAKOVIC et al., 2008), *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera) (CHRISTELLER et al., 2010), *Hermetia illucens* (Diptera) (KIM et al., 2011) e *Neohelice granulata* (Crustacea) (PINONI; IRIBARNE; LÓPEZ MAÑANES, 2011).

Existe uma ampla gama de substratos utilizados para a detecção da atividade de lipases descritas na literatura (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Os métodos utilizados para medir a atividade de lipase dos animais citados acima foram basicamente os métodos titrimétricos e radiométricos. Os ensaios radiométricos, apesar de serem bastante sensíveis, requerem o uso de substratos radiomarcados de preço elevado e que necessitam de estrutura adequada para sua manipulação enquanto os ensaios em sistema titrimétrico não apresentam alta sensibilidade (REYNOLDS et al., 1991). Devido à ampla gama de substratos e a utilização de diferentes técnicas não foi possível comparar as atividades encontradas no intestino dos animais estudados com as atividades encontradas para os animais descritos na literatura.

Uma boa alternativa aos ensaios tradicionais são os ensaios colorimétricos, por serem mais baratos que os radiométricos e mais sensíveis que os titrimétricos. Contudo, já é de conhecimento geral que os métodos colorimétricos apresentam algumas limitações como a ocorrência de hidrólise espontânea em pHs mais alcalinos. Utilizamos um substrato colorimétrico, DMPTB, para caracterização das lipases (CHOI; HWANG; KIM, 2003; KUROOKA; OKAMOTO; HASHIMOTO, 1977) (materiais e métodos, item 1.2.2.). Apesar de ser uma boa alternativa como um substrato semelhante a um triglicerídeo, esse ensaio não pode ser usado como substrato de rotina para as quantificações em amostras de insetos alimentados em sangue por sofrer alta interferência deste tipo de amostra. Devido às limitações encontradas na utilização do ensaio colorimétrico foi necessário procurar um método mais sensível para determinação de atividade de lipases dos animais hematófagos.

O uso de substratos lipídicos ligados a compostos fluorescentes fornecem um método mais sensível para detecção e quantificação da atividade da enzima em sistemas biológicos (HENDRICKSON, 1994). Dentre os substratos fluorescentes, os derivados de 4-metilumbeliferona se mostram úteis para determinação da atividade de lipase. Estes substratos são comercialmente disponíveis em uma ampla série de tamanhos de cadeias carbônicas o que permitiu o estudo da especificidade das lipases caracterizadas neste trabalho. A observação das limitações encontradas em outras técnicas e a necessidade de um substrato mais sensível para medir a atividade nos animais hematófagos estudados, levou a escolha dos substratos fluorescentes derivados de 4-metilumbeliferona.

Além da importância na digestão e obtenção de ácidos graxos essenciais as lipases podem ter também um papel de defesa. Ponnuvel et al. (2003) demonstraram que a lipase digestiva de *Bombyx mori* apresenta atividade antiviral sobre vírus do grupo nucleopolihedrovirus. O papel de defesa das lipases ainda deve ser explorado.

5.2 Especificidade das lipases de insetos e propriedades gerais

Há um consenso na literatura de que substratos sintéticos contendo ácidos graxos de cadeia longa seriam mais adequados para medidas de lipases. Essa preocupação se dá pela possibilidade de hidrólise destes substratos sintéticos em serem hidrolisados por esterases em preparações brutas e substratos de cadeia

carbônica mais curta seriam mais susceptíveis a hidrólise inespecífica (MILLER; FULCHER; ALTOSAAR, 1989; TIETZ et al., 1993).

As lipases de *Aedes aegypti* tanto da fase larval quanto de adultos em estudo neste trabalho apresentam uma maior atividade sobre os substratos de cadeia curta (Tabela 3). No entanto, a lipase de *Aedes aegypti* larva apresentou maior eficiência catalítica sobre butirato (4C) enquanto a lipase de *Aedes aegypti* adulto apresentou maior eficiência catalítica sobre heptanoato (7C) o que evidencia a expressão de lipases distintas nas duas fases de desenvolvimento do animal em análise. Foi interessante observar que resultados encontrados para as lipases presentes em outros artrópodes como o escorpião *Scorpio maurus* (ZOUARI et al., 2005), das mariposas *Lymantria dispar* (MRDAKOVIC et al., 2008) e *Epiphyas postvittana* (CHRISTELLER et al., 2010) mostraram um comportamento similar em relação a atividade sobre substratos de cadeia curta, o que pode indicar uma semelhança de comportamento das lipases de insetos. Foi observada atividade sobre os substratos de cadeia longa como oleato e estearato, no entanto esta atividade é bastante baixa principalmente sobre substratos contendo cadeia carbônica longa e saturada como é o caso do substrato estearato (18 C). Encontramos melhores medidas com o substrato oleato que também possui 18 carbonos com uma insaturação no carbono nove.

A comparação dos valores de Km, Vmáx e da relação Vmáx/Km obtidos para os diferentes substratos utilizando amostras de lipase parcialmente purificadas de *Aedes aegypti* larva e adultos ainda indicam outras diferenças entre as lipases dos diferentes estágios de desenvolvimento deste mosquito. A lipase de larvas apresenta maior afinidade por substratos de cadeia carbônica longa. Entretanto, há uma redução das velocidades máximas com o aumento da cadeia carbônica do substrato, resultando em uma maior eficiência catalítica sobre substratos de cadeias curtas.

No entanto, esta mesma análise quando realizada com os dados obtidos para a lipase de *Aedes aegypti* adulto revela que não há uma variação tão grande entre os valores de Km sendo que esta enzima apresenta uma maior afinidade por heptanoato. No entanto, o padrão observado para a velocidade máxima segue uma tendência semelhante a observada para a lipase de *Aedes aegypti* larva com um aumento da velocidade sobre substratos contendo cadeias carbônicas menores. No entanto, a lipase da forma adulta apresenta uma maior eficiência catalítica sobre

heptanoato. A comparação dos dados cinéticos obtidos evidencia com clareza que as lipases expressas nas duas fases de desenvolvimento do mosquito são distintas. Estas diferenças de expressão podem estar relacionadas aos hábitos alimentares distintos nas duas fases de desenvolvimento. Esta distinção pode ter sido uma das vantagens evolutivas de muitos grupos de insetos, evitando a competição por alimento em suas fases de desenvolvimento.

O efeito de íons metálicos como ativadores de lipase já foi demonstrado para a lipase pancreática humana (ZANGENBERG et al., 2001). Este efeito também já foi observado para algumas lipases de artrópodes como é o caso das lipases presentes no intestino médio do triatomíneo *Rhodnius prolixus* (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007) e do escorpião *Scorpio maurus* (ZOUARI et al., 2007).

A lipase de *Aedes aegypti* larva aparentemente não é ativada pela presença de Ca^{+2} assim como a lipase digestiva presente no intestino médio da mariposa *Lymantria dispar* (MRDAKOVIC et al., 2008). Já as lipases de *Aedes aegypti* adulto e *Amblyomma cajennense* apresentam ativação. Assim como a lipase de *Rhodnius prolixus,* as lipases destes vetores hematófagos parecem não ser dependentes de cálcio, mas sim apresentam um aumento de atividade na presença deste íon. Já a lipase digestiva de *Scorpio maurus* parece ser dependente desse íon tendo sua atividade bastante reduzida na presença de um quelante como EDTA, sendo reativada em altas concentrações de cálcio (7 mM) (ZOUARI et al., 2007). Mais uma vez os dados de ativação na presença de cálcio evidenciam diferenças entre as lipases envolvidas no processo digestivo em larvas de *Aedes aegypti* e em fêmeas adultas deste inseto.

Os valores de pH ótimo encontrados para as lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto e de *Amblyomma cajennense* (todas na faixa entre 8,5 e 9,0) mostraram semelhança com os valores de pH ótimo da lipase pancreática humana na família das lipases neutras (MILED et al., 2003), que possuem um pH ótimo pH 7,0 ao 10,0.

