

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

**Purificação, caracterização físico-químico e cinética
das quimotripsinas digestivas de *Periplaneta
americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis***

Paloma Mieko Sato

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

**São Paulo
2006**

Agradecimentos:

O resultado deste trabalho é consequência de uma colaboração direta ou indireta de várias pessoas a quem expresso meus agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Walter Terra pela oportunidade e profissionalismo;

À Profa. Dra. Maria A. Juliano pelos peptídeos e grande ajuda nas análises;

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano Neto pela colaboração e espaço no seu laboratório;

À Profa. Dra. Clélia Ferreira pelo apoio;

À Dra. Adriana Rios Lopes pelas discussões e correções;

Às técnicas Luiza Nakabayshi, Maria Ivanilde e Cristiane pela amizade e ajuda;

A todos os colegas de laboratório: Alcides, Alexandra, Alexandre, Ciça, Fábio, Fernando, João, Lucas Blanes, Lucas Guerra, Plínio, Renata e Sandro;

A todos os funcionários e alunos do laboratório de Biofísica-Infar da Escola Paulista de Medicina pela atenção e colaboração;

E em especial quero agradecer a duas pessoas que conheci durante esses dois anos de trabalho e que fizeram com que esse trabalho chegasse até o fim através de palavras de apoio e amizade:

Ao grande amor da minha vida Atila Iamarino que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e de luta;

À minha grande amiga e irmã Ana Gomez que me apoiou nos momentos mais difíceis e que sempre vai estar no meu coração;

Durante a elaboração desse trabalho o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, CNPq e PRONEX;

A bolsa de Mestrado foi concedida pela FAPESP a quem agradeço.

Abreviaturas

Abz: ácido orto-aminