UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Serina Endopeptidases de Insetos e a Interação
Inseto-Planta

Adriana Rios Lopes
Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. Walter R. Terra

SÃO PAULO
Nove de Março de 2.004

“Serina endopeptidases de insetos e a interação inseto-planta”

ADRIANA RIOS LOPES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. MARIA TERÊSA MACHINI DE MIRANDA
IQ – USP

Prof. Dr. EMER SUAVINHO FERRO
ICB – USP

Profa. Dra. APARECIDA SADAЕ TANAKA
UNIFESP

Prof. Dr. PEDRO LAGERBLAD DE OLIVEIRA
UFRJ

SÃO PAULO
03 DE MAIO DE 2004

Aos meus preciosos tesouros

Lincoln e Sofia

Aos meus pais Carlos e
Herminia e a minha irmã Carol por todo
carinho, apoio e dedicação de sempre.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra pela orientação, amizade e confiança durante a minha iniciação científica, mestrado e doutorado.

A Dra. Clélia Ferreira pelo apoio, discussões, mas acima de tudo pela amizade carinhosa.

Aos colegas de laboratório: Alcides, Alexandra, Alexandre, Ana, Átila, Ciça, Érika (Cakes), Fábio, Fernando, João, Letícia, Lucas Blanes, Lucas Guerra, Luciana, Marisa, Paloma, Plínio, Renata e Sandro pelas discussões e amizade.

Aos alunos de iniciação científica André, Luciana, Marisa e Fabio pela oportunidade de aprender muito durante o período que trabalhamos juntos.

Aos meus sogros Agamenon e Sônia e ao cunhado Jeff.

Ao Carlos Peres Silva pela orientação durante o início da minha Iniciação Científica.

Às técnicas Luiza Nakabayashi e Maria Ivanilde Marcelino pelo auxílio e amizade.

Aos professores Dr. Luis Juliano e Dra. Maria Aparecida Juliano pelos substratos de fluorescência apagada e pelas discussões.

Ao pessoal do laboratório de cristalografia de proteínas do LNLS.

A FAPESP pela bolsa concedida.

Durante a elaboração desta tese, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX e CNPq.

1. Introdução	10
1.1. Considerações gerais	10
1.2. Aspectos gerais da digestão de proteínas em insetos	10
1.3. Serina endopeptidases	11
1.3.1. Organização do grupo	13
1.3.2. Mecanismo catalítico e especificidade da família S1 de serina endopeptidases	15
1.3.3. Aspectos estruturais e interação com inibidores	26
1.4. Serina endopeptidases em insetos	28
1.4.1. Tripsinas digestivas em insetos	28
1.4.2. Quimotripsinas digestivas em insetos	29
1.4.3. Elastases digestivas em insetos	31
1.5. Coevolução de enzimas digestivas e plantas	31
1.6. Análises e estudo de sequências de serina-endopeptidases em insetos	35
1.7. Análises baseadas em matrizes de distância	36
2. Objetivos deste estudo	37
3. Materiais e métodos	38
3.1. Insetos	38
3.1.1. <i>Periplaneta americana</i>	38
3.1.2. <i>Tenebrio molitor</i>	38
3.1.3. <i>Musca domestica</i>	38
3.1.4. <i>Diatraea saccharalis</i>	39
3.1.5. <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
3.1.6. Outros insetos	40
3.2 Quimotripsina bovina	40
3.3. Preparo das amostras	40
3.4. Ensaio enzimáticos e determinação de proteína	41
3.5. Purificação de tripsinas de insetos	42
3.5.1. Purificação da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	42
3.5.2. Purificação da tripsina de <i>Diatraea saccharalis</i>	43

3.5.3. Purificação da tripsina de <i>Spodoptera frugiperda</i>	43
3.6. Diálise com membrana de diálise	44
3.7. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS em condições desnaturantes	44
3.8. Determinação de parâmetros cinéticos para substratos de fluorescência apagada	44
3.8.1. Substratos com fluorescência direta	44
3.8.2. Substratos de fluorescência apagada	45
3.9. Cálculo da hidrofobicidade dos subsítios de tripsina	45
3.10. Inibição da tripsina purificada de <i>Periplaneta americana</i>	46
3.10.1. Efeito da concentração de benzamidina sobre a atividade da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	46
3.10.2. Titulação da tripsina de <i>Periplaneta americana</i> e constante aparente de dissociação de complexo tripsina-SBTI	46
3.11. Modificação química da histidina do sítio ativo de quimotripsinas e tripsinas	47
3.11.1 Modificadores específicos	47
3.11.2. Modificadores não específicos	48
3.12. Diálise reversa para concentração da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	48
3.13. Testes dos kits de cristalização da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	48
3.14. Extração de RNA total de epitélio do intestino médio de <i>Musca domestica</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Periplaneta americana</i>	49
3.15. Precipitação de RNA total	50
3.16. Alinhamento das sequências de serina-endopeptidases de insetos e análise de agrupamentos por metodologia de distância	50
3.17. Reação de PCR	50
3.18. Eletroforese me gel de agarose para amostras de DNA	51
3.19. Extração de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose e purificação de produtos de PCR	51
3.20. Sistema TOPO para clonagem de produtos de PCR	51

3.21. Reações de sequenciamento de DNA e análise inicial das sequências	52
3.22. Purificação da quimotripsina de <i>Periplaneta americana</i>	53
3.23. Gel filtração para determinação de peso molecular	54
3.24. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS em condições semidesnaturantes para isolamento de endopeptidases de <i>Diatraea saccharalis</i>	54
3.25. Cromatografia de afinidade em coluna SBTI agarose para isolamento parcial da quimotripsina de <i>Diatraea saccharalis</i>	54
3.26. Efeito de pH sobre a atividade quimotripsina	55
3.27. Focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida	55
3.28. Modelagem e alinhamento de diferentes quimotripsinas	55
3.29. Transformação de células XL1 Blue	56
3.30. Purificação de plasmídeos de cultura de células	56
3.31. Desenho de “primer” e construção da quimera do quimotripsinogênio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	56
3.32. Transformação de células Origami (DE3), indução e lise celular	57
3.33. Preparação de bactérias competentes para transformação	58
4. Resultados	58
4.1. Purificação e isolamento parcial de tripsinas de diferentes insetos	58
4.1.1. <i>Periplaneta americana</i>	58
4.1.1.1. Purificação da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	58
4.1.1.2. Cristalização da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	59
4.1.2 <i>Diatraea saccharalis</i>	62
4.1.3. <i>Spodoptera frugiperda</i>	62
4.2. Determinação da razão de hidrólise de peptídeos P1 Arg/Lys para as tripsinas de diferentes ordens de insetos	64
4.3. Caracterização da especificidade dos subsítios de ligação de tripsinas de insetos	64
4.3.1. Substratos colorimétricos e de fluorescência direta	64
4.3.1.1. <i>Periplaneta americana</i>	64
4.3.1.2. <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	67

4.3.2. Substratos de fluorescência apagada	70
4.4. Determinação da hidrofobicidade dos subsítios de ligação de tripsina de insetos.	72
4.5. Estudos de inibição e caracterização dos resíduos presentes no sítio ativo da tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	72
4.5.1. Efeito da concentração dos inibidores benzamidina e SBTI sobre a atividade da tripsina purificada de <i>Periplaneta americana</i>	72
4.5.2. Caracterização dos resíduos envolvidos em catálise para a tripsina de <i>Periplaneta americana</i>	75
4.5.2.1. Caracterização da serina catalítica	75
4.5.2.2. Caracterização da histidina catalítica	75
4.6. Clonagem e sequenciamento das tripsinas de <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>Periplaneta americana</i>	78
4.7. Análise evolutiva das tripsinas de insetos	82
4.8. Purificação e isolamento parcial das quimotripsinas de insetos	85
4.8.1 <i>Periplaneta americana</i>	85
4.8.2. <i>Diatraea saccharalis</i>	88
4.8.3. <i>Spodoptera frugiperda</i>	95
4.9. Caracterização da especificidade de quimotripsinas em insetos	95
4.9.1. Caracterização cinética de diferentes quimotripsinas utilizando substratos colotimétricos e de fluorescência direta	97
4.10. Caracterização da histidina catalítica de quimotripsinas em insetos	101
4.10.1. Modificação química por clorometilcetona	101
4.10.2. Modificação por DEPC	107
4.11. Modelagem molecular da quimotripsinas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e análise evolutiva das quimotripsinas de insetos	108
4.12. Clonagem e expressão do quimotripsinogênio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	113
5. Discussão	121
5.1. Isolamento, caracterização e sequenciamento de serina endopeptidases de insetos	121

5.1.1. Tripsinas	121
5.1.2. Quimotripsinas	127
5.2. Especificidade de tripsinas em insetos	128
5.3. Hidrofobicidade e subsítios de ligação em tripsinas de insetos	131
5.4. Especificidade de quimotripsinas de insetos	132
5.5. Coevolução de serina endopeptidases de insetos e compostos vegetais	135
5.5.1. Tripsinas	136
5.5.2. Quimotripsinas de insetos e cetonas de plantas	138
6. Conclusões	141
7. Referências	143
8. Resumo	160
9. Abstract	162
<i>Curriculum vitae</i>	163

Abreviaturas

Ac-FR-pNa: acetil-Phe-Arg-p-nitroanilida
 B-R-MCA: benzoil-arginina 7-amida-4-metil cumarina
 B-Y-ee: Benzoyl-Tyr-ethyl-esther
 B-Y-pNA: benzoyl-Tyr-p-nitroanilida
 DEPC: dietil pirocarbonato
 DMSO: dimetilsulfóxido
 Ee: ethyl esther
 IPTG: Isopropil tio β -D galactosídeo
 MCA: 7-amino-4-metil coumarina
 NaCl: cloreto de sódio
 NJ: "Neighbor Joining"
 PAGE: poly-acrilamide gel electrophoresis
 PBA: fenilbutil amina
 PCR: Polimerase Chain Reaction
 PMSF: fenil metil sulfonil fluoreto
 pNA: p-nitroanilina
 SBTI: "soy bean trypsin inhibitor" inibidor de tripsina de soja
 SDS: dodecil-sulfato de sódio
 Suc-AAF-MCA: succinil ala-ala-phe7-amida-4-metil cumarina
 Suc-AAPA-pNa: Succinil-Ala-Ala-Pro-Ala-p-nitroanilida
 Suc-AAPL: succinil-Ala-Ala-Pro-Leu
 Suc-AAPV: Succinil-Ala-Ala-Pro-Val
 Suc-AFK-MCA: succinil ala- phe-lys7-amido-4-metil cumarina
 Suc-APA: Succinil-Ala-Pro-Ala
 Suc-F-pNa: Succinil-Phe-p-nitroanilida
 Suc-LY-MCA: Succinil-Leu-Tyr-7-amido-4-metil cumarina
 TAE: Tris-acetato 40mM contendo EDTA 2,0 mM
 T-F-CK: tosil-Phe-clorometil cetona
 T-K-CK (TLCK): tosil-Lys-clorometil cetona
 Tris: tris-hidroximeil aminometano
 UPGMA: "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean"

Z-FR-MCA: carbobenzoxi-fenilalanina-arginina 7-amido-4-metil cumarina

Z-GGF-CK: carbobenzoxi-Gly-Gly-Phe-clorometil cetona

Z-GGR-MCA: carbobenzoxi-glicina-glicina-arginina 7-amido-4-metil cumarina

Z-R-MCA: carbobenzoxi-arginina 7-amido-4-metil cumarina

Meios utilizados

LB: (NaCl, bactotripton, extrato de levedura)

SOC:(Bactotripton, extrato de levedura, NaCl, KCl, Magnésio e glicose)

NZY(NaCl, sulfato de magnésio, extrato de levedura, hidrolisado de caseína)

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

Os insetos constituem um grupo extremamente bem sucedido pela capacidade de ocupação dos mais diferentes nichos, podendo ser considerados os principais competidores do homem na Terra. Esta competição se dá, principalmente, pelo ataque direto à produção de alimentos, desde o cultivo até a estocagem dos produtos alimentícios, ou de forma indireta, sendo vetores de grande número de doenças que afetam o homem e os animais de criação (Gillott, 1995).

A proteção dos cultivos é de fundamental importância para a produção agrícola, pela crescente demanda de alimentos e pela organização das áreas produtoras. Tem sido evidenciado que a monocultura leva a um aumento dramático na população de insetos, aumentando desta forma, a perda da safra (Gatehouse e Gatehouse, 1998). Algumas estimativas indicam a perda de pelo menos 15% da safra anual mundial devido a predação por insetos, excluindo as perdas ocasionadas indiretamente, onde os insetos são vetores de várias doenças vegetais (Wu et al., 1996).

Até o presente momento, o controle de pragas agrícolas depende essencialmente da utilização de agroquímicos. Estudos de ecologia, nas áreas de cultivo, têm demonstrado que um programa de controle de pragas combinando o uso racional de praguicidas, rotação de cultivos, sanitização do campo e, principalmente, aumentando a hereditabilidade de características que tornem as plantas resistentes aos seus predadores, são as soluções para a redução das perdas agrícolas. Nesta última categoria estão incluídas as plantas transgênicas. O descobrimento de compostos e de seus alvos em insetos que possam ser utilizados para esta finalidade é de grande interesse. Como o tubo digestivo de insetos é uma das mais importantes superfícies de contato com o ambiente este torna-se um importante alvo para controle de pragas.

1.2. Aspectos gerais da digestão de proteínas em insetos

Peptidases (peptídeo-hidrolases, EC 3.4) são enzimas que clivam ligações peptídicas e incluem as exopeptidases (EC 3.4.11-19) e as endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-24). As exopeptidases incluem enzimas que removem aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases, EC 3.4.11) ou C-terminal (carboxipeptidases, EC 3.4.16-18) de uma cadeia peptídica, bem como as dipeptidases (dipeptídeo-hidrolases, EC 3.4.13). As endopeptidases estão divididas em quatro principais subclasses de acordo com o seu mecanismo catalítico: serina-endopeptidases, cisteína-endopeptidases, aspártico-endopeptidases e metalo-endopeptidases. Um quinto grupo, treonina-endopeptidases, tem sido proposto por alguns autores. Estas enzimas são muito semelhantes às serina-endopeptidases, sendo que as treonina endopeptidases apresentam um resíduo de treonina ao invés de uma serina envolvida em catálise (Barrett et al., 1998).

A maioria das moléculas de alimento a serem digeridas são polímeros e, neste caso, proteínas. Estas são digeridas em três etapas. A digestão inicial ou primária, a qual freqüentemente ocorre no interior da membrana peritrófica (Figura 1), consiste da dispersão e redução do tamanho dos polipeptídeos. Esta etapa da digestão é realizada por endopeptidases, resultando em oligopeptídeos. Para a digestão das proteínas de diversas fontes de alimento são necessárias endopeptidases de diferentes especificidades, sendo que em insetos, endopeptidases das classes serina, cisteína e aspártico já foram descritas envolvidas no processo digestivo. Durante a digestão intermediária, a qual freqüentemente ocorre no espaço ectoperitrófico (Figura 1), estas moléculas são novamente reduzidas, agora a dímeros, os quais serão reduzidos a monômeros na digestão final, que ocorre na superfície das células do intestino médio. A digestão intermediária de proteínas ocorre pela atividade de amino e carboxi-peptidases enquanto a digestão final ocorre por ação de dipeptidases.

Dentre as endopeptidases envolvidas na digestão em insetos, as enzimas da classe das serina-endopeptidases são as enzimas que ocorrem no intestino médio de quase todas as ordens de insetos com exceção dos Hemiptera e de alguns grupos da série Cucujiformia, como os Curculionidae (Coleoptera) (Terra e Ferreira,

Figura 1: Representação esquemática da organização do tubo digestivo de insetos.

1994). No entanto, alguns Hemiptera apresentam serina-endopeptidases nas glândulas salivares.

1.3. Serina endopeptidases

1.3.1. Organização do grupo

Endopeptidases cujo mecanismo catalítico depende da hidroxila de um resíduo de serina atuando como nucleófilo são chamadas serina endopeptidases. Existem aproximadamente 40 famílias de serina endopeptidases que são distinguíveis pelas suas estruturas primárias. Estas famílias estão agrupadas em seis clãs pela comparação de suas estruturas terciárias (Barrett et al., 1998). A maquinaria catalítica destas enzimas geralmente envolve, além do resíduo de serina, um doador de prótons que nos clãs SA, SB, SC e SH é um resíduo de histidina e um terceiro resíduo que promove a orientação do anel imidazol da histidina. Geralmente, este terceiro grupo é constituído de um resíduo de ácido aspártico ou até mesmo de uma outra histidina (Clã SH) (Barrett et al., 1998).

O clã SA reúne as serina endopeptidases que apresentam uma estrutura terciária em duplo β barril (Figura 2) e os resíduos His, Asp e Ser dos aminoácidos participantes da tríade catalítica nesta ordem, sendo que o sítio catalítico está dividido entre os dois domínios. A presença dos resíduos de serina e histidina em tripsinas e quimotripsinas foi demonstrada pela utilização de modificadores químicos específicos como DFP e clorometilcetona (Shaw et al., 1965), enquanto a importância do resíduo de ácido aspártico na posição 102 foi demonstrada por mutação sítio-dirigida (Blow et al., 1969 e Craik et al., 1987).

Além disso, estas enzimas apresentam, como todas as enzimas proteolíticas, um sítio ativo formado por um sítio catalítico e um sítio de ligação. O sítio catalítico consiste de um número limitado de resíduos de aminoácidos envolvidos na quebra de uma ligação peptídica, seja pela transferência de prótons ou pela ligação a um oxianion do intermediário tetraédrico. O sítio de ligação é composto de vários resíduos de aminoácidos, os quais garantem um alinhamento apropriado do

Figura 2: Diagrama topológico dos dois domínios de tripsina, mostrando que os resíduos essenciais do sítio ativo são parte de duas alças entre os dois domínios da proteína, incluindo os resíduos participantes da triade catalítica e os determinantes da especificidade em S1 (Reproduzido de Branden e Tooze, 1998).

substrato para a catálise. Além disso, a energia de ligação é utilizada para transformar o substrato em seu estado de transição (Breddam et al., 1992).

O sítio de ligação, como definido por Schechter e Berger (1967) (Figura 3), pode estar subdividido em um número de subsítios, cada um garantindo, por múltiplas interações, a ligação de um único resíduo de aminoácido do substrato. As propriedades dos resíduos de aminoácidos, os quais constituem um dado subsítio de ligação, determinam qual resíduo de aminoácido do substrato poderá se ligar e, desta forma, determinam a especificidade dos subsítios. O clã SA contém as famílias S1→S4 e S29→S32, sendo que tripsinas, quimotripsinas e elastases pertencem à família S1 (Barrett et al., 1998).

1.3.2. Mecanismo catalítico e especificidade da família S1 de serina endopeptidases.

A família S1 tem como seus principais representantes quimotripsinas (EC 3.4.21.1), tripsinas (EC 3.4.21.4) e elastases (EC 3.4.21.36), sendo que estas enzimas são as serina endopeptidases relacionadas à digestão em insetos. Estas três enzimas apresentam o mesmo mecanismo catalítico descrito a seguir: após a ligação da enzima ao substrato formando um complexo Michaeliano, o resíduo de serina 195 ataca nucleofilicamente a carbonila da ligação peptídica formando um estado de transição tetraédrico (catálise covalente), o qual é estabilizado por pontes de hidrogênio formada com os resíduos Gly193 e Ser195 (bolso oxiânion), como pode ser visto na Figura 4 (Robertus et al., 1972). O anel imidazol da His57 recebe o próton liberado formando um íon imidazol. Este processo é favorecido pelo efeito polarizante da carboxila não solvatada da cadeia lateral do resíduo Asp102, o qual faz uma ponte de hidrogênio com a His57.

O intermediário tetraédrico decompõe-se em um intermediário acil-enzima pela força de doador de prótons do N3 da His57. O grupo amino deixante (a nova porção N-terminal formada) é liberado da enzima e substituído por uma molécula de água do solvente. O intermediário acil-enzima é extremamente instável, sendo que o processo de desacilação é essencialmente o inverso dos passos anteriormente descritos seguido da liberação do carboxilato formado (o novo C-terminal).

Figura 3: Representação esquemática e nomenclatura dos subsítios de ligação de endopeptidases e das posições dos resíduos de aminoácidos ocupante de cada subsítio segundo Schechter e Berger (1967).

Figura 4. Mecanismo de reação de serina endopeptidases. (A) Formação de um intermediário acil-enzima envolvendo um resíduo de serina da enzima na primeira etapa da hidrólise da ligação peptídica. Inicialmente, é formado um estado de transição onde a ligação peptídica é clivada na qual o carbono tem uma geometria tetraédrica ligando-se a quatro grupos incluindo o resíduo de serina catalítica da enzima. (B) deacilação do intermediário acil-enzima é o segundo passo da hidrólise. Este é essencialmente o inverso da acilação.

No entanto, apesar da similaridade de suas estruturas tanto primária quanto terciária, evidenciada por estudos cristalográficos: tripsina (Stroud et al., 1974; Huber et al., 1974); quimotripsina (Birktoft e Blow, 1974; Tulinsky et al., 1973) e elastase (Shotton e Watson, 1970; Sawyer et al., 1978) estas enzimas apresentam especificidades bastante distintas. Tripsinas clivam cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos básicos como lisina ou arginina, sendo que a maior eficiência de hidrólise sobre cadeias laterais básicas é evidenciada pelos valores de eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) de pelo menos 10^5 vezes maior do que para outros resíduos de aminoácidos naturais. Já as quimotripsinas hidrolisam preferencialmente cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral aromática, enquanto elastases hidrolisam cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral menos volumosas como Ala, Gly, Val e Leu.

Estudos de especificidade de serina endopeptidases têm por objetivo: (a) compreender o mecanismo catalítico destas enzimas, (b) o fator de distinção dentre estas quanto a sua especificidade, isto é, a capacidade de distinção para formação de um complexo estável tanto com o estado inicial quanto com o estado de transição de um ligante em particular dado à semelhança estrutural destas enzimas e, (c) a caracterização da especificidade primária, isto é, a comparação da eficiência sobre substratos contendo Arg ou Lys em P1.

A comparação da eficiência catalítica entre substratos que apresentem resíduos de arginina ou lisina em P1, demonstra que a especificidade primária das tripsinas de mamíferos pode ser de 2 a 10 vezes mais favorável à hidrólise de ligações peptídicas apresentando arginina (Craik et al., 1985; Hedstrom, 1996). Estudos com tripsinas de mamífero demonstram que alguns resíduos presentes em S1 apresentam diferentes interações com substratos Lys ou Arg estando envolvidos na discriminação dos dois resíduos positivamente carregados. Tanto arginil quanto lisil substratos formam pontes de hidrogênio com uma molécula de água presente no sítio ativo, a qual faz pontes de hidrogênio com os oxigênios das carbonilas dos resíduos Trp215 e Val227. A cadeia lateral da lisina se liga ao sítio S1 fazendo uma ponte de hidrogênio direta com a Ser190 e fazendo uma ponte de hidrogênio indireta (através de outra molécula de água presente no sítio ativo) com Asp 189. Já a

cadeia lateral da arginina, que é mais longa, desloca a molécula de água e faz uma ponte de hidrogênio diretamente com Asp189. Mutantes de tripsina foram caracterizados por estudos cinéticos e por seleção genética. Craik e colaboradores (1985) construíram por mutação sítio-dirigida os mutantes de tripsina Gly216Ala, Gly226Ala e Gly216Ala/Gly226Ala, os quais foram caracterizados cineticamente. Estes estudos demonstraram que o mutante Gly226Ala hidrolisa com maior eficiência o substrato que contém Lys em P1. Esta alteração de especificidade se deve à adição de um grupo metil na posição 226, o que permite acomodar melhor este substrato à base do sítio S1. Na segunda estratégia, realizada por Evnin e colaboradores (1990) foram gerados mutantes de tripsina com alterações de resíduos em S1 nas posições 189 e 190, dado que estudos cristalográficos indicavam que estas duas posições são críticas na definição da especificidade da enzima. No entanto, a caracterização inicial destes mutantes se deu por seleção genética baseando-se na habilidade demonstrada para *Escherichia coli* de secretar tripsina ativa no espaço periplasmático e na inabilidade de *Escherichia coli* metabolizar um aminoácido derivatizado com β -naftilamida. *Escherichia coli* X90 são auxotróficas para biossíntese de arginina. Conseqüentemente, Arg- β -naftilamida não pode ser uma fonte anabólica deste resíduo. No entanto, bactérias desta linhagem que expressem tripsina Arg específica ativa, a qual hidrolisa rapidamente a ligação arginil-naftilamida, sobrevivem. Os mutantes selecionados (Ser190Cys; Ser190Thr, Ser190Val, Ser190Gly, Ser190Pro, Asp189Glu, Asp189Glu/Ser190Thr; Asp189Glu/Ser190Ala; Asp189Ser/Ser190Asp; Asp189Gly/Ser190Asp e Asp189Gly/Ser190Glu) foram posteriormente caracterizados. Estes estudos demonstraram que os mutantes D189E e D189E/S190T preferem o substrato contendo Lys em P1 ao substrato que apresenta Arg na mesma posição, sendo que este aumento de especificidade se dá, principalmente, por um aumento do k_{cat} , refletindo uma estabilização do estado de transição. Tripsina selvagem de rato apresenta uma relação Arg/Lys de 4 vezes enquanto mutantes como S190G e S190P apresentam razões Arg/Lys de 40 e 135 vezes. Estes dados indicam que a deleção da hidroxila da cadeia lateral na posição 190 causa uma modulação importante na seletividade dos substratos Arg/Lys, sendo que a ausência desta hidroxila na posição 190 favorece a hidrólise de substratos contendo Arg em P1. A

caracterização da especificidade Arg/Lys de tripsinas de diferentes insetos (Lopes et al., 2004) foi realizada e será discutida adiante.

Já a especificidade de tripsina por resíduos positivamente carregados é explicada pela presença do resíduo de Asp189 na base do sítio S1. Este resíduo é substituído por uma serina em quimotripsinas, criando um sítio mais hidrofóbico, o que leva a especificidade desta enzima por Trp/Tyr/Phe. O sítio S1 de elastases é ocluído pelas cadeias laterais da Val 216 e Thr 226 (ambos resíduos de Gly em tripsinas e quimotripsinas), os quais justificam a especificidade de elastase por Ala/Val. Este modelo predizia que a troca destes poucos elementos estruturais deveria ser suficiente para a troca de especificidade pelo substrato para estas enzimas (Steitz et al., 1969).

Estudos de mutação sítio-dirigida, no entanto, demonstraram que este modelo não estava correto. A troca do resíduo Asp189 por Ser não converte a tripsina em quimotripsina, mas sim em uma proteinase pouco eficiente e não específica (Graf et al., 1988). De maneira semelhante, a substituição de outros resíduos do sítio S1 de tripsinas por resíduos análogos de quimotripsina foram realizadas (Gln192Met, Ile138Thr, inserção Thr219, Asp189Glu, Asp189Lys, Asp189Gly/Gly226Asp, Gly216Ala, Gly226Ala) (Hedstrom et al., 1992; Graf et al., 1988; Graf et al., 1987; Perona et al., 1993; Craik et al., 1985). Estes mutantes também não apresentam especificidade de quimotripsina. Desta forma, demonstrou-se que a especificidade de tripsinas, quimotripsinas e elastases não é uma simples função de propriedades estéricas e eletrostáticas do sítio S1, mas ao invés disso, a especificidade deve ser determinada por resíduos fora do sítio ativo. Um mutante de tripsina contendo um sítio de ligação S1 como de quimotripsina, isto é, contendo as mutações citadas anteriormente, adquire especificidade de quimotripsina quando duas alças da superfície de tripsina são repostas com as alças correspondentes de quimotripsina. Alça 1 (resíduos 185-188) e alça 2 (resíduos 221-225) conectam as paredes do sítio S1, mas não estão em contato com o substrato (Hedstrom et al., 1992). A sequência da alça 1 é conservada em quimotripsina e é distinta da alça 1 também conservada das tripsinas. A sequência da alça 2 também é conservada dentre as quimotripsinas, enquanto as tripsinas apresentam 2 motivos de estrutura idêntica para esta região. Além disso, as seqüências e estruturas das alças 1 e 2 também são conservadas dentre as elastases e distintas das alças de tripsina e quimotripsina. Estas

observações sugerem que as alças 1 e 2 sejam determinantes gerais de especificidade nesta família de serina endopeptidases. A caracterização cinética do mutante Tr-Ch [S1+L1+L2] (mutante de tripsina para quimotripsina com as mutações do subsítio S1 mais a substituição das duas alças) permitiu verificar que a ligação ao substrato esta afetada neste mutante reduzindo a relação k_{cat}/K_m 1000 vezes em relação à quimotripsina selvagem, indicando que o mutante existe em duas conformações: uma inativa na qual o S1 encontra-se deformado e uma espécie minoritária ativa que é estabilizada em altas concentrações de substrato. Estas observações indicavam que a construção de mutantes que estabilizassem a estrutura das alças 1 e 2 seriam mais eficientes. Uma nova série de mutantes Tr-Ch [S1+L1+L2+Y172W] (mutante de tripsina para quimotripsina com as mutações do subsítio S1 mais a substituição das duas alças e a troca do resíduo de tirosina da posição 172 por um resíduo de triptofano) foi construída (Hedstrom et al., 1994). Esta substituição gera uma enzima 10 vezes mais ativa sobre substrato específico de quimotripsina do que o mutante anterior, resultando em uma enzima com 15% da atividade quimotríptica de uma enzima selvagem. Da mesma forma, a substituição dos resíduos de uma quimotripsina por seus análogos de tripsina não convertem uma quimotripsina em uma endopeptidase com especificidade de tripsina (Venekei et al., 1996). Estes resultados indicam que outros determinantes estruturais da especificidade pelo substrato na família das tripsinas ainda devem ser identificados. É também bastante claro que a ocupação dos outros subsítios de ligação (subsítios de especificidade secundária), além daquele que contém a tríade catalítica nas serina endopeptidases, contribui para um aumento da eficiência catalítica dado que tanto tripsina, quimotripsina quanto elastases hidrolisam oligopeptídeos com maior eficiência do que substratos com apenas um aminoácido, como B-R-pNa (Hedstrom et al., 1992; Thompson e Blout, 1973). Estudos cinéticos dos mutantes Tr-Ch[S1+L1+L2] e Tr-Ch[S1+L1+L2+Y172W] mostram que estas enzimas hidrolisam com maior eficiência substratos oligopeptídicos do que substratos de apenas um aminoácido. Esta observação indica que as duas alças de superfície têm um papel importante na tradução da energia de ligação das interações nos subsítios S2-S4 na catálise da hidrólise do substrato. A co-cristalização do mutante na posição 172 com Succinil-AlaAlaProPhe clorometil cetona demonstrou que a base estrutural da discriminação do passo de acilação está na habilidade da alça 2 em especificar a

conformação do resíduo Gly216, o qual forma duas pontes de hidrogênio com o esqueleto carbônico do resíduo de aminoácido presente em P3. A mutação Y172W propaga mudanças estruturais na base do subsítio S1, resultando em um aumento da afinidade de ligação favorável aos substratos de quimotripsina (Perona et al., 1995). A posterior comparação de 500 enzimas homólogas dentro desta família, que apresentam mecanismo catalítico idêntico e especificidade por substrato variável, demonstrou que a variabilidade é uma função da diversidade das estruturas das superfícies das alças que circundam o sítio estendido de ligação. As alças são conservadas nas suas posições relativas em relação a região N-terminal da ligação a ser hidrolisada, bem como a C-terminal desta, podendo ter diferentes funções. Determinantes estruturais de especificidade secundária também estão descritos: duas alças determinam a especificidade do subsítio S1' (alça 40 e alça 60) (Kurth et al., 1997) e o resíduo 225 (Tyr ou Pro) (Guinto et al., 1999). Quimotripsinas hidrolisam preferencialmente substratos que apresentam Arg/Lys em P1'. Esta preferência é atribuída a interações eletrostáticas com os resíduos Asp35 e Asp64. Já as tripsinas não contêm resíduos carregados negativamente nestas alças e têm um caráter mais hidrofóbico, justificando a preferência destas enzimas por resíduos hidrofóbicos nesta posição. Tripsinas e quimotripsinas também diferem quanto à especificidade do S2', sendo que tripsina prefere resíduos positivamente carregados em P2' e quimotripsina prefere resíduos hidrofóbicos (Schellenberger et al., 1994; Kurth et al., 1997). Os determinantes estruturais de S2' estão localizados em regiões análogas nas 2 enzimas. No complexo tripsina-BPTI, Glu 151 forma uma ponte salina com Arg em P2' e a Asn 143 também está em contato com Arg em P2'. Em quimotripsina o resíduo 151 é Thr enquanto 143 é Leu, resultando na preferência de quimotripsina por resíduos hidrofóbicos em P2'. A mutação das alças determinantes estruturais da especificidade do subsítio S1' da tripsina pelas alças análogas da quimotripsina, diferentemente dos resultados obtidos para S1, leva à troca da especificidade neste subsítio, sem interferir no entanto, na especificidade do sítio S1 (Kurth et al., 1997). Estes estudos demonstram a importância da caracterização da especificidade tanto primária quanto secundária (subsítios de ligação) de serina-endopeptidases.

Métodos espectrofotométricos comumente utilizados para a determinação da atividade de tripsina e para o estudo de sua especificidade são baseados na

hidrólise de p-nitroanilidas, β -naftilamidas e metil cumarinas derivadas de arginina ou lisina. Nestes substratos, o cromóforo ou fluoróforo está diretamente envolvido na ligação peptídica que será hidrolisada, sendo que a quebra resultará em uma mudança espectral significativa pela conversão de uma amida aromática em uma amina aromática. Estudos da especificidade dos subsítios S1, S2 e S3 foram realizados com estes tipos de substratos (Juliano e Juliano, 1985). Estes substratos, no entanto, não permitem a caracterização da especificidade dos subsítios S'.

Duas metodologias podem ser utilizadas para a caracterização dos subsítios S'. Uma delas tem por base a construção de peptídeos com fluorescência apagada (Oliveira et al., 1992 e Grahn et al., 1998). A transferência de energia não radiante é um fenômeno no qual a excitação de um cromóforo fluorescente (o doador) transfere a sua energia de excitação para o outro cromóforo (aceptor), conforme esquema da Figura 5. Esta transferência resulta no apagamento da fluorescência do doador e o aparecimento da fluorescência do acceptor, mesmo este não sendo excitado diretamente. A clivagem enzimática resulta na separação do doador e do acceptor por difusão, o que ocasiona um rompimento na transferência de energia. Este efeito é utilizado para a determinação da atividade enzimática pela monitoração de um aumento de fluorescência do acceptor (Katchalski, 1973). A outra metodologia tem por base a taxa de acilação (Figura 6). A enzima livre (EH) e um doador acil (Ac-X) formam um complexo e, subseqüentemente, um acil-enzima Ac-E. Este complexo pode ser atacado por uma molécula de água levando à formação do produto Ac-OH ou, alternativamente, por um peptídeo nucleófilo adicionado (R-NH₂), sendo formado um produto Ac-N, sendo esta reação o inverso da acilação da enzima por um substrato peptídico. Conseqüentemente, os dois processos têm a mesma especificidade. Estes estudos combinados com estudos de cristalografia utilizando co-cristais de enzima e substrato ou enzima e inibidores permitiram verificar para tripsinas e quimotripsinas de mamífero que: aminoácidos volumosos em P1' e P3' provavelmente formam contatos com as mesmas regiões da superfície da enzima dado que S1'e S3' apresentam especificidades muito semelhantes e a variação do volume dos resíduos que ocupam, por exemplo, em P3' afeta a especificidade de S1'. Desta forma pode-se concluir que as cadeias laterais de P1'e P3' apontam para uma mesma direção, enquanto P2' aponta para a direção oposta. A estrutura do cristal sugere ainda que a cadeia lateral de P2' liga-se a uma região da superfície da

Figura 5: Representação esquemática do sistema de fluorescência apagada, demonstrando as transferências de energia entre o doador e o apagador.

Figura 6: Representação esquemática da reação de transferência de grupos acil catalisada por serina endopeptidases

enzima que é delimitada pela His40 e Tyr151 na tripsina e pela His40 e Leu143 em quimotripsina (Schellenberger et al., 1994). A caracterização da especificidade dos subsítios S1' (Lopes, 1999, Marana et al., 2002) e S2' (dados apresentados nesta tese) foi realizada para tripsinas de diferentes insetos com a utilização de peptídeos de fluorescência apagada e será discutida adiante.

1.3.3. Aspectos estruturais e interação com inibidores

Inibidores de peptidases estão presentes em todos os sistemas vivos e desempenham papel fundamental em muitos processos fisiológicos regulando a atividade de suas peptidases alvo. A maioria dos inibidores protéicos de peptidases conhecidos e caracterizados é específica para serina-endopeptidases. Estes inibidores podem ser classificados em 18 diferentes famílias baseando-se em similaridade de suas sequências, similaridade topológica e mecanismos de ligação. Estes inibidores formam complexos muito estáveis com as enzimas apresentando valores de K_i da ordem de 10^{-7} a 10^{-13} M. (Laskowski e Kato, 1980; Bode e Huber, 1992). Tais inibidores apresentam uma alça de ligação exposta, denominada sítio reativo, a qual liga-se à enzima. Representantes das diferentes famílias têm conformações completamente diferentes, no entanto, a conformação da cadeia principal do segmento P3-P3' é similar (Bode e Huber, 2000; Otlewski et al., 2001). Esta conformação, denominada conformação padrão ("canonical conformation"), forma uma alça de forma convexa que se liga ao sítio ativo côncavo da enzima cognata. Além das interações formadas pelo sítio reativo, as cadeias laterais de outros resíduos fazem numerosas interações de van der Waals e pontes de hidrogênio com a peptidase alvo. Um número semelhante de resíduos do inibidor (de 10 a 12 resíduos) faz contato com a enzima (20-25 resíduos) apresentando áreas de contato proteína-proteína semelhantes de cerca de 600-900 Å. A interface é predominantemente hidrofóbica. Apesar disso, várias pontes de hidrogênio e algumas interações eletrostáticas são formadas. A maioria dos inibidores de serina endopeptidases liga-se à sua enzima alvo de forma semelhante a um substrato: quanto a especificidade e quanto a formação de uma folha β anti-paralela curta entre os resíduos P3-P1 do substrato e resíduos 214-216 da enzima; contato entre o carbono da carbonila de P1 e o O_γ da Ser195 e duas pontes de hidrogênio formadas

entre o oxigênio da carbonila de P1 e as amidas dos resíduos Gly193/Ser195 (bolso oxiânion). Tripsina, devido à localização e orientação única na base de um sítio estreito e profundo é particularmente adequada para interagir com as cadeias laterais de resíduos de Arg e Lys. Esta especificidade é válida tanto para substratos quanto para inibidores. No entanto, quimotripsina, que apresenta um sítio maior e mais hidrofóbico, pode interagir com uma série maior de resíduos para inibição, como por exemplo, Arg e Lys. Esta interação é explicada pela conformação adotada pelo resíduo P1 Lys, por exemplo no complexo BPTI-quimotripsina (Scheidig et al., 1997). A interação enzima-inibidor é particularmente rígida lembrando o modelo chave-fechadura. Tanto k_{cat} quanto K_m são muito baixos, portanto, os inibidores protéicos são hidrolisados lentamente por peptidases. Dois modelos podem explicar a distinção entre as diferentes taxas de hidrólise de moléculas de substrato e inibidores protéicos de endopeptidases. No primeiro modelo a enzima se liga ao inibidor de tal forma que interações não covalentes favoráveis no complexo enzima-inibidor tem que ser perturbadas na formação de um complexo enzima-estado de transição. Desta forma, a alta energia de ligação do complexo é utilizada para aumentar a energia do estado de transição para a clivagem da ligação. No segundo modelo, seguindo a clivagem da ligação peptídica do sítio reativo, a nova extremidade gerada é mantida tão próxima do complexo inibidor modificado-endopeptidase acil enzima fazendo com que a ligação peptídica se forme-se novamente. A ligação "tight-binding" inibe a hidrólise do complexo covalente acil-enzima impedindo a entrada de uma molécula de água no sítio ativo (Longstaff et al., 1990; Perona et al., 1993).

Inibidores protéicos são moléculas fundamentais na complementação dos estudos de especificidade. Por exemplo a introdução de cadeias laterais longas em P1' aparentemente levam a uma cascata de pequenas alterações da interface tripsina-BPTI, desestabilizando o complexo. A análise por raio X da estrutura do complexo formado pela β -tripsina bovina e o mutante P1'-Leu de BPTI mostra conflitos entre P1'-Leu e a cadeia lateral de P3'-Ile, a qual é forçada a rotar aproximadamente 90°. Ile18(P3') na sua nova orientação, interage com a Tyr39 da tripsina (Grzesiak et al., 2000). Da mesma forma, mutantes de BPTI em P3 e P4 mostram diferenças de especificidade.

1.4. Serina endopeptidases em insetos

1.4.1. Tripsinas digestivas em insetos.

Tripsinas são enzimas digestivas comuns à maioria dos insetos, estando várias destas enzimas já purificadas (Terra e Ferreira, 1994, Lopes e Terra, 2003) e sequenciadas. Um total de 109 tripsinas de insetos foram registradas no GenBank (www.ncbi.nih.gov), correspondendo a 34 espécies pertencentes a 5 diferentes ordens. Exemplos podem ser encontrados entre os Hemiptera (Zeng et al., 2002), Coleoptera (Girard e Jouanin, 1999; Wu et al., 1999), Diptera (Davis et al., 1985; Barillas-Mury et al., 1993), Siphonaptera (Gaines et al., 1999) e Lepidoptera (Peterson et al., 1994; Zhu et al., 2000). As tripsinas de insetos e vertebrados apresentam propriedades gerais bastante semelhantes como: peso molecular (20-35 kDa), ponto isoelétrico (4 – 5), pH ótimo (8 – 9). Além disso, várias porções de suas sequências são conservadas, como: sequência N-terminal (IVGG), resíduos envolvidos em catálise (His57, Asp102 e Ser195), três pares de cisteínas para a formação de pontes de dissulfeto e resíduo de especificidade primária Asp189. Apesar disso, há distinções entre as tripsinas de insetos e vertebrados, como a não estabilização por cálcio nas tripsinas de insetos e respostas diferenciadas a inibidores protéicos de tripsina (Applebaum, 1985, Purcell et al., 1992, Terra e Ferreira, 1994).

Caracterizações da especificidade das endopeptidases em insetos haviam sido realizadas para alguns representantes de poucas ordens; Hymenoptera (*Vespa crabro* e *Apis mellifera*) (Giebel et al., 1971 e Jany et al., 1978a,b), Lepidoptera (*Pieris brassicae*, *Manduca sexta* e *Tineola bisselliella*) (Lecadet e Dedonder, 1966; Miller et al., 1974 e Ward, 1975) e Diptera (*Hypoderma lineatum*) (Tong et al., 1981). Estes estudos eram realizados usando polipeptídeos como substrato (geralmente cadeia β da insulina) e mostravam que as tripsinas de insetos são similares, mas não idênticas, às tripsinas de mamíferos. Entretanto, parte dessas análises foi realizada de forma semi-quantitativa, necessitando de uma caracterização mais detalhada e profunda. Além disso, estes estudos foram realizados em poucas

ordens de insetos e em espécies pouco representativas dentro da ordem estudada (por exemplo, *Hypoderma lineatum*, Diptera).

A purificação de tripsinas de insetos de quatro diferentes ordens (Cristofolletti et al., 2001, Lopes, 1999, Lopes e Terra, 2003), bem como a caracterização da especificidade da atividade de tripsina de diferentes insetos quanto à hidrólise preferencial de peptídeos apresentando Arg ou Lys em P1, demonstra que as diferentes ordens de insetos apresentam diferentes eficiências de hidrólise de peptídeos que apresentem estes resíduos, sendo que insetos da ordem Lepidoptera hidrolisam preferencialmente substratos P1 Lys (Lopes et al., 2004 e dados apresentados nesta tese). Além disso, a caracterização cinética da especificidade dos subsítios de ligação das enzimas purificadas, com a utilização de substratos de fluorescência apagada, permitiram verificar que estas enzimas apresentam diferentes especificidades (Lopes, 1999), que estes subsítios diferem quanto ao favorecimento da ligação da enzima ao substrato ou da catálise (Marana et al., 2002) e quanto à sua hidrofobicidade (Lopes, 1999 e dados apresentados nesta tese). As possíveis implicações da alteração de especificidade e hidrofobicidade dos subsítios de ligação das tripsinas de insetos serão apresentadas nesta tese.

1.4.2. Quimotripsinas digestivas em insetos

A presença de quimotripsinas está demonstrada em uma série de ordens de insetos como Diptera (Shukle et al., 1985, Casu et al., 1994; de Almeida et al., 2003), Hymenoptera (Jany et al., 1983, Withworth et al., 1998), Orthoptera (Sakal et al., 1988), Dictyoptera (Baumann, 1990), Coleoptera (Girard e Jouanin, 1999; Zhu e Baker., 2000), Siphonaptera (Gaines et al., 1999) e Lepidoptera (Peterson et al., 1995; Zhu et al., 1997; Valaitis et al., 1999, Kotani et al., 1999 e Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001b), além das salivares descritas em Heteroptera (Colebatch et al., 2002). Ao todo estão descritas 63 sequências completas registradas no GenBank (Março 2003) correspondendo a 22 espécies. Todas as sequências contêm um peptídeo sinal, um peptídeo de ativação, a tríade catalítica característica das serina endopeptidases, três pares de cisteínas, porção N-terminal conservada e Ser/Gly/Tyr na posição 189 que confere a especificidade de quimotripsina. As quimotripsinas de insetos apresentam peso molecular de 20-30 kDa, pH ótimo de 8-

11 e diferem das quimotripsinas de mamíferos pela sua instabilidade a pHs ácidos, padrão de inibição por SBTI (Terra e Ferreira, 1994) e, finalmente, pela sua reatividade a T-F-CK, como discutido posteriormente. Apesar da presença de quimotripsina em diferentes ordens de insetos, esta enzima não está tão bem descrita quanto tripsina neste grupo devido a fatores limitantes como: (a) dificuldade de demonstração da especificidade de endopeptidases sobre substratos protéicos; (b) ausência de modificação por T-F-CK nas concentrações utilizadas para a quimotripsina de mamíferos; (c) ausência de atividade sobre substratos como B-Y-pNa, Suc-F-pNa, substratos utilizados na identificação da quimotripsina de mamíferos e (d) dificuldade de distinção das atividade de quimotripsina e elastase sobre substratos como Suc-AAPL-pNa. Lee e Anstee (1995) demonstraram que as quimotripsinas de insetos apresentam um sítio de ligação estendido, hidrolisando preferencialmente substratos peptídicos com um número de resíduos igual ou superior a três. Já as quimotripsinas de mamíferos hidrolisam substratos como B-Y-pNa apesar de também apresentarem sítio estendido. A ausência de modificação das quimotripsinas por T-F-CK, descrita para *Spodoptera littoralis* (Lee e Anstee, 1995), *Lacanobia oleracea* (Gatehouse et al., 1999) e *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* (Mazumdar-Leighton e Broadway., 2001) todos estes insetos pertencentes à família Noctuidae da ordem Lepidoptera, foi atribuída ao fato de este modificador apresentar um único resíduo de aminoácido, que não seria suficiente para interagir com a quimotripsina de insetos. No entanto, as quimotripsinas de *Locusta migratoria* (Sakal et al., 1988) bem como a de *Solenopsis invicta* (Withworth et al., 1998) foram modificadas por T-F-CK. A determinação da estrutura tridimensional da quimotripsina de *Solenopsis invicta* (Botos et al., 2000) indica que há algumas diferenças entre as quimotripsinas de insetos e a quimotripsina bovina incluindo mecanismo de ativação e substituições no subsítio S1 e , principalmente, nos outros subsítios (S4-S4') sugerindo diferentes especificidades em relação a substratos e inibidores, tornando necessário um estudo mais detalhado da especificidade das quimotripsinas de insetos.

1.4.3. Elastases digestivas em insetos

Elastases são as serina-endopeptidases menos caracterizadas em insetos, estando descritas em *Teleogryllus commodus* (Christeller et al., 1990), *Lymantria dispar* (Valaitis et al., 1995) e *Solenopsis invicta* (Withworth et al., 1999). Outras atividades semelhantes a elastases foram descritas para outros insetos. Para a detecção da atividade de elastase utiliza-se Suc-AAPL-pNa como substrato combinada com a observação de ausência de atividade sobre B-Y-pNa ou B-Y-ee e resistência a T-F-CK. No entanto, muitas quimotripsinas hidrolisam Suc-AAPL-pNa e não são capazes de hidrolisarem B-Y-pNa ou B-Y-ee não sendo também inativadas na presença de T-F-CK. Esta semelhança nas atividades de quimotripsinas e elastases dificulta a identificação destas enzimas. As elastases de *Solenopsis invicta* (E1 e E2) hidrolisam substratos típicos de elastase como Suc-APA-pNa e Suc-AAPV-pNa (Bieth et al., 1974) e não hidrolisam substratos contendo Phe em P1. Uma destas elastases (E2) foi clonada, seqüenciada e apresenta maior similaridade com elastase do que com quimotripsina (Withworth et al., 1999). No entanto, uma caracterização mais detalhada destas enzimas faz-se necessária de forma a avaliar a sua importância na digestão em insetos.

1.5. Coevolução de enzimas digestivas e plantas

Cerca de 70% das espécies animais descritas pertencem ao grupo dos insetos (Figura 7), sendo que dentre estes muitos são herbívoros. Levando-se em conta que uma única lagarta de mariposa consome várias vezes o seu peso por dia, o consumo de biomassa vegetal seria tão grande que não permitiria a existência das plantas nem na quantidade nem na diversidade que conhecemos hoje. Este simples fato indica que de alguma forma as plantas apresentam mecanismos de defesa contra seus predadores.

A defesa das plantas está baseada em fatores físicos e químicos. Defesas físicas contra herbívoros são facilmente reconhecíveis: depósitos de cutícula, espinhos, tricomas entre outras. A defesa química, no entanto, constitui um mecanismo mais importante e complexo com substâncias tóxicas e repelentes produzidas pela planta.

Figura 7: Representação gráfica da distribuição de espécies animais descritas.

As toxinas vegetais são, na sua maioria, sintetizadas em uma das três principais vias biossintéticas: terpenóides (mevalonato), compostos fenólicos (ácido chiquímico) ou compostos nitrogenados (aminoácidos) e, para alguns complexos específicos, como poliacetilenos, são utilizadas vias de biossíntese de ácidos graxos. Uma mesma espécie vegetal pode apresentar mais de um tipo de composto tóxico originário de diferentes vias, enquanto outras espécies podem apresentar poucos compostos tóxicos como as gramíneas. Alguns destes compostos podem gerar adaptações de comportamento dos insetos, disparar sistemas de defesa e podem afetar enzimas digestivas.

As plantas, de uma forma geral, apresentam uma vasta capacidade metabólica e produzem muitos compostos secundários tóxicos, anti-nutricionais ou adversos aos seus predadores como, por exemplo, os terpenóides, glicosídeos cianogênicos e saponinas, os quais conferem proteção contra os insetos. Cerca de 2.000 espécies vegetais distribuídas por 110 famílias de angiospermas apresentam compostos cianogênicos, os quais têm sido demonstrados como importantes substâncias para redução de herbivoria. A hidrólise de um glicosídeo cianogênico leva à separação do glicone e do aglicone, ao qual está associado o precursor de HCN. Após a separação, o cianeto é liberado espontaneamente. Apesar da toxicidade do cianeto, tem sido demonstrado que não só este, mas também o aglicone é extremamente tóxico apresentando atividade biológica. Dentre estes glicosídeos cianogênicos alguns liberam cetonas quando clivados. Dentre estes glicosídeos estão os glicosídeos cianogênicos ciclopentenóides. A hidrólise dos glicosídeos ciclopentenóides produz cetonas que são quimicamente muito diferentes das cetonas aromáticas ou alifáticas encontradas em outros aglicones. Devido à insaturação do anel 2,3-dieno estar associada ao carbono-1, estas cetonas possuem um sistema de α,β -insaturação, o qual é muito favorável a reações de adição nucleofílicas, levando à alquilação de uma série de moléculas de importância biológica. A associação de ciclopentenonas a outros grupos pode ainda conferir uma certa especificidade de alquilação a estas cetonas. (Spencer, 1987).

Ehrlich e Raven (1964) foram os primeiros autores a proporem a teoria de coevolução bioquímica, processo no qual a síntese de determinados compostos secundários vegetais tóxicos estaria diretamente relacionada aos seus predadores,

na maioria dos casos, insetos. De acordo com esta teoria um cenário evolutivo pode ser visualizado no qual a produção e acúmulo de uma toxina particular (por exemplo: alcalóides) é seguida da resposta recíproca no inseto, como a adaptação por sistemas de detoxificação e excreção, desta forma podendo se alimentar da planta. Como apenas algumas espécies adaptam-se a esta, ocorre apenas uma predação limitada ocorrendo um balanço entre a planta e o inseto. O modelo mais bem estudado de coevolução inseto-planta é a interação da borboleta *Heliconius* (Lepidoptera) com o maracujá *Passiflora*. *Passiflora* apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários tóxicos, dentre estes, vários compostos cianogênicos. Em contrapartida, a alta especialização de *Heliconius* em alimentar-se destas plantas e o seu sucesso chamam atenção para as possíveis adaptações de seu metabolismo.

Já um grupo mais reduzido de plantas tem por mecanismo de proteção a produção de proteínas com algum efeito tóxico. Como estas proteínas não podem ser volatilizadas, este mecanismo tem como alvo o sistema digestivo de seus predadores.

Outro modelo coevolutivo tem sido cada vez mais estudado: plantas que produzem inibidores protéicos de enzimas digestivas e insetos. Estas proteínas podem ser inibidores de enzimas fundamentais na digestão em insetos, como inibidores de endopeptidases e inibidores de amilases, sendo que as duas enzimas estão envolvidas na digestão inicial de proteínas e carboidratos, respectivamente. Dentre os inibidores de endopeptidases, os mais freqüentemente descritos são inibidores de serina-endopeptidases que incluem inibidores principalmente das famílias Kunitz, Bowman-Birk e inibidor de batata II. Inibidores de cisteína endopeptidases são descritos como é o caso da cistatina de arroz (orizacistatina) e mais recentemente inibidores de aspártico endopeptidases foram descritos. A demonstração do mecanismo pelo qual as plantas produzem inibidores de endopeptidases foi proposto por Ryan (1978), quando este autor demonstrou que, ferimentos artificiais ou causados pelo inseto, nas plantas ocasionam um acúmulo de inibidores de endopeptidases que não têm efeito sobre estas enzimas da planta, mas que são capazes de inibir as endopeptidases digestivas do inseto. Este aumento da produção de inibidores de proteinases não é apenas verificado na folha atacada, mas em toda a planta. A produção generalizada destes inibidores é

controlada por um fitormônio; a sistemina, a qual está, aparentemente, relacionada à ativação dos genes produtores de inibidores de proteinase. A sistemina é um peptídeo de 18 aminoácidos rico em prolinas que apresenta uma estrutura terciária do tipo Z folha β -pregueada que é uma estrutura típica de proteínas que interagem com DNA, sendo esta uma evidência do mecanismo de ação da sistemina (Barciszewski et al., 1997).

Uma série de inibidores vegetais apresenta resultados positivos na inibição do desenvolvimento de insetos (Pompermayer et al., 2001). Por outro lado, existem evidências que têm mostrado que os insetos podem adaptar-se à ingestão de inibidores de endopeptidases de origem vegetal, superexpressando endopeptidases digestivas ou induzindo a produção de novas endopeptidases insensíveis a estes inibidores (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001a,b, Brito et al., 2001, Paulillo et al., 2000, Broadway, 1996; Jongsma e Bolter, 1997; Bown et al., 1997, Gatehouse et al., 1997 e Jouanin et al., 1998).

Além disso, os insetos apresentam diferentes níveis de resistência aos inibidores, sendo mais ou menos capazes de responder a uma molécula específica, assim como, também são capazes de produzir respostas diferenciadas a famílias distintas de inibidores, quando estes estão presentes em dietas artificiais ou na sua alimentação natural (Gatehouse et al., 1997; Broadway, 1997).

1.6. Análises e estudo de sequências de serina-endopeptidases em insetos

Com o advento de projetos genoma e a ampliação da facilidade de seqüenciamento de DNA, uma série de informações estão disponíveis e estas podem ser submetidas a diferentes metodologias de análise. A combinação de dados bioquímicos, modelos estruturais e sequências tem permitido a comprovação de uma série de hipóteses envolvendo a determinação de especificidade de serina-endopeptidases em insetos, o desenvolvimento de resistência por estes a inibidores vegetais, mutações envolvidas em mecanismos adaptativos a compostos secundários de plantas e outras.

Os dados de sequência têm permitido também a caracterização de grupos dentre as proteínas de insetos, bem como o desenvolvimento de hipóteses

filogenéticas para o surgimento de adaptações. Uma metodologia de interesse para a análise de agrupamento de proteínas é a análise por metodologia de distância.

1.7. Análises baseadas em matrizes de distância

A construção e estudo de árvores evolutivas, isto é, de uma representação gráfica das informações sobre o grau de parentesco entre espécies vivas e ancestrais, tem permitido o teste de uma série de hipóteses de coevolução e adaptação (Futuyma, 1986). Árvores evolutivas podem ser inferidas por três classes de métodos: (1) Métodos de matriz de distância, que constroem um dendrograma a partir de uma matriz de distâncias, (2) Métodos de Parcimônia, que analisam distribuições de caracteres (e não distâncias entre grupos) e buscam a topologia que apresenta o menor número de mudanças de caráter e (3) Métodos de verossimilhança, que buscam a topologia que apresenta a maior probabilidade de ter gerado os dados observados, assumindo determinado modelo de mudança evolutiva.

Distâncias genéticas quantificam o grau de diferenciação entre dois grupos ou *taxa*, podendo quantificar a transformação evolutiva que ocorreu desde que 2 *taxa* se separaram. Há uma série de métodos tanto para cálculo de matrizes de distância quanto para a inferência de árvores a partir destas matrizes. As análises baseadas em matrizes de distância podem ser realizadas por diferentes métodos sendo que aqui serão descritas as metodologias de ligação média ou “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean” (UPGMA) (Michner e Sokal, 1957 em Meyer, 1994) e de Neighbor Joining (NJ). As duas metodologias constituem análises de “cluster” ou agrupamento, pois agrupam sucessivamente pares de *taxa* de acordo com o nível de similaridade. Em UPGMA o algoritmo opera da seguinte forma:

- o par de *taxa* mais semelhantes é unido. Esse par fica separado por uma distância idêntica ao valor que os separa na matriz de distâncias e um nó é posicionado exatamente a meio caminho entre os dois.
- O par de *taxa* recém unido passa a ser considerado um novo táxon (táxon composto). A sua distância aos demais é calculada da seguinte forma: a distância entre um táxon composto e um individual é a média aritmética das distâncias entre cada um dos dois *taxa* que compõem a

unidade composta e o táxon em relação ao qual ele esta sendo comparado. A menor distância determina quais *taxa* devem ser unidos, novamente posicionando o nó exatamente no meio do caminho entre os dois *taxa*.

Este procedimento é repetido até que todos os *taxa* tenham sido incorporados ao dendrograma.

Esse método gera um dendrograma no qual os ramos que partem de um mesmo nó apresentam necessariamente o mesmo comprimento. Árvores com esta simetria baseiam-se no pressuposto de que as taxas evolutivas são constantes. Neste requisito reside a limitação da metodologia "UPGMA", pois é sabido que as taxas de evolução podem variar entre as linhagens evolutivas. Apesar deste tipo de análise não ser o mais adequado, alguns autores (Zhu et al., 1997) têm seguido esta metodologia.

Saitou e Nei (1987) propuseram um algoritmo para obter uma topologia que não requer o pressuposto de taxas constantes de evolução denominado de Neighbor Joining (NJ). O algoritmo de NJ é mais complexo do que o de UPGMA, mas em linhas gerais opera através da adição sucessiva de *taxa* a um núcleo inicial, sempre incorporando novos *taxa* de modo a minimizar o aumento do tamanho da árvore. Esta metodologia tem sido a metodologia mais aceita para estimativas de distância e tem sido utilizada em análises de sequências de diferentes proteínas de insetos (Vizioli et al., 2001, Theodorides et al., 2002 e Luque e O'Reilly, 2002).

2. Objetivos deste estudo

Este estudo tem como objetivo a caracterização da especificidade de serina-endopeptidases de insetos em relação a diferentes substratos e inibidores, bem como caracterizar grupos envolvidos em catálise e estudos estruturais destas enzimas em insetos. Os resultados obtidos serão relacionados a processos co-evolutivos da interação inseto-planta.

3. Materiais e métodos

3.1 . Insetos

3.1.1. *Periplaneta americana*

Adultos de *Periplaneta americana* foram adquiridos no setor de Nutrição da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e adaptados por duas semanas a uma dieta de aveia (Quaker). O fornecimento de água era realizado através de algodão umedecido com água. Machos de *Periplaneta americana* foram imobilizados em atmosfera de gás carbônico, colocados em gelo e dissecados em solução NaCl 225 mM preparada com água bi-destilada e os intestinos anterior e médio assim como seus conteúdos eram isolados e congelados a -20°C até a utilização. Machos adultos de *Periplaneta americana* também foram dissecados em solução NaCl 225 mM esterilizada contendo DEPC sob estereomicroscópio com a utilização de lâminas e pinças previamente esterilizadas a 150°C por, no mínimo, 3 horas. Os intestinos médios deste inseto foram isolados e subdivididos em conteúdo luminal e epitélio ventricular. Os epitélios foram transferidos para microtubos previamente lavados em água contendo DEPC e autoclavados, dispostos em um banho de gelo seco e etanol para congelamento imediato das amostras, de forma a preservar o RNA presente nestas. Estas amostras foram mantidas a -80°C até sua utilização.

3.1.2. *Tenebrio molitor*

Culturas estoques de *Tenebrio molitor* (Coleoptera), são mantidas sob fotoregime natural em farelo de trigo a $24-26^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 70-75%. Larvas de último estágio (cada uma pesando cerca de 0,12 g). O epitélio do intestino médio destas larvas foi dissecado em salina 342 mM contendo DEPC.

3.1.3. *Musca domestica*

Larvas de *Musca domestica* (mosca comum; Diptera, Cyclorrhapha: Muscidae) são criadas à temperatura média de 24°C e luz constante em uma mistura de ração comercial para porcos e palha de arroz (1:2 v/v) umedecidas e fermentadas (Targa e Peres, 1979). Foram utilizadas neste estudo larvas do terceiro ínstar larval que se alimentavam ativamente. Para preparações de RNA foi seguido o protocolo descrito para *Periplaneta americana*.

3.1.4. *Diatraea saccharalis*

As larvas de *Diatraea saccharalis* (broca da cana; Lepidoptera: Pyralidae) utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Prof. Dr. J.R.P. Parra do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Estas larvas são criadas em dieta artificial (Parra e Mihsfeldt, 1992). Foram utilizados insetos do último estágio larval que apresentavam o tubo digestivo repleto de alimento.