Estes valores de pH ótimo estão de acordo com os valores de pH ótimo verificados para as lipases de *Lymantria dispar* (8,2) (MRDAKOVIC et al., 2008), *Scorpio maurus* (9,0) (ZOUARI et al., 2007) e *Rhodnius prolixus* (7,0-7,5) (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). No entanto, Christeller e colaboradores (2011) mostraram que os pH ótimos de lipases de 6 diferentes espécies de Lepidoptera estão em uma faixa entre 9,2 e 10,5. Entretanto, este grupo de insetos apresenta

pHs ótimos mais alcalinos para muitas de suas enzimas digestivas (TERRA e FERREIRA, 1994) como uma adaptação à digestão de folhas.

Ainda em relação ao efeito de pH foi observada uma ampla faixa de estabilidade ao pH encontrada para a atividade da lipase de *Aedes aegypti* larva (6,0 a 12) e adulto (3,0 a 10) e de *Amblyomma cajennense* (3,0 a 10,0). Estas amplas faixas de estabilidade ao pH já haviam sido observadas para outras lipases de artrópodes tanto dentre os insetos quanto dentre os aracnídeos (FILIETAZ e LOPES, 2010). As lipases de insetos mais basais aparentemente são resistentes à condições mais ácidas enquanto as lipases de insetos mais derivados, como é o caso das lipases descritas de espécies de Lepidoptera as quais apresentam baixa estabilidade em pHs inferiores a 5,0. No entanto, as lipases de *Aedes aegypti* apresentaram comportamentos evidentemente distintos quanto a estabilidade ao pH. A lipase da fase larval apresentou um comportamento semelhante às lipases de Lepidoptera enquanto a lipase da fase adulta apresenta maior estabilidade em meio ácido como os insetos mais basais. Este fato esta, provavelmente, relacionado aos pHs luminais das diferentes porções do intestino médio de larvas e adultos deste mosquito. O intestino médio das larvas é extremamente alcalino (cecos 8,8; ventrículo anterior 9,0; ventrículo médio 10 e ventrículo posterior 8,0); muito semelhante às condições encontradas no intestino de Lepidoptera (TERRA e FERREIRA, 1994) enquanto o intestino de adulto apresenta condições mais ácidas (BILLKER; MILLER; SINDEN, 2000).

Além de possuírem amplas faixas de estabilidade ao pH, as lipases digestivas dos animais em estudo se mostraram resistentes a altas temperaturas. A lipase de *Lymantria dispar* apresenta 50% de sua atividade máxima após pré-incubação a 42 ˚C por 1 hora (MRDAKOVIC et al., 2008) enquanto as lipases de *Aedes aegypti* larva ($t_{1/2}$ a 60 ˚C= 42 minutos); *Aedes adulto* ($t_{1/2}$ a 55 ˚C= 46 minutos) e *Amblyomma cajennense* ($t_{1/2}$ 55 ˚C= 25 minutos).

As lipases expressas no intestino dos animais em suas duas fases de desenvolvimento se mostraram distintas em suas características em praticamente todos os testes bioquímicos realizados, indicando que as enzimas de *Aedes aegypti* também fazem parte de uma família multigênica e que a expressão das enzimas estaria relacionada ao tipo de substrato lipídico ingerido. Outra possível evidencia de alteração de dieta e alteração de expressão é a ausência de expressão nas larvas

em estudo de uma lipase já descrita como um transcrito presente no intestino médio de larvas de *Aedes aegypti* (BQ790381; AAEL 007044).

5.3 A expressão diferencial das lipases digestivas

A lipases digestivas dos animais estudados se mostraram estruturalmente parecidas com a família das lipases neutras e, desta forma, foram modeladas usando uma lipase desta família (1HPL) como modelo. As lipases presentes em artrópodes apresentam características em comum quando comparadas estruturalmente. As características mais marcantes no grupo são a ausência do domínio C-terminal de ligação a colipase, a ausência do domínio lid (tampa) e a alteração das alças β9 e β5. Estas estruturas estão diretamente relacionadas com a eficiência catalítica da lipase de mamíferos e a ausência destas regiões evidenciam que essas lipases não sofrem regulação mediada por colipase e que o sítio ativo da enzima está sempre aberto permitindo a ligação constante com o substrato. Estas diferenças que já haviam sido descritas para alguns insetos foram confirmadas também para as lipases digestivas de *Aedes aegypti*. As sequencias amplificadas de *Aedes aegypti* foram utilizadas para buscas utilizando o blast no genoma de *Ixodes scapularis*. Ao todo no genoma de *Ixodes scapularis* foram encontradas 30 sequências de lipase. Este número é semelhante aos valores verificados para *Apis mellifera* e para *Bombyx mori* que apresentam 26 e 29 sequencias de lipase respectivamente em seus genomas. Alguns autores tem correlacionado este número ao tipo da dieta e à quantidade de lipídeos nestas (HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009). As sequências do genoma de *Ixodes scapularis* foram analisadas e uma sequência foi selecionada para modelagem. A análise por alinhamento e do modelo desta sequencia demonstrou que a lipase de *Ixodes scapularis* não apresenta o domínio C-terminal de ligação à colipase, não apresenta a região “lid”, mas apresenta a alça β9 completa em estrutura semelhante as lipases neutras de mamífero na sua forma aberta.

Todas as lipases neutras de mamíferos com atividade hidrolítica significativa sobre triacilglicerois apresentam tanto a região “lid” quanto a alça β9 (AOKI et al.,2007; WINKLER; D’ARCY; HUNZIKER,1990). Na lipase pancreática humana a região da alça β9 está entre os resíduos 204 e 224 e a região “lid” é demarcada entre os resíduos de Cys 238 e a Cys 262 (LOWE, 2002). Entretanto, não é

conhecido qual o tamanho mínimo que a alça β9 e a região “lid” devem ter para possibilitar a hidrólise de TAG. Contudo, lipases humanas que apresentam alterações nestas estruturas são menos ativas ou não são capazes de hidrolisar TAG (AOKI et al., 2007; HIRATA et al., 1999). Horne e colaboradores verificaram que as principais sequencias de lipase no insetos pertencem as famílias de lipase neutra e ácidas. As lipases de insetos pertencentes à família das lipases ácidas contêm tanto a região “lid” quanto a alça β9. Estudos de modelagem de lipases ácidas de *Drosophila melanogaster* apresentam estrutura semelhante às lipases ácidas de mamíferos (MUELLER et al., 2004).

Desta forma, estes autores postulam que a digestão de TAG seria catalisada pelas lipases ácidas e não pelas lipases neutras que poderiam estar envolvidas na digestão de outras moléculas como galactolipídeos (HORNE; HARITOS; OAKESHOTT, 2009).

Entretanto, diferenças de afinidade de interação com substrato são observadas mesmo em enzimas que apresentam ausência da região “lid” e alterações na alça β9 como é o caso das lipases de *Aedes aegypti* larva e adulto. Estudos mais específicos combinados as informações obtidas pelas sequencias, pelas modelagens e por dados cinéticos serão necessários. As lipases identificadas de *Aedes aegypti* larva e adulto neste trabalho, serão expressas para prosseguimento destes estudos.

6 CONCLUSÕES

A atividade de lipases digestivas foi identificada e medida em dois animais vetores modelos: o mosquito *Aedes aegypti* (fase larval e adulta) e o carrapato *Amblyomma cajennense*.

A caracterização destas enzimas quanto à especificidade de hidrólise de diferentes substratos, massa molecular, pH ótimo, estabilidade térmica e ao pH e separação por diferentes técnicas cromatográficas demonstrou que as lipases presentes nas diferentes fases de desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* são enzimas distintas; produtos de genes específicos que fazem parte de uma família multigênica de lipases digestivas, cuja expressão é provavelmente controlada por componentes da dieta como já demonstrado para lipases digestivas de outros insetos. A expressão de diferentes genes pode estar também relacionada às diferentes condições do microambiente formado no lúmen do intestino médio nas duas fases de desenvolvimento: extremamente alcalino na fase larval e mais próximo da neutralidade na fase adulta. Já as enzimas dos dois hematófagos em estudo se mostraram bastante distintas. No entanto, o isolamento destas enzimas está sendo provavelmente afetado pela presença de enzimas proteolíticas tanto do tipo tripsinas e quimotripsinas (presentes tanto na fase larval quanto adulta de *Aedes aegypti*) como por enzimas do tipo catepsina L presentes no intestino de carrapatos como é o caso de *Amblyomma cajennense*.

REFERÊNCIAS[1]

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stabilityand potential as detergent additives. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 43-46, 1997.

ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 7-17, 2001.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201, 2006.

AOKI, J.; INOUE, A.; MAKIDE, K.; SAIKI, N.; ARAI, H. Structure and function of extracellular phospholipase A_1 belonging to the pancreatic lipasegene family. **Biochimie**, v. 89, p. 197-204, 2007.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207-225, 2010.

BOLLADE, D.; PARIS, R.; MOULINS, M. Origine et mode d´action de la lipase intestinale chez les blattes. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, p. 45-53, 1970.

BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R. J.; HWANG, P. C. Digestive enzymes of the American Lobster (*Homarus americanus*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, p. 1357–1370, 1970.

BOURNE, Y.; MARTINEZ, C.; KERFELEC, B.; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CAMBILLAU, C. Horse pancreatic lipase. The crystal structure refined at 2.3 A resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, p. 709, 1994.

BILLKER, O.; MILLER, A. J.; SINDEN, R. E. Determination of mosquito bloodmeal pH *in situ* by íon-selective microlectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. **Parasitology**, v.120, p. 547-551, 2000.

BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. Morphological evidence for proliferative regeneration of the *Anopheles stephensi* midgut epithelium following *Plasmodium falsiparum* ookinete invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 244-254, 2007.

BRYANT, J. E.; HOLMES, E. C.; BARRETT, A. D. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. **PLoS Pathogens**, v. 3, p. 0668-0673, 2007.

---

[1] De acordo com.
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs> Acesso em: 07 maio 2011.

COONS, L. B.; ALBERTI, G. Acari: Ticks. In: HARRISON, F. W.; FOELIX, R. F. **Microscopic anatomy of invertebrates:** Chelicerate arthropoda. New Jersey: J.Wiley & Sons, 1999. v. 8, pt. B. p. 373-398.

CARRIÈRE, F.; RENOU, C.; LOPEZ, V.; DE CARO, J.; FERRATO, F.; LENGSFELD, H.; DE CARO, A.; LAUGIER, R.; VARGER, R. The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. **Gastroenterology**, v. 119, p. 949-960, 2000.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 23-46, 2001.

CHOI, S-J.; HWANG, J. M.; KIM, S. A. Colorimetric Microplate Assay Method for High Throughput Analysis of Lipase Activity**. Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 417-420, 2003

CANAVOSO, L. E.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 845-854, 2004.

CLARK, T. M.; HUTCHINSON, M. J.; HUEGEL, K. L.; MOFFETT, S. B.; MOFFETT, D. F. Additional morphological and physiological heterogeneity within the midgut of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) revealed by histology, electrophysiology, and effects of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Tissue and Cell**, v. 37, p. 457-468, 2005.

CHERIF, S.; FENDRI, A.; MILED, N.; TRABELSI, H.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Crab digestive lipase acting at high temperature: Purification and biochemical characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 1012-1018, 2007.

CHEMICAL BOOK. 4-Methylumbeliferil oleate, butirate, heptanoate and stearate. 2008. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=4-Methylumbelliferyl%20oleate> Acesso em: 13 Oct 2011.

CAPERUCCI, D.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I. C. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. **Micron**, v. 41, p. 710-721, 2010.

CHRISTELLER, J. T.; POULTON, J.; MARKWICK, N. M.; SIMPSON, R. M. The effect of diet on the expression of lipase genes in the midgut of the lightbrown apple moth (*Epiphyas postvittana* Walker; Tortricidae). **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 9-25, 2010.

DEREWENDA, Z. S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 1-52, 1994.

DE FREITAS, M. T. *Aedes aegypti*. 2009. Disponível em: <http://www.djibnet.com/photo/mosquito/aedes-aegypti-3707897327.html> Acesso em: 20 de Set 2011.

DEL FIOL, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 461-466, 2010.

FORATTINI, O. P. *Aedes* (*Stegomyia*). In:_____. **Culicidologia médica**. São Paulo: Edusp, 2002. v. 2. p. 462-463,

FILIETAZ, C. F. T.; LOPES, A. R. Caracterização de lipases em Arthropoda. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 2, p. 23-36, 2010.

GEERING, K.; FREYVOGEL, T. A. Lipase activity and stimulation mechanism of esterase en midgut of female *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, p. 1251-1256, 1975.

GRAF, R.; BRIEGEL, H. Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L.). **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 611–618, 1985.

GRAF, R.; BRIEGEL, H. The synthetic pathway of trypsin in the mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) and *in vitro* stimulation in isolated midguts. **Insect Biochemistry**, v. 19, p. 129-137, 1989.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. New York: Cambridge University Press; 2005. p. 3; 5, Diversity and Evolution.

GORDON, K. H.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature biotechnology**, v. 25, p. 1231-1232, 2007.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 579–588, 2007

GUSMÃO, D. S.; SANTOS, A. V.; MARINI, D. C.; RUSSO, E. S.; PEIXOTO, A. M. D.; JÚNIOR, M. B.; BERBET-MOLINA, M. A.; LEMOS, F. J. A. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culidae): new perspectives for insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 919–924, 2007.

GENESIO, J. Cancer Research. 2009. Disponível em: <https://naturalunseenhazards.wordpress.com/tag/cancer-research/> Acesso em: 20 Sep 2011.

GU, J.; LIU, M.; DENG, Y.; PENG, H.; CHEN, X. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its

preliminary application in mosquito control. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21329, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0021329

HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. **Lipids**, v. 14, p. 893-899, 1979.

HENDRICKSON, H. S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. **Analytical Biochemistry**, v. 219, p. 1-8, 1994.

HIRATA, K.; DICHEK, H. L.; CIOFFI, J. A.; CHOI, S. Y.; LEEPER, N. J.; QUINTANA, L.; KRONMAL, G. S.; COOPER, A. D.; QUERTERMOUS, T. Cloning of a Unique Lipase from Endothelial Cells Extends the Lipase Gene Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 14170-14175, 1999.

HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 1, p. 209-235, 2000.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Jounal of Medical Entomology**, v. 38, p. 411–422, 2001.

HAHN, D. A.; DENLINGER, D. L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 760-773, 2007.

HAQ, S. K.; ATIF S. M.; KHAN R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HORNE, I.; HARITOS, V. S.; OAKESHOTT, J. G. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 39, p. 547-567, 2009.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 593-608, 2010.

JACKS, T. J.; KIRCHER, H. W. Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone. **Insect Biochemistry**, v. 21, p. 279-285, 1967.

JORNAL do Pontal. Com o período de chuvas, a Secretaria Municipal de Saúde vem se preocupando com os casos de Dengue. 2009. Disponível em: <http://www.jornaldopontal.com.br/index.php?ac=news&id=1963> Acesso em: 20 set. 2011.

KUROOKA, S.; OKAMOTO, S.; HASHIMOTO, M. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. **Journal of Biochemistry**, v. 81, p. 361-369, 1977.

KIMURA, H.; FUTAME, Y.; TARUI, S.; SHINOMIYA, T. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bili salts. **Journal of Biochemistry**, v. 92, p. 243-251, 1982.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D387-D392, 2009.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual Review of microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.