As larvas de *Diatraea saccharalis* são imobilizadas em gelo e dissecadas em solução NaCl 125 mM gelada sob estereomicroscópio. O intestino médio deste inseto foi subdividido em conteúdo luminal e epitélio ventricular, sendo utilizado apenas o conteúdo luminal como fonte de tripsina e quimotripsina. Os conteúdos luminais são homogeneizados em água bidestilada gelada com a utilização de um homogeneizador tipo Potter–Elvehjem. Este homogeneizado é centrifugado a 20.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação é filtrado em lã de vidro e mantido a –20 °C até o uso. As dissecções para preparação de RNA total foram feitas como descrito no item 3.1.1.

3.1.5. *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) foi criada em laboratório de acordo com Parra (1986). As larvas são individualmente distribuídas em tubos de vidro com dieta baseada em feijão (*Phaseolus vulgaris*), germe de trigo, levedura e agar e foram mantidas sob fotoregime natural a 25 °C. Larvas de quinto ínstar de ambos os sexos foram utilizadas nos experimentos.

3.1.6. Outros insetos

Para os experimentos de modificação química e caracterização cinética de quimotripsinas de insetos foram utilizados homogeneizados de insetos representantes de algumas diferentes ordens com o objetivo de observar alguma alteração de especificidade de suas enzimas.

Homogeneizados em água bidestilada gelada foram preparados utilizando homogeneizadores do tipo Potter – Elvehjem para: intestino médio de larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae) e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), intestino médio de fêmeas adultas de *Aedes aegypti* (Diptera) e intestino médio de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera). Estes homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 4°C por 30 minutos a 20.000 g. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados como fonte de enzimas.

3.2. Quimotripsina bovina

Para os experimentos de modificação química e caracterização cinética da quimotripsina de mamífero foi utilizada uma preparação em água bidestilada de 1,0 mg/mL de quimotripsina do Tipo I-S de pâncreas bovino (Sigma nº C-7762). Esta preparação foi mantida a -20°C até a utilização.

3.3. Preparo das amostras

Homogeneizados em água bidestilada gelada foram preparados utilizando homogeneizadores do tipo Potter – Elvehjem para todos os insetos citados anteriormente. Estes homogeneizados foram submetidos a centrifugação a 4°C por 30 minutos a 20.000 g. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados em lã de vidro e utilizados como fonte de enzimas.

3.4. Ensaios enzimáticos e determinação de proteína

Determinações fluorimétricas e colorimétricas da atividade de tripsina das diferentes preparações foram realizadas com a utilização de três substratos cumarínicos: Benzoil-Arginina-7-amida-4-metil-cumarina (B-R-MCA Sigma-Aldrich), Carbobenzoxi-Phe-Arg-7-amida-4-metil-cumarina (Z-R-MCA Sigma-Aldrich) e Succinil-Ala-Phe-Lys-7-amida-4-metil-cumarina (Suc-AFK-MCA), todos na concentração de 0,01 mM e um substrato colorimétrico benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (B-R-pNa) 0,83 mM em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 a 30 °C. As reações são interrompidas pela adição de ácido acético 30%. A detecção dos produtos de hidrólise dos substratos fluorescentes foi realizada em um fluorímetro (F2000-Hitachi, Japão), utilizando um comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para detecção da emissão de fluorescência (Alves et al., 1996) e do substrato colorimétrico pela utilização de espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 410 nm (Erlanger et al., 1961). Determinações fluorimétricas e colorimétricas da atividade de quimotripsina das diferentes preparações foram realizadas com a utilização de dois substratos cumarínicos: Succinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metil-cumarina (Suc-AAF-MCA-Sigma-Aldrich) e Succinil-Leu-Tyr-7-amido-4-metil-cumarina (Suc-LY-MCA-Sigma-Aldrich), todos na concentração de 0,01 mM em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 a 30°C e três substratos colorimétricos benzoil-DL-Tyr-p-nitroanilida (B-Y-pNa ou B-T-pNa), Succinil-Phe-p-nitroanilida (Suc-F-pNa) e Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (Suc-AAPF-pNa), sendo que os substratos colorimétricos foram preparados nas concentrações de 100 mM, 100 mM e 1,0 mM respectivamente em DMSO e diluídos para utilização em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. As reações para todas as metodologias foram interrompidas pela adição de ácido acético 30%. A detecção dos produtos de hidrólise foi realizada em um fluorímetro (F2000-Hitachi, Japão), utilizando um comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para detecção da emissão de fluorescência (Alves et al., 1996) ou pela utilização de espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 410 nm (Erlanger et al., 1961).

Determinação de proteína das amostras foi realizada pelos métodos de Bradford (1976) ou pelo método de Krystal et al., (1985) utilizando ovoalbumina como padrão.

3.5. Purificação de tripsinas de insetos.

Foi realizada a purificação de uma série de tripsinas de diferentes insetos. As marchas para purificação destas enzimas de *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* foram descritas por Levinski e colaboradores (1977) e Lemos e Terra (1992). As purificações das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* estão detalhadas abaixo.

3.5.1. Purificação da tripsina de *Periplaneta americana*

A tripsina de *Periplaneta americana* foi purificada a partir do filtrado do sobrenadante da centrifugação do homogeneizado dos intestinos anterior e médio deste inseto. Em sequência, este material foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão Econo System (Bio-Rad, EUA) utilizando-se uma coluna EconoPac HighQ (Bio-Rad, EUA), equilibrada em tampão piperazina 20 mM pH 5,0. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M no mesmo tampão em que a coluna foi equilibrada. As frações contendo atividade de tripsina (determinadas com a utilização de B-R-MCA como substrato) foram reunidas e submetidas a uma nova cromatografia de troca aniônica em sistema de alta pressão (FPLC System, Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia), utilizando uma coluna ResourceQ (Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia). Esta coluna apresenta o mesmo grupo de interação, mas trabalha com pressões mais elevadas e pode ser utilizada com quantidades maiores de proteína, levando a um aumento da eficiência da marcha de purificação. Esta coluna foi equilibrada em tampão piperazina 20 mM pH 10,0. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl 0 a 1,0 M. As frações eluídas com atividade sobre B-R-MCA foram reunidas e utilizadas para SDS-PAGE corado com prata (Blum et al., 1987).

3.5.2. Purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*

A metodologia utilizada para a purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis* utiliza uma cromatografia de afinidade em coluna de Benzamidina-Sepharose equilibrada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e realizada em sistema de baixa pressão (EconoSystem – BioRad). A amostra aplicada na coluna de afinidade é o sobrenadante da centrifugação do homogeneizado do conteúdo luminal de *Diatraea saccharalis*. A eluição dos ligantes inespecíficos foi realizada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo KCl 0,5 M, enquanto que a eluição específica empregou tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo benzamidina 0,1 M. A utilização de substratos fluorescentes tendo 7-amino-4-metil-cumarina como fluoróforo, por sua maior sensibilidade em relação aos ensaios colorimétricos, permitem a localização da atividade eluída, mesmo na presença do inibidor. As frações ativas desta cromatografia foram reunidas. Uma alíquota foi fervida, dialisada, seca por centrifugação a vácuo e utilizada em SDS-PAGE com coloração por prata (Blum et al., 1987).

3.5.3. Purificação da tripsina de *Spodoptera frugiperda*

A porção solúvel do conteúdo luminal do intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda* (500 µL) foi aplicada a uma coluna Hitrap-benzamidina (Pharmacia), que é realizada com a utilização de seringas para aplicação e eluição, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (5,0 mL) e eluída com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M (5,0 mL); tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo benzamidina 0,1 M (10,0 mL) e Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo benzamidina 0,5 M (10,0 mL). Frações de aproximadamente 1,0 mL foram coletadas. Alíquotas de 2,0 µL foram ensaiadas em placas brancas de 96 poços utilizando Suc-AFK-MCA como substrato. A leitura foi feita com a utilização de um aparelho Fluorocount (Packard). Alíquotas de 50 µL de cada fração foram submetidas a determinação de proteína pelo método de Bradford. Brancos contendo benzamidina foram feitos. Alíquotas de 100 µL foram fervidas e dialisadas contra água MilliQ por 3 horas sob agitação e aplicadas em gel de SDS-PAGE.

3.6. Diálise com membrana de diálise

Para as amostras de interesse são colocadas em membranas de diálise previamente equilibradas por uma hora em água Milli-Q (Millipore, EUA) ou tampão apropriado, amarrada em suas extremidades formando uma bolsa onde será depositada a amostra. A diálise foi realizada contra 4,0 L de água MilliQ, no mínimo 100 vezes o volume a ser dialisado, por pelo menos 3 horas a 4 °C com agitação. Este tipo de diálise foi utilizado para amostras eluídas da cromatografia de troca aniônica utilizadas para amostras de *Periplaneta americana* e da cromatografia de afinidade de *Diatraea saccharalis*.

3.7. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS em condições desnaturantes

Eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes foram realizadas segundo Laemmli (1970), em géis de poliacrilamida 12% contendo SDS 0,1%, utilizando-se o equipamento Mini-Protean II (BioRad, EUA). As amostras das diversas frações obtidas durante as diferentes marchas de purificação foram misturadas ao tampão de amostra, composto de Tris 60 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v). Esta mistura foi fervida por 5 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese sob voltagem constante de 200V. Para a coloração dos géis após a eletroforese foi utilizada metodologia de coloração por prata (Blum et al., 1987) ou por Comassie Blue R.

3.8. Determinação dos parâmetros cinéticos para substratos de fluorescência direta e de fluorescência apagada

3.8.1. Substratos com fluorescência direta

Estudos do efeito da concentração de diferentes substratos nas atividades de tripsina de *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana*

foram realizados utilizando no mínimo 10 diferentes concentrações de substrato. As incubações com as preparações foram mantidas a 30 °C por intervalos de tempo específicos. Os dados obtidos foram aplicados ao programa Enzfitter (Elsevier Biosoft) para obtenção de valores da constante de Michaelis-Mentem e da velocidade máxima. Da mesma forma, foi feito o estudo da atividade de quimotripsina de diferentes insetos e o efeito da concentração de diferentes substratos.

3.8.2. Substratos de fluorescência apagada

Substratos S1, S2, S3 e S1' foram previamente utilizados na caracterização das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* (Lopes, 1999, Marana et al., 2002 e Lopes et al, 2004).

Os substratos S2' variantes foram fornecidos pelos profs. Dr. Luis Juliano e Dra. Maria Juliano da UNIFESP-SP. Estudos do efeito da concentração destes substratos nas atividades das tripsinas purificadas de *Tenebrio molitor*, *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* foram realizados utilizando no mínimo 10 diferentes concentrações de substrato. As incubações com as preparações foram mantidas a 30 °C por intervalos de tempo específicos. Os dados obtidos foram aplicados ao programa Enzfitter (Elsevier Biosoft) para obtenção de valores da constante de Michaelis-Mentem e da velocidade máxima.

3.9. Cálculo da hidrofobicidade dos subsítios de tripsina

O cálculo do índice de hidrofobicidade de cada subsítio de tripsina dos insetos *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* caracterizados foi realizado fazendo-se a somatória de todos os valores de k_{cat}/K_m obtidos com todos os substratos variantes para uma determinada posição ($\Sigma k_{cat}/K_m$). Cada valor de k_{cat}/K_m obtido para cada um dos resíduos caracterizados foi então dividido pelo valor da somatória de forma a se ter um valor relativo e o resultado desta divisão foi multiplicado pelo valor de hidropaticidade da cadeia lateral do resíduo em questão. A hidrofobicidade do subsítio foi determinada pela

somatória dos valores obtidos com todos os resíduos. Estes cálculos resultam na fórmula abaixo:

$$H = \sum n [(k_{cat}/K_m)_i / \sum k_{cat}/K_m n) \times I_i],$$

onde **H** é o índice de hidrofobicidade estimado para o subsítio em estudo, **n** equivale ao total de variações de aminoácidos caracterizados ocupando determinado subsítio e **i** indica um determinado resíduo e **I_i** é o índice de hidropaticidade da cadeia lateral de aminoácido ocupante daquele subsítio.

3.10. Inibição da tripsina purificada de *Periplaneta americana*

3.10.1. Efeito da concentração de benzamidina sobre a atividade da tripsina de *Periplaneta americana*.

Nos estudos de inibição, a tripsina purificada foi incubada com 5 diferentes concentrações de inibidor, sendo que em cada uma pelo menos 4 diferentes concentrações de substrato foram utilizadas. B-R-MCA foi utilizado como substrato. Os valores de K_i foram calculados de acordo com Segel (1975).

3.10.2. Titulação da tripsina de *Periplaneta americana* e constante aparente de dissociação de complexo tripsina-SBTI.

Amostras da tripsina purificada de *Periplaneta americana* foram incubadas na presença de SBTI (0-2.5 pmol/tubo). A porção linear do gráfico de atividade de tripsina versus concentração de SBTI extrapola para a concentração de SBTI que é equivalente à concentração total de tripsina. A atividade da tripsina no ponto de equivalência (ponto na curva de titulação sobre o intercepto no eixo de concentração de SBTI) corresponde a enzima livre. Conhecendo a concentração total de enzima (E_{total}), a concentração de enzima livre (E) e de inibidor livre (I) é possível calcular a concentração do complexo (EI). A constante aparente de dissociação do complexo (K_D) pode ser calculada pela equação (Green e Work, 1953; Knight e Barrett, 1976):

$$K_D = [E].[I] / [EI]$$

3.11. Modificação química da histidina do sítio ativo de quimotripsinas e tripsinas

3.11.1. Modificadores específicos

Os experimentos de modificação química foram realizados utilizando dois modificadores cetônicos específicos para a histidina da tríade catalítica de quimotripsinas Tosil-Phe-clorometil cetona (T-F-CK) ou carbobenzoxi-Gly-Gly-Phe-clorometil cetona e um modificador cetônico para a histidina da tríade catalítica de tripsinas tosil-Lys-cloro-metil cetona. Estes modificadores foram dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 para as concentrações necessárias para a realização das diferentes modificações. Cinco diferentes concentrações de modificador e dois controles (presença de tampão e presença de tampão e DMSO) foram utilizadas para cada enzima modificada. Misturas na proporção de 1:1 das preparações de enzima e as soluções dos diferentes modificadores foram realizadas e, posteriormente, aliquotadas em diferentes tubos e incubados a 30 °C por diferentes intervalos de tempo de forma a podermos calcular o k observado: os valores das inclinações dos plotes de porcentagem da atividade remanescente por tempo de modificação das diferentes concentrações de modificador são multiplicados por 2,303; estes valores são então dispostos em um gráfico de kobs por concentração de modificador, sendo que o intercepto obtido foi subtraído de todos os valores de kobs experimentais, dado que eram valores semelhantes as inclinações obtidas nos plotes de porcentagem de atividade remanescente por tempo dos controles em DMSO. A inclinação do plote de kobs versus concentração do modificador indica a reatividade em $M^{-1} \text{ min}^{-1}$. Para o cálculo do valor de reatividade em $M^{-1} \text{ s}^{-1}$, os valores das inclinações obtidos neste último plote foram divididos por 60. A inclinação do plote do logaritmo da concentração de modificador por logaritmo dos valores de kobs indica a ordem de reação entre a enzima e o modificador.

3.11.2. Modificadores não específicos.

Dietilpirocarbonato e Fenil-metil-sulfóxido fluoreto foram utilizados como modificadores de histidina e da serina presente em sítios ativos, respectivamente. DEPC foi dissolvido em etanol e posteriormente diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 6,4 para uma concentração de 40 mM, a qual era misturada a enzima e tampão ou a enzima e Suc-AAPF-pNa 1,0 mM para os experimentos de proteção da modificação por substrato, sendo que a concentração final de DEPC era de 10 mM. A reação de modificação era interrompida pela adição de 200 μ L de imidazol 0,1 M pH 6,5 em diferentes intervalos de tempo e os ensaios para quantificação da atividade remanescente eram feitos em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, utilizando Suc-AAF-MCA como substrato. PMSF era inicialmente dissolvido em metanol e diluído posteriormente em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. Misturas na proporção de 1:1 das preparações de enzima e das soluções do modificador em diferentes concentrações foram realizadas e, posteriormente, aliqüotadas em diferentes tubos e incubados a 30°C por diferentes intervalos de tempo. Os cálculos de k_{obs} , da reatividade e da ordem de reação foram realizados da mesma forma descrita anteriormente.

3.12. Diálise reversa para concentração da tripsina de *Periplaneta americana* para cristalização

Membranas de diálise (corte de 12 kDa) foram hidratadas por 20 minutos em água Milli Q (Millipore, EUA) e preenchidas com tripsina purificada e modificada de *Periplaneta americana*, como descrito no item 2.6. As membranas eram então transferidas para béqueres contendo polietilenoglicol (PEG) 20.000 sólido e recobertas com este mesmo composto. PEG 20.000 absorverá a solução na qual a amostra está diluída, concentrando-a.

3.13. Testes dos kits de cristalização da tripsina de *Periplaneta americana*

Solução de tripsina purificada modificada por PMSF foi submetida a testes de cristalização utilizando-se os kits Crystal Screen I e II (Hampton) em placas de 24

poços para sistema de "sitting-drop". A gota foi formada pela adição de 1,5 µL da solução de proteína e 1,5 µL da solução de cristalização, sendo que o poço contém 500 µL da solução de cristalização. As placas foram então seladas e mantidas a 20 °C.

3.14. Extração de RNA total de epitélio do intestino médio de *Musca domestica*, *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana*

Para a extração de RNA total de epitélio do intestino médio de *Musca domestica*, *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana* foi utilizada a solução de TRIZOL (Invitrogen). Os tecidos foram homogeneizados em solução de TRIZOL utilizando um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem conectado a homogeneizador elétrico. O homogeneizado era incubado na solução de TRIZOL por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 11.000 rpm a 4°C por 10 minutos. A porção solúvel era recolhida e transferida para novo microtubo de 1,5 mL. Eram adicionados 200 µL de clorofórmio, agitados por 15 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras eram novamente centrifugadas a 11.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante é novamente transferido para novo microtubo ao qual podem ser adicionados 250 µL de isopropanol e 250 µL de solução de precipitação (citrato trisódico 0,8 M e NaCl 1,2 M dissolvido em água DEPC) ou 500 µL de isopropanol e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas a 11.000 a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado formado é lavado duas vezes com 1,0 mL de solução etanol 75% em água DEPC. As amostras foram secas em fluxo laminar por 3 minutos, ressuspensas em 100 µL de água DEPC e incubadas a 65°C por 10 minutos com agitação branda a cada 2 minutos. Uma alíquota de 5,0 µL de cada uma das amostras foi retirada e misturada a 1 mL de água Milli Q e a absorbância era lida a 260 nm e 280 nm para quantificação de RNA e para cálculo da razão 260/280 nm para estimativa da qualidade do RNA isolado. O ideal a ser obtido são razões da ordem de 2,0. As primeiras extrações foram feitas utilizando-se 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. As razões obtidas eram da ordem de 1,6-1,8.

A adição da solução de precipitação melhorou a qualidade do RNA total isolado elevando as razões para os valores esperados.

3.15. Precipitação de RNA total

O RNA total isolado foi precipitado em acetato de sódio 0,3 M pH 4,8 e etanol 62,5%. Após a adição destas soluções o RNA foi mantido por 1 hora e 30 minutos a -20°C. As amostras de RNA foram centrifugadas a 11.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado com solução de etanol 70% e submetido a nova centrifugação a 11.000 rpm a 4°C por 5 minutos. Os precipitados secos foram estocados a -80°C até o envio para a Stratagene.

3.16. Alinhamento das seqüências de serina-endopeptidases de insetos e análise de agrupamentos por metodologia de distância

Todas as seqüências de quimotripsinas de insetos, assim como as seqüências de tripsinas de insetos, disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram analisadas por alinhamento de seqüências múltiplas realizada no programa Clustal X versão 1.81 PPC (Thompson et al., 1999).

Análises filogenéticas usando estas seqüências foram realizadas com o programa PAUP* versão 4.0b10 (Swofford, 1999). Análises de distância foram realizadas utilizando-se o algoritmo de Neighbor Joining (Saitou e Nei, 1987). A análise estatística de suporte dos ramos da árvore gerada foram avaliados por Bootstrap baseado em 1000 réplicas.

3.17. Reação de PCR

Para as reações de PCR foram utilizados: 2,0 µL de DNA molde; 39,5 µL de água MilliQ estéril; 1,5 µL MgCl₂ (1,5 mM), 0,25 µL "primer" forward 100 µM; 0,25 µL "primer" reverse 100 µM; 7,0 µL DNTp 10 mM; 5,0 µL de tampão de PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM; glicerol 50% e estabilizantes) e 0,5 µL de TAQ DNA polimerase (2,5 Unidades). O número de ciclos e as

temperaturas foram adaptados a cada condição de acordo com os “primers”, o DNA molde e o passo sequencial. Para a amplificação de um produto correspondente a tripsina de *T. molitor* diferentes condições de PCR foram utilizadas: o controle segue as condições descritas acima. Nas outras condições 5 µL de água foram substituídos por DMSO 25%, DMSO 50%, DMSO 100%, glicerol 50%. A concentração de MgCl₂ foi alterada de 1,5 mM para 4,0 mM de forma a tornar a reação menos específica. Todos os aditivos também foram testados nesta condição.

3.18. Eletroforese em gel de agarose para amostras de DNA

Agarose 1,0% (p/v) é solubilizada em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM contendo EDTA 2,0 mM pH 8,5) 1 x e aquecida em microondas até a solubilização completa e gelificada em cuba de eletroforese horizontal (Life-Technologies). As amostras eram misturadas a tampão de amostra contendo azul de bromofenol e xilenocianol. A corrida é realizada em TAE 1x a 100 V. O gel é corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por cerca de 20 minutos, lavado em água e visualizado em transiluminador de UV (312 nm).

3.19. Extração de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose e purificação de produtos de PCR

Produtos de PCR podem ser purificados de duas formas: extração de gel de agarose após separação eletroforética ou por purificação em colunas-spin contendo membranas de sílica-gel. As duas metodologias foram utilizadas. As duas metodologias utilizam o kit QUIAEX (Qiagen), sendo a única diferença entre os dois a dissolução da agarose.

3.20. Sistema TOPO para clonagem de produtos de PCR

No sistema TOPO os vetores são fornecidos no kit já linearizados com extremidades coesivas dT na extremidade 3' ativados com Topoisomerases. A TAQ por sua vez adiciona dA à extremidade 3' do produto de PCR. A ligação é rápida,

sendo necessários apenas 30 minutos. Os plasmídeos TOPO com diferentes fragmentos de tripsina que foram gerados foram digeridos com *EcoRI* para confirmação da presença do inserto.

3.21. Reações de seqüenciamento de DNA e análise inicial das seqüências

Para o seqüenciamento de DNA foi utilizado um procedimento que se baseia no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com uso de dideoxiribonucleotídeos (Sanger, 1977) utilizando marcação fluorescente. As reações de seqüenciamento para todas as seqüências realizadas utilizaram 1,0 µL de plasmídeo previamente purificado; 3,0 µL de uma solução tampão Tris-HCl 200 mM pH 9,0 contendo cloreto de magnésio 5,0 mM; 2,0 µL de Big Dye (Applied Biosystem); 3,0 µL de "primer" 3,2 pmol/µL e 6,0 µL de água MilliQ previamente autoclavada. Os "primers" utilizados foram escolhidos conforme o vetor de clonagem utilizado e a direção desejada para seqüenciamento. Para produtos de PCR clonados em vetor TOPO foram usados os "primers" Sp6, T7, M13 reverse e M13 forward e para produtos clonados em PT7-7 foi utilizado "primer" T7. Foram realizados 35 ciclos de reação (96°C 45 seg., 50°C 30 seg. e 60°C 4min) em termociclador Applied Biosystem. O produto da reação foi precipitado em 25 µL de uma mistura de etanol 100% gelado (500 µL), acetato de sódio 3,0 M pH 5,2 (20 µL) e glicogênio 1mg/mL (20 µL). Após a adição da solução as amostras eram mantidas em gelo por 15 min e centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante era descartado. Foram adicionados 50 µL de etanol 70% gelado e a centrifugação foi repetida. Novamente o sobrenadante foi descartado. As amostras foram secas por uma hora à temperatura ambiente no escuro e estocadas a -20 °C até o seqüenciamento. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático capilar (ABI 3700) no Departamento de Bioquímica (IQ-USP). Os cromatogramas foram analisados utilizando o software Chromas e as seqüências foram identificadas e alinhadas com seqüências disponíveis no GenBank por BlastX (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.22. Purificação da quimotripsina de *Periplaneta americana*

A quimotripsina foi purificada a partir do filtrado do sobrenadante da centrifugação do homogeneizado dos intestinos anterior e médio de adultos machos de *Periplaneta americana*. Em sequência, este material foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão Econo System (Bio-Rad, EUA) utilizando-se uma coluna EconoPac HighQ de 1,0 mL (Bio-Rad, EUA), equilibrada em tampão piperazina 20 mM pH 5,0. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M no mesmo tampão em que a coluna foi equilibrada. As frações contendo atividade de quimotripsina (determinadas com a utilização de Suc-AAF-MCA como substrato) foram acrescidas de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,5 contendo SDS 0,5% e reunidas. Uma nova cromatografia de troca catiônica em sistema de alta pressão (FPLC System, Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia), utilizando uma coluna ResourceS (Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia) foi realizada. Esta coluna foi equilibrada em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl 0 a 1,0 M. As frações eluídas com atividade sobre Suc-AAF-MCA foram reunidas, concentradas em microcon (Centriplus) na presença de Tween 20 0,02% e aplicadas SDS-PAGE .

3.23. Gel filtração para determinação de peso molecular

Com o objetivo de determinar o peso molecular da quimotripsina verificada nas preparações de *Diatraea saccharalis* foram aplicados a uma coluna Superose-12 (Pharmacia) 200 μ L da porção solúvel do conteúdo luminal de *Diatraea saccharalis* previamente filtrados utilizando membranas 0,45 μ m (Millipore, USA). Esta cromatografia foi realizada em duas diferentes condições: tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 e tampão Tris-HCl pH 7,5 contendo SDS 0,05%. As frações eluídas foram ensaiadas utilizando Suc-AAF-MCA e Z-FR-MCA como substratos. Como padrão foram utilizados: tiroglobulina (355.000); β -amilase (200.000); ovoalbumina (43.000); mioglobina (17.200) e citocromo c (11.700).

3.24. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS em condições semi-desnaturantes para isolamento de endopeptidases de *Diatraea saccharalis*

Cilindros de géis de 8,0 cm de altura em poliacrilamida 5,5%, 7,5%, 10% e 12% contendo SDS 0,1% ou cilindros de géis de 18 cm de altura em poliacrilamida 12% foram utilizados para separação das endopeptidases mais ativas de *Diatraea saccharalis*. As eletroforeses foram realizadas segundo Laemmli (1970). A porção solúvel de homogeneizados do intestino médio de *Diatraea saccharalis* foi misturada ao tampão de amostra, composto de Tris 60 mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,05% (p/v) em uma proporção de 1:1. As amostras foram submetidas a eletroforese sob voltagem constante de 100 V a 4 °C em um período de quatro horas ou a corrente constante 1,5 mA por gel com voltagem máxima de 200 V para os géis longos. Após a eletroforese, os géis foram lavados em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 em três trocas após trinta minutos a 4 °C em agitador orbital. Após as lavagens os géis foram fracionados, eluídos a 4 °C por pelo menos 3 horas e as frações foram ensaiados com os substratos Suc-AFK-MCA, Z-FR-MCA e Suc-AAF-MCA por 30 minutos a 30 °C e as atividades foram determinadas com a utilização de um espectrofluorímetro F2000 (Hitachi). As frações ativas foram reunidas, fervidas, dialisadas, secas por centrifugação à vácuo e submetidas a SDS-PAGE em condições desnaturantes.

3.25. Cromatografia de afinidade em coluna SBTI Agarose para isolamento parcial da quimotripsina de *Diatraea saccharalis*

A coluna de SBTI Agarose foi equilibrada em tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,5, sendo a aplicação realizada num fluxo de 0,5 mL/min. A amostra foi pré-incubada na coluna por 5 minutos e, posteriormente, eluída com 10 mL de solução KCl 0,1 M pH 3,0 (fluxo de 1,0 mL/min) e 25 mL de solução KCl 0,2 M pH 2,0 (fluxo de 1,0 mL/min).

Foram coletadas frações de 1,0 mL, sendo acrescentados a todos os tubos, antes da coleta, 200 uL de tampão Tris HCl 0,5 M pH 8,5 contendo SDS 0,5%. Esse tampão tem por objetivo manter a estabilidade da enzima elevando o valor de pH a

um valor no qual a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* é estável e com a presença de SDS. Estas frações foram utilizadas para ensaios enzimáticos.

3.26. Efeito de pH sobre a atividade de quimotripsina

O efeito de pH sobre a atividade de quimotripsina de *Diatraea saccharalis* foi determinado utilizando-se a porção solúvel do conteúdo luminal do intestino médio como fonte de enzima, uma série de tampões (Tris HCl 0,1 M pH 7,0-9,0 contendo NaCl 0,2 M; glicina NaOH 0,1 M pH 9,0-10,5 contendo NaCl 0,2 M; fosfato NaOH 0,1 M pH 10,5-12,0 contendo NaCl 0,2 M), com variações de 0,5 unidade de pH, e o substrato Suc-AAF-MCA. Para cada pH foi realizado um ensaio de atividade enzimática e foi construída uma curva de porcentagem de atividade enzimática por pH, obtendo-se assim o valor de pH ótimo.

3.27. Focalização isoeletrica em géis de poliacrilamida

Foram aplicados 90 µl da porção solúvel do conteúdo luminal do intestino médio de *Diatraea saccharalis* contendo 32 animais/mL.

A focalização isoeletrica foi realizada em géis cilíndricos de poliacrilamida 7,5% contendo anfolito 2% pH 3–10 (Pharmalite), conforme detalhado em Terra e colaboradores (1978). Após a focalização os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador (Autogeldivider Savant Instruments) em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5. O pH ao longo do gel é determinado fracionando-se um gel controle em água bi-destilada e medindo-se o pH de cada fração com a utilização de um pHmetro.

3.28. Modelagem e alinhamento de diferentes quimotripsinas

A quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* já foi clonada e seqüenciada em nosso laboratório (Lopes et al., manuscrito em preparação). A seqüência foi enviada para o site Swiss Prot (www.expasy.ch) para a modelagem desta seqüência tendo por base a quimotripsina A de mamífero. Através do programa SwissProtviewer o posicionamento dos diferentes aminoácidos de interesse foram verificados, sendo

possível a comparação de diferentes quimotripsinas. O programa permite também o desenho das prováveis pontes de hidrogênio existentes entre os diferentes resíduos de aminoácidos. Para o alinhamento de seqüências conhecidas disponíveis na rede (www.ncbi.nlm.nih.gov - Blast) foi utilizado o programa Clustal X.

3.29. Transformação de células XL1Blue

Foram adicionados a 100 µL de células XL1Blue competentes de 1,0 a 2,0 µL de plasmídeo. A mistura células mais plasmídeos foi incubada por 30 minutos em gelo. Após a incubação a mistura foi submetida a um choque de temperatura sendo incubada a 42 °C por 90 segundos e incubadas novamente em gelo por 3 minutos. Meio NZY+ ou SOC foram adicionados e a nova mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C. As células foram plaqueadas em placas LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas por 16 horas a 37 °C.

3.30. Purificação de plasmídeos de cultura de células

Uma colônia de células contendo plasmídeo de interesse foi crescida em 3,0 mL de meio LB por 16 horas a 37 °C e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi submetido ao protocolo Wizard Miniprep (Promega), que é composto de uma solução de ressuspensão (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase A - 100 µg/mL); solução de lise (NaOH 0,2 M contendo SDS 1%), solução neutralizadora (acetato de potássio 1,32 M pH 4,8). Essa mistura é centrifugada e o sobrenadante é aplicado a uma resina de sílica. A resina é lavada em tampão acetato de potássio 80 mM contendo EDTA 40 mM e etanol 55% e eluída em 50 µL de água MilliQ autoclavada.

3.31. Desenho de “primer” e construção da quimera do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*.

A construção de uma quimera de quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* se deu com a utilização do “primer” PROTRYCHY: 5'gg gAA TTC CAT

ATG TTC CCG GTG GAT GAT GAT GAT AAG ATT GTT GGT GGT CAG GCT TCC. A reação de PCR utiliza este “primer” e o “primer” Q3C 5’CGC GGA TCC TTA CAA TTG ACC GTT GAT CCA. Como DNA molde, foi utilizado 0,5 µL de plasmídeo previamente obtido contendo o gene do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*. 1,5 µL de “primer” PROTRYCHY, 1,5 µL de “primer” Q3C 5,0 µL de tampão 10x concentrado para Platinum (Invitrogen), 1,0 µL de MgSO₄, 38,0 µL de água Milli Q autoclavada, 1,5 µL de dNTPs e 1,0 µL de TAQ PFX Platinum foram adicionados a reação. O PCR gerou uma única banda de peso molecular de aproximadamente 750 pb.

3.32. Transformação de células Origami (DE3), indução e lise celular

Células Origami (DE3) (Novagen) foram transformadas com pT7-7 PROTRYCHY para expressão da quimera de quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*. Foi adicionado 1,0 µL de plasmídeo a 20 µL de células. A mistura foi incubada por 5 minutos em gelo. Foi feito um choque de temperatura a 42 °C por 30 segundos e imediatamente após a incubação em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 80 µL de SOC e a mistura foi incubada por duas horas a 37 °C em agitador com rotação de 250 rpm. As células foram plaqueadas em LB-Agar contendo 50 µg de ampicilina e incubadas por 16 horas a 37 °C. Uma colônia foi isolada e transferida para 2,0 mL meio LB contendo carbenicilina (50 µg/mL) e crescidas até turbidez, sendo finalmente transferidas para um kitassato contendo 48 mL de LB-carbenicilina. As células foram crescidas até DO a 600 nm entre 0,6 e 1,0. A indução da expressão foi realizada com IPTG 1,0 mM a 30 °C. Alíquotas de 50 µL foram retiradas após 3, 7 e 16 horas de indução. Após o tempo máximo de indução as células foram resfriadas por 5 minutos, centrifugadas a 7.000 g a 4 °C por 15 minutos. O sedimento obtido foi transferido para tubo Falcon de 50 mL. As células foram ressuspensas em 30,0 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M, 6,0 mg de lisozima e 30µL de Triton X-100 e agitadas por 30 minutos a 4 °C e 10 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento a preparação foi sonicada por 30 segundos por 4 vezes com intervalos de 3 minutos a cada ciclo e centrifugadas novamente a 7.000 g a 4 °C por 15 minutos. A porção solúvel foi

recolhida e a porção insolúvel foi ressuspensa em 30 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M.

3.33. Preparação de bactérias competentes para transformação

Uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem XL1-Blue MRF' era crescida em LB líquido por 16 horas a 37 °C com agitação de 300 rpm. Em seguida 400 mL de LB líquido foram inoculados com 4,0 mL desta cultura inicial e mantidos nas mesmas condições anteriores de crescimento até que se atingisse a $DO_{600}=0,375$. As células foram então transferidas para tubos Falcon e mantidas no gelo por 10 min. Em seguida foram sedimentadas por centrifugação a 1.600 g por 7 min. O sobrenadante era descartado e o sedimento contendo as células era ressuspensa em 10 mL de $CaCl_2$ 60 mM solubilizado em tampão PIPES 10 mM pH 7,0 contendo glicerol 15% (v/v) previamente autoclavado. Estas células ressuspendidas eram novamente sedimentadas por centrifugação (1.100 g por 5 min.) e as células eram novamente ressuspensas em 10 mL de solução de $CaCl_2$ e mantidas no gelo por 30 min. Após esta incubação realizou-se nova centrifugação (1.100 g por 5 min.) e desta vez as células eram ressuspensas em 2 mL de solução de $CaCl_2$ e podiam ser aliquoteadas e mantidas a -80°C. Estas alíquotas continham as células prontas para transformação.

4. Resultados

4.1. Purificação e isolamento parcial de tripsinas de diferentes insetos

4.1.1. *Periplaneta americana*

4.1.1.1. Purificação da tripsina de *Periplaneta americana*

Inicialmente, a tripsina de *Periplaneta americana* foi purificada a partir de uma marcha que era constituída de uma cromatografia em coluna de troca aniônica High Q de 1,0 mL em sistema de baixa pressão (EconoSystem – BioRad) em tampão

piperazina pH 5,0. O eluído ativo sobre B-R-pNa ou B-R-MCA era reunido e submetido a uma cromatografia de troca aniônica MonoQ em sistema de alta pressão (FPLC – Pharmacia) em tampão piperazina pH 10,0. Esta marcha de purificação apresentava recuperação de apenas 30%. Para os testes iniciais de cristalização foram necessários 10 mg da tripsina de *Periplaneta americana*. Para a obtenção desta quantidade, a marcha de purificação foi otimizada. A diálise do reunido ativo da HighQ contra 100 vezes o volume da amostra por 3 horas sob agitação a 4 °C em tampão piperazina 20 mM pH 10,0 foi um dos passos desta otimização. A recuperação deste processo é de 100% e permite a aplicação de maior quantidade de amostra no passo seguinte da purificação. Além disso, a substituição de uma coluna Mono Q por uma coluna Resource Q permite aplicações de volumes maiores de amostra e quantidade maior de proteína a uma única cromatografia, concentrando a amostra e tornando mais rápida a purificação de maiores quantidades de proteína (Figura 8). Uma alíquota de 2 µg de tripsina purificada foi submetida a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12 % em tampão de amostra não contendo β-mercaptoetanol e sem fervura prévia da amostra. O objetivo deste experimento era demonstrar que a banda de proteína visualizada após coloração por prata em SDS-PAGE é correspondente a atividade de tripsina. O resultado é apresentado na Figura 8 demonstrando que a proteína purificada é correspondente à atividade de tripsina. A quantidade de proteína foi determinada por prata para todos os passos da marcha de purificação e as atividades específicas foram calculadas. A atividade específica determinada para a tripsina purificada de *Periplaneta americana* foi de 2.000 U/mg (Tabela 1). Esta proteína apresenta pI de 6,0, pH ótimo de 8,9. (Lopes e Terra, 2003).

4.1.1.2. Cristalização da tripsina de *Periplaneta americana*

A tripsina obtida foi submetida à inativação química por PMSF 10 mM durante 1 hora a 30 °C, dialisada contra tampão piperazina 10 mM pH 10,0, concentrada utilizando diálise reversa e submetida aos testes de cristalização utilizando os kits Crystal Screen 1 e 2 (Hampton), no laboratório de cristalografia de proteínas no

Figura 8: Perfis de atividade sobre B-R-MCA (linhas cheias) e perfis de proteína (linhas pontilhadas) das cromatografias de troca aniônica utilizadas para a purificação da tripsina de *Periplaneta americana*. (A) Cromatografia de troca iônica em sistema de baixa pressão (EconoSystem - BioRad) utilizando uma coluna HighQ 1,0 mL, a partir da porção solúvel de homogeneizados de intestino anterior e médio de machos adultos de *Periplaneta americana*. As frações ativas foram reunidas, dialisadas e submetidas a uma cromatografia aniônica em sistema de alta pressão (FPLC System-Amersham-Pharmacia) em coluna Resource Q (B). As frações ativas foram reunidas e utilizadas em experimentos SDS-PAGE (C) Raia M: marcadores de massa molecular, Raia 1: Homogeneizado do intestino anterior e médio de *Periplaneta americana*, Raia 2: reunido ativo após cromatografia em coluna HQ e Raia 3; reunido ativo após cromatografia em coluna Resource Q. Raia 4 atividade sobre Suc-AFK-MCA da tripsina de *Periplaneta americana* purificada.

Tabela 1: Purificação da tripsina digestiva de *Periplaneta americana*.

Fração	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Enriquecimento	Recuperação (%)
Homogeneizado	26,5	1,600	60,0	1	100
HighQ	5,0	1,200	240,0	4	70
Resource Q	0,6	1,200	2,000	33	70

Substrato utilizado: B-R-MCA

LNLS. Não houve formação de cristais no período em que as placas foram observadas, sendo necessários novos testes de cristalização.

4.1.2. *Diatraea saccharalis*

O método encontrado de maior eficiência para a purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis* utiliza uma cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose (Amersham-Pharmacia), em sistema de baixa pressão (EconoSystem – BioRad). O método consiste na aplicação do sobrenadante do homogeneizado do conteúdo luminal em uma coluna de afinidade que tem por grupo ligante uma p-aminobenzamidina. A amostra é aplicada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. A eluição de ligantes inespecíficos é realizada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo KCl 0,5 M. A eluição específica da tripsina é realizada em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 contendo benzamidina 0,1 M. A localização da atividade da tripsina eluída é realizada utilizando B-R-MCA ou Z-R-MCA como substrato (Figura 9). A eluição da tripsina de *Diatraea saccharalis* em benzamidina reduz intenso processo autolítico verificado para esta enzima, tornando possível estudos com a enzima purificada.

As frações ativas obtidas nos passos cromatográficos foram dialisadas, secas por centrifugação a vácuo e submetidas a uma eletroforese em condições desnaturantes. Desta forma, foi possível observar a presença de uma única banda de proteína (Figura 9). A proteína purificada apresenta um peso molecular de 28,7 kDa determinado por SDS-PAGE. Esta proteína apresenta pI de 5,6 e pH ótimo de 10,5. (Lopes, 1999).

4.1.3. *Spodoptera frugiperda*

A atividade de tripsina de *Spodoptera frugiperda* foi isolada a partir da porção solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de larvas de último estágio larval com a utilização de uma coluna Hitrap benzamidina (Pharmacia) utilizando-se de diferentes tampões (Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; Tris-HCl 0,05 M contendo NaCl 0,5 M; Tris-HCl contendo benzamidina 0,1 M e Tris-HCl contendo benzamidina 0,5 M. A eluição desta cromatografia pode ser observada na Figura 10A.

Figura 9: Purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*. (A) Cromatografia em coluna Benzamidina Agarose da porção solúvel do conteúdo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* equilibrada com tampão fosfato 20 mM pH 7.0. A seta indica o início da eluição com benzamidina 0,1 M no mesmo tampão. (B) SDS-PAGE da tripsina digestiva purificada de *Diatraea saccharalis*. raia M, marcador de massa molecular: raia 1 e 2, Porção solúvel do conteúdo do intestino médio de *Diatraea saccharalis* raia 3, Reunido ativo da Benzamidina-Agarose.

O eluído ativo sobre Suc-AFK-MCA foi reunido (Frações 22 e 23). Uma alíquota de 50 μ L foi fervida, dialisada e, posteriormente, submetida a SDS-PAGE. O gel foi corado por prata demonstrando o isolamento de uma única proteína (Figura 10B).

4.2. Determinação da razão de hidrólise de peptídeos P1 Arg/Lys para as tripsinas de diferentes ordens de insetos

Resultados obtidos previamente (Lopes, 1999) indicavam que as tripsinas de insetos apresentavam diferentes especificidades sendo que a tripsina de *Diatraea saccharalis* apresentava troca da especificidade primária, hidrolisando preferencialmente substratos que apresentam Lys em P1. Desta forma, outros insetos foram caracterizados neste trabalho representando outras ordens e outras famílias de Lepidoptera. Esta caracterização permitiu verificar que as tripsinas dos insetos *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Heliothis virescens*, todos pertencentes à ordem Lepidoptera, mas representantes de duas diferentes famílias: Pyralidae e Noctuidae, apresentam hidrólise preferencial sobre substratos P1 Lys. Já insetos de outras ordens como Dictyoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera hidrolisam preferencialmente substratos P1Arg (Tabela 2) (Lopes et al., 2004).

4.3. Caracterização da especificidade dos subsítios de ligação de tripsinas de insetos

4.3.1. Substratos colorimétricos e de fluorescência direta

4.3.1.1. *Periplaneta americana*

Foi determinado o efeito da concentração de diferentes substratos colorimétricos e de fluorescência direta sobre a atividade da tripsina purificada de *Periplaneta americana*. A determinação dos valores de K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m demonstram algumas características cinéticas desta enzima. Levando em conta os valores de k_{cat}/K_m os quais são os melhores parâmetros de comparação de eficiência enzimática (Segel, 1975), é claro que a tripsina de *Periplaneta americana* hidrolisa preferencialmente substratos cumarínicos em relação aos substratos

A **B**

Figura 10: Isolamento da tripsina de *Spodoptera frugiperda*. (A) Cromatografia em coluna Hitrap benzamidina da porção solúvel do conteúdo do intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda*. (B) SDS-PAGE do reunido ativo após Hi-trap benzamidina a partir da porção solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Spodoptera frugiperda*. Raia 1: Marcadores de massa molecular, raia 2: eluído ativo reunido.

Tabela 2: Razão de hidrólise de peptídeos P1 Arg/Lys (R/K) dos substratos de fluorescência apagada ABZ-AGGXGAGQ-EDDnp* pelas tripsinas de insetos.

Inseto	Vmax/Km (R)	Vmax/Km (K)	R/K
<i>Periplaneta americana</i>	230	78	3,00
<i>Tenebrio molitor</i>	210.000	23.000	9,00
<i>Musca domestica</i>	4,8	1,6	3,00
<i>Scaptotrigona postica</i>	41	23	1,80
<i>Diatraea saccharalis</i>	1,3	1,4	0,93
<i>Spodoptera frugiperda</i>	45	52	0,87
<i>Heliothis virescens</i>	45	53	0,85

*A letra X no substrato corresponde a um resíduo de Arg ou Lys e a razão de hidrólise foi calculada a partir dos valores de kcat/Km obtidos de ensaios de tripsina em 10 diferentes concentrações de substrato. As amostras utilizadas para as detmrinações foram:

Periplaneta americana: Tripsina purificada

Tenebrio molitor, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* . Tripsina purificada ou fração solúvel do intestino médio.

Scaptotrigona postica: Porção solúvel do intestino médio de adultos.

Spodoptera frugiperda and *Heliothis virescens*: Porção solúvel do intestino médio de larvas de último instar.

p-nitroanilídicos e dentre os cumarínicos os peptídeos mais longos são os melhor hidrolisados (Tabela 3). A eficiência de hidrólise aumenta mais do que 100 vezes quando um substrato com um único resíduo de aminoácido é substituído por outro com dois resíduos (comparar B-R-pNA com Ac-FR-pNa e Z-R-MCA com Z-FR-MCA). Outro aumento de 1,6 vezes é observado com um substrato de três resíduos ao invés de um com dois resíduos de aminoácidos (comparar Z-FR-MCA com Z-GGR-MCA). Como pode ser visto da comparação dos substratos B-R-MCA e Z-R-MCA a natureza do grupo bloqueador da extremidade N-terminal também afeta a eficiência hidrolítica (Tabela 3), porém menos significativamente do que o número de resíduos de aminoácidos.

Inibição pelo substrato foi verificada com altas concentrações de Z-FR-MCA, sugerindo que MCA na posição P1' poderia causar inibição. No entanto, este efeito não foi verificado para os outros substratos cumarínicos. Poderia ser feita a hipótese de que a presença de um grupo volumoso em P1' (a metil cumarina) e dois grupos volumosos em P2 e P3 (o resíduo de fenilalanina e o grupo carbobenzoí) poderiam estar influenciando nesta inibição, dado que nenhum dos outros substratos testados apresenta estas características. A determinação das especificidades primárias (S1) e de alguns subsítios envolvidos em especificidade secundária já foram caracterizados para a tripsina purificada de *Periplaneta americana* (Lopes, 1999 e Marana et al., 2002).

4.3.1.2. *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*

As tripsinas de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* foram caracterizadas quanto à sua ação sobre diferentes substratos cumarínicos (Tabela 4). Esta caracterização demonstra que, assim como a tripsina de *Periplaneta americana*, as tripsinas destes insetos hidrolisam preferencialmente substratos mais longos que apresentem dois ou mais resíduos, sendo que o melhor substrato hidrolisado pelas duas enzimas foi Z-GGR-MCA. No entanto, a tripsina de *Diatraea saccharalis* hidrolisa melhor o substrato Z-R-MCA do que o substrato Suc-AFK-MCA, mesmo com a presença de lisina em P1. Este fato demonstra a influência dos sítios de especificidade secundária, dado que estas enzimas apresentam razão Arg/Lys menor que um. A comparação dos resultados de k_{cat}/K_m obtidos para Z-GGR-MCA

Tabela 3: Especificidade da tripsina purificada de *Periplaneta americana* ¹.

Substrato	Km (μ M)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ μM ⁻¹)	kcat/Km Relativo
Ac- FR -pNA	19 ± 2	31 ± 1	1,6 ± 0,2	0,02
B- R -pNA	120 ± 30	1,3 ± 0,1	0,011±0,003	0,00011
B- R -MCA	1,5 ± 0,2	265 ± 7	180 ± 20	1,8
Z- R -MCA	2,2 ± 0,3	121 ± 4	55 ± 8	0,6
Z-F RM CA ²	2,0 ± 0,5	11.000 ± 1.000	6.000 ± 1.000	60
Z-G GR -MCA	1,9 ± 0,3	19.000 ± 600	10.000 ± 1.000	100
Suc-A FK -MCA	0,50± 0,07	430 ± 20	900 ± 100	9

1.Parâmetros cinéticos (médias e desvios) foram determinados por regressão linear. O aminoácido em negrito indica a posição P1 onde a hidrólise ocorre.

2.Causa inibição pelo substrato em altas concentrações. Este fenômeno não foi observado com outros substratos contendo MCA.

Tabela 4: Efeito da concentração de diferentes substratos de fluorescência direta sobre a atividade de tripsina de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*.*

substrato	<i>Diatraea saccharalis</i>			<i>Spodoptera frugiperda</i>		
	Km (μM)	Vm (mmoles.min ⁻¹)	%	Km	Vm (mmoles.min ⁻¹)	%
B-R-MCA	4,9 ± 0,7	0,12 ± 0,007	1,6	3,1 ± 0,3	0,45 ± 0,016	6
Z-R-MCA	6,4 ± 0,7	0,30 ± 0,015	3,0	6,4 ± 0,66	0,7 ± 0,03	4
Z-FR-MCA	7,2 ± 1,2	3,6 ± 0,3	31,0	5,4 ± 0,6	12 ± 0,5	92
Z-GGR-MCA	14,0 ± 2.8	23,0 ± 3,0	100,0	62 ± 21	150 ± 48	100
Suc-AFK-MCA	48 ± 16	1,5 ± 0,4	2,0	25 ± 1,9	10 ± 0,6	17

*Porção solúvel do conteúdo do intestino médio do último estágio larval destes insetos foi utilizada como fonte de enzima. Os valores de % indicam os valores de Vm/Km relativos.

e Z-FR-MCA indica que a presença de Phe em P2 para a tripsina de *Diatraea saccharalis* leva a uma redução da eficiência catalítica de 3 vezes, enquanto para a tripsina de *Spodoptera frugiperda* esta alteração não atinge 10%. Da mesma forma o substrato Suc-AFK-MCA foi melhor hidrolisado pela tripsina de *Spodoptera frugiperda* do que pela tripsina de *Diatraea saccharalis* em relação a Z-GGR-MCA. Estes dados dão indícios de que há diferenças de especificidade secundária entre as tripsinas destes insetos, mesmo sendo estes pertencentes a ordem Lepidoptera. Estas enzimas apresentaram diferenças de especificidade também em relação ao bloqueador N-terminal, sendo que a tripsina de *Diatraea saccharalis* hidrolisa preferencialmente o substrato bloqueado por carbobenzoxi enquanto a tripsina de *Spodoptera frugiperda* hidrolisa preferencialmente o substrato bloqueado por um benzoil. No entanto, a ligação dos substratos às duas enzimas deve ser semelhante dado que os valores de K_m são semelhantes (Tabela 4).

4.3.2. Substratos de fluorescência apagada

O efeito da concentração de 15 diferentes substratos de fluorescência apagada variantes na posição S2' foi testado para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* (Tabela 5). Verifica-se que as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* hidrolisam preferencialmente o substrato que apresenta um resíduo Phe na posição S2' enquanto a tripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisa preferencialmente o substrato que apresenta Val nesta posição. Diferentemente das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, a tripsina de *Diatraea saccharalis* parece apresentar uma especificidade limitada para determinados resíduos na posição S2', hidrolisando apenas os substratos que apresentavam resíduos de Phe, Val, Lys e Leu. A tripsina de *Tenebrio molitor* não hidrolisou os substratos apresentando Glu, His e Thr. Para a tripsina de *Diatraea saccharalis* a presença de um resíduo de Lys em S2', diferentemente do que ocorre nos outros subsítios caracterizados (Lopes, 1999), resulta em uma eficiência relativa menor do que 100%, podendo indicar um efeito negativo da presença de carga positiva em S2'.

Tabela 5: Efeito da concentração de diferentes substratos de fluorescência apagada, variantes em P2' sobre as tripsinas purificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*.*

substrato	<i>Periplaneta americana</i>			<i>Tenebrio molitor</i>			<i>Diatraea saccharalis</i>		
	Km (μM)	Vm (μmoles.min ⁻¹)	%	Km (μM)	Vm (mmoles.min ⁻¹)	%	Km (μM)	Vm (nmoles.min ⁻¹)	%
ABZ-AGGRG I GQ-EDDnp	3,0 ± 0,30	1,5 ± 0,05	62.5	0,40 ± 0,03	0,17 ± 0,002	28	—	—	—
ABZ-AGGRG F GQ-EDDnp	9,0 ± 2,00	7,0 ± 0,9	100	0,30 ± 0,04	0,26 ± 0,005	60	3,9 ± 0,6	16 ± 1,0	100
ABZ-AGGRG E GQ-EDDnp	12,7 ± 2,00	0,27 ± 0,04	2.5	—	—	—	—	—	—
ABZ-AGGRG V GQ-EDDnp	2,7 ± 0,30	1,6 ± 0,08	75	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,003	100	3,1 ± 0,7	7,8 ± 0,9	61
ABZ-AGGRG G GQ-EDDnp	2,4 ± 0,20	0,6 ± 0,02	31	0,60 ± 0,09	0,24 ± 0,008	26	—	—	—
ABZ-AGGRG Q GQ-EDDnp	2,8 ± 0,30	0,32 ± 0,01	14	0,50 ± 0,10	0,12 ± 0,005	16	—	—	—
ABZ-AGGRG S GQ-EDDnp	2,9 ± 0,60	0,7 ± 0,06	30	0,58 ± 0,06	0,21 ± 0,005	24	—	—	—
ABZ-AGGRG K GQ-EDDnp	0,9 ± 0,20	0,9 ± 0,05	125	0,25 ± 0,02	0,30 ± 0,003	80	4,3 ± 1,1	15 ± 2	85
ABZ-AGGRG D GQ-EDDnp	15 ± 3,00	0,3 ± 0,05	2.5	0,14 ± 0,02	0,20 ± 0,002	93	—	—	—
ABZ-AGGRG Y GQ-EDDnp	6,3 ± 1,00	3,0 ± 0,3	60	1,00 ± 0,06	0,31 ± 0,005	21	4,8 ± 1,1	5,8 ± 0,7	30
ABZ-AGGRG M GQ-EDDnp	2,4 ± 0,20	1,3 ± 0,03	68	0,62 ± 0,06	0,25 ± 0,005	26	—	—	—
ABZ-AGGRG L GQ-EDDnp	2,0 ± 0,15	1,4 ± 0,04	88	0,85 ± 0,17	0,29 ± 0,01	23	4,3 ± 1,0	8,9 ± 1,0	51
ABZ-AGGRG N GQ-EDDnp	3,7 ± 0,3	0,55 ± 0,02	19	0,2 ± 0,03	0,12 ± 0,002	40	—	—	—
ABZ-AGGRG H GQ-EDDnp	3,2 ± 0,3	1,3 ± 0,05	50	—	—	—	—	—	—
ABZ-AGGRG T GQ-EDDnp	7,0 ± 2,0	1,4 ± 0,25	25	—	—	—	—	—	—

*Os valores de porcentagem descritos na tabela representam Vm/Km relativos e — não foi detectada atividade sobre estes substratos nas condições em que o experimento foi realizado.

4.4. Determinação da hidrofobicidade dos subsítios de ligação de tripsina de insetos

A hidrofobicidade dos subsítios de ligação das tripsinas dos insetos caracterizados foi determinada como descrito em material e métodos. O subsítio S3 apresenta hidrofobicidades de 0,3; 0,9; 1,4 e 1,9 para *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, respectivamente (Figura 11). O subsítio S2 apresenta hidrofobicidades de 1,4; 1,9; 2,2 e 1,8 para *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. O subsítio S1' apresenta índices de hidrofobicidade de -0,2; 1,2 e 1,5 para *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* enquanto o subsítio S2' apresenta índices de hidrofobicidade de 1,5; 1,6 e 2,9. Os subsítios mais diferenciados quanto à sua hidrofobicidade entre as diferentes tripsinas de insetos são os subsítios S3 e S1'. A comparação dos valores de hidrofobicidade destes subsítios para as tripsinas dos insetos mais distantes na escala evolutiva, *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*, demonstra diferenças de hidrofobicidade de 6,3 vezes para o subsítio S3 e 7,5 vezes para o sítio S1'. Por outro lado o subsítio que apresentou as menores diferenças foi o S2. Provavelmente este subsítio exerça alguma função essencial, dado que este subsítio apresenta maior semelhança entre as tripsinas de insetos, devendo estar envolvido no favorecimento da ligação ou da catálise dos substratos.

4.5. Estudos de inibição e caracterização dos resíduos presentes no sítio ativo da tripsina de *Periplaneta americana*

4.5.1. Efeito da concentração dos inibidores benzamidina e SBTI sobre a atividade da tripsina purificada de *Periplaneta americana*

Benzamidina é um inibidor descrito como inibidor específico de tripsinas (Bode et al., 1975, Bode et al., 1984). Para a tripsina de *Periplaneta americana* este inibidor apresentou padrão de inibição do tipo competitivo linear simples (Figura 12) com um K_i de 0,25 μM , semelhante ao de tripsinas de outros insetos como *Manduca*

*Periplaneta americana**Tenebrio molitor* *Musca domestica**Diatraea saccharalis*

Figura 11: Peptídeos ideais desenhados e índices de hidrofobicidade para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, a partir da caracterização de especificidade de cada um dos subsítios estudados para estas enzimas. Nd: não determinados.

Figura 12: Inibição da tripsina purificada de *Periplaneta americana* por benzamidina. O plote de Lineweaver-Burk da atividade sobre B-R-MCA contra diferentes concentrações (μM) de benzamidina ($\bullet$, 0; $\diamond$, 2,2; $\triangle$, 4,3, $\square$, 8,6; $\circ$, 17,2). Gráfico inserido: replote das inclinações calculadas do plote de Lineweaver-Burk x concentração de benzamidina.

sexta (Miller et al., 1974); *Ostrinia nubilalis* (Bernardi et al., 1996) e *Sesamia nonagrioides* (Novillo et al., 1999).

O inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz, SBTI, é um inibidor do tipo “tight-binding”. A tripsina de *Periplaneta americana* apresentou um K_D de 0,4 nM (Figura 13) em relação a este inibidor. Dado que SBTI é um inibidor de ligação permanente e de estequiometria de 1:1, é possível calcular a atividade específica da tripsina de *Periplaneta americana* e compará-la com os dados obtidos pela determinação da atividade específica da marcha de purificação (Tabela 1). A atividade específica calculada a partir dos dados de titulação com SBTI foi de 1.400 U/mg, valor que concorda com o valor determinado anteriormente.

4.5.2. Caracterização dos resíduos envolvidos em catálise para a tripsina de *Periplaneta americana*

4.5.2.1. Caracterização da serina catalítica

A caracterização da presença da serina catalítica no sítio ativo da tripsina de *Periplaneta americana* foi realizada utilizando-se PMSF. A tripsina de *Periplaneta americana* é inativada por PMSF com cinética de pseudo primeira ordem (Figura 14). Um plote do logaritmo de k_{obs} (s^{-1}) da modificação de PMSF contra a concentração de PMSF resulta em uma reta (Figura 14) com uma inclinação (ordem de reação) de 1,0. A constante de segunda ordem da reação desta enzima com PMSF é de $0,18 M^{-1}s^{-1}$.

4.5.2.2. Caracterização da histidina catalítica

A caracterização da presença da histidina catalítica no sítio ativo da tripsina de *Periplaneta americana* foi realizada utilizando-se T-K-CK. A tripsina de *Periplaneta americana* é inativada por T-K-CK com cinética de pseudo primeira ordem (Figura 15). Um plote do logaritmo de k_{obs} (s^{-1}) da modificação de T-K-CK contra a concentração de T-K-CK resulta em uma reta (Figura 15) com uma inclinação (ordem de reação) de 1,0. A constante de segunda ordem de reação desta enzima com T-K-CK é de $3,3 M^{-1}s^{-1}$ (Figura 15).

Figura 13: Titulação da tripsina purificada de *Periplaneta americana* por SBTI. Ensaios de 30 minutos foram realizados com Z-GGR-MCA como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5.

Figura 14: Inativação da tripsina de *Periplaneta americana* na presença de 0 (●); 1,0 (◆); 1,5 (▲) e 2,0 (■) mM PMSF em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5. O gráfico inserido mostra um plote de k_{obs} (s^{-1}) x log da concentração de PMSF.

Figura 15: Inativação da tripsina de *Periplaneta americana* na presença de 0 (●); 0,1 (◆); 0,25 (■) e 0,75 (○) mM de T-K-CK em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. O gráfico inserido mostra um plote de k_{obs} (s^{-1}) x log da concentração de T-K-CK.

4.6. Clonagem e seqüenciamento das tripsinas de *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana*

Foram utilizados dois protocolos de extração de RNA total de intestino médio de *Diatraea saccharalis*, *Musca domestica* e *Periplaneta americana*, sendo que a segunda metodologia, utilizando precipitação com isopropanol na presença da solução de precipitação (vide Material e Métodos), permite a obtenção de razões 260 nm/280 nm entre 1,9 e 2,0; enquanto a precipitação unicamente com isopropanol apresentava razões de 1,6 a 1,8. Estas amostras apresentaram-se em géis de agarose como uma banda conspícua de RNA de alto peso molecular, correspondente a RNA ribossômico. Não surgiram bandas de baixo peso molecular o que indica que o RNA estava em boas condições não apresentando degradação por RNases. Estes materiais foram enviados à Stratagene (*Musca domestica*: 1,2 mg de RNA total; *Periplaneta americana*: 4,0 mg e *Diatraea saccharalis*: 4,0 mg) para confecção de bibliotecas de cDNA em vetor Lambda Zap II.