KIM, W.; BAE, S.; PARK, K.; LEE, S.; CHOI, Y.; HAN, S.; KOH, Y. Biochemical characterization of digestive enzymes in the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 11-14, 2011.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, p. 65-77, 2002.

LOWE, M. E. The triglyceride lipases of the pancreas. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 2007-2016, 2002.

LOUNIBOS, L. P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 233-266, 2002.

LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 170-178, 2003.

LAWSON, D.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P.; BESANSKY, N. J.; BRUGGNER, R. V.; BUTLER, R.; CAMPBELL, K. S.; CHRISTOPHIDES, G. K.; CHRISTLEY, S.; DIALYNAS, E.; HAMMOND, M.; HILL, C.; KONOPINSKI, N.; LOBO, N. F.; MACCALLUM, R. M.; MADEY, G.; MEGY, K.; MEYER, J.; REDMOND, S.; SEVERSON, D. W.; STINSON, E. O.; TOPALIS, P.; BIRNEY, E.; GELBART, W. M.; KAFATOS, F. C.; LOUIS, C.; COLLINS, F. F. VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D583-D587, 2009.

MALE, K. B.; STOREY, K. B. Triglyceride, diglyceride and monoglyceride lipases in *Periplaneta Americana*, *Locusta migratoria* and *Polia adjunct*. **Insect Biochemistry**, v. 11, p. 423-427, 1981.

MONATH, T. P. Yellow Fever. In:_____ **The Arboviruses:** epidemiology and ecology. Florida: CRC Press; 1989. v. 5. p. 139–231.

MICKEL, F. S.; WEIDENBACH, F.; SWAROVSKY, B.; LAFORGE, K. S.; SCHEELE, G. A. Structure of the canine pancreatic lipase gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 12895-12901, 1989.

MILLER, S. S.; FULCHER, R. G.; ALTOSAAR, I. Evaluation of 4-Methylumbelliferyl heptanoate as a substrate for oat lipase. **Journal of Cereal Science**, v. 10, p. 61-68, 1989.

MILED, N.; CANAAN, S.; DUPUIS, L.; ROUSSEL, A.; RIVIÈRE, M.; CARRIÈRE, F.; CARO, A.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. **Biochimie**, v. 82, p. 973-986, 2000.

MEHLHORN, H. **Encyclopedic reference of parasitology**. 2nd ed. Berlin: Springer: Verlag Heidelberg, 2001.

MILED, N.; BUSSETTA, C.; DE CARO, A.; RIVIÈRE, M.; BERTI, L.; CANAAN, S. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases. **Comparative Biochemistry Pysiology - Part B**, v. 136, p. 131-138, 2003.

MUELLER, J. L.; RIPOLL, D. R.; AQUADRO, C. F.; WOLFNER, M. F. Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 13542-13547, 2004.

MUTEBI, J. P.; GIANELLA, A.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; TESH, R. B.; BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever virus infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1657-1660, 2004.

MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 430-448, 2005.

MRDAKOVIC, M.; LAZAREVIC, J.; PERIC-MATARUGA, V.; IJIN, L.; VLAHOVIC, M. Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar L.*) larval midgut. **Folia Biologica (Krakow)**, v. 56, p. 103-110, 2008.

NENE, V.; WORTMAN, J. R.; LAWSON, D.; HAAS, B.; KODIRA, C.; TU, Z.; LOFTUS, B.; XI, Z.; MEGY, K.; GRABHERR, M.; REN, Q.; ZDOBNOV, E. M.; LOBO, N. F.; CAMPBELL, K. S.; BROWN, S. E.; BONALDO, M. F.; ZHU, J.; SINKINS, S. P.; HOGENKAMP, D. G.; AMEDEO, A.; ARENSBURGER, P.; ATKINSON, P. W.; BIDWELL, S.; BIEDLER, J.; BIRNEY, E.; BRUGGNER, R. V.; COSTAS, J.; COY, M. R.; CRABTREE, J.; CRAWFORD, M.; DEBRUYN, B.; DECAPRIO, D.; EIGLMEIER, K.; EISENSTADT, E.; EL-DORRY, H.; GELBART, W. M.; GOMES, S. L.; HAMMOND, M.; HANNICK, L. I.; HOGAN, J. R.; HOLMES, M. H.; JAFFE, D.; JOHNSTON, J. S.; KENNEDY, R. C.; KOO, H.; KRAVITZ, S.; KRIVENTSEVA, E. V.; KULP, D.; LABUTTI, K.; LEE, E.; LI, S.; LOVIN, D. D.; MAO, C.; MAUCELI, E.; MENCK, C. F. M.; MILLER, J. R.; MONTGOMERY, P.; MORI, A.; NASCIMENTO, A. L.; NAVEIRA, H. F.; NUSBAUM, C.; O'LEARY, S.; ORVIS, J.; PERTEA, M.; QUESNEVILLE, H.; REIDENBACH, K. R.; ROGERS, Y.; ROTH, C. W.; SCHNEIDER, J. R.; SCHATZ, M.; SHUMWAY, M.; STANKE, M.; STINSON, E. O.; TUBIO, J. M. C.; VANZEE, J. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; WERNER, D.; WHITE,

O.; WYDER, S.; ZENG, Q.; ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; HILL, C. A.; RAIKHEL, A. S.; SOARES, M. B.; KNUDSON, D. L.; LEE, N. H.; GALAGAN, I. J.; SALZBERG, S. L.; PAULSEN, I. T.; DIMOPOULOS, G.; COLLINS, F. H.; BIRREN, B.; FRASER-LIGGETT, C. M.; SEVERSON, D. W. Genome sequence of *Aedes aegypti* a major arbovirus vector, **Science**, v. 316, p. 1718-1722, 2007.

PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail. **Nature Biotechnology**, v. 13, p. 658-660, 1995.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 897-928, 2001.

PONNUVEL, K. M.; NAKAZAWA, H.; FURUKAWA, S.; ASAOKA, A.; ISHIBASHI, J.; TANAKA, H.; YAMAKAWA, M. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10725-10729, 2003.

PINONI, S. A.; IRIBARNE, O.; LÓPEZ MAÑANES, A. A. Between-habitat comparison of digestive enzymes activities and energy reserves in the SW Atlantic euryhaline burrowing crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 158, p. 552-559, 2011.

POLICLÍNICA VATERINÁRIA DE COTIA. Febre Maculosa, Cuidado com o carrapato. Disponível em: <http://www.policlinicaveterinaria.com.br/artigos.asp?xcod=33> Acesso em: 20 set 2011.

RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; LEWENGRUB, S.; PIESMAN, J.; KARAKASHIAN, S. Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. **Cell and Tissue Research**, v. 221, p. 471– 481, 1982.

REYNOLDS, L. R.; WASHBURN, W. N.; DEEMS, R. A.; DENNIS, E. A. Assay strategies and methods for phospholipases. **Methods in Enzymology**, v. 197, p. 3-23, 1991.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of insects**. 2nd ed. Burlington: Academic Press, 2009.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2773-2786, 2010.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; CORDEIRO, M. T.; BRAGA, C.; DE SOUZA, W. V.; MARQUES, E. T.; CUMMINGS, D. A. T. From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of dengue epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. e935, 2011. doi:10.1371/journal.pntd.0000935.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D.

C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

SMITH, G. M.; ROTHWELL, K.; WOOD, S. L.; YEAMAN, S. J.; BOWNES, M. Specificity and localization of lipolytic activity in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Journal**, v. 304, p. 775-779, 1994.

SALVESEN, G. S.; NAGASE, H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes:** a practical approach. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2001. p. 105-128.

SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**, v. 49, p. 597-600, 2007.

SPERANÇA, M. A.; CAPURRO, M. L. Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 425-433, 2007.

STEINERT, S.; LEVASHINA, E. A. Intracellular immune dipteran insects. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 129-140, 2011.

TSUSHIDA, K.; WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipids to the fat body. **Insect Biochemistry**, v. 18, p. 263-268, 1988.

TIETZ, N. W.; SHUEY, D. F. Lipase in serum – the elusive enzyme – an overview. **Clinical Chemistry**, v. 39, p.746-756, 1993.

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

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. Comprehensive molecular insect science, **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.4, p.171-224, 2005.

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 48, p. 40074-40083, 2005.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. D. C. N.; BARRETO, F.; BARRETO, M. L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.

WEINTRAUB, H.; TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 306, p. 31-41, 1973.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p. 328-345, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases-dengue and dengue haemorrhagic fever. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/CSR_ISR_2000_1/en/>. Acesso em: 05 May 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and dengue hemorrhagic fever. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html> Acesso em: 18 Ago 2011.

WIKIPEDIA. *Aedes aegypti* larva. 2008. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aedes_aegypti_larva.jpg> Acesso em: 20 Sep 2011.

ZANGENBERG, N. H.; MULLERTZ, A.; KRISTENSEN, H. G.; HOVGAARD, L. A dynamics *in vitro* lipolysis model II: Evaluation of the model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 237-244, 2001.

ZOUARI, N.; MILED, N.; ROUIS, S.; GARGOURI, Y. Scorpion digestive lipase: A member of a new invertebrate's lipase group presenting novel characteristics. The scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 67–74, 2005.

ZOUARI, N.; MILED, N.; CHERIF, S.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: **Biochimie**, v. 89, p. 403-409, 2007.

ZEE, J. P. V.; GERACI, N. S.; GUERRERO, F. D.; WIKEL, S. K.; STUART, J. J.; NENE, V. M.; HILL, C. A. Tick genomics: The *Ixodes* genome project and beyond. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1297–1305, 2007.

Rev. Pesq. Inov. Farm., v.2, n.1, pp. 23-36, jan-jul, 2010

Caracterização de Lipases em Arthropoda

[1]Carlos Felipe Tasso Filietaz, [2]Adriana Rios Lopes
1- Curso de Biomedicina da Uniban Brasil , Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan; bolsista programa PIBIC-CNPQ, 2- Instituto Butantan.
e-mail: bogus_eu@yahoo.com.br

RESUMO

Lipases são carboxil-esterases (EC 3.1.1.3) importantes para a digestão de triacilgliceróis pouco caracterizadas em Arthropoda. A quantificação da atividade de lipase foi realizada utilizando amostras de intestino ou hepatopâncreas de 10 diferentes espécies de Arthropoda. Dentre as espécies estudadas foram escolhidas as lipases de *Tityus serrulatus*, *Nephilengys cruentata, Periplaneta americana, Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* para caracterização mais detalhada. A caracterização das propriedades bioquímicas das lipases destes animais foi feita através de experimentos de pH ótimo, estabilidade ao pH, determinação das massas moleculares, efeito da concentração de substrato, determinação de especificidade com a utilização de diferentes substratos, efeito da presença de cloreto de cálcio, determinação do ponto isoelétrico, inativação térmica e separações cromatográficas. De uma maneira geral, as lipases de Arthropoda são ativas em uma faixa de pH alcalino (7,0 – 9,0), têm massa molecular da ordem de 50 kDa, têm pI da ordem de 6,0, são estáveis em ampla faixa de pH. Foi possível evidenciar que estas enzimas apresentam especificidades distintas nos diferentes animais estudados. *Tityus serrulatus* foi escolhido como modelo para isolamento das lipases digestivas. Para a purificação das lipases digestivas do hepatopâncreas de *Tityus serrulatus* foram utilizados dois passos. Uma cromatografia de troca catiônica (Hitrap S), no qual são separadas duas atividades de lipase denominadas Lip1 e Lip2, sendo Lip2 a atividade majoritária. As frações correspondentes a Lip2 foram aplicadas em uma coluna de troca aniônica (Resource Q). As frações ativas foram submetidas a eletroforese demonstrando o enriquecimento de uma proteína.

Palavras-chave: Lipase. Arthropoda. Digestão.

INTRODUÇÃO

Os artrópodes constituem a forma de vida mais numerosa do planeta, com aproximadamente um milhão de espécies, (80% do número total de espécies). Sua grande diversidade permitiu a ocupação de diversos ambientes. Existem 70.000 espécies de aracnídeos (quelicerados) descritas e um milhão estimadas. Este táxon inclui animais bem conhecidos como aranhas, escorpiões, ácaros, carrapatos. Dentre os Arachnida as ordens Araneae e Scorpione são principalmente carnívoras sendo os insetos as principais presas destes animais. O corpo gorduroso constituí porção importante da massa corpórea dos insetos e é principalmente constituído de triacilgliceróis (Chapman, 1998). Portanto, aracnídeos predadores devem apresentar alta atividade de lipase para degradação deste tecido.

Lipases são carboxil-esterases (EC 3.1.1.3) importantes na digestão de triacilgliceróis, resultando na liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Essa enzima opera na superfície de emulsões de substratos lipídicos. Apesar de sua grande importância na digestão de lipídeos, a lipase foi pouco estudada em artrópodes.

Recentemente foi purificada uma lipase com atividade antiviral a partir do suco digestivo de *Bombyx mori* (Insecta: Lepidoptera) (Ponnuvel et al., 2003). A lipase do escorpião *Scorpio maurus* foi purificada a partir do hepatopâncreas desse animal. A lipase digestiva deste escorpião é uma proteína glicosilada que apresentou massa molecular de 50 kDa, apresentou-se estável em pHs alcalinos tendo um pH ótimo de 9,0 (Zouari et al., 2005). Esta enzima purificada foi utilizada para experimentos de imunização em coelhos e utilizada para marcação e identificação das células envolvidas em digestão (Zouari et al., 2006).

Lipases têm sido largamente utilizadas em várias aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética, de detergentes e farmacêutica. O estudo de lipases em novos modelos animais possibilitará: (a) um estudo comparativo e evolutivo destas enzimas, dado que os animais modelo escolhidos diferem quanto a sua origem evolutiva; (b) permitirá um estudo comparativo das especificidades destas enzimas e (c) possíveis aplicações específicas em diferentes ramos da indústria devido às adaptações fisiológicas selecionadas e evidenciadas nos diferentes modelos. Um exemplo é a estabilidade a pHs extremamente alcalinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dissecção dos animais e preparo das amostras

Os animais foram anestesiados em câmara de CO_2 (obtido a partir de gelo seco) por no mínimo 5 minutos e foram dissecados sob estereomicroscópio para isolamento do sistema digestivo (intestino e hepatopâncreas). As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e mantidas a -20°C até a sua utilização.

As amostras provenientes dos diferentes animais foram homogeneizadas em água MilliQ gelada utilizando homogeneizadores do tipo Potter – Elvehjem e utilizados como fonte de enzimas.

Ensaios enzimáticos para determinação da atividade de lipase

Foram utilizadas duas metodologias para o ensaio da atividade de lipase.

A primeira metodologia foi otimizada por Choi e colaboradores (2003) de um ensaio para lipases descrito por Kurooka e colaboradores (1977). Esta metodologia utiliza 5,5´dithiobis (2-nitro benzoic acid) – DNTB, Ellman´s reagente e 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (DMPTB). Grupos tiol livres que são gerados pela hidrólise de DMPTB por lipases reduzem o DNTB o qual fica amarelo quando reduzido. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices). Esta metodologia foi utilizada como padrão.

A segunda metodologia utiliza substratos derivados de p-nitrofenol (Gupta et al, 2002) para quantificação da atividade de lipases. Estes substratos foram necessários para uma caracterização da especificidade das enzimas em estudo. Foram usados p-nitrofenol palmitato, acetato e estearato. A hidrólise destes substratos resulta na formação de p-nitrofenolato, quantificado pela medida de absorbância a 410 nm.