“Primers” degenerados para tripsina foram desenhados a partir do alinhamento de seqüências das tripsinas de insetos conhecidas e a partir de “primers” utilizados para clonagem de famílias multigênicas de tripsinas de insetos da ordem Lepidoptera (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001a,b). Os “primers” apresentam as seqüências: 5'TYSTSWCCGCIGCTCACTG3' (TRYPHis 57; “primer” forward), “primer” MID (que apresenta a seqüência complementar ao “primer” TrypHis 57 e 5'CCRGAGTCICCTGGCAIKSITC3' (TRYPAsp 189; “primer” reverse), sendo que Y= c + T; S=c+g; W=A+T; I=deoxyinosine. Apesar da presença de degeneração nestes “primers”; a combinação destes foi bastante específica para tripsina, pois estas seqüências codificam para a histidina envolvida em catálise (His57) e para o ácido aspártico 189 envolvido na determinação de especificidade de tripsina. Reações de PCR tendo como DNA molde alíquotas de bibliotecas de cDNA de *Periplaneta americana*, *Diatraea saccharalis* utilizando estes “primers” demonstram a amplificação de uma banda única, para cada biblioteca, de 400 pb, tamanho correspondente ao esperado (Figura 16). Estes produtos de PCR foram purificados com a utilização do kit QIAquick (Qiagen) e utilizados para inserção em

Figura 16: Produtos de PCR obtidos com “primers” degenerados de sequências conservadas de tripsina gerados tendo como molde bibliotecas de *Tenebrio molitor* (raia 1), *Musca domestica* (raia 2), *Periplaneta americana* (raia 3), *Diatraea saccharalis* (raia 4) e *Spodoptera frugiperda* (raia 5). As raias indicadas pela letra M representam os marcadores de massa molecular.

vetor de clonagem TOPO. Este plasmídeo foi utilizado para a transformação de células XL1Blue. Todas as transformações foram bem sucedidas. Colônias isoladas foram crescidas e foi realizada a purificação dos plasmídeos através de Mini-Prep (Promega). Os plasmídeos foram digeridos e os produtos de digestão foram aplicados a um gel de agarose 1% demonstrando que os plasmídeos contendo como inserto os produtos de PCR correspondentes à amplificação das bibliotecas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* estão clonados. O seqüenciamento destes insertos permitiu a obtenção de seqüências internas das tripsinas dos dois insetos. Para a obtenção das seqüências completas das tripsinas de interesse os “primers” TRYP-His e TRYP-Asp e Mid foram combinados com os “primers” T3 e T7 correspondentes a seqüências dos braços do fago no qual a biblioteca de cDNA está inserida. Esta metodologia permitiu a obtenção do N-terminal de duas tripsinas maduras de *Diatraea saccharalis* (Figura 17).

A utilização desta estratégia para obtenção da seqüência da tripsina de *Diatraea saccharalis* obteve sucesso parcial para seqüenciamento das regiões N e C terminais, faltando para completar a seqüência total da proteína cerca de 40 aminoácidos (120 pB). Uma primeira análise das seqüências e comparação com seqüências de tripsinas de insetos descritas no GenBank permitiu a verificação de sete seqüências de tripsina formando três grupos de genes distintos de tripsina em *Diatraea saccharalis*, formados pelas seqüências 1 e 2 (A), 3 e 4 (B) e pelas seqüências 5 e 7 (C) (Figura 17). Os grupos A e C apresentam algumas características como: um resíduo R que antecede o N-terminal da proteína madura (RIVGG), região diferenciada da His catalítica estando presentes um resíduo de treonina ou um resíduo de serina na seqüência XAAHC, presença de todas as cisteínas conservadas em todas as tripsinas indicando que o dobramento das proteínas seja semelhante, manutenção de uma série de resíduos envolvidos em determinação de especificidade como os aminoácidos 193 e 195 formadores do “oxyanion hole”, o ácido aspártico 189, a tirosina 172, assim como o ácido aspártico 102 (Figura 17). As seqüências 3 e 4, apesar de similares a tripsinas, apresentam um maior número de cisteínas e não apresentam o resíduo de His catalítico, sendo, provavelmente, uma proteína não funcional. Contudo todas as seqüências compartilham a região C-terminal da proteína que apresenta a região conservada DVGGKDPCQGDSG (Figura 17), incluindo o resíduo de serina catalítico, destacado

A

81

tccctctccggtcactgcactatcaatgaccatccgttccagtggcagctcgtgtagga
 L **S** **A** **A** **H** C T I N D H P F Q W Q S R V G
 tccaccttcgctaatagtgtgtgttatatacgtctcgcgaatcatcatcca
 S T F A N S G G V I Y A T S Q I I N H P
 caatacaaccaacaacatcatcgttaatgatatacgccatcccttcgtaccgttaaccaatt
 Q Y N P N I I G N D I A I L R T V N P I
 aattttgtcataacttaacttaatccaacaagccagtattgccagtggcactatatacttgcg
 N F V N N L I Q Q A S I A S G T Y I L A
 gacaaccaagtagtttgggtactgtgtgggacgtcaatatctgggggtccaccatca
 D N Q V V W A T G W G R Q Y S G G P P S
 gagcaactgagacacgttccaatatgacccgtttaatcaagctgtttgcagagctcgttac
 E Q L R H V Q I W T V N Q A V C R A R Y
 gcagaggtacgcctcactatcaaccgcacaacatgttgttccggtcgtggtgacgtcgt
 A E V R L T I T D N M L C S G W L D V **G**
 ggtcgtgaccactggccagggcgcactctgg

5	IVGGELTINIP	INVELLIMFEGSNL	INCGSILNRALITPAACIG	HEFMNSVGSFANSGGVASHILHNPQ	PIY	INVAIIRFANILFVNML	ASISGKVVLLN	RVVLFEGERY	GGGSESL	144					
7	-----NIP	INVELLMFEGSNL	INCGSILNRALITPAACIG	HEFMNSVGSFANSGGVASHILHNPQ	PIY	INVAIIRFANILFVNML	ASISGKVVLLN	RVVLFEGERY	GGGSESL	135					
1	IVGGELTINIP	INVELLMFEGSNL	INCGSILNRALITPAACIG	HEFMNSVGSFANSGGVASHILHNPQ	PIY	INVAIIRFANILFVNML	ASISGKVVLLN	RVVLFEGERY	GGGSESL	148					
2	-----NIP	INVELLMFEGSNL	INCGSILNRALITPAACIG	HEFMNSVGSFANSGGVASHILHNPQ	PIY	INVAIIRFANILFVNML	ASISGKVVLLN	RVVLFEGERY	GGGSESL	132					
Index 1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150

	160	170	180	190
5	REYQVIMINACAAIAEVLIVDMLCGNRLVGGHPGCGSG			191
7	REYQVIMINACAAIAEVLIVDMLCGNRLVGGDDPGCGSG			182
1	LVIIVFVENVLCRRNALIVVPMIAGIILVGGHPGCGSG			195
2	LVIIVFVENVLCRRNALIVVPMIAGIILVGGHPGCGSG			179

Figura 17: (A) Sequência interna de tripsina de *Periplaneta americana* obtidas a partir de bibliotecas de cDNA confeccionadas utilizando o intestino médio deste inseto. (B) Alinhamento múltiplo de sequências de tripsinas de *Diatraea saccharalis* obtidas a partir de biblioteca de cDNA confeccionadas utilizando o intestino médio deste inseto utilizando o programa Clustal X (1.81)..

em vermelho. Apesar de termos seqüenciado vários fragmentos de genes de tripsina utilizando esta estratégia, para *Periplaneta americana* não foi obtido o mesmo sucesso, não sendo possível o seqüenciamento N ou C-terminal da proteína de interesse (Figura 7).

4.7. Análise evolutiva das tripsinas de insetos

Cerca de 109 seqüências de tripsinas de insetos estão descritas no GenBank (Março 2003). Estas seqüências foram organizadas e alinhadas através do programa ClustalX. Estas mesmas seqüências foram utilizadas para análise de distâncias pelo algoritmo de Neighbor-Joining. Foi obtida uma árvore que apresenta 10 ramos principais. O ramo A (Figura 18 e Tabela 6) contém, principalmente, as seqüências de Diptera Nematocera representados por *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Aedes polynensis*. O grupo B contém duas seqüências de tripsina salivar de Hemiptera Heteroptera. O grupo C contém seqüências de tripsinas de três diferentes ordens de insetos: duas das seqüências de *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera), duas das seqüências de *Anthonomus grandis* (Coleoptera) e uma das seqüências de *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera). Provavelmente estas tripsinas não são digestivas, mas podem ter uma função na qual uma tripsina bastante conservada seja necessária. O grupo D contém todas as seqüências das tripsinas de Lepidoptera, com exceção das seqüências de *Agrotis ipsilon* (6) e da seqüência de *Scirpophaga incertulans* (2). Este grande grupo apresenta-se dividido em três subgrupos muito distintos denominados D1, D2 e D3. O grupo E contém, principalmente, as tripsinas de Coleoptera já descritas. O grupo F contém seqüências de Diptera Nematocera, assim como o grupo A. A separação das tripsinas de Diptera Nematocera em dois grupos distintos pode estar relacionada ao desenvolvimento da alimentação por sangue em mosquitos, sendo que as enzimas que são induzidas por alimentação estão separadas das enzimas constitutivas. O grupo G é formado pelas seqüências de Siphonaptera e uma seqüência de *Phaedon cochleriae* (Coleoptera). O grupamento desta tripsina de Coleoptera com as enzimas de Siphonaptera não é claro. Os grupos H e I são constituídos das seqüências de tripsina de Diptera Cyclorrhapha e de Hemiptera Auchenorrhyncha. Finalmente, o último grupo é constituído pelas tripsinas de mamífero, sendo que a tripsina de rato

Figura 18: Árvore de distância por análise de NJ mostrando os agrupamentos formados pelas tripsinas de insetos descritas no GenBank. Os ramos são suportados estatisticamente por análise por *Bootstrap*.

Tabela 6: Sequências de tripsina de insetos utilizadas para análise de distância por NJ**.

Insect trypsin		GenBank Access number	Insect trypsin		GenBank Access number
*	Diptera		*		
1	<i>Aedes aegypti</i>	AY 198134	69	<i>Rhyzoperta dominica</i>	AF 130842
2	<i>Aedes aegypti</i>	AF 187078	70	<i>Rhyzoperta dominica</i>	AF 130841
3	<i>Aedes aegypti</i>	M 77814	71	<i>Rhyzoperta dominica</i>	AF 130840
79	<i>Aedes aegypti early</i>	AF 487426		Hemiptera	
78	<i>Aedes aegypti early</i>	AF 508783	11	<i>Lygus hesperus</i>	AF 356841
4	<i>Aedes albopictus</i>	AY 148880	12	<i>Lygus lineolaris</i>	AF 414430
5	<i>Aedes albopictus</i>	AF 268665	106	<i>Nilaparvata lugens</i>	AJ 316142
6	<i>Aedes polynensis</i>	AY 155563		Lepidoptera	
75	<i>Anopheles gambiae</i>	Z 22930	29	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261990
73	<i>Anopheles gambiae</i>	Z 18889	23	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261991
74	<i>Anopheles stephensis</i>	AF 02809	24	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261979
77	<i>Culex pipiens early</i>	U 65411	30	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261977
80	<i>Culex pipiens pallens</i>	AY 034060	17	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261976
76	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	AY 029276	55	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261975
72	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	AY 271695	31	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261974
97	<i>Drosophila erecta alpha</i>	U 40653	56	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261973
101	<i>Drosophila erecta beta</i>	U 40653	25	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261972
100	<i>Drosophila erecta delta</i>	U 40653	28	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261971
104	<i>Drosophila erecta epsilon</i>	U 40653	22	<i>Agrotis ipsilon</i>	AF 261970
92	<i>Drosophila erecta eta</i>	U 40653	46	<i>Choristoneura fumiferana</i>	L 04749
99	<i>Drosophila erecta gama</i>	U 40653	45	<i>Choristoneura fumiferana</i>	U 12917
95	<i>Drosophila erecta theta</i>	U 40653	47	<i>Galleria mellonella</i>	AY 040819
91	<i>Drosophila erecta zeta</i>	U 40653	37	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12283
93	<i>Drosophila heteroneura</i>	AF 049235	33	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12278
98	<i>Drosophila melanogaster alpha</i>	NG 000192	40	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12277
103	<i>Drosophila melanogaster beta</i>	M 96372	43	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12276
102	<i>Drosophila melanogaster delta</i>	NM 080374	42	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12275
105	<i>Drosophila melanogaster epsilon</i>	NM 135881	34	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12271
10	<i>Glossina fuscipes</i>	AF 525314	39	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12270
96	<i>Glossina morsitans</i>	AF 252869	35	<i>Helicoverpa armigera</i>	Y 12269
8	<i>Ochlerotatus triseriatus</i>	AY155564	26	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261989
7	<i>Ochlerotatus epactius</i>	AY155562	61	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261988
94	<i>Sarcophaga bullata</i>	X94691	59	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261987
81	<i>Simulium vittatum</i>	L 08428	57	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261986
	Siphonaptera		27	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261985
15	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053921	36	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261983
89	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053919	44	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261984
85	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053918	58	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261982
82	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053917	60	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261981
13	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053915	41	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 261980
87	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053914	38	<i>Heliothis virescens</i>	AF 267416
83	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053913	32	<i>Lacanobia oleraceae</i>	AJ 007706
86	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053910	50	<i>Manduca sexta</i>	L 16807
88	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053909	49	<i>Manduca sexta</i>	L 16805
84	<i>Ctenocephalides felis</i>	AF 053906	48	<i>Manduca sexta</i>	L 16806
	Coleoptera		62	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 173498
18	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377990	63	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 173497
19	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377989	51	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 173496
68	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377988	52	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 173495
16	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377987	53	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 064526
65	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377986	54	<i>Plodia interpunctella</i>	AF 064525
67	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377983	64	<i>Scirpophaga incertulas</i>	AF 045142
14	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377982	21	<i>Scirpophaga incertulas</i>	AF 045140
9	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377980			
20	<i>Anthonomus grandis</i>	AF 377979			
66	<i>Diaprepes abbreviatus</i>	AF 072690			
90	<i>Phaedon cochleariae</i>	Y 17905			

*os números correspondentes representam as espécies de insetos na árvore de distância (Figura 18).

**Sequências 107-109 correspondem a tripsina caùônica bovina, tripsina aniônica bovina e a tripsina de rato respectivamente.

foi utilizada como grupo externo. Este resultado demonstrou que a maioria das tripsinas tende a se agrupar de acordo com as relações filogenéticas baseadas na morfologia de insetos (Wheeler et al., 2001) (Tabela 6 e Figura 18).

Para esclarecer a relação entre os três ramos de tripsinas de Lepidoptera e a sensibilidade ou resistência destas enzimas a inibidores de plantas, uma nova análise de NJ foi realizada apenas com as seqüências de Lepidoptera para as quais se conhece a alteração de expressão na presença ou ausência de inibidores do tipo Kunitz em suas dietas de acordo com Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001a e Bown et al., 1997. Como descrito anteriormente, 3 ramos são verificados na nova árvore obtida (Figura 19). Os ramos I e III são formados principalmente por enzimas que estão ausentes ou são menos expressas na presença do inibidor, enquanto o ramo II é constituído pelas enzimas descritas como resistentes.

4.8. Purificação e isolamento parcial das quimotripsinas de insetos

4.8.1. *Periplaneta americana*

A purificação da quimotripsina de *Periplaneta americana* é obtida com a combinação de dois passos cromatográficos de troca iônica. A quimotripsina é um sub-produto do primeiro passo da marcha de purificação da tripsina de *Periplaneta americana*, sendo que esta proteína não interage com a coluna High Q em pH 5,0 (Figura 20). A recuperação de atividade inicialmente obtida para este passo de purificação era de 30 %. A adição de tampão Tris-HCl na concentração final de 0,1 M pH 8,5 contendo SDS 0,05% às frações eluídas da cromatografia de troca aniônica em coluna High Q contendo atividade de quimotripsina levou à recuperações de 100% da atividade desta enzima. Este tipo de resultado já havia sido observado para as quimotripsinas de *Diatraea saccharalis*, *Heliothis virescens* e *Spodoptera frugiperda* para as quais a adição de SDS à eletroforese nativa leva a um aumento de recuperação de aproximadamente 10 vezes.

O eluído ativo sobre Suc-AAF-MCA foi reunido, dialisado contra tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 contendo SDS 0,05 % e submetido a uma cromatografia de troca catiônica em coluna Resource S em sistema FPLC. A utilização desta coluna é bastante favorável pois não há necessidade de remoção do

Figura 19: Árvore de distância por análise de NJ mostrando os agrupamentos formados pelas tripsinas sensíveis ou resistentes descritas para insetos da ordem Lepidoptera e posições de interação com inibidores e substrato. Os ramos são suportados estaticamente por análise por Bootstrap.

Figura 20: (A) Perfil de atividade (●, linha cheia) sobre Suc-AAF-MCA após cromatografia de troca aniônica em coluna High Q, a partir da porção solúvel do homogeneizado do intestino anterior e médio de machos adultos de *Periplaneta americana*. (B) Perfil de atividade sobre Suc-AAF-MCA após cromatografia de troca catiônica em coluna Resource S, a partir do reunido do eluído com atividade quimotríptica da coluna HighQ, acrescidos de tampão Tris-HCL 0,5 M pH8,5 contendo SDS 0,5%. (C) SDS-PAGE da quimotripsina digestiva purificada de *Periplaneta americana*.

SDS das amostras para aplicação na coluna, mantendo a proteína mais estável. A recuperação deste último passo de purificação da quimotripsina de *Periplaneta americana* é de pelo menos 70 % (Figura 20). Esta proteína apresenta um peso molecular de aproximadamente 29 kDa (Figura 20), pI de 8,2 (Figura 21) e pH ótimo de 9,0 (Figura 22).

4.8.2. *Diatraea saccharalis*

A caracterização inicial da quimotripsina de *Diatraea saccharalis* a partir da porção solúvel do homogeneizado de intestino médio indica um ponto isoelétrico de 5,4 (Figura 23) e um pH ótimo de 10,0 (Figura 24).

Diferentes metodologias foram utilizadas com o intuito de purificar a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*. Eletroforese em condições semi-desnaturantes, cromatografias em coluna de afinidade SBTI-Agarose, filtração em gel utilizando uma coluna Superose-12 em sistema de alta pressão na presença de SDS, focalização isoelétrica, eletroforese em condições semi-desnaturantes em cilindros de 8,0 e 18,0 cm. Em todos os experimentos a atividade de quimotripsina foi acompanhada utilizando Suc-AAF-MCA como substrato.

A cromatografia em filtração em gel demonstrou uma atividade importante de quimotripsina não isolada completamente da atividade de tripsina, o que indica que estas duas enzimas apresentam pesos moleculares semelhantes (Figura 25). Esta cromatografia foi realizada em duas diferentes condições: tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,5 contendo NaCl 0,2 M e tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo SDS 0,05%. As recuperações foram de 20 e 56% respectivamente.

A cromatografia em SBTI-Agarose levou ao isolamento de uma atividade de quimotripsina com recuperação de 20%, com a adição de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo SDS 0,05% às frações. O perfil de atividade e a eletroforese das frações ativas reunidas estão demonstrados nas Figura 26. Como a eletroforese em placa havia apresentado uma recuperação de 44% e poucas proteínas contaminantes, foram realizadas eletroforeses em condições semi-desnaturantes em cilindros de 8,0 cm e 18,0 cm, sendo que os géis menores foram realizados em três diferentes concentrações de acrilamida (Figura 27) com o objetivo de melhorar a resolução de separação. Neste experimento também se observa apenas uma

Figura 21: Focalização isoeétrica a partir da porção solúvel do homogeneizado de intestino anterior e médio de *Periplaneta americana*. (●) Atividade sobre Suc-AAF-MCA; (○) gradiente de pH obtido nas leituras das frações de gel controle, determinando um pI de 7,3 para a quimotripsina de *Periplaneta americana*.

Figura 22: Efeito do pH sobre a atividade de quimotripsina de *Periplaneta americana*. Para este estudo foi utilizada uma série de tampões composta por: pHs 7-9 (◆): tampão Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,2 M; pHs 9 -10,5 (●): tampão Gly-NaOH 0,1 M contendo NaCl 0,2 M e pHs 10,5-12 (■): tampão fosfato-NaOH 0,1 M contendo Na Cl 0,2 M .

Figura 23: Focalização isoeétrica a partir da porção solúvel do conteúdo luminal do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis* determinando um pI de 5,7.

Figura 24: Efeito do pH sobre a atividade de quimotripsina a partir da porção solúvel do conteúdo luminal do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis*. Para este estudo foi utilizada uma série de tampões composta por: pHs 7-9 (●): tampão Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,2 M; pHs 9 -10,5 (○): tampão Gly-NaOH 0,1 M contendo NaCl 0,2 M e pHs 10,5-12 (■): tampão fosfato-NaOH 0,1 M contendo Na Cl 0,2 M .

Figura 25: Filtração em gel em coluna Superose 12 em sistema de alta pressão (FPLC-Pharmacia) em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo SDS 0,05%, a partir da porção solúvel do conteúdo do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis*. Perfil de atividade de quimotripsina utilizando Suc-AAF-MCA como substrato (●). Perfil de atividade de tripsina utilizando Z-FR-MCA como substrato (○).

Figura 26: Cromatografia de afinidade em coluna de SBTI-Agarose a partir da porção solúvel do conteúdo do intestino médio de *Diatraea saccharalis* Perfil de atividade de quimotripsina de aliquotas das frações às quais foram adicionados 200 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,5 contendo SDS 0,05%, utilizando Suc-AAF-MCA como substrato

Figura 27: Eletroforeses em condições semidesnaturantes em géis de 8cm com diferentes concentrações de poliacrilamida 5,5 % (A), 7,5 % (B), 10 % (C) e 12 % (D) e gel de 18 cm em poliacrilamida 12% (E) a partir da porção solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de larvas *Diatraea saccharalis*.

As frações indicadas em círculos vazios representam fluorescência emitida a 460 nm após incubação de aliquotas das frações das eletroforeses com Z-FR-MCA como substrato indicando atividade de tripsina. As frações indicadas em círculos cheios representam fluorescência emitida a 460 nm após incubação de alíquotas das frações das eletroforeses com Suc-AAF-MCA como substrato indicando atividade de quimotripsina.

atividade de quimotripsina, a qual não está completamente isolada da atividade de tripsina contaminante (Figura 27).

A utilização de uma cromatografia afinidade utilizando uma coluna de PBA-agarose combinada com uma cromatografia de afinidade para tripsina, como Hitrap benzamidina, tem se mostrado promissora para a purificação de quimotripsinas de Lepidoptera como demonstrado para *Spodoptera frugiperda*.

4.8.3. *Spodoptera frugiperda*

Uma combinação de cromatografias de afinidade para tripsina e quimotripsina tem dado resultados satisfatórios de separação destas enzimas em Lepidoptera. A aplicação da porção solúvel do conteúdo do intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda* em PBA-Agarose leva a separação de boa parte da atividade de tripsina, a qual não interage com a coluna, da atividade de quimotripsina que é eluída na presença de PBA. O eluído ativo sobre substrato específico de tripsina é, então, aplicado a uma coluna Hitrap-benzamidina para purificação da tripsina (Figura 28).

4.9. Caracterização da especificidade de quimotripsinas em insetos

Com o objetivo de obter informações sobre a especificidade de quimotripsinas de insetos pertencentes a ordens de insetos em diferentes posições na escala evolutiva, as atividades de quimotripsina foram caracterizadas tanto quanto à sua especificidade em relação a diferentes substratos quanto em relação a diferentes modificadores químicos. Como apresentado na introdução, existem poucos casos descritos na literatura de modificações de quimotripsinas de insetos por clorometil cetonas do tipo T-F-CK, sendo que, na sua grande maioria, estas inativações não são bem sucedidas. A modificação ou não por T-F-CK é um fator discriminatório da atividade quimotríptica, sendo que, desta forma, muitos autores têm considerado que alguns insetos em estudo não apresentariam quimotripsinas como endopeptidases digestivas. Outra hipótese é a de que as quimotripsinas de insetos apresentam especificidade muito diferente em relação a quimotripsina de mamífero (Lee e Anstee, 1995, Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001b).

Figura 28: Perfil de atividade sobre Z-GGR-MCA (●) e Suc-AAF-MCA (○) após cromatografia em PBA-agarose a partir da porção solúvel do conteúdo luminal de *Spodoptera frugiperda*. A seta indica a adição de fenil butilamina.

As atividades quimotrípticas de diferentes insetos e da quimotripsina bovina foram caracterizadas em relação a diferentes substratos contendo de 1 a 4 resíduos, para verificar qual a influência do número de resíduos na eficiência catalítica destas enzimas, bem como em relação a modificadores de tamanhos diferentes utilizando T-F-CK, um modificador que simularia os substratos de um único resíduo e Z-GGF-CK, que simula os substratos tripeptídicos. Os insetos utilizados foram: *Periplaneta americana* (Dictyoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Aedes aegypti* (Diptera), *Diatraea saccharalis* (Pyralidae), *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 29). A quimotripsina de mamífero foi caracterizada a título de comparação. Desta forma, foi possível esclarecer se as diferenças nas modificações estavam relacionadas: (a) ao preparo dos modificadores, muitas vezes preparado sem a utilização de solventes orgânicos (b) ao número de resíduos associados ao grupamento clorometil cetona como era sugerido na literatura ou, (c) a alguma diferença no sítio ativo das quimotripsinas de insetos.

4.9.1. Caracterização cinética de diferentes quimotripsinas utilizando substratos colorimétricos e de fluorescência direta

A caracterização de diferentes quimotripsinas em relação a diferentes substratos foi realizada pelo estudo do efeito da concentração dos substratos colorimétricos Suc-F-pNa, B-Y-pNa, Suc-AAPF-pNa e dos substratos fluorimétricos Suc-LY-MCA e Suc-AAF-MCA.

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. Todas as enzimas estudadas apresentam maior eficiência de hidrólise sobre Suc-AAF-MCA com exceção da atividade quimotríptica de *Aedes aegypti*. No entanto, as quimotripsinas estudadas apresentam, comparativamente, diferentes relações de eficiência de hidrólise sobre os substratos caracterizados. A quimotripsina de mamífero apresenta mesma eficiência de hidrólise sobre Suc-AAPF-pNa e Suc-AAF-MCA, o que não é verificado para as quimotripsinas de nenhum dos insetos em estudo, indicando que a ocupação de S2 por uma prolina é menos favorável à hidrólise nas quimotripsinas de insetos. Já a quimotripsina de *Tenebrio molitor* apresenta maior eficiência de

Figura 29: Relações filogenéticas entre as principais ordens de insetos e números aproximados de espécies atuais (percentagens do total de insetos, que somam cerca de 860 mil espécies). As linhas sólidas mostram os ramos a partir do momento em que aparecem no registro fóssil, e as linhas tracejadas mostram possíveis distribuições geológicas baseadas em evidências indireta (Reproduzido de Terra e Ferreira, 1991).

Tabela 7. Especificidade da atividade de quimotripsina de diferentes insetos*.

INSETO	Suc-F-pNA		Suc-AAPF-pNA		Suc-AAF-MCA		Suc-LY-MCA	
	Km (mM)	Vm (nmoles/min)	Km (mM)	Vm (µmoles/min)	Km (µM)	Vm (nmoles/min)	Km (µM)	Vm (µmoles/min)
<i>Periplaneta americana</i>	4,8 ± 1,2	0,75 ± 0,05	1,1 ± 0,04	7,6 ± 1,4	6,0 ± 0,4	0,11 ± 0,003	10 ± 0,9	0,7 ± 0,02
<i>Tenebrio molitor</i>	2,3 ± 0,2	8,5 ± 0,2	0,30± 0,02	2,7 ± 0,06	10 ± 1,3	0,52 ± 0,030	32 ± 2,4	330 ± 16
<i>Aedes aegypti</i>	---	---	0,09 ± 0,01	0,3 ± 0,02	27 ± 1,8	0,07± 0,002	21 ± 1,7	1,2 ± 0,04
<i>Diatraea saccharalis</i>	3,3 ± 1,0	1,3 ± 0,13	0,50±0,03	2,6 ± 0,07	13,0 ± 2,0	0,14 ± 0,008	22 ± 1,9	4,9 ± 0,2
<i>Erynnis ello</i>	64± 6,4	140 ± 14	0,2 ± 0,02	8,3 ± 0,2	54 ± 3,0	0,04 ± 0,001	19 ± 2,4	5,0 ± 0,2
<i>Spodoptera frugiperda</i>	2,1 ± 0,2	0,7 ± 0,02	0,2 ± 0,02	1,1 ± 0,1	23 ± 5,0	0,15 ± 0,013	25 ± 3,0	7,3 ± 0,4
Quimotripsina bovina	197 ± 20	2400 ± 240	0,6 ± 0,1	100 ± 7	105 ± 12	20 ± 0,9	77 ± 33	115 ± 29

*As preparações utilizadas como fonte de enzima utilizada nestas caracterizações estão descritas abaixo.
Periplaneta americana: porção solúvel de homogeneizado de intestino anterior e médio.
Tenebrio molitor: porção solúvel de homogeneizado do conteúdo do intestino médio posterior.
Aedes aegypti: porção solúvel de homogeneizado do intestino médio.
Diatraea saccharalis: porção solúvel de homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio.
Erynnis ello : porção solúvel de homogeneizado de intestino médio.
Spodoptera frugiperda: porção solúvel de homogeneizado de conteúdo luminal.
Quimotripsina bovina: preparação comercial.

Tabela 8: Especificidade da atividade de quimotripsina de diferentes insetos*.

INSETO	Suc-F-pNa	Suc-AAPF-pNa	Suc-AAF-MCA	Suc-LY-MCA
	Vmax/Km (10 ⁻³)	Vmax/Km	Vmax/Km	Vmax/Km
<i>Periplaneta americana</i>	0,16 ± 0,04	6,90 ± 1,30	18,0 ± 1,20	0,07 ± 0,007
<i>Tenebrio molitor</i>	3,70 ± 0,33	9,00 ± 0,40	52,0 ± 7,00	10,3 ± 0,9
<i>Aedes aegypti</i>	---	3,30 ± 0,06	2,6 ± 0,20	0,06 ± 0,005
<i>Diatraea saccharalis</i>	0,40 ± 0,14	5,20 ± 0,34	10,0 ± 1,80	0,22 ± 0,02
<i>Erynnis ello</i>	2,20 ± 0,3	41,5 ± 4,30	0,74 ± 0,04	0,26 ± 0,04
<i>Spodoptera frugiperda</i>	0,33 ± 0,047	5,50 ± 0,74	6,50 ± 1,50	0,30 ± 0,04
Quimotripsina bovina	12,20 ± 1,73	167 ± 30	190,0 ± 20,0	1,5 ± 0,7

*As preparações utilizadas como fonte de enzima são as mesmas descritas na Tabela 7.

hidrólise sobre Suc-LY-MCA em comparação a todas as quimotripsinas em estudo, com exceção da quimotripsina de *Aedes aegypti*, como citado anteriormente. No entanto, as quimotripsinas de *Tenebrio molitor* e *Aedes aegypti*, assim como a dos outros insetos, não foram capazes de hidrolisar B-Y-pNa nas condições testadas, mas a quimotripsina de mamífero hidrolisa B-Y-pNa melhor do que Suc-F-pNa, o que indica que a quimotripsina de mamífero apresenta maior eficiência sobre substratos que apresentem um resíduo de tirosina em P1, enquanto as quimotripsinas de insetos hidrolisam preferencialmente substratos que apresentem resíduos de fenilalanina nesta posição. Além disso, a comparação entre os dados obtidos sobre Suc-F-pNa para as diferentes quimotripsinas demonstra que a quimotripsina de mamífero hidrolisa mais eficientemente substratos pequenos do que as quimotripsinas de insetos, sendo que dentre estes *Tenebrio molitor* e *Erinnyis ello* apresentaram eficiência de hidrólise pelo menos 10 vezes maior sobre este substrato que os outros insetos (Tabelas 7 e 8). Como citado acima, a quimotripsina de *Aedes aegypti* apresentou uma eficiência catalítica 4 vezes maior sobre o substrato Suc-LY-MCA do que sobre o substrato Suc-AAF-MCA, indicando uma especificidade diferencial desta quimotripsina em relação a dos outros insetos. Os três insetos da ordem Lepidoptera apresentaram afinidades (valores de Km) semelhantes em relação aos substratos utilizados nesta caracterização.

4.10. Caracterização da histidina catalítica de quimotripsina de insetos

4.10.1. Modificação química por clorometilcetonas

Os estudos com T-F-CK e Z-GGF-CK foram realizados através de experimentos de cinética de modificação, sendo possível verificar tanto a reatividade destas enzimas quanto à ordem de reação em relação aos modificadores.