Determinação de proteína das amostras

Determinação de proteína das amostras foi realizada pelos métodos de Smith e colaboradores (1985) utilizando ovoalbumina como padrão.

pH ótimo

O efeito do pH sobre a atividade de lipases dos animais modelos foram avaliados, utilizando 6 tipos diferentes de tampão que apresentavam uma faixa de pH de 2,5 à 10. O pH dos tampões foi ajustado na temperatura dos ensaios (37 °C).

Estabilidade ao pH

Foram realizados experimentos para verificar a estabilidade ao pH sendo utilizados 7 diferentes tipos de tampão que apresentavam uma faixa de pH de 2,5 à 12. A enzima foi diluída em água (diluição de 2 vezes) e foi colocada junto ao tampão (1 μL enzima diluída 2 vezes mais 20 μL tampão). Os tampões foram diluídos para uma concentração final de 40 mM. Os experimentos de estabilidade ao pH foram realizados por duas horas a 4°C e a 30°C.

Caracterização cinética das lipases

Foram realizados experimentos para verificar o efeito da concentração do substrato DMPTB sobre a atividade enzimática das lipases dos animais estudados. Foram utilizadas 12 diferentes concentrações de substrato em ensaios utilizando como fonte de atividade enzimática. o homogeneizado de intestino e hepatopâncreas dos animais estudados. O pH utilizado para estes ensaios foi o pH ótimo para cada uma das enzimas caracterizadas.

Focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida

Amostras de homogeneizado de hepatopâncreas de *Tityus serrulatus* foram submetidas a focalização isoelétrica. A eletrofocalização é realizada a 4 ºC por 2 horas a voltagem de 200 V. Após a focalização, os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador (Autogeldivider, Savant Instruments, EUA) em água MilliQ. O pH ao longo do gel é determinado fracionando-se um gel controle em água MilliQ e medindo-se o pH de cada fração com a utilização de um pHmetro e microeletrodo (Mettler, Suiça).

Inativação térmica

A amostra de *Tityus serrulatus* foi incubada a 45 ºC por uma hora em banho com recirculação sendo retirada três alíquotas de 20 μL em diferentes intervalos de tempo (0, 10, 20, 30 e 60 minutos) para realização do ensaio. A amostra de *Spodoptera frugiperda* foi incubada a 50 ºC por duas horas em banho com recirculação sendo retirada três alíquotas de 20 μL em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 30, 60 e 120) para medir a atividade remanescente. O controle do ensaio foi feito com três alíquotas de 20 μL retiradas da diluição antes da incubação nas diferentes temperaturas.

Ativação por cloreto de cálcio

Foram preparadas diferentes misturas derivadas da mistura padrão para o ensaio de lipase, onde foram adicionadas diferentes concentrações de cloreto de cálcio (2 mM, 5 mM 10 mM, 20 mM, 50 mM e 100 mM), todas as misturas, foram feitas sem a adição de EDTA. Foram feitos dois controles: o primeiro controle consiste na mistura padrão para o ensaio de lipase e o segundo controle consiste na mistura padrão sem a adição de EDTA.

Determinação de massa molecular das lipases em estudo

A massa molecular das atividades de lipase para diferentes artrópodes foi determinada através da cromatografia de filtração em gel. Foram utilizadas amostras da porção solúvel do homogeneizado dos animais estudados. Estas amostras foram aplicadas a uma coluna de filtração em gel Superdex 75 10/300 (GE Healthcare, Sweden). O fluxo de corrida foi de 0,5 mL/minuto e frações de 0,5 mL foram coletadas. Foram utilizados como padrões de massa molecular: ovoalbumina (MM, 45 kDa), albumina sérica bovina (MM 66 kDa), inibidor de tripsina de soja, SBTI, (21,5 kDa).

Sequência cromatográfica para o isolamento da lipase de *Tityus serrulatus*

Amostras de homogeneizado de hepatopâncreas de *Tityus serrulatus* foram diluídas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Estas amostras foram aplicadas a uma coluna de troca catiônica Hitrap S. Todos os passos foram realizados em um fluxo de 1,0 mL/minuto e frações de 1,0 ml foram coletadas. As frações ativas sobre DMPTB foram reunidas e aplicadas a uma coluna Hitrap desalting equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 para troca de tampão. Esta amostra foi submetida a uma cromatografia de troca aniônica em coluna Resource Q. As frações ativas foram reunidas e submetidas a uma eletroforese em acrilamida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das atividades de lipase em diferentes artrópodes

A atividade de lipase foi medida em diferentes espécies de artrópodes: Arachnida (*Tityus serrulatus; Nephilengys cruentata*); Insecta (*Periplaneta americana; Diatraea saccharalis;*

Musca domestica; Gryllus sp; Dysdercus peruvianus; Gonyleptis saprophilus; Dermestes maculatus; *Spodoptera frugiperda*). Através desses ensaios pudemos calcular a atividade absoluta e atividade específica em cada artrópode acima apresentado, como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1- Atividades absoluta e específica de lipases digestivas em diferentes espécies de Artrópodes*

Espécie	Atividade absoluta (mU)	Atividade específica ($mU.mg^{-1}$)
Tityus serrulatus	670 ± 220	21 ± 0,6
Gonyleptis saprophilus	284 ± 50	19 ± 1,6
Nephilengys cruentata	500 ± 142	4,7 ± 2,8
Periplaneta americana	470 ± 22	54 ± 13
Gryllus sp	72 ± 22	16 ± 4,7
Dysdercus peruvianus	13 ± 3,0	20,4 ± 0,9
Musca domestica	35 ± 0,8	66.1 ± 8,0
Diatraea saccharalis	54 ± 3,0	35 ± 2,0
Spodoptera frugiperda	193 ± 36	42 ± 6,0
Dermestes maculatus	14 ± 1,5	13 ± 2,0

*As medidas são médias e seus respectivos desvios de pelo menos três diferentes lotes, repetidos duas ou três vezes para cada espécie estudada.

Dentre os aracnídeos foram escolhidos como modelo *Tityus serrulatus* e *Nephilengys cruentata* e entre os insetos foram escolhidos *Periplaneta americana*, *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* por apresentarem alta atividade de lipase.

A atividade de lipase sobre substratos derivados de p-nitrofenol foi medida em homogeneizados de hepatopâncreas dos animais modelo selecionados. O objetivo deste experimento era evidenciar possíveis diferenças de especificidade das lipases dos diferentes artrópodes (Tabela 2). Foi observado que as lipases de insetos foram capazes de hidrolisar todos os substratos utilizados enquanto as enzimas de Arachnida não hidrolisaram pNp estearato (*Tityus serrulatus* e *Nephilengys cruentata*) e pNp palmitato (*Nephilengys cruentata*). Além disso, as razões de hidrólise entre DMPTB e pNp acetato indicam que as lipases dos aracnídeos apresentam maior atividade sobre pNp acetato enquanto as lipases de insetos apresentam maior atividade sobre DMPTB.

Tabela 2 - Atividades de lipase em diferentes espécies de artrópodes utilizando diferentes tipos de substrato*

Espécie	**Atividade (mU/animal)**			
	DMPTB	**pNp acetato**	**pNp palmitato**	**pNp estearato**
Tityus serrulatus	613	2771	360	N
Nephilengys cruentata	523	866	N	N
Diatraea saccharalis	78	63	6	4
Spodoptera frugiperda	300	198	44	22
Periplaneta americana	670	501	248	103

* As medidas são as médias dos valores de atividade obtidos em triplicata para cada animal. Os campos que apresentam a letra N representam a ausência de hidrólise do respectivo substrato.