Os resultados estão demonstrados nas Figura 30 e Tabelas 9 e 10. As quimotripsinas de mamífero, *Tenebrio molitor*, *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* foram modificadas tanto por T-F-CK quanto por Z-GGF-CK. As modificações por T-F-CK apresentaram pouca variação dos valores de reatividade para as quimotripsina inativadas (no máximo 3x), sendo que a atividade de quimotripsina melhor modificada foi a de *Diatraea saccharalis*. Já os valores de

Figura 30: Inativação da quimotripsina de *Tenebrio molitor* na presença de diferentes concentrações de T-F-CK (A) ou Z-GGF-CK (B) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. O gráfico inserido é o plote de log de k_{obs} (s⁻¹) x log da concentração do modificador.

Tabela 9: Determinação da reatividade e da ordem de reação (n) de quimotripsinas em relação ao modificador químico T-F-CK.

Enzima	Reatividade M ⁻¹ .s ⁻¹	n
<i>Periplaneta americana</i>	42,00	0,88
<i>Tenebrio molitor</i>	45,00	0,93
<i>Aedes aegypti</i>	0,08	0,82
<i>Diatraea saccharalis</i>	131,00	0,90
<i>Erimys ello</i>	5,30	0,83
<i>Spodoptera frugiperda</i>	0,13	1,03
Quimotripsina bovina	78,00	1,00

* As preparações utilizadas como fonte de enzima utilizada nestas caracterizações estão descritas abaixo.
Periplaneta americana: porção solúvel de homogeneizado de intestino anterior e médio.
Tenebrio molitor: porção solúvel de homogeneizado do conteúdo do intestino médio posterior.
Aedes aegypti: porção solúvel de homogeneizado do intestino médio.
Diatraea saccharalis: porção solúvel de homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio.
Erimys ello : porção solúvel de homogeneizado de intestino médio.
Spodoptera frugiperda: porção solúvel de homogeneizado de conteúdo luminal.
Quimotripsina bovina: preparação comercial.

Tabela 10: Determinação da reatividade e da ordem de reação (n) de quimotripsinas em relação ao modificador químico Z-GGF-CK.

Enzima	Reatividade M ⁻¹ .s ⁻¹	n
<i>Periplaneta americana</i>	150,0	1,10
<i>Tenebrio molitor</i>	152,0	1,07
<i>Aedes aegypti</i>	1,2	1,00
<i>Diatraea saccharalis</i>	445,0	0,80
<i>Trinnyx ello</i>	3,2	1,25
<i>Spodoptera frugiperda</i>	6,1	1,03
Quimotripsina bovina	615,0	1,05

*As preparações utilizadas como fonte de enzima para estas caracterizações são as mesmas descritas na tabela 9.

reatividade para Z-GGF-CK apresentaram variações de 4 vezes, sendo que a atividade melhor modificada foi a de mamífero. A reatividade descrita em literatura para a quimotripsina de mamífero é de $7,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Shaw et al., 1971) e a obtida foi de $77 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta diferença deve estar relacionada às diferentes condições de pH e temperatura nas quais as modificações foram realizadas, sendo que a ordem de reação não foi alterada. No entanto, como as condições utilizadas neste trabalho foram sempre as mesmas, é possível fazer uma comparação direta dos dados. As atividades de quimotripsina em *Tenebrio molitor* e *Periplaneta americana* apresentam reatividades muito semelhantes indicando uma provável semelhança tanto da acessibilidade da histidina presente no sítio ativo destas proteínas, tanto do efeito da presença de glicinas nas posições P2 e P3 verificada nos experimentos com o modificador Z-GGF-CK. No entanto, o efeito do posicionamento destas glicinas parece ser diferencial para as quimotripsinas de *Diatraea saccharalis* e bovina. A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* foi a enzima de maior reatividade em relação a T-F-CK, no entanto, não foi a enzima mais reativa nas modificações por Z-GGF-CK, o inverso ocorrendo à enzima bovina. A quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* apresenta uma reatividade 1000 vezes menor quando modificada por T-F-CK, se comparada a modificação da histidina reativa de *Diatraea saccharalis* e uma reatividade da ordem de 100 vezes menor quando a modificação é realizada com Z-GGF-CK.

Há uma diferença muito significativa na reatividade das histidinas presentes nos sítios catalíticos das quimotripsinas de diferentes insetos da ordem Lepidoptera. No entanto, esta diferença não é verificada com a utilização de diferentes substratos. Verificando a literatura, observamos que os trabalhos de quimotripsina que descrevem a ausência de modificação de quimotripsinas de insetos por T-F-CK têm sido realizados com insetos de uma mesma família dentro da ordem Lepidoptera, a família Noctuidae, mesma família de *Spodoptera frugiperda*, mas não a mesma família de *Diatraea saccharalis*, a qual pertence à família Pyralidae. A observação de um cladograma da ordem (Figura 31) permite verificar que estas famílias são distantes dentro do grupo Lepidoptera. A alteração da reatividade da histidina presente no sítio ativo podia ser então, uma exclusividade da família Noctuidae, ou de alguns grupos dentro da ordem Lepidoptera. Os dados de reatividade obtidos para a atividade quimotriptica de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae) foram

Figura 31: Cladograma da ordem Lepidoptera

utilizados para esta comparação, dado que esta família está em posição intermediária em relação às famílias Noctuidae e Pyralidae. Como *Erinnyis ello* foi alimentado em folhas, e os vegetais podem apresentar inibidores de endopeptidases, optamos pela realização prévia de uma filtração em gel utilizando uma coluna de Fast-desalting (Pharmacia) em sistema de alta pressão (FPLC System - Amersham Pharmacia). Esta cromatografia apresenta uma recuperação de 70%. As frações ativas reunidas foram utilizadas como fonte de enzima para todos os experimentos de caracterização cinética e de modificação química.

Os resultados obtidos para as modificações químicas da quimotripsina de *Erinnyis ello* utilizando T-F-CK e Z-GGF-CK como modificadores estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. A reatividade obtida para a histidina modificada por T-F-CK foi 25 vezes menor que a reatividade obtida para este mesmo resíduo da quimotripsina de *Diatraea saccharalis* e 250 vezes menor se modificada por Z-GGF-CK, demonstrando uma menor reatividade da histidina do sítio ativo de *Erinnyis ello* em comparação a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*. No entanto, como era esperado, a reatividade da histidina de *Erinnyis ello* é maior que a reatividade deste mesmo resíduo da quimotripsina de *Spodoptera frugiperda*. As inativações utilizando diferentes modificadores também foram úteis para elucidar o efeito da presença de resíduos de glicina ocupando S2 e S3. Mesmo a quimotripsina de *Erinnyis ello* sendo mais reativa com T-F-CK que a quimotripsina de *Spodoptera frugiperda*, ela foi menos reativa com Z-GGF-CK, o que indica um efeito negativo da presença destes resíduos de glicina nestas posições para a quimotripsina de *Erinnyis ello*, demonstrando que estas enzimas, provavelmente, apresentam grande influência dos subsítios de ligação para a catálise. Estes dados de modificação evidenciam a existência de uma diferença no sítio ativo das quimotripsinas em estudo.

4.10.2. Modificação por DEPC

As atividades das quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* quando caracterizadas quanto às suas especificidade por diferentes substratos (Tabela 7) e modificadas com T-F-CK e Z-GGF-CK (Tabelas 9 e 10), indicam uma exposição diferencial do resíduo de histidina presente no sítio ativo destas enzimas. Os modificadores utilizados anteriormente são volumosos e por isso

poderiam ter um acesso mais restrito ao sítio ativo. A utilização de um modificador pequeno de histidina poderia indicar se esta menor reatividade da quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* está relacionada ao tamanho do modificador. Dietilpirocarbonato foi escolhido como modificador. Como DEPC não é um modificador específico de histidinas presentes no sítio ativo de serina-endopeptidase, foi utilizada uma combinação de substratos p-nitroanilídicos para proteger o sítio ativo da modificação e cumarínicos para medida da atividade remanescente após a modificação, de forma a demonstrar se a presença de DEPC estava reduzindo a atividade de quimotripsina devido apenas à modificação da histidina catalítica. A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* é modificada por DEPC (Figura 32) e é protegida na presença de Suc-AAPF-pNa (Figura 32). Já a quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* não foi modificada por DEPC (Figura 32). Estes resultados indicam a proximidade de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos na vizinhança a His catalítica, os quais poderiam dificultar a ligação dos modificadores ou alterar o microambiente formado no sítio ativo alterando a reatividade do resíduo de His catalítico.

4.11. Modelagem molecular da quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* e análise evolutiva das quimotripsinas de insetos.

A sequência da quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* previamente obtida em nosso laboratório foi utilizada para estudos de modelagem com o programa Swiss-Prot tendo por base o quimotripsinogênio A de pâncreas bovino. Este modelo está apresentado na Figura 33. Utilizando o programa Swiss-Prot viewer foi possível observar o posicionamento dos resíduos catalíticos e de especificidade primária e os resíduos a 3,5 Å (distâncias maiores levam a interações muito fracas ou inexistentes) da histidina catalítica. Desta forma são visualizados os resíduos que podem interagir (constituir pontes de hidrogênio e outros tipos de interações) com o resíduo de His. Com este tipo de estudo foi possível identificar o resíduo de triptofano 59 (Figura 33). A comparação das sequências de mamífero e de *Spodoptera frugiperda* demonstra que nesta posição a quimotripsina de mamífero apresenta uma glicina (Figura 33). Ao observar o modelo gerado para a quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* verificamos que a cadeia lateral do resíduo

Figura 32: Inativação da atividade de quimotripsina de *Diatraea saccharalis* (A) e *Spodoptera frugiperda* (B) na presença de DEPC (●); na ausência de DEPC (■) e na presença de Suc-AAPF-pNa (◆) como substrato protetor da modificação.

B

Figura 33: Modelagem molecular da quimotripsina bovina (A) e da quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* (B) mostrando os resíduos que ocupam a posição 59 nestas duas enzimas. O resíduo de Gly59 presente na quimotripsina bovina está destacado em verde enquanto o resíduo de Trp59 presente na quimotripsina de *Spodoptera frugiperda* está destacado em vermelho. O resíduo de His57 catalítico está destacado em azul.

de triptofano poderia estar encobrindo a cadeia lateral do resíduo de histidina, constituindo uma barreira de contato da histidina com o meio da fenda catalítica (Figura 33). Este fato poderia ser uma das explicações para uma menor reatividade da histidina 57 nas quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda* e *Erinnyis ello*. No entanto, a ligação dos substratos parece não ser afetada pela presença da cadeia lateral do triptofano, dado que os valores de Km obtidos para as quimotripsinas de todos os Lepidoptera estudados (*Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Erinnyis ello*) são muito semelhantes para todos os de substratos estudados (Tabelas 7 e 8).

O alinhamento das sequências de quimotripsinas digestivas de outros insetos com o programa Clustal-X e posterior análise de distância por NJ gerou uma árvore para as quimotripsinas de insetos. Este estudo demonstrou que, assim como as tripsinas, as quimotripsinas de insetos agrupam-se de acordo com as relações filogenéticas estabelecidas baseadas na morfologia de insetos (Wheeler et al., 2001), (Figura 34) sendo que foram formados 6 grupos. O grupo I contém as sequências de insetos da ordem Lepidoptera com exceção do subgrupo C, representado por uma quimotripsina de *Phaedon cochleriae* (Coleoptera). A distribuição dos insetos da ordem Coleoptera nesta árvore é atípica, dado que o outro representante da ordem agrupa-se próximo a *Anopheles* (Diptera) e *Ctenocephalides* (Siphonaptera).

O grupo II é formado pelas quimotripsinas de 3 diferentes espécies de *Anopheles* estando separados das quimotripsinas de outros Diptera Nematocera (grupo V). O grupo IV é constituído pelas quimotripsinas de Hymenoptera e o sexto grupo pelas quimotripsinas bovina e de rato. O grupo I está subdividido em 3 subgrupos: o grupo A contém as sequências de *Plodia interpunctella* (Pyrilidae), o grupo B contém as sequências de insetos da família Noctuidae e Sphingidae e o grupo D contém a sequência da quimotripsina de *Scirpophaga incertulas* (Pyrilidae), demonstrando a separação de sequências de quimotripsina de insetos de uma mesma família. O alinhamento das sequências que constituem a árvore permitiu observar que o grupo formado por A e B compartilha a alteração do resíduo 59 por triptofano.

Figura 34: Árvore de distância por análise de NJ mostrando os agrupamentos formados pelas quimotripsinas de insetos descritas no GenBank. Os ramos são suportados estatisticamente por análise por Boot-strap. Em destaque o ramo contendo a substituição do resíduo 59, indicado por W59.

4.12. Clonagem e expressão do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*

O gene do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* já havia sido previamente clonado em nosso laboratório juntamente com o gene da β -glucosidase deste inseto. Uma tentativa de expressão da quimotripsina madura havia sido realizada sem sucesso em células BL21. A hipótese seria de que o aumento da concentração da proteína na bactéria levaria a um intenso processo autolítico, não sendo possível a visualização da expressão. Desta forma, escolhemos expressar o pró-peptídeo mantendo a proteína inativa. O produto de PCR de 900 pb correspondente à sequência do quimotripsinogênio foi extraído do gel de agarose com o kit Quiaex II e ligado ao vetor de expressão pT7-7, o qual foi denominado pT7-7 CHY. O vetor foi inicialmente utilizado para a transformação das células XL1-Blue que foram plaqueadas em LB-Ampicilina e crescidas por 16 horas a 37 °C. Uma colônia isolada foi crescida em meio LB-Amp a 37 °C a 250 rpm por 16 horas. As células foram centrifugadas e submetidas a Mini-Prep para isolamento do plasmídeo, o qual foi utilizado para transformação das células Novagen BL21 (DE3). Após a transformação e crescimento das células estas foram induzidas com 10 mM de IPTG a 37 °C por 5 horas (Figura 35). Após a lise das células uma alíquota do sedimento (insolúvel) e uma alíquota do sobrenadante (solúvel) foram submetidas a SDS-PAGE. A Figura 36 demonstra este resultado mostrando que 100% da proteína expressa esta na forma insolúvel em corpos de inclusão. A proteína expressa foi submetida a dois sistemas de solubilização dos corpos de inclusão: SDS 3% e Uréia 8,0 M em diferentes intervalos de tempo. Após a incubação, as amostras foram dialisadas contra soluções SDS 1,5%; 0,75% e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e Uréia 4,0 M; 2,0 M e tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, respectivamente. O resultado das solubilizações está na Figura 37, mostrando que os dois sistemas foram eficientes na solubilização do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*, sendo que SDS é mais eficiente, mostrando boa solubilização no menor intervalo de tempo e melhor purificação. A formação de corpos de inclusão pode ser um indício de que a proteína está em muito alta concentração dentro da célula e esta sem a conformação correta. A expressão na presença da chaperonina GroEL poderia

Figura 35: SDS-PAGE da indução da expressão do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* em BL21 (DE3), induzida por IPTG. Raia 1: padrão de peso molecular, raia 2: alíquota da cultura de células não induzidas por IPTG, alíquota da cultura de células induzida por IPTG

Figura 36: SDS-PAGE de alíquotas da cultura de célula BL21 transformada com pT7-7CHY não induzida e induzida por IPTG (raias 2 e 3), respectivamente. As raias 4 e 5 apresentam alíquotas da porção solúvel (3) e da porção insolúvel(4) após a lise celular demonstrando que o quimotripsinogênio encontra-se na sua totalidade em corpos de inclusão.

Figura 37: SDS-PAGE da solubilização dos corpos de inclusão formados pela expressão do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* expressos em BI21 (DE3). Em A: solubilização com SDS 3%. Raia 1: induzido com IPTG, raia 2, solúvel, raia 3 insolúvel, raias 4 a 6 solubilizações com SDS em diferentes intervalos de tempo. Em B: solubilização com Uréia 8,0 M. Raia 1: induzido, raia 2: solúvel, raia 3 insolúvel, raias 4 a 6, solubilizados em diferentes tempos com Uréia.

auxiliar em um dobramento adequado da proteína de forma a aumentar a sua solubilidade. O vetor pT7-7 CHY foi utilizado, então para a transformação de células BL21 GroEL. Além da alteração do sistema de expressão, a indução foi feita a 25 °C durante 3 horas de forma a reduzir a quantidade de proteína expressa, com o objetivo de diminuir a formação de corpos de inclusão. É possível observar um aumento da porção solúvel para pelo menos 30% (Figura 38). As proteínas solúveis obtidas com a expressão tanto em BL21 quanto em BL21 GroEL foram utilizadas em testes de ativação por tripsina bovina. A ativação, mesmo em diferentes intervalos de tempo não se mostrou eficiente. Duas hipóteses poderiam explicar este resultado. A tripsina bovina não está sendo capaz de ativar o quimotripsinogênio de inseto ou a tripsina cliva a molécula do quimotripsinogênio em mais de um ponto, levando à inativação total da proteína.

A expressão do quimotripsinogênio de mamífero e sua ativação são realizadas a partir da construção de uma quimera que reúne o pró-peptídeo de tripsina, o qual contém o sítio de ativação por enteroquinase, composto de 4 resíduos de ácido aspártico e um resíduo de lisina adjacentes ao N-terminal da proteína (IVGG). Desta maneira, optamos pela construção da quimera de quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* devido a maior estabilidade da enteroquinase para experimentos de ativação e pela especificidade da ativação (Figura 39). O “primer” PROTRYCHY foi desenhado codificando para resíduos específicos (Figura 39). O produto de PCR gerado foi seqüenciado, comprovando a inserção do sítio de especificidade de enteroquinase à sequência e clonado no vetor de expressão pT7-7. Este plasmídeo foi utilizado para a transformação de *Escherichia coli* (linhagem Origami (DE3)), diferenciando-se da expressão realizada em linhagem BL-21 descrita anteriormente. Na expressão em BL-21, obtinha-se proteína solúvel apenas na presença da chaperona GROEL (30% de proteína solúvel em indução a 25 °C). A linhagem Origami (DE3) apresenta uma combinação de mutações nos genes da tioredoxina redutase e na glutathione redutase criando um ambiente citoplasmático compatível com a formação de pontes de dissulfeto, facilitando a expressão de proteínas intactas, ativas e solúveis em *Escherichia coli*. Após a indução a 30 °C por 1,0 mM de IPTG foi possível observar a indução da expressão de uma proteína de peso molecular esperado (Figura 40). Após a lise

Figura 38: SDS-PAGE da expressão do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* em sistema BL21 GROEL. Raia M: marcador de peso molecular. As raias 1 e 2: alíquotas da cultura não induzida (1) e induzida (2) por IPTG. As raias 3 e 4 são alíquotas do material solúvel e não solúvel após a lise celular, demonstrando que a presença da chaperona pode auxiliar no dobramento desta proteína .

Figura 39: Estratégia utilizada para construção da quimera do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda*.

Figura 40: Indução da expressão da quimera do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* por IPTG em células Origami (DE3) e lise celular indicando a solubilidade da proteína expressa. Raia 1: Padrão de massa molecular, raia 2: amostra não induzida, raia 3: 3 horas de indução por IPTG a 30oC, raia 4: 7 horas de indução por IPTG a 30oC, raia 5: 16 horas de indução por IPTG a 30oC, raia 6: proteínas solúveis após lise celular e raia 7: proteínas insolúveis após lise celular.

celular foi possível observar a presença de pelo menos 30% de proteína solúvel, um resultado melhor do que obtido em BL-21 (Figura 40). Amostras de material solúvel foram utilizadas nos experimentos de ativação com enteroquinase. Inicialmente, a quimera solúvel do quimotripsinogênio de *Spodoptera frugiperda* foi incubada na presença de enteroquinase por 24 horas a 30 °C. Ensaios de quimotripsina nesta preparação não demonstraram atividade. Uma hipótese possível seria a de que, estando o quimotripsinogênio estruturado, o sítio de ativação por enteroquinase estaria com acesso reduzido, não permitindo a ativação do zimógeno. A quimera foi então incubada com uréia nas concentrações de 1,5 M e 3,0 M na presença de enteroquinase. Segundo o fabricante, estas concentrações de uréia não afetam a atividade de enteroquinase possibilitando uma desnaturação do zimógeno, exposição do sítio de ativação específico de enteroquinase e a conseqüente ativação da quimotripsina. Após 16 horas de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 para renaturação da quimotripsina. Novamente os ensaios de atividade não deram resultado positivo.

5. Discussão

5.1. Isolamento, caracterização e seqüenciamento de serina endopeptidases de insetos

5.1.1. Tripsinas

Neste estudo foram purificadas até a homogeneidade as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* e foi isolada a atividade tríptica de *Spodoptera frugiperda*. Tripsinas de Orthoptera, Dictyoptera e Coleoptera são comumente purificadas por cromatografias de troca iônica, enquanto as quimotripsinas de Diptera e Lepidoptera são freqüentemente purificadas por combinação de cromatografias de troca iônica e cromatografias de afinidade ou exclusivamente por cromatografias de afinidade como SBTI-sepharose ou benzamidina-agarose com eluição por benzamidina (Peterson et al., 1994; Graf et al., 1991; Lemos e Terra, 1992; Bernardi et al., 1996; Marchetti et al., 1998). A tripsina de *Periplaneta americana* ainda apresenta uma peculiaridade quanto a sua

carga, interagindo com cromatografias de troca aniônica tanto em pH 5,0 quanto em pH 10,0, mesmo sendo o seu pI de 6,0, diferentemente da tripsina de *Tenebrio molitor* (Levinsky et al., 1977 e Cristofolletti et al., 2001). A escolha de diferentes tipos de cromatografias para a purificação das tripsinas de diferentes ordens de insetos está diretamente relacionada à intensidade de autólise sofrida por estas enzimas. Tripsinas de insetos de ordens filogeneticamente mais basais, como Dictyoptera, são mais estáveis enquanto as tripsinas de grupos mais derivados, como Lepidoptera, sofrem processo autolítico mais intenso. Esta diferença de processamento autolítico poderia estar relacionada à quantidade de argininas e lisinas nas moléculas destas enzimas. Uma análise das sequências de tripsina disponíveis no GenBank foi realizada observando: a quantidade de resíduos Arg nas tripsinas de insetos; a quantidade de resíduos Lys nestas enzimas; a porcentagem de resíduos carregados positivamente em relação ao total de resíduos presentes nas enzimas ativas e o resíduo presente no peptídeo de ativação da enzima madura, se Arg ou Lys. Verificou-se que as tripsinas de insetos, provavelmente, sofrem auto-ativação, pois na sua maioria apresentam resíduos de Arg anteriores ao motivo N-terminal conservado IVGG e não há descrição de uma enzima semelhante a enteroquinase para insetos. Nota-se claramente que as tripsinas dos insetos da ordem Lepidoptera apresentam maior frequência de Arg em suas sequências sendo praticamente inexistentes resíduos de Lys, em compensação insetos de outras ordens apresentam alto conteúdo de Lys (Figura 41). Pelas altas taxas de autólise verificada para os Lepidoptera seria esperado, então, que as tripsinas destes insetos apresentassem maior porcentagem de cargas positivas em suas sequências, o que também não ocorre. Peterson e colaboradores (1994) já haviam descrito um alto conteúdo de Arg na sequência da tripsina de *Manduca sexta*. Os autores acreditam que o alto conteúdo de Arg poderia conferir maior estabilidade das tripsinas de Lepidoptera ao pH extremamente alcalino verificado no intestino médio destes insetos, dado que o pKa da cadeia lateral de Arg é maior. A maior frequência de autólise pode estar relacionada a uma maior exposição dos resíduos positivamente carregados, sendo necessários estudos estruturais das tripsinas de insetos para esclarecer estas diferenças.

Esta diferença de processamento (maior ou menor autólise) das endopeptidases de insetos no tubo digestivo pode ser uma adaptação de grupos

Figura 41: Representação gráfica das proporções de resíduos positivamente carregados para tripsinas de insetos de diferentes ordens. (A) Histograma representativo da porcentagem de resíduos de arginina presentes nas diferentes seqüências de tripsinas de insetos descritas. (B) Histograma representativo da porcentagem de resíduos de lisina presentes nas diferentes seqüências de tripsinas de insetos descritas. (C) Histograma representativo da porcentagem da soma dos resíduos de arginina e lisina presentes nas diferentes seqüências de tripsinas de insetos descritas.

filogeneticamente mais derivados. Estes insetos, geralmente, alimentam-se de plantas que produzem inibidores de endopeptidases sendo, na sua maioria, e em insetos polívoros. Vários estudos demonstram que insetos apresentam famílias multigênicas de tripsinas que são diferentemente expressas de acordo com os inibidores presentes na dieta. Uma tripsina muito estável, suscetível ao inibidor seria extremamente prejudicial para o inseto. Uma alta renovação tanto ao nível de transcrição, quanto de tradução e de substituição no tubo digestivo com um processo de degradação mais eficiente, permitiria uma substituição rápida das endopeptidases envolvidas na digestão, possibilitando uma rápida adaptação a diferentes dietas e uma troca eficiente do elenco de enzimas utilizadas no processo. Apesar de as tripsinas de insetos terem sido bastante estudadas nenhum cristal destas enzimas foi obtido até agora. Isto se deve à necessidade de grandes quantidades de proteína para os estudos de cristalografia e à dificuldade da purificação destas quantidades a partir do tubo digestivo dos insetos. O único inseto para o qual era possível obtenção desta quantidade de enzima era a tripsina de *Periplaneta americana*. Desta forma, uma preparação contendo 10 mg de tripsina purificada deste inseto foi preparada e submetida a testes cristalográficos iniciais. Contudo, até o presente momento, não foram obtidos cristais e novos testes são necessários. Mesmo com a otimização da marcha de purificação desta enzima, há um investimento de tempo muito grande para o acúmulo desta quantidade de proteína, sendo que, mesmo para *Periplaneta americana*, a expressão desta proteína, assim como das tripsinas de outros insetos, seria o ideal para os estudos de cristalografia. A expressão destas também possibilita estudos de mutação sítio-dirigida que completariam a caracterização dos resíduos envolvidos em especificidade. No entanto, a expressão de serina endopeptidases de insetos deve apresentar alguma dificuldade diferente destas enzimas de mamífero, dado que a tentativa de expressão destas em diferentes sistemas não resultou em proteínas ativas (Volpicella et al., 2003). Será, desta forma, necessário o desenvolvimento de um sistema de expressão compatível com estas enzimas.

Outra dificuldade para a purificação das tripsinas de insetos, principalmente da ordem Lepidóptera, é a separação das tripsinas e das quimotripsinas. Para insetos de ordens mais basais como Dictyoptera, estas enzimas são de mais fácil isolamento. Como demonstrado em resultados, a quimotripsina de *Periplaneta*

americana é um subproduto do primeiro passo cromatográfico da marcha de purificação da tripsina deste inseto, apresentando valores de pI bastante distintos. Esta facilidade de separação não se mostrou válida para tripsinas e quimotripsinas de Lepidoptera. A separação da quimotripsina da tripsina de *Diatraea saccharalis* na cromatografia de afinidade só é possível com a utilização de duas diferentes concentrações de benzamidina (0,1 M para eluição da tripsina e 0,5 M para eluição da quimotripsina). Esta estratégia não é eficiente para a separação de quimotripsina de tripsina de *Spodoptera frugiperda*. A aplicação da porção solúvel de homogeneizados de conteúdo de intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda* em colunas Hitrap-benzamidina e eluição na presença de benzamidina 0,1 M permite a eluição da atividade de tripsina. O reunido das frações ativas após fervura e diálise foi aplicado a um gel de SDS-PAGE e demonstra apenas uma banda de cerca de 25 kDa, indicando que esta proteína estava pura. No entanto, o reunido ativo ainda apresenta atividade de quimotripsina quando ensaiado com substrato Suc-AAF-MCA. Apesar de a atividade sobre este substrato ser um forte indício da presença de uma quimotripsina, dado que tripsinas, em geral, apresentam uma atividade 10^5 vezes menor sobre substratos que não apresentem Arg ou Lys, poderíamos ter a hidrólise deste pela própria tripsina ou por fragmentos desta, isto é, produtos de autólise com a sua especificidade alterada devido a alterações de conformação (Keil-Dlouha, 1971). No entanto, esta hipótese foi descartada pela migração diferenciada verificada entre as tripsinas e quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda* em cromatografia de afinidade em PBA-agarose. A dificuldade da separação da tripsina de *Manduca sexta* de sua quimotripsina foi verificada por Peterson e colaboradores (1994). Tanto a tripsina quanto a quimotripsina isoladas apresentam os mesmos pesos moleculares em SDS-PAGE. A determinação da sequência N-terminal apresentou mais de uma sequência e a hidrólise da cadeia β de insulina apresenta fragmentos tanto de hidrólise por tripsina quanto por quimotripsina.

Foram obtidas três sequências de tripsina de *Diatraea saccharalis* sendo duas de proteínas maduras com a porção N-terminal completa e uma sequência interna da tripsina de *Periplaneta americana* durante o desenvolvimento deste projeto. As sequências obtidas para estes dois insetos foram analisadas quanto a presença de resíduos determinantes de especificidade como será discutido posteriormente. Além

das seqüências obtidas para *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*, as tripsinas e quimotripsinas de vários insetos estão sendo seqüenciadas em nosso laboratório com a utilização dos “primers” específicos para as regiões dos resíduos catalíticos Ser e His e com a utilização de “primers” aleatórios para varredura de biblioteca por PCR. Além disso, outras seqüências diversas de tripsina e quimotripsina foram obtidas com a utilização de anticorpos contra proteínas presentes em preparações de microvilosidades do intestino médio de diferentes insetos. Esta abundância de seqüências é compatível com a informação de que 20% do mRNA do intestino médio de insetos é de serina-endopeptidases (Volpicella et al., 2003). No entanto, algumas destas seqüências codificam para tripsinas e quimotripsinas não ativas, pois apresentam substituição dos resíduos catalíticos. No entanto, estas proteínas podem estar envolvidas em outras funções no intestino médio de insetos. Uma série de serina endopeptidases denominada proteínas homólogas de serina endopeptidases (SPHs) tem sido descrita tanto em vertebrados quanto em invertebrados. As SPHs estão associadas a uma série de funções em invertebrados como resposta antimicrobiana em caranguejos, ligação de músculos somáticos em embriões de *Drosophila* e resposta imunológica em *Anopheles* e *Holotrichia* (Ross et al., 2003). Estas proteínas apresentam alta similaridade com serina-endopeptidases digestivas típicas, mas tem como características distintivas: (a) a substituição de um ou mais resíduos nos domínios conservados TAAHC, DIAL e GDSGGP, que contém os resíduos de His, Ser e Asp catalíticos e (b) presença de domínios associados ao N-terminal destas proteínas e conseqüente aumento de tamanho. Serina endopeptidases típicas têm tamanhos entre 200 e 250 aminoácidos enquanto as SPHs apresentam sempre mais do que 300 resíduos, indicando a adição de outros domínios à estas proteínas. Um dos domínios adicionais já descritos é o domínio em clipe (“clip-domains”) devido a sua estrutura tridimensional determinada pela presença de uma dupla de cisteínas seguidas e 4 outras cisteínas distribuídas entre 30 e 63 resíduos constituintes deste tipo de domínio. Em *Tenebrio molitor* uma SPH que contém um “clip-domain” esta envolvida na ativação da profenoloxidase na cascata de síntese de melanina ativada por β -glucanas, peptideoglicanas e lipopolisacarídeos de fungos e bactérias (Lee et al., 2002). A presença do “clip-domain” garante interações proteína-proteína em cascatas de ativação. Proteínas digestivas contendo clip-domains poderiam estar envolvidas, de

alguma forma, na regulação da expressão diferencial de enzimas de acordo com a dieta.