A determinação do efeito do pH sobre a atividade da lipase foi feita nos animais modelos selecionados. (Tabela 3). O pH ótimo das lipases dos artrópodes estudados vária entre 7,0 e 9,0. As enzimas são estáveis em uma faixa de pH de 5,5 a 11 sendo que as lipases de *Tityus serrulatus* foram estáveis com alta atividade em pHs até 3,5 e a lipase de *Spodoptera frugiperda* é estável em pHs até 12 com 80% de sua atividade.

Os experimentos mostraram uma grande semelhança nas massas moleculares das lipases de *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Periplaneta americana*. Essas massas moleculares indicam lipases parecidas com a com a lipase de *Tityus serrulatus* e com a lipase já purificada de *Scorpio maurus* (Zouari et al 2005). A lipase de *Nephilengys cruentata* apresenta uma massa molecular distinta (Tabela 3).

Foram medidos os Kms das atividades de lipase nos animais modelos selecionados. Os valores de Km (Tabela 3) indicam que as atividades de lipase encontradas em *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea* saccharalis são similares, os valores de Km da atividade de lipase de *Periplaneta americana* indicam similaridade com as lipases de *Nephilengys cruentata* e *Tityus serrulatus.* As atividades de lipase dos animais estudados seguem um padrão Michaeliano.

Tabela 3 - Atividades de lipase em diferentes espécies de artrópodes utilizando diferentes tipos de substrato*

Animais	pH ótimo	Massa Molecular	Km
Tityus serrulatus	7,6 – 8,8	117,5 kDa (P1); 53,7 kD(P2)	0,12 mM ± 0,0089 mM
Nephilengys cruentata	8,5	29,8 kDa	0,116 mM ± 0,0189 mM
Periplaneta americana	7,6 e 8,4	67,8 kDa (P1); 53,1 kDa	0,12 mM ± 0,01 mM

		(P2)	
Diatraea saccharalis	8,5 – 9,0	60 kDa	0,08 mM ± 0,015 mM
Spodoptera frugiperda	7,6 – 9,0	60 kDa (P1);17,7 kDa (P2)	0,072 mM ± 0,008 mM

As lipases de mamíferos são ativadas na presença de íons cálcio. Este comportamento não foi observado para as lipases de Arthropoda. A lipase de *Diatraea saccharalis* apresentou inibição de sua atividade nas concentrações mais altas de íons cálcio.

Focalização isoelétrica

A focalização isoelétrica em homogeneizado de *Tityus serrulatus* indica a presença de duas enzimas com pIs de 5,7 e 6,0, resultando em pouca separação das duas enzimas na focalização (Gráfico 1).

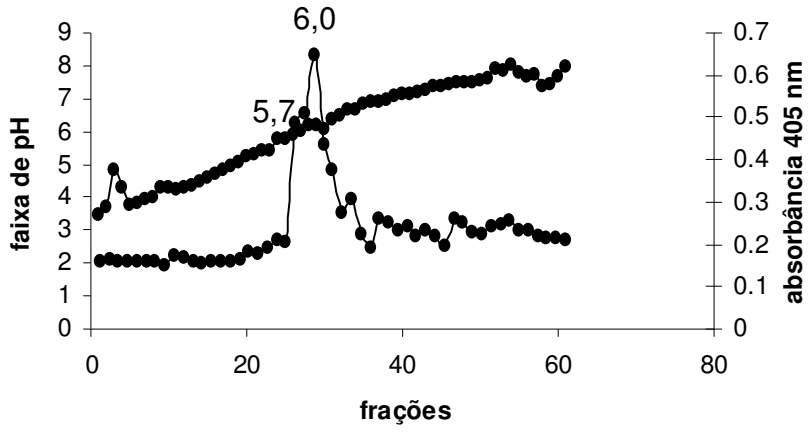


Gráfico 1 - Ensaio sobre DMPTB em frações obtidas após focalização isoelétrica a partir de amostras de homogeneizado de hepatopâncreas de *Tityus serrulatus*.

Inativação térmica

A atividade de lipase verificada em *Tityus serrulatus* apresenta uma inativação térmica a 45 ºC de acordo com uma cinética aparente de primeira ordem por mais de 3 meias vidas com meia vida de 10 minutos (Gráfico 2A). A atividade de lipase verificada em *Spodoptera frugiperda* apresenta uma inativação térmica a 50 ºC de acordo com uma cinética aparente de primeira ordem por mais de 3 meias vidas com meia vida de 5 minutos, indicando a presença de apenas uma enzima (Gráfico 2B).

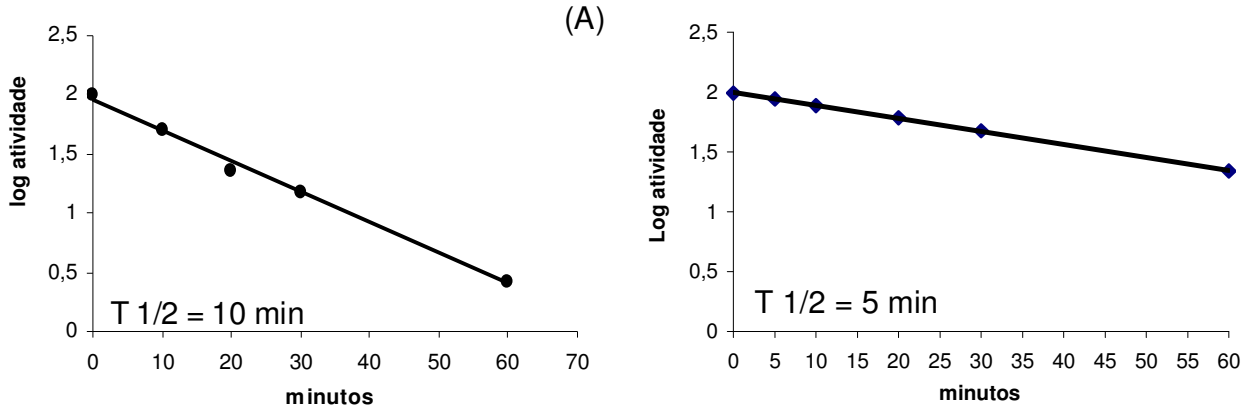
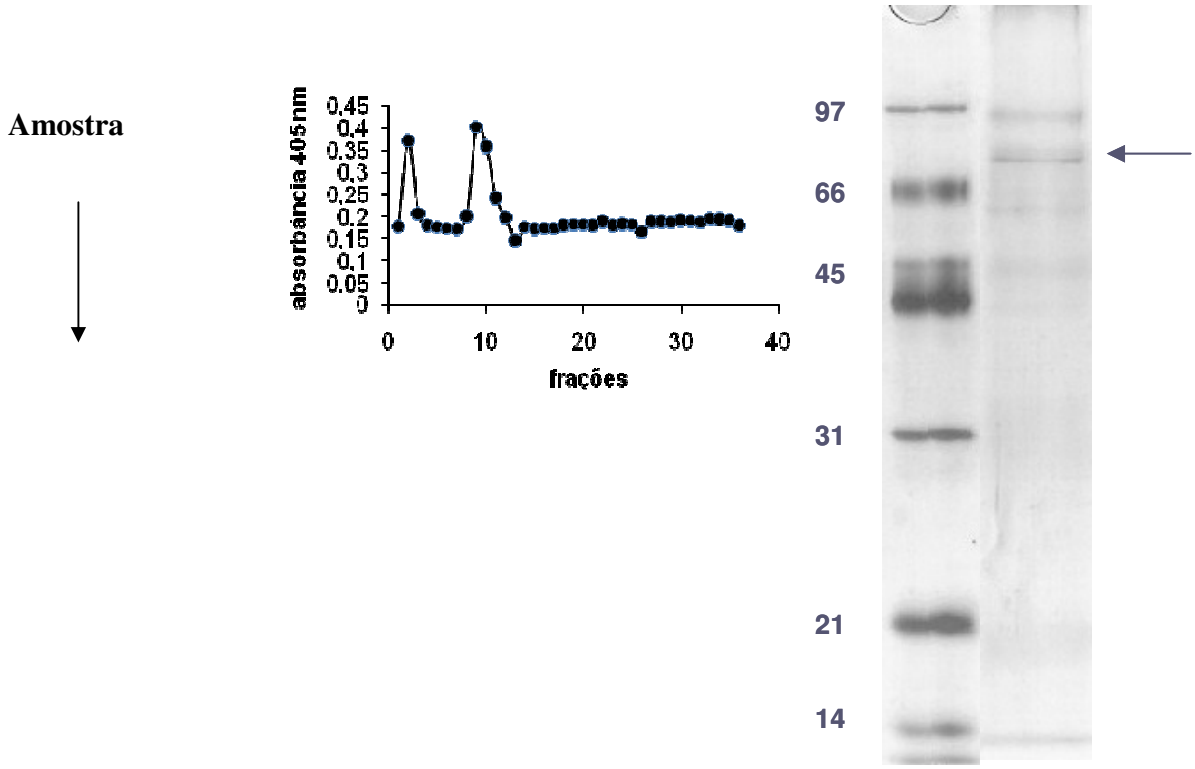