5.1.2. Quimotripsinas

Neste estudo foi purificada até a homogeneidade a quimotripsina de *Periplaneta americana* e foram parcialmente isoladas as quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*. Algumas quimotripsinas de insetos já foram caracterizadas como as de *Periplaneta americana*, (Baumann, 1990); *Vespa orientalis*; (Jany et al., 1974 e Jany et al., 1983); *Spodoptera littoralis* (Lee e Anstee, 1995); *Solenopsis invicta* (Withworth et al., 1998); *Chryzomia bezziana* (Muharsini et al., 2001); *Aedes aegypti* (Yang et al., 1971), *Locusta migratoria* (Sakal et al., 1988), *Lucilia cuprina* (Sandeman et al., 1990); *Manduca sexta* (Peterson et al., 1995) sendo que algumas foram clonadas como *Spodoptera frugiperda* (Lopes et al., manuscrito em preparação), *Rhizoperta dominica* (Zhu e Baker, 2000); *Plodia interpunctella* (Zhu et al., 1997); *Helicoverpa zea* e *Agrotis ipsilon* (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001b) e *Anopheles gambiae* (Vizioli et al., 2001) e uma quimotripsina foi cristalizada e teve sua estrutura determinada (Botos et al., 2000). Estas enzimas são usualmente purificadas utilizando-se cromatografias de afinidade como fenilbutilamina-agarose (Sakal et al., 1988) ou D-tirosina-agarose (Peterson et al., 1995) ou mesmo da combinação de cromatografias de troca iônica (Baumann, 1990). No entanto, as quimotripsinas, mesmo de insetos de ordens mais basais como Dictyoptera, são menos estáveis que as tripsinas. Os resultados obtidos com as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* indicaram uma estabilização destas enzimas na presença de SDS.

Ainda não está claro qual seria o papel do SDS, mas aparentemente, há uma redução da autólise. Uma hipótese seria a formação de interações hidrofóbicas entre a enzima e o detergente, reduzindo interações proteína-proteína e diminuindo processos autolíticos. A caracterização tanto de tripsinas quanto de quimotripsinas de mamífero demonstrou que estas enzimas apresentam alças autolíticas cuja hidrólise não afeta a atividade da enzima e pontos de hidrólise (Várallyay et al., 1998, Bodi et al., 2001). Trabalhos de análise de estrutura por cristalografia e NMR com tripsina bovina e detergentes, como polidocanol, demonstram que este

detergente interage justamente com as alças autolíticas levando a uma estabilização da enzima. Além dos estudos de estabilização da atividade proteolítica, há também o interesse no estudo da interação de detergência do tubo digestivo de insetos e endopeptidases digestivas. Brito e colaboradores (2001) demonstraram diferenças nas atividades trípticas encontradas no intestino médio de larvas de *Heliothis virescens* quando estas eram alimentadas na presença ou ausência de inibidores vegetais. Os resultados indicaram a formação de oligômeros mesmo na presença de SDS para as tripsinas expressas na presença do inibidor. Martin e colaboradores (1987) demonstram diferenças na quantidade de surfactantes presentes no intestino médio de *Manduca sexta* e *Schistocerca gregaria* quando estes são alimentados em diferentes dietas, indicando uma alteração do meio no qual as enzimas atuam.

5.2. Especificidade de tripsinas em insetos

A caracterização cinética demonstrou que B-R-pNa é o pior substrato hidrolisado pela tripsina de *Periplaneta americana* com Km de 120 μ M, semelhante ao descrito para *Tenebrio molitor* (Levinski et al., 1977); *Musca domestica* (Lemos e Terra, 1992); *Ostrinia nubilalis* (Bernardi et al., 1996). Todas as tripsinas caracterizadas hidrolisam melhor substratos cumarínicos do que p-nitroanilídicos e substratos de cadeias peptídicas com maior número de resíduos, assim como descrito para tripsinas de mamíferos. Os bloqueadores N-terminal têm algum efeito na eficiência catalítica desta enzima, mas menos significativo que os resíduos propriamente.

A caracterização cinética com substratos de fluorescência apagada dos subsítios S3, S2, S1, S1' e S2' permitiu verificar que as tripsinas de insetos apresentam diferenças em suas especificidades, inclusive da especificidade primária, demonstrando que os insetos da ordem Lepidoptera hidrolisam preferencialmente substratos que contêm Lys em P1. Podemos verificar qual é a especificidade de um único subsítio com a utilização de peptídeos sistematicamente variados. No entanto, não podemos afirmar que um peptídeo formado por todos os resíduos de maior eficiência catalítica relativa será um excelente substrato, pois a especificidade de uma enzima, em qualquer um dos subsítios, é influenciada pela ocupação dos subsítios vizinhos (Schellenberger et al., 1994). Contudo, estão

esquematizados na Figura 11 quais seriam os substratos ideais para cada uma das tripsinas estudadas, demonstrando a diferença em suas especificidades e na Tabela 2 as diferenças de especificidade primária para diferentes insetos.

A troca da especificidade primária em insetos Lepidoptera pode ter um caráter altamente adaptativo. O alinhamento das sequências do sítio reativo de inibidores vegetais de serina endopeptidases demonstra que a maioria destes inibidores apresenta Lys em P1, o que é evolutivamente interessante para as plantas, pois este inibidor estaria bem adaptado para inibir enzimas que hidrolisam preferencialmente substratos P1Arg, como é o caso da maioria dos insetos e de mamíferos e inibidores P1Lys são bons inibidores também de quimotripsinas, como apresentado na introdução. Portanto, insetos que apresentam melhor hidrólise sobre Lys poderiam utilizar os inibidores como substratos.

A especificidade primária das tripsinas de Lepidoptera é semelhante à especificidade de uma tripsina de rato modificada por mutação sítio-dirigida (Craik et al., 1985). A substituição da glicina 226 (um dos resíduos envolvidos em determinação da especificidade primária em tripsinas) por alanina ocasiona uma alteração da eficiência catalítica com que são hidrolisados substratos P1Arg ou P1Lys, sendo o último melhor hidrolisado. O aumento da eficiência de hidrólise de P1Lys está diretamente relacionado à constante catalítica e não a uma melhor ligação da enzima ao substrato. Da mesma forma ocorre para a tripsina de *Diatraea saccharalis* (Tabela 2). Esta comparação indicava a possibilidade de uma mutação nesta posição para as tripsinas de Lepidoptera. No entanto, tanto as seqüências obtidas para *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana* quanto as seqüências de Lepidoptera descritas apresentam Gly na posição 226. Outra posição discriminante para a especificidade Arg/Lys é a Ser190. Nesta posição encontram-se variações importantes dentre as tripsinas de insetos. Insetos da ordem Lepidoptera apresentam resíduos de Ala ou Gln nesta posição com exceção de uma tripsina de *Helicoverpa zea* que possui uma Ser. Os estudos de mutação sítio-dirigida da tripsina de mamífero substituíram o resíduo 190 por Gly, Pro ou Thr. Portanto é desconhecido o efeito dos resíduos apresentados pelas tripsinas deste grupo. As enzimas de Coleoptera (*Rhyzoperta dominica*, *Diaprepes abbreviata* e *Phaedon cochleriae*) apresentam um resíduo de serina nesta posição, assim como a tripsina salivar de *Nilaparvata lugens* (Hemiptera), *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera) e

dos Diptera *Lucilia cuprina*, *Glossina morsitans*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Culex pipiens* e *Simulium vitatum*. Para a tripsina de *Periplaneta americana* já seqüenciada esta posição é ocupada por um resíduo de His enquanto para as duas seqüências de tripsina de *Diatraea saccharalis* obtidas até o momento esta posição é ocupada Pro ou Asp. Nos mutantes de tripsina de mamífero a substituição de uma serina por uma prolina nesta posição favorece a hidrólise de substratos P1Arg. A diferença observada para *Diatraea saccharalis*, a qual apresenta uma razão Arg/Lys menor do que um, pode estar relacionada a substituição de outros aminoácidos que poderiam favorecer a troca de especificidade. Além disso, ainda há a necessidade da determinação do número de genes de tripsina expressos e identificação do gene da tripsina purificada em *Diatraea saccharalis*. Uma comparação das alças 1 e 2 (resíduos 185-188 e resíduos 221 a 225) descritas na introdução indica uma grande variação das seqüências de insetos e mamífero. A alça 1 de mamíferos apresenta dois motivos conservados: YLEGGKD e FLEGGKD. As tripsinas de insetos apresentam pelo menos 9 diferentes motivos: WPSGGRD, WATGGRD, WSGGGRD, WPTGGRD, WPNGGRD e ILDVGGKD. Estes motivos são principalmente conservados em Lepidoptera, enquanto as outras ordens apresentam algumas outras variações. Já nos Diptera *Glossina morsitans*, *Lucilia cuprina*, *Drosophila melanogaster* há um "gap" nesta região. As seqüências de tripsina de *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana* obtidas até o momento apresentam os seguintes motivos: WLDVGGRD e ILDVGGKD para *Diatraea saccharalis* e WLDVGGRD para *Periplaneta americana*. A alça 2 que em mamífero apresenta os motivos AQKNK e ALPDN é menos conservada entre os insetos não se verificando um padrão.

Estas comparações indicam que a possibilidade de variação da especificidade das tripsinas em insetos é muito mais significativa do que se poderia imaginar. No entanto, estas diferenças justificam a diversidade de respostas observadas destas enzimas frente a inibidores vegetais. Foi realizado, então, um estudo mais detalhado da interação de tripsinas envolvidas em resistência a inibidores, resíduos de aminoácidos envolvidos em interação com inibidores e análise de distância. Os resultados obtidos serão discutidos no item 5.5.1

A caracterização da especificidade secundária das tripsinas de insetos, principalmente dos subsítios S', demonstra as alterações de especificidade que

estas enzimas apresentam em relação às tripsinas de mamífero, as quais hidrolisam preferencialmente substratos que apresentam Phe e Arg/Lys em P1' e P2' respectivamente (Schellenberger et al., 1994, Kurth et al., 1997). Semelhante às tripsinas de mamíferos, as tripsinas de insetos apresentaram em P1' especificidade por substratos contendo resíduos hidrofóbicos nesta posição: Met, Ile, Ala respectivamente para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. Contudo, diferente das tripsinas de mamífero, as quais apresentam maior especificidade sobre substratos contendo resíduos positivamente carregados (Arg/Lys) em P2', as enzimas de inseto hidrolisam preferencialmente substratos contendo Phe, Val, Phe em P2' para *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* respectivamente. Para a tripsina de *Diatraea saccharalis* a presença de um resíduo de Lys em S2', diferentemente do que ocorre para S1', S2 e S3 resulta em uma eficiência relativa menor do que 100%, indicando um efeito negativo da presença de carga positiva em S2' (Lopes, 1999).

5.3. Hidrofobicidade e subsítios de ligação em tripsinas de insetos

A análise da hidrofobicidade dos subsítios de ligação das tripsinas de insetos caracterizadas quanto a sua especificidade em relação a substratos de fluorescência apagada indicou um aumento de hidrofobicidade nestes subsítios que acompanham a posição do inseto na escala evolutiva sendo que esta tendência pode ser observada, principalmente, pela comparação dos índices obtidos para os subsítios das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*. A tripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta subsítios mais hidrofóbicos do que as tripsinas dos outros insetos. A interface de interação entre inibidores protéicos de endopeptidases e as suas enzimas alvo é predominantemente hidrofóbica. No entanto, numerosas pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas são formadas. Como discutido anteriormente, a tripsina de *Diatraea saccharalis*, assim como a de outros Lepidoptera testados, apresenta especificidade primária trocada, o que poderia lhe conferir uma melhor capacidade de hidrólise dos inibidores vegetais, os quais predominantemente apresentam resíduos de Lys na posição P1 de seus sítios reativos.

Duas hipóteses foram formuladas associando a troca de afinidade, o aumento da hidrofobicidade destas enzimas e o desenvolvimento de resistência a inibidores protéicos vegetais demonstrada em Lepidoptera. Sendo a enzima mais hidrofóbica e a alça reativa dos inibidores predominantemente hidrofílica haveria uma redução das pontes de hidrogênio, de interações eletrostáticas estabelecidas entre a enzima e o inibidor o que poderia piorar a ligação entre as duas moléculas, facilitar a entrada da molécula de água, essencial para a hidrólise da ligação peptídica. No entanto, justamente pelo fato da enzima ser mais hidrofóbica, se a ligação entre as tripsinas de Diptera ou Lepidoptera (grupos que apresentam as tripsinas mais hidrofóbicas) forem melhores com os inibidores, a entrada da molécula de água estaria dificultada, prejudicando ainda mais a utilização das moléculas de inibidor como substrato. A comparação dos valores de K_D do complexo formado pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e de *Musca domestica* em relação ao inibidor de tripsina de soja indicam uma redução da afinidade de ligação destes inibidores à tripsina de *Musca domestica* (Figura 42), o que favorece a primeira hipótese. No entanto, estudos cristalográficos das tripsinas de insetos complexadas aos inibidores são essenciais para completar esta caracterização.

5.4. Especificidade de quimotripsinas de insetos

A caracterização da atividade de quimotripsina de diferentes insetos frente a modificadores químicos e substratos, tanto colorimétricos, quanto cumarínicos, confirma dados da literatura (Lee e Anstee, 1995; Withworth et al., 1998; Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001b) os quais indicam que as quimotripsinas de insetos apresentam diferenças de especificidade significativas, tornando interessante uma caracterização mais detalhada da especificidade destas enzimas.

Os dados obtidos através de modificação química por T-F-CK permitiram esclarecer que há problemas na literatura quanto a preparação dos modificadores quanto as concentrações utilizadas (adequadas para a quimotripsina de mamíferos), o que levava à conclusão errada de que as quimotripsinas de insetos não seriam modificadas por estas clorometil cetonas. A caracterização das quimotripsinas de insetos realizada neste trabalho evidenciou a diferença da reatividade dentre as estas enzimas, indicando diferenças de especificidade além da presença de

Figura 42: Titulação das tripsinas purificadas de *Periplaneta americana* e *Musca domestica* por SBTI.

diferentes resíduos próximos ou no sítio ativo. Este fato evidencia-se principalmente pela comparação das reatividades com clorometil cetonas e especificidade em relação aos substratos quimotripsinas de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda*. A diferença de reatividade entre as atividades quimotrípticas destes dois insetos é de cerca de 1000 vezes em relação a T-F-CK. Esta diferença poderia ser explicada por duas hipóteses: diferente ligação do modificador ao sítio ativo ou diferenças no microambiente do sítio ativo alterando a reatividade da His catalítica. Os dados obtidos com os diferentes substratos, com modificação por DEPC e por modelagem molecular indicam que a segunda hipótese é mais adequada. A modificação da quimotripsina de *Manduca sexta* (Peterson et al., 1995) por T-F-CK foi realizada em dois diferentes pHs 8,0 e 9,75. Não houve modificação em pH 8,0, mas esta mesma enzima foi modificada por esta clorometil cetona em pH mais alto. Este resultado indica diferença no pKa da His catalítica. Além disso, a determinação do pKa dos grupos envolvidos em catálise da quimotripsina de *Manduca sexta* demonstrou a presença de um grupo de pKa 9,2, o qual provavelmente corresponde à histidina. O pKa deste grupo mostrou-se muito mais alto do que o pKa normalmente determinado para as quimotripsinas de mamífero, que é de cerca de 6,8. Esta alteração pode estar relacionada à presença do triptofano na posição 59, o qual também está presente na quimotripsina de *Manduca sexta*. Pelos estudos de modelagem o triptofano nesta posição poderia estabelecer uma ponte de hidrogênio com a His 57, o que poderia alterar sua reatividade. No entanto, seria necessário conhecer a reatividade das quimotripsinas de *Plodia interpunctella* (W59) e *Scirpophaga incertulas* (M59) que são os dois insetos de seqüências conhecidas da família Pyralidae (Lepidoptera) e que apresentam resíduos diferentes nesta posição, ou conhecer a seqüência da quimotripsina caracterizada de *Diatraea saccharalis*. Outras duas quimotripsinas de Pyralidae estão descritas na literatura: *Ostrinia nubilalis* (Houseman e Philògene, 1989) e *Galleria mellonella* (Hamed e Attias, 1987) as quais são modificadas por T-F-CK. Estes insetos são detritívoros e seriam muito interessantes para comparação. No entanto, não há seqüências destas quimotripsinas descritas na literatura. A quimotripsina de *Aedes aegypti* também apresentou baixa reatividade em relação as clorometil cetonas e apresenta diferença significativa de afinidade (10 vezes) em relação ao substrato Suc-AAPF-pNa indicando uma diferença não só do microambiente, mas também no sítio de ligação.

Esta diferença pode estar sendo causada pela presença de um resíduo de lisina na posição 59. Neste caso há uma dificuldade inicial de entender qual a vantagem adaptativa da redução da reatividade da His em insetos hematófagos. O grupo heme é coordenado por 1 histidina (Voet e Voet, 1995). Em insetos hematófagos há uma grande quantidade de heme sendo que alguns mecanismos são necessário para o seu processamento nestes insetos (Lara et al., 2003). Uma possível interação deste grupo com histidinas catalíticas de serina endopeptidases poderia levar à inativação destas enzimas. A hipótese de coordenação de grupos heme também deve ser analisada para insetos que se alimentam de tecidos vegetais contendo clorofila. Esta hipótese também seria adequada para explicar a diferença de reatividade das histidinas catalíticas de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* dado que *Diatraea saccharalis* se alimenta do colmo da cana de açúcar enquanto *Spodoptera frugiperda*, como inseto polífago, pode se alimentar de folhas.

5.5. Coevolução de serina endopeptidases de insetos e compostos vegetais

A crescente quantidade de seqüências descritas na literatura disponibiliza uma quantidade suficiente de informações para análises de agrupamentos ou "cluster" por análises de distância destas seqüências, sendo possíveis os testes de hipóteses como: (1) há diferenciação de enzimas conforme a dieta do inseto, (2) há uma tendência a agrupar as enzimas de um determinado tipo segundo o seu grupo filogenético, (3) em famílias multigênicas, qual o grau de diferenciação de uma enzima para outra determinando especificidades diferenciadas, (4) visualizar o surgimento de uma mutação específica conferindo determinada adaptação e avaliar se o seu surgimento se deu em um único evento ou em mais de um. Trabalhos recentes têm utilizado cálculos de distância para o agrupamento de enzimas como serina-endopeptidases (Zhu et al., 1997; Vizioli et al., 2001; Luque e O'Reilly, 2002), sendo que os cálculos de distâncias foram baseados em duas metodologias distintas, "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean", UPGMA e "Neighbor Joining", NJ. Como descrito na introdução, a metodologia de NJ é mais adequada para este tipo de análise. Utilizando-se esta metodologia foram feitas as análises de distância para tripsinas e quimotripsinas de insetos. As árvores geradas foram analisadas quanto: (a) ao agrupamento filogenético dos insetos e a influência

da dieta nestes grupos e (b) a possível adaptação de determinadas seqüências a diferentes metabólitos secundários de planta como será discutida particularmente para cada enzima.

5.5.1 Tripsinas

As seqüências de tripsinas de insetos foram agrupadas por NJ. Como descrito anteriormente é possível observar o agrupamento das tripsinas de acordo com cada ordem de inseto, seguindo a filogenia baseada em morfologia (Wheller et al., 2001). A partir da sugestão de que as tripsinas de Lepidoptera apresentavam um agrupamento particular possivelmente relacionado à resistência a inibidores de insetos uma nova análise foi feita utilizando-se seqüências previamente descritas de tripsinas de *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001a; Bown et al., 1997) expressas ou suprimidas quando o inibidor SBTI do tipo Kunitz era adicionado às dietas. Como descrito anteriormente esta análise gerou uma árvore que também está dividida em três ramos, denominados I, II e III. Volpicella e colaboradores (2003) utilizaram uma abordagem interessante para comparação de tripsinas resistentes ou sensíveis a inibidores vegetais. A partir da tripsina de porco co-cristalizada com inibidores da família Kunitz e Bowman-Birk foram verificadas as posições de interação destes inibidores e da tripsina e estas posições foram verificadas em duas enzimas isoladas de *Helicoverpa zea*, uma sensível e outra resistente ao inibidor. O seqüenciamento parcial das duas enzimas, obtida por espectrometria de massa, foi comparado a seqüências depositadas no GenBank para obtenção de seqüências completas por similaridade. No entanto, os autores utilizaram uma seqüência de *Helicoverpa armigera* nas comparações como enzima sensível ao inibidor e uma enzima de *Helicoverpa zea* como resistente. Desta forma, algumas das posições que foram consideradas diferentes pelos autores são idênticas quando comparamos seqüências apenas de *Helicoverpa zea*. Contudo, a análise das estruturas e o estudo dos resíduos presentes nas posições de interação com os inibidores de todas as tripsinas já descritas como sensíveis ou resistentes poderia indicar posições realmente importantes. Este estudo foi feito após as análises por NJ verificando se as posições de interesse sustentam os ramos da árvore obtida. Song e Suh (1998)

identificaram os resíduos de aminoácidos de interação com o inibidor do tipo Kunitz (His40, Phe41, Cys42, His57, Lys60, Phe94, Gly96, Asn97, Leu99, Asp102, Tyr151, Asp189, Ser190, Cys191, Gln192, Gly193, Asp194, Ser 195, Ser214, Trp215, Gly216, Tyr217, Gly219, Cys220, Gly226) e Lin e colaboradores (1993) identificaram os resíduos de interação com o inibidor do tipo Bowman-Birk (Phe41, His57, Asn97, Leu99, Asp 189, Ser190, Cys191, Gln192, Gly193, Ser195, Val213, Trp215, Gly216, Tyr217, Gly219, Val227). Alguns resíduos de contato são comuns a interação dos dois tipos de inibidores com a tripsina de porco e alguns são exclusivos para interação com inibidores do tipo Kunitz (resíduos das posições 40, 60, 94, 102, 151, 214) ou Bowman-Birk (resíduos 213 e 227). Os resíduos Cys42, His57, Tyr151, Asp189, Cys191, Gln192, Gly193, Asp194, Ser195, Ser214, Gly216, Cys220 e Gly226 são resíduos conservados em todas as tripsinas estudadas não sendo posições distintivas para determinação de resistência. A His40 está presente na tripsina de porco, mas em insetos este resíduo é substituído por uma glutamina. Como algumas seqüências do GenBank não estão completas a posição 41 não foi considerada. Após desconsiderar as posições conservadas ou não bem representadas foram selecionadas as seguintes posições para análise: 60, 94, 97, 99, 190, 213, 215, 217 e 219. Além dos resíduos envolvidos em interação com inibidor foram considerados resíduos que formam as paredes do subsítio S1 (189-195; 214-220; 225-228, as alças 1 e 2 (Koepke et al., 2000) e resíduos formadores do subsítio S4 (99, 172 e 215) sendo que apenas os resíduos 99 e 215 foram considerados dado que o resíduo 172 é conservado em todas as tripsinas de insetos.

Os resíduos de aminoácidos envolvidos em resistência aos inibidores foram relacionados aos ramos das árvores (Figura 19 e Tabela 11). Esta comparação pode revelar as posições críticas para a resistência aos inibidores. Os resíduos 188, 190 e 215 suportam os ramos I, II e III e os resíduos 99 e 228 suportam ramos menores na árvore (Figura 19 e Tabela 11). O resíduo na posição 60 suporta os ramos menores da árvore, sendo que resíduos de Phe, Val, Ala, Asn, His e Asp podem ocupar esta posição, indicando que estas tripsinas apresentam diferentes interações com os inibidores. O resíduo na posição 215, que pode ser Trp ou Phe suporta os ramos I, II e III, sendo que o resíduo Phe é conservado no ramo II, o qual contém as principais seqüências de enzimas insensíveis aos inibidores. A posição 94 suporta os ramos I

e III e subdivisões do ramo II. Posições 97, 99, 217, 219 são Ala, Leu, Phe e Gln no ramo I e são variáveis nos ramos II e III, suportando várias subdivisões destes grupos. A substituição de resíduos pode ocorrer entre aminoácidos pertencentes a uma mesma classe (por exemplo, um resíduo hidrofóbico por outro) ou de classes diferentes (um resíduo hidrofóbico por um resíduo carregado positivamente). Apesar de as tripsinas sensíveis ou resistentes terem sido caracterizadas na presença ou ausência de inibidor do tipo Kunitz, as posições 213 e 227, relacionadas a interação com inibidores Bowman-Birk também foram estudadas. O resíduo 227 é conservado em todas as tripsinas caracterizadas. Já o resíduo 213 suporta os ramos I e III e subdivisões do ramo II (Figura 19 e Tabela 11). As sequências de *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana* obtidas foram também analisadas quanto aos resíduos presentes nas posições de interação descritas acima (Tabela 12). A sequência de *Periplaneta americana* obtida apresenta na posição 60 uma Ile, resíduo que não está presente em nenhuma outra sequência descrita. Já as sequências de tripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta uma Ile, mas também Ala ou Thr, sendo Ala comum a algumas das sequências descritas dentre as enzimas sensíveis e resistentes. Na posição 94 tanto a tripsina de *Periplaneta americana* quanto de *Diatraea saccharalis* apresentam 1 resíduo de Tyr igual ao encontrado, principalmente, nas enzimas descritas como sensíveis. Em relação às posições 97 e 99 tanto *Periplaneta americana* quanto *Diatraea saccharalis* apresentam resíduos não descritos para enzimas sensíveis ou resistentes. Já na posição 188 a tripsina de *Periplaneta americana* apresentou um resíduo de Arg semelhante às enzimas resistentes enquanto *Diatraea saccharalis* apresenta sequências com os dois resíduos. A diversidade entre as sequências sensíveis e resistentes está provavelmente relacionada à resistência dos insetos a diferentes famílias de inibidores e à expressão diferencial de genes de serina-endopeptidases em resposta a estas diferentes famílias (Broadway, 1997).

5.5.2. Quimotripsinas de insetos e cetonas de plantas

As sequências de quimotripsinas de insetos foram agrupadas por NJ. Como descrito anteriormente é possível observar o agrupamento das quimotripsinas de mamífero, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera. Os resultados desta análise indicam

Tabela 11: Sensibilidade e resíduos de interação com PIs ou substratos para tripsinas de insetos da ordem Lepidoptera.

Grupo	Sensibilidade	Resíduos nas posições de interação
<i>I</i>		
IA	sensível	60 (F), 94(Y), 97(A), 99(L), 188 (K), 190 (A), 213 (V), 215 (W), 217 (F), 219(Q), 228 (N)
IB	insensível	60 (Y), 94(Y), 97(S), 99(L), 188 (K), 190 (A), 213 (T), 215 (W), 217 (F), 219(Q), 228 (S)
<i>II</i>		
IIA	insensível	60 (F), 94 (F), 97(N), 99(L), 188 (R), 190 (Q), 213 (C), 215 (F), 217 (I), 219(Q), 228 (N)
IIB	insensível	60 (A), 94(Y), 97(R), 99(M), 188 (R), 190 (Q), 213 (C), 215 (F), 217 (I), 219(G), 228 (N)
IIC	insensível	60 (A), 94(Y), 97(R), 99(M), 188 (R), 190 (Q), 213 (C), 215 (F), 217 (I), 219(G), 228 (N)
IID	insensível	60 (N), 94(Y), 97(N), 99(Y), 188 (R), 190 (Q), 213 (C), 215 (F), 217 (V), 219(G), 228 (N)
IIE	insensível	60 (V), 94(F), 97(W), 99(L), 188 (R), 190 (Q), 213 (C), 215 (F), 217 (I), 219(G), 228 (S)
IIF	insensível	60 (F), 94(F), 97(N), 99(L), 188 (R), 190 (Q), 213 (S), 215 (F), 217 (V), 219(G), 228 (S)
IIG	insensível	60 (H), 94(F), 97(R), 99(L), 188 (R), 190 (Q), 213 (S), 215 (F), 217 (I), 219(G), 228 (S)
<i>III</i>		
IIIA	sensível	60 (A), 94(Y), 97(N), 99(M), 188 (K), 190 (A), 213 (V), 215 (W), 217 (R), 219(G), 228(S)
IIIB	sensível	60 (D), 94(Y), 97(N), 99(Y), 188 (K), 190 (A), 213 (V), 215 (W), 217 (H), 219(G), 228 (S)
IIIC	sensível	60 (D), 94(Y), 97(N), 99(A), 188 (K), 190 (A), 213 (V), 215 (W), 217 (H), 219(G), 228 (S)
IIID	sensível	60 (A), 94(Y), 97(L), 99(A), 188 (K), 190 (A), 213 (V), 215 (?), 217 (?), 219(G), 228 (?)

Tabela 12: Substituições verificadas nas posições de interação de tripsina com inibidores protéicos para as seqüências de tripsina obtidas para *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*.

Posição	<i>Periplaneta americana</i>	<i>Diatraea saccharalis</i>
60	Ile	Ile, Ala, Thr
94	Tyr	Tyr
97	Pro	Pro, Asp, Gly
99	Ile	Asn, Tyr
188	Arg	Arg, Lys

uma tendência de agrupamento das quimotripsinas de acordo com cada ordem de inseto, seguindo a filogenia baseada em caracteres morfológicos (Wheller et al., 2001). É possível observar que há distinção nas distâncias observadas dentro de cada grupo podendo haver enzimas pertencentes a uma mesma espécie animal que se distingam mais do que enzimas pertencente a uma ordem de insetos. Estas diferenças podem ser verificadas, por exemplo, se compararmos as distâncias entre as quimotripsinas de insetos das ordens Hymenoptera e Lepidoptera. Há uma quantidade maior de diferenças dentre as quimotripsinas de Lepidoptera do que entre as quimotripsinas de Hymenoptera. A variação de distâncias dentre os grupos podem indicar uma diferença das pressões seletivas sofridas por estes. Para os Lepidoptera a dieta, baseada em plantas de diferentes famílias, deve ser uma das mais importantes pressões seletivas responsáveis pela diferença entre as endopeptidases envolvidas em digestão. Como demonstrado anteriormente o ramo dos Lepidoptera apresentou 3 subdivisões: Noctuidae, assim como Sphingidae, representado apenas por *Manduca sexta*, se agrupam em um único ramo, estando entre as quimotripsinas mais diferenciadas dentre os Lepidoptera. Diferentemente dos Noctuidae, os insetos da família Pyralidae, *Plodia interpunctella* e *Scirpophaga incertulas* estão separados em dois ramos independentes. Todos os insetos da família Noctuidae e Sphingidae, cujas seqüências foram analisadas neste estudo, bem como *Plodia interpunctella*, são insetos polípagos os quais alimentam-se de pelo menos 20 famílias diferentes de plantas (<http://www.nhm.ac.uk>). Já *Scirpophaga incertulas*, assim como *Diatraea saccharalis* (Pyralidae), são insetos que alimentam-se exclusivamente de gramíneas. Este estudo indica que, assim como evidenciado anteriormente por Ferreira e Terra (1994) por análise de características morfológicas e bioquímicas do sistema digestivo em insetos, as relações filogenéticas são fator determinante para as enzimas apresentadas e determinação de suas características gerais em insetos como verificado tanto para tripsinas, descrita anteriormente, como para quimotripsinas. No entanto, para um grau de parentesco mais próximo (dentro das ordens, relação entre as famílias) parece que os dois fatores, filogenia e dieta, influenciam nas enzimas presentes envolvidas no processo digestivo. Uma maior distância entre quimotripsinas de insetos da mesma família como exemplificado acima, indica uma influência da dieta na distinção entre os animais. Já os dados de modificação por T-F-CK obtidos para os três Lepidoptera estudados *Spodoptera*

frugiperda, *Diatraea saccharalis* e *Erinnyis ello* indicam a manutenção das relações filogenéticas do grupo (Figura 31). Além desta caracterização, a análise de distância permitiu verificar que a mutação do resíduo 59 sustenta o ramo formado pelas enzimas de *Plodia interpunctella* e dos insetos Sphingidae e Noctuidae, todas apresentando um resíduo de triptofano nesta posição, enquanto a quimotripsina de *Scirpophaga incertulas* apresenta uma Met59. A vantagem adaptativa em relação ao triptofano 59 seria a diminuição da reatividade da His catalítica com cetonas naturalmente produzidas por plantas (Spencer, 1987).

Não há descrição na literatura da presença de cetonas em gramíneas. Desta forma este nicho ocupado por alguns Lepidoptera não oferece este tipo de pressão seletiva, enquanto insetos polípagos estariam submetidos a este tipo de pressão. O aparecimento da mutação do resíduo 59 ocorreu como evento único e mantido por todo o grupo, sendo aparentemente uma mutação importante. No entanto, provavelmente, a grande distância verificada nas quimotripsinas dos Noctuidae podem estar relacionadas a adaptação a outras pressões seletivas, como inibidores de serina endopeptidases presentes em plantas, justificando, por exemplo, a separação de diferentes seqüências de quimotripsinas de uma mesma espécie, como pode ser observado para *Helicoverpa armigera* e *Agrotis ipsilon* no dendrograma. Apesar dos agrupamentos obtidos, os dados de distância não indicam um valor temporal de ocorrência das mutações, tornando difícil inferir dados de ancestralidade. Experimentos com DNA mitocondrial poderiam permitir o desenvolvimento de um modelo filogenético combinando a evolução das quimotripsinas em insetos em paralelo a evolução das plantas e a presença de cetonas reativas neste grupo.

6. Conclusões

A partir deste trabalho pode-se concluir que:

- Diferentemente do que se acreditava, as serina-endopeptidases de insetos são bastante distintas das enzimas de mamífero quanto às suas especificidades.
- As diferenças verificadas para as serina-endopeptidases de insetos incluem o processo de purificação destas enzimas, sendo que, muitas vezes,

estas diferenças verificadas estão relacionadas ao grupo ao qual o inseto em estudo pertence.

- Pela primeira vez uma tripsina de inseto é caracterizada cineticamente quanto à reatividade de modificação dos resíduos do sítio ativo, estudo realizado com a tripsina de *Periplaneta americana*.
- As serina-endopeptidases de inseto apresentam diferenças de especificidade entre si tanto em relação a diversos substratos quanto para modificadores químicos e inibidores.
- Análises de distância por NJ de serina-endopeptidases de insetos demonstram que a distribuição das enzimas dentre os grupos de insetos segue a filogenia determinada por estudos morfológicos. No entanto, há uma influência da dieta para grupos menores.
- Um estudo dos subsítios de ligação para 4 tripsinas de insetos purificadas demonstra diferença de especificidade e hidrofobicidade de seus sítios de ligação
- O estudo de seqüências de tripsina permitiu verificar alterações de resíduos importantes envolvidos em interação com inibidores em tripsinas sensíveis e resistentes a inibidores. Análises de distância por NJ permitiu observar que estas alterações sustentam todos os ramos da árvore obtida, indicando um processo coevolutivo de tripsinas e inibidores.
- Um estudo da especificidade de quimotripsinas de insetos foi realizado permitindo esclarecer as diferenças observadas na literatura quanto às reatividades destas enzimas a clorometil cetonas e confirmando os dados de que quimotripsinas de insetos apresentam um sítio estendido de ligação.
- Estudos de modelagem molecular e alinhamento de seqüências de quimotripsinas permitiram verificar a alteração de um resíduo na posição 59 que pode justificar a alteração da reatividade das quimotripsinas à clorometil cetonas
- Análise de distância por NJ permitiu a obtenção de uma árvore que relaciona seqüências conhecidas de quimotripsina, sendo que um sub-ramo dentro da ordem Lepidoptera é sustentado pela substituição do resíduo 59, o qual pode estar envolvido em proteção das quimotripsinas de insetos a cetonas reativas das plantas, indicando um processo coevolutivo.

7. Referências

- Alves, L.C., Almeida, P.C., Franzoni, L., Juliano, L., Juliano, M.A., 1996. Synthesis of N α -protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Peptide Res.* 9, 92-96.
- Applebaum, S. W., 1985. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.L (Ed). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 4.* Pergamont Press, New York, pp. 279-311.
- Barciszewski, J., Radlowski, M., Gulewicz, K., Giel-Pietraszuk, M., Mucha, P., Rekowisk, P., Kupryszewski G., 1997. Systemin- an inducer of proteinase inhibitor synthesis can be responsible for biological activity of a lupin extract agains insects. *J. Plant Physiol.* 150, 220-223
- Barillas-Mury, C., Graf, R., Hagedorn, H.H., Wells, M.A., 1993. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 2, 7-12.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woerner, J.F., 1998. *Handbook of proteolytic enzymes.* Academic Press, INC., London.
- Baumann, E., 1990. Isolation and partial characterization of a chymotrypsin-like endoprotease from cockroach intestinal system. *Insect Biochem.* 20, 761-768.
- Bernardi, R., Tedeschi, G., Ronchi, S., Palmieri, S., 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 883-889.
- Bieth, J., Spiess, B., Wermuth, C.G., 1974. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem. Med.* 11, 350-357.

- Blow, D.M., Birktoft, J.J., Hartley, B.S. 1969. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* 221, 337-339.
- Birktoft, J.J., Blow, D.M., 1972. Structure of crystalline-chymotrypsin.V. The atomic structure of tosyl-chymotrypsin at 2 Angstroms resolution. *J. Mol. Biol.*, 68, 187-240.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrlamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bode, W., Huber, R., 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204, 433-451.
- Bode, W., Huber, R., 2000. Structural basis of the endoproteinae-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 241-252.
- Bode, W., Schwager, J., 1975. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Angstroms resolution II. *J.Mol. Biol.* 98, 593.
- Bode, W., Walter, J., Huber, R., Wenzel, H.R., Tschesche, H., 1984. The refined 2.2 Angstroms (0.22 nm) X-ray crystal structure of the tertiary complex formed by bovine trypsinogen, valine-valine and Arg15 analogue of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochemistry* 144, 185-190.
- Bodi, A., Kaslik, G., Venekei, I., Graf, L., 2001. Structural determinants of the half-life and cleavage site preference in the autolytic inactivation of chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.* 268, 6238-6246.
- Botos, I., Meyer, E., Nguyen, M., Swanson, S.M., Koomen, J.M., Russell, D.H., Meyer, E.F., 2000. The structure of an insect chymotrypsin. *J.Mol.Biol.* 298, 895-901.
- Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Gatehouse, J.A, 1997. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem.Molec.Biol.*, 27, 625-638.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Branden, C., Tooze, J., 1999. *Introduction to Protein Structure*. 2nd edition - Garland Publishing, Inc. New York.
- Breddam, K., Gron, H., Medal, M., 1992. Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* 31, 6011-6018.
- Brito, L.O., Lopes, A.R., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitor may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 365-375.
- Broadway, R., 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 39-53.
- Broadway, R.M., 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 855-874.
- Casu, R.E., Jarmey, J.M., Elvin, C.M., Eisemann, C.H., 1994. Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol.* 3, 159-170.
- Christeller, J.T., Laing, W.A., Shaw, B.D., Burgess, E.P.J., 1990. Characterization and partial purification of the digestive proteases of the black field cricket, *Teleogryllus commodus* (Walker): elastase is a major component. *Insect Biochem.* 20, 157-164.
- Colebatch, G., Cooper, P., East, P., 2002. cDNA cloning of a salivary chymotrypsin-like protease and the identification of a six additional cDNAs encoding putative digestive proteases from the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 1065-1075.

- Craik, C.S., Largman, C., Fletcher, T., Roczniak, S., Barr, P.J., Fletterick, R., Rutter, W.J. 1985, Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science* 228, 291-297.
- Craik, C.S., Roczniak, S., Largman, C., Rutter, W.J. 1987. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* 237, 909-913.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2001. Apocrine secretion of amylase and trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47, 143-155.
- Davis, C. A., Riddell, D. C., Higgins, M. J., Holden, J. J., White, B. N., 1985. A gene family in *Drosophila melanogaster* coding for trypsin-like enzymes. *Nucleic Acids Res.* 13, 6605-6619.
- de Almeida, R.W., Tovar, F.J., Ferreira, I.I., Leoncini, O., 2003. Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes, *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33, 307-315.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18, 586-608.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Evnin, L.B., Vásquez, J.R., Craik, C.S., 1990. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6659-6663.
- Futuyma, D. J., 1986. Evolutionary biology, 2nd ed. *Imprenta* Sunderland, Mass. Sinauer Associates 600 pp.
- Gaines, P.J., Sampson, C.M., Rushlow, K.E., Stiegler, G.L., 1999. Cloning of a family of serine protease genes from the cat flea *Ctenocephalides felis*. *Insect Mol. Biol.* 81, 11-22.

- Gatehouse, A. M.R., Gatehouse, J. A., 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* 52, 165-175.
- Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P.J., Christeller, J.T., 1997. Characterization of major midgut protease cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 929-944.
- Gatehouse AM, Norton E, Davison GM, Babbe SM, Newell CA, Gatehouse JA. 1999. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *J. Insect Physiol.* 45(6): 545-558.
- Giebel, W., Zwilling, R., Pfeleiderer, G. 1971. The evolution of endopeptidases - XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 38B, 197-210.
- Gillott C. 1995, *Entomology* 2nd ed. Plenum Press, New York. 798pp.
- Girard, C., Jouanin, L., 1999. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 1129-1142.
- Graf, L., Craik, C.S., Patthy, A., Roczniak, S., Fletterick, R.J., Rutter, W.J., 1987. Selective alteration of substrate specificity by replacement of the aspartic acid 189 with lysine in the binding pocket of trypsin. *Biochemistry* 26, 2616-2623..
- Graf, L., Jancso, A., Szilagyi, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradsky, K., Rutter, W.J., 1988. Electrostatic complementarity within the substrate binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4961-4965.
- Graf, R., Boehlen P., Briegel H., 1991. Structural diversity of trypsin from different mosquito species feeding on vertebrate blood. *Experientia* 47, 603-609.

- Grahn, S., Ulmann, D., Jakubke, H.D., 1998. Design and synthesis of fluorogenic trypsin peptide substrates based on resonance energy transfer. *Analyt. Biochem.* 265, 225-231.
- Green, N.M., Work, E., 1953. Pancreatic trypsin inhibitor. 2. Reaction with trypsin. *Biochem. J.* 54, 347-352.
- Grzesiak, A., Helland, R., Smalás, A.O., Krowarsch, D., Dadlez, M., Otlewski, J., 2000. The P1' position in BPTI is a major determinant of the association energy with serine proteinases. *J. Mol. Biol.* 301, 207-218.
- Guinto, E. R., Caccia, S., Rose, T., Fütterer, K., Waksman, G., Di Cera, E. 1999. Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1852-1857.
- Hamed, M.B.B., Attias, J., 1987. Isolation and characterization of two alkaline proteases of the greater wax moth *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem.* 5, 653-658.
- Hedstrom, L., Perona, J., Rutter, W.J., 1994. Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant. *Biochemistry* 33, 8757-8763.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W.J., 1992. Converting trypsin to chymotrypsin – The role of surface loops. *Science* 255, 1249-1253.
- Hedstrom, L., 1996. Trypsin: a case study in the structural determinants of enzyme specificity. *Biol. Chem.* 377, 465-470.
- Houseman, J.G., Philogène, B.J.R., 1989. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Can. J. Zool.* 67, 864-868.
- Huber, R., Kukla, D. Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., Steigemann, W., 1974. Structure of the complex formed by bovine trypsin and

bovine pancreatic trypsin inhibitor. II Crystallographic refinement at 1.9 resolution. *J. Mol. Biol* 89, 73-101.

Jany, K.D., Haug, H., Pfeleiderer, G., Ishay J., 1978a. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidase from the larva of the hornet *Vespa crabro*. *Biochemistry*. 17(22):4675-82.

Jany, K.D, Haug, H., Ishay, J., 1978b. Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect Biochem*. 8, 221-230.

Jany, K.D., Bekelar, K., Pfeleiderer G., Ishay, J., 1983. Amino-acid sequence of an insect chymotrypsin from the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 110, 1-7.

Jany, K.D., Pfeleider, G., Molitori, H.P., 1974. Purification and some physical properties of a chymotrypsin-like protease of larva of hornet, *Vespa orientalis*. *Eur. J. Biochem*. 42, 419-428.

Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol*. 43, 885-895.

Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M., 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131, 1-11.

Juliano, L., Juliano, M.A., 1985. Synthesis and kinetic parameters of hydrolysis by trypsin of some acyl-arginyl-p-nitroanilides and peptides containing arginyl-p-nitroanilide. *Brazilian J. Med. Biol. Res*. 18, 435-445.

Katchalski, E., Carmel, A., Zur, M., Yaron, A., 1973. Use of substrates with fluorescent donor and acceptor chromophores for the kinetic assay of hydrolases. *FEBS Letters* 30, 11-14.

Keil-Dlouha, V., 1971. Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Letters* 16, 291-295.

- Knight, C.G., Barrett, A.J., 1976. Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem. J.* 155, 117-125.
- Koepke, J., Ermler, U., Warkentin, E., Wenzl, G., Flecker, P., 2000. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J. Mol. Biol.* 298: 477-491.
- Kotani, E., Niwa, T., Suga, K., Sugimura, Y., Oda, K., Mori, H., Furusawa, T., 1999. Cloning and sequencing of a cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molec. Biol.* 8.299-304.
- Krystal, G., MacDonald, C., Munt, B., Ashwell, S., 1985. A method for quantitating nanograms amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Anal. Biochem.* 148, 451-460.
- Kurth, T., Ullmann, D., Jakubke, H-D., Hedstrom, L., 1997. Converting trypsin to chymotrypsin: structural determinants of S1' specificity. *Biochemistry* 36, 10098-10014.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.
- Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *The J. of Exper. Biol.* 206, 1707-1715.
- Laskowski, M. Jr., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593-626.
- Lecadet, M.M., Dedonder, R., 1966. Les protéases de *Pieris brassicae*. II. Spécificité. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 48, 661-691.

- Lee, K.Y., Zhang, R., Kim, M.S., Park, J.W., Park, H.Y., Kawabata, S., Lee, B.L., 2002. A zymogen form of masquerade-like serine proteinase homologue is cleaved during pro-phenoloxidase activation by Ca^{2+} in coleopteran and *Tenebrio molitor* larvae. *Eur. J. Biochem.* 269, 4375-4383.
- Lee, M. J., Anstee, J. H., 1995. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 49-61.
- Lemos, F.J.A., Terra, W.R., 1992. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 613-619.
- Levinsky, H., Birk, Y., Applebaum, S.W., 1977. Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 10, 252-264.
- Lin, G., Bode, W., Huber, R., Chi, C., Engh, R.A., 1993. The 0.25-nm X-ray structure of Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *Eur. J. Biochem.* 212: 549-555.
- Longstaff, C., Campbell, A.F., Fersht, A.R., 1990. Recombinant chymotrypsin inhibitor 2: expression, kinetic analysis of inhibition with alpha-chymotrypsin and wild-type and mutant subtilisin BPN', and protein engineering to investigate inhibitory specificity and mechanism. *Biochemistry* 29, 7339-7347.
- Lopes, A.R., 1999. Caracterização das tripsinas de insetos. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química. USP, São Paulo.
- Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L., Terra, W.R., 2004. Coevolution of insect trypsin and inhibitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 140-152.
- Lopes, A.R., Marana, S.R., Terra, W.R., Insect chymotrypsins substrate specificity, Chloromethyl ketones inactivation and molecular modeling: possible coevolutional adaptation of insects and plants. *Manuscrito em preparação.*

- Lopes, A.R., Terra, W.R., 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33, 407-415.
- Luque, T., O'Reilly, D.R., 2002. Functional and phylogenetic analyses of a putative *Drosophila melanogaster* UDP-glycotransferase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1597-1604.
- Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C., Terra, W.R., 2002. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 494-497.
- Marchetti, S., Chiabà, C., Chiesa, F., Bandiera, A., Piotti, A., 1998. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 28, 449-458.
- Martin, J.S., Martin, M.M., Bernays, E.A., 1987. Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores: implications for theories of plant defense. *J. Chem. Ecol.* 13, 605-621.
- Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R.M., 2001a. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 645-657.
- Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R.M., 2001b. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 633-644.
- Meyer, D., 1994. Árvores evolutivas humanas: uma revisão crítica sobre a contribuição da genética na elucidação da origem dos humanos modernos. Dissertação de Mestrado. 171 pp. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

- Miller, J. W., Kramer, K.J., Law, J.H., 1974. Isolation and parcial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*, Johansson (Lepidoptera: Sphingidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 48B, 117-129.
- Muharsini, S., Dalrymple, B., Vuocolo, T., Hamilton, S., Willadsen, P., Wijffels, G., 2001. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screw worm fly. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31 (11): 1029-1040.
- Novillo, C., Castañera, P., Ortego, F., 1999. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 177-184.
- Oliveira, M.C.F., Hirata, I.Y., Chagas, J.R., Boschcov, P., Gomes, R.A.S., Figueiredo, A.F.S., Juliano, L., 1992. Intramolecular quenched fluorogenic peptide substrate for human renin. *Analytical Biochemistry* 203, 39-46.
- Otlewski, J., Jaskólski, M., Buczek, O., Cierpicki, T., Czapinska, H., Krowarsch, D., Smalas, A.O., Stachowiak, D., Szpineta, A., Dadlez, M., 2001. Structure function relationship of serine protease – protein inhibitor interaction. *Acta Biochim. Pol.* 48, 419-428.
- Parra, J.R.P. 1986. Criação de insetos para estudos com patógenos. In *Controle microbiano de insetos* (Edited by Alves S.B.), pp 348-373. Editora Manole, São Paulo.
- Parra, J.R.P., Mihsfeldt, L.J., 1992. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson T.E.; Leppla N.C. (eds). *Advances in insect rearing for research and pest management*. Boulder, CO: Westview Press.
- Paulillo, L.C., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho M.C., 2000. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitor. *J. Econ. Entomol.* 93, 892-896.

- Perona, J.J., Tsu, C.A., Craik, C.S., Fletterick, R.J., 1993. Crystal structures of rat anionic trypsin complexed with the protein inhibitors APPI and BPTI. *J. Mol. Biol.* 230, 919-933.
- Perona, J.J., Hedstrom, L., Rutter, W.J., Fletterick, R.J., 1995. Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* 34, 1489-1499.
- Peterson, A.M., Barillas-Mury, C.V., Wells, M.A., 1994. Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 24, 463-471.
- Peterson, A.M., Fernando, G.J.P., Wells, M.A., 1995. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25 (7): 765-774
- Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C, Silva-Filho, M.C. 2001. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Ent. Exp. Appl.* 99, 79-85.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Sammons, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 41-47.
- Robertus, J.D., Kraut, J., Alden, R.A., Birktoft, J.J., 1972. Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry.* 11(23): 4293-4303.
- Ross J., Jiang, H., Kanost, M.R., Wang, Y., 2003. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* 304. 117-131.
- Ryan. C., 1978. Proteinase inhibitor in plant leaves: a biochemical mode for pest induced natural plant protection. *TIBS*, 148-151.

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4): 406-425.
- Sakal, E., Applebaum, S.W., Birk, Y., 1988. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. *Int. J. Peptide. Res.* 32, 590-598.
- Sandeman, R.M., Feehan, J.P., Chandler, R.A., Bowles, V.M., 1990. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int. J. Paras.* 20, 1019-1023.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-7.
- Sawyer, L., Shotton, D.M., Campbell, J.W., Wendel, P.L., Muirhead, H., Watson, H.C., Diamond, R., Ladner, R.C., 1978. The atomic structure of crystalline porcine pancreatic elastase at 2.5 Å resolution: comparisons with the structure of alpha-chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* 118, 137-208.
- Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.
- Scheidig, A.J., Hynes, T.R., Pelletier, L.A., Wells, J.A., Kossiakoff, A.A., 1997. Crystal structure of bovine chymotrypsin and trypsin complexed to the inhibitor domain of Alzheimer's amyloid β protein precursor (APPI) and basic pancreatic trypsin inhibitor (BPTI): Engineering of inhibitors with altered specificities. *Protein Sci.* 6, 1806-1824.
- Schellenberger, V., Turck, C.W., Rutter, W.J., 1994. Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, α -lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry* 33, 4251-4257.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme kinetics*. Wiley, New York.
- Shaw, E., Mares-Guia, M., Cohen, W., 1965. Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-

- heptanone, the chloromethyl ketone derived from N^α-Tosyl-L-lysine. *Biochemistry* 4, 2219-2224.
- Shaw, E., Ruscica, J. 1971. The reactivity of His-57 in chymotrypsin to alkylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 484-489.
- Shotton, D.M., Watson, H.C., 1970. Three-dimensional structure of tosyl-elastase. *Nature* 225, 811-816. *Nature*.
- Shukle, R.H., Murdock, L.L., Gallun, R.L., 1985. Identification and partial characterization of a major gut proteinase from larvae of the hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). *Insect Biochem.* 15, 93-101.
- Song, H.K., Suh, S.W. 1998. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 275: 347-363.
- Spencer, K.D., 1987. Specificity of action of allelochemicals: Diversification of glycosides. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 330, 275-288.
- Steitz, T. A., Henderson, R., Blow, D.M. 1969. Structure of crystalline alpha-chymotrypsin. 3. Crystallographic studies of substrates and inhibitors bound to the active site of alpha-chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* 46, 337-348.
- Stroud, R.M., Kay, L.M., Dickerson, R.E., 1974. The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 83, 185-208.
- Swofford, D.L., 1999. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Targa H. J., Peres C. A. 1979. Radiation-induced dominant lethal mutations in oocytes of *Musca domestica*. *Mutation Res.* 63: 153-160.

- Terra, W.R., Ferreira, C., 1991. A digestão em insetos. *Ciência hoje* 12, 28-38.
- Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp.Biochem.Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra, W.R., Ferreira, C., De Bianchi, A.G., 1978. Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochim. Biophys. Acta* 571, 79-85.
- Theodorides, K., De Riva, A., Gómez-Zurita, J., Foster, P.G., Vogler, A.P., 2002. Comparison of EST libraries from seven beetle species: towards a framework for phylogenomics of the Coleoptera. *Insect. Mol. Biol.* 11 (5): 467-475
- Thompson, J.D., Plewniak, F., Poch, O., 1999. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.* 27, 2682-2690.
- Thompson, R.C., Blout, E.R., 1973. Dependence of the kinetic parameters of elastase catalyzed amide hydrolysis on the length of peptide substrates. *Biochemistry* 12, 1301-1305.
- Tong, N.T., Imhoff, J.M., Lecroisey, A., Keil, B., 1981. Hypodermin A, a trypsin neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochim. Biophys. Acta* 658, 209-219.
- Tulinsky, A., Mani, N.V., Morimoto, C.N., Vandlen, R.L., 1973. The Structure Of Alpha-Chymotrypsin. I. The Refinement Of The Heavy-Atom Isomorphous Derivatives At 2.8 Angstroms Resolution *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 29, 1309-1322.
- Valaitis, A., Augustin, S., Clancy, K., 1999. Purification and characterization of the western spruce budworm larval midgut proteinases and comparison of laboratory-reared and field-collected insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 405-415.

- Valaitis, A.P., 1995. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush-border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 139-149.
- Várallyay, E., Pál, G., Patthy, A., Szilágyi, L., Graf, L. 1998. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 56-60.
- Venekei, I., Szilagyi, L., Graf, L., Rutter, W.J., 1996. Attempts to convert chymotrypsin to trypsin. *FEBS letters* 379, 143-147
- Vizioli, J., Catteruccia, F., della Torre, A., Reckmann, I., Muller, H.M, 2001. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur. J. Biochem.* 268, 4027-35.
- Volpicella, M., Ceci, L.R., Cordewener, J., America, T., Gallerani, R., Bode, W., Jongsma, M.A., Beekwilder, J., 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.* 270, 10-19.
- Voet, D., Voet, J.G. 1995. *Biochemistry – Second edition*. Wiley, New York. 1361 pp.
- Ward, C.W. , 1975. Properties and specificity of the major anionic trypsin like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochim.Biophys. Acta* 410, 201-211.
- Wheeler, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D., Carpenter, J.M., 2001. The phylogeny of the extant hexapode orders. *Cladistics* 17, 113-169.
- Whitworth, S.T., Blum, M.S., James, T. 1998. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta*. Isolation and characterization of four serine endopeptidases. *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14430-14434.

- Whitworth, S.T., Kordula, T., Travis, J., 1999. Molecular cloning of Soli EC: an elastase-like serine proteinase from the imported red fire ant (*Solenopsis invicta*). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 249-254.
- Wu, R., Zhu, Y.C., Baker, J.E., 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 1053-1063.
- Wu, R., Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-El-Saad M., Xu D., 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnol.* 14, 494-498.
- Yang, Y.J., Davies, D.M., 1971. Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *J Insect Physiol.* 17, 117-131.
- Zeng, F., Zhu, Y.C., Cohen, A.C., 2002. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 455-464.
- Zhu, Y.C., Baker J.E., 2000. Molecular cloning and characterization of a midgut chymotrypsin-like enzyme from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 43, 173-184.
- Zhu, Y.C., Oppert, B., Kramer, K.J., McGaughey, W.H., Dowdy, A.K., 1997. cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 1027-1037.

8. Resumo

Serina endopeptidases de insetos, principalmente tripsinas e quimotripsinas, estão envolvidas na digestão inicial de proteínas. Genes codificadores para estas enzimas estão organizados em famílias multigênicas tendo expressão diferencial de acordo com a dieta do inseto, estando envolvidos no desenvolvimento de resistência a diferentes metabólitos secundários vegetais. Para uma melhor compreensão desta interação, fez-se necessário o isolamento destas enzimas para insetos de diferentes ordens, bem como a caracterização de suas especificidades por duas abordagens: (a) caracterização cinética dos subsítios componentes do sítio de ligação de tripsinas e quimotripsinas, utilizando diferentes substratos, modificadores químicos e inibidores e (b) estudos estruturais por modelagem molecular, clonagem, expressão e cristalização destas enzimas de insetos. Além disso, estudos evolutivos por análise de distância possibilitaram uma caracterização inicial da interação inseto-planta. Estas determinações permitiram verificar que tripsinas de insetos apresentam diferenças de especificidade tanto dentre as diferentes ordens de insetos quanto em relação às tripsinas de vertebrados, sendo que as tripsinas da ordem Lepidoptera apresentam troca de especificidade primária hidrolisando preferencialmente substratos P1Lys. Foram também observadas diferenças de hidrofobicidade para os subsítios caracterizados sendo que estes apresentam hidrofobicidades crescentes segundo o grau de complexidade dos insetos na sua escala evolutiva. A troca de especificidade e o aumento da hidrofobicidade podem permitir a hidrólise dos inibidores vegetais protéicos. A análise das sequências de tripsinas de insetos por Neighbor Joining (NJ) compõe uma árvore de distâncias topologicamente semelhante à árvore de relações filogenéticas determinadas por morfologia. A sobreposição de estruturas pré-determinadas de tripsina complexada a diferentes inibidores permite a identificação de posições de interação enzima-inibidor que justificam a classificação em grupos distintos de enzimas sensíveis ou resistentes à presença de inibidores na dieta de insetos.

Da mesma forma, a caracterização da especificidade das quimotripsinas de insetos permitiu a separação de grupos distintos de quimotripsinas. Estes grupos

são sustentados pela substituição do resíduo 59 em insetos polípagos que alimentam-se de plantas que contêm cetonas naturais reativas.

Estas caracterizações demonstram a importância de um estudo detalhado da especificidade de serina endopeptidases possibilitando o desenho de moléculas apropriadas para inibição destas e desenvolvimento de estratégias de controle de insetos.

9. Abstract

Insect serine endopeptidases, mainly trypsin and chymotrypsin are involved in initial protein digestion. Genes that encode these proteins are members of complex multigene families and are differentially expressed according to insects diet, thus being involved with resistance to plant metabolites. Purification of trypsins from different insect orders and chymotrypsins, as well as, characterization of their specificity are essential to a better understanding of this interaction. Characterization relied on two approaches: (a) kinetic characterization of the binding subsites of trypsins and chymotrypsins using different substrates, chemical modification and inhibition assays and (b) study of protein structure by molecular modelling and cloning, expression and crystallization of these enzymes. Besides that, evolutionary studies performed through distance analysis, permitted the investigation of plant-insect interaction. These characterizations showed that insect trypsins, in terms of specificity, are quite different from vertebrate trypsins and among insect orders. Lepidopterans trypsins have a distinct primary specificity, since they hydrolyse preferentially P1Lys substrates, and present a crescent subsite hydrophobicity, which is directly correlated with the evolutionary scale. Both, the specificity exchange and the crescent hydrophobicity can allow the hydrolysis of vegetal proteic inhibitors. The analysis of trypsin sequences in Neighbor-Joining (NJ) algorithm yield a distance tree that is coherent with morphological phylogenetic relationships. The superposition of predicted structures of trypsins-inhibitors complexes permits to observe amino acid residues of interaction between enzyme-inhibitor, which support the distinction of different groups between sensitive and insensitive trypsins to the presence of inhibitors on insect diet.

Similarly, characterization of insect chymotrypsins according to their specificity allowed us to classify these enzymes into different groups. These groups are supported by residue 59 replacements in polyphagous insects, which feed on plants bearing natural reactive ketones.

These studies show the importance of a detailed study of serine endopeptidases, which may help in the development of better insect control strategies.

Curriculum vitae

IDENTIFICAÇÃO

Adriana Rios Lopes, RG 25.138.832-3, nascida em 13/06/1.975, São Paulo, SP.

ENSINO MÉDIO

Colégio Stella Maris, 1989-1992.

GRADUAÇÃO

Bacharelado em Ciências Biológicas, 1993-1996, Universidade de São Paulo.

Licenciatura curta em Ciências Biológicas, 1993-1996, Universidade de São Paulo.

Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, 1993-1996, Universidade de São Paulo.

MESTRADO

Lopes, A. R. 1999. Caracterização das tripsinas de insetos. Orientador: Dr. Walter R. Terra. Área: Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP.

DOUTORADO

Lopes, A. R. (em andamento). Endopeptidases de insetos e interação inseto-planta. Orientador: Dr. Walter R. Terra. Área: Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP.

OCUPAÇÃO ATUAL

Bolsista de Doutorado, processo FAPESP nº 99/06684-0.

PUBLICAÇÕES

Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L., Terra, W.R., 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 55, 140-152.

Lopes, A.R., Terra, W.R., 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. Insect Biochem. Molec. Biol, 33, 407-415.

- Andrade, S.A., Santomauro, E.M., Lopes, A.R., Chudzinski-Tavassi, A.M., Juliano, M.A., Terra, W.R., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M., Oliva, M.L.V., 2003. *Bauhinia* proteinase inhibitor-based synthetic fluorogenic substrates for enzymes isolated from insect midgut and caterpillar bristles. *Biological Chemistry*, 384, 489-492.
- Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C. Terra, W.R., 2002. Subsites of trypsin active site favour catalysis or substrate binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 494-497.
- Brito, L.O, Lopes, A.R., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 128 B, 365-375.
- Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C, Silva-Filho, M.C. 2001. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Ent. Exp. Appl.* 99, 79-85.
- Paulillo, L.C., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho M.C., 2000. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitor. *J. Econ. Entomol.* 93, 892-896.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., de Sá M. F. G., Lopes, A.R., Pontes, E.G., 1999. Digestion in larvae of *Calosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29, 355-366.
- Lopes, A.R., Marana. S.R., Terra, W.R., 2003. Insect chymotrypsins substrate specificity, chloromethyl ketones inactivation and molecular modeling: possible coevolutional adaptation of insects and plants. *Manuscrito em preparação.*

Participações em congresso

Participação no The Annual Meeting of the Entomological Society of America (ESA) no ano de 2002 em Fort Lauderdale, EUA com apresentação da conferência em simpósio "Coevolution of insect trypsins and inhibitors", no simpósio: Insect digestion: potential applications in insect management."

Participação no XXI International Congress of Entomology realizado no ano de 2000 em Foz do Iguaçu, Brasil com apresentação de 1 trabalho.

Participação nas reuniões anuais da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular no período de 1995 a 2002 com a apresentação de 16 resumos.

Atividades Didáticas

Participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da Universidade de São Paulo, nos períodos:

2º semestre de 1.997; 2º semestre de 1.999; 2º semestre de 2.000.