Gráfico 2 - Estabilidade térmica da atividade de lipase presente em hepatopâncreas de *Tityus serrulatus* a 45 ºC (A) e em conteúdo luminal e membrana peritrófica de Spodoptera frugiperda a 50 ºC (B). A atividade remanescente fornecida utilizando DMPTB como substrato.

Purificação da lipase majoritária de *Tityus serrulatus*

Foi estabelecida uma marcha de purificação para lipase de *Tityus serrulatus* a partir da combinação de uma cromatografia de troca catiônica em coluna Hitrap S e de uma coluna de troca aniônica Resource Q representada na figura 1.

Após a Hitrap S, foram verificadas duas atividades uma nas frações coletadas no lavado e outra eluída com NaCl 0,12 M denominadas Lip1 e Lip2, respectivamente. Utilizamos Lip2 para dar continuidade a marcha de purificação submetendo esta enzima a uma cromatografia em coluna Resource Q. Os reunidos ativos obtidos nos dois passos cromatográficos foram dialisados e liofilizados e aplicados em um gel de SDS-PAGE para verificar o grau de purificação da enzima.



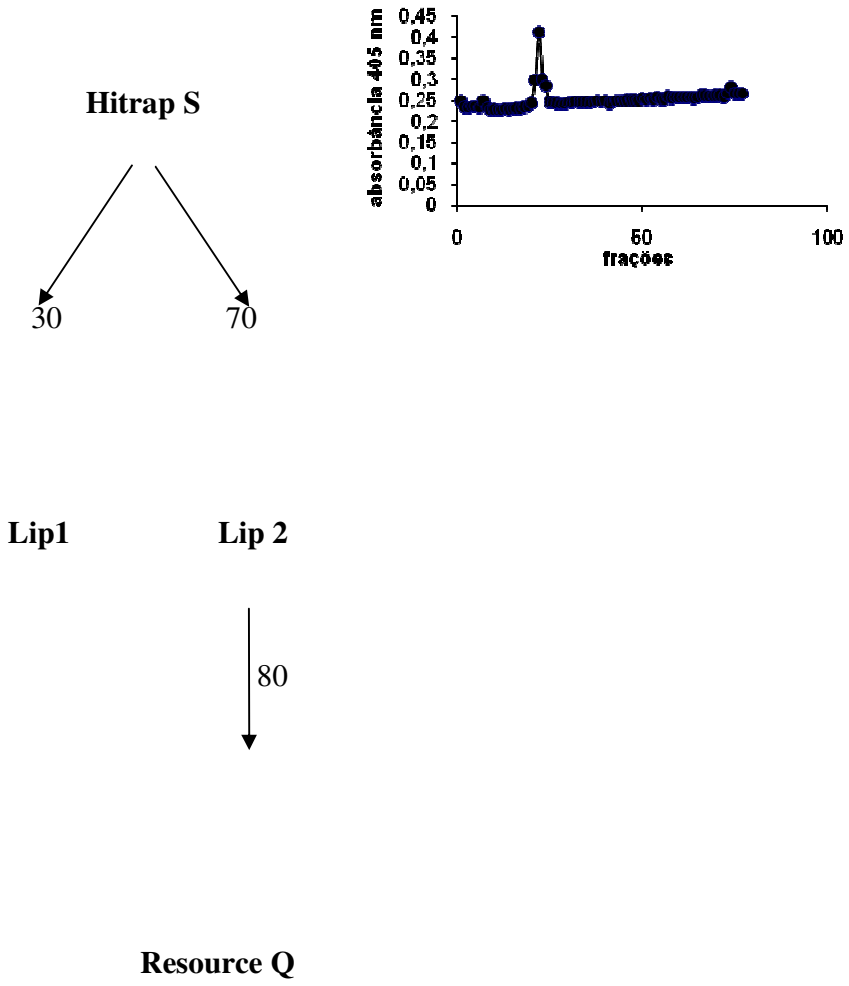


Figura 1 - Marcha de purificação final para lipase de *Tityus serrulatus*. Os números ao lado das setas representam a recuperação do passo em porcentagem. SDS-PAGE para a marcha de purificação da lipase.

As atividades absoluta e específica de lipase foram medidas em diferentes espécies em Arthropoda. As enzimas, de uma maneira geral, apresentaram um pH ótimo de 8,0 à 8,5 e uma faixa de estabilidade ao pH que vai de 5,5 a 11,0. As massas moleculares foram obtidas em uma em faixa de 50 a 60 kDa, com exceção da lipase de *Nephilengys cruentata* que apresentou massa

molecular de 29,8 kDa. Os valores de Km encontrados evidenciaram comportamentos parecidos entre as lipases de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* para as quais foram obtidos valores de 0,08 mM e entre as lipases de *Tityus serrulatus, Nephilengys cruentata* e *Periplaneta americana* com valores de Km de 0,12 mM. Foi feita determinação do ponto isoelétrico para as lipases de *Tityus serrulatus,* onde foi observada a presença de duas enzimas com pIs de 5,7 e 6,0. Através dos experimentos de ativação por cloreto de cálcio pudemos observar a diferença de comportamento das lipases de artrópodes e mamíferos em relação a presença de cálcio. Por fim foi estabelecida uma marcha de purificação para lipase de *Tityus serrulatus.*

REFERÊNCIAS

Chapman RF. The insects: structure and funcion. 4.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 788p.

Choi S-J, Hwang JM, Kim SA. Colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity. J. Biochem. Mol.Biol. 2003; 36(4): 417-420.

Gupta N, Rathi P, Gupta R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Anal. Biochem. 2002; 311(1): 98-99.

Kurooka S, Okamoto S, Hashimoto M. A novel and simple colorimetric assay for human serum lipase. J. Biochem. 1977; 81(2): 361-369.

Mickel FS, Weidenbach F, Swarovsky B, Laforge KS, Scheele GA. Structure of the canine pancreatic lipase gene. The Journal of Biological Chemistry 1989; 264(22): 12895-12901.

Ponnuvel KM, Nakazawa H, Furukawa S, Asaoka A, Ishibashi J, Tanaka H, Yamakawa M. A lipase isolated from the Silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. Journal of Virology 2003; 77(190; 10725– 10729.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analyt. Biochem. 1985; 150 (1): 76-85.

Zouari N, Miled N, Cherif S, Mejdoub H, Gargouri Y. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: the scorpion. Biochimica et Biophysica Acta – general subjects 2005; 1726 (1): 67-74.

Zouari N, Bernadac A, Miled N, Rebai T, De Caro A, Rouis S, Carriere F, Gargouri Y. Immunocytochemical localization of scorpion digestive lipase. Biochim Biophys Acta. 2006; 1760(9): 1386-92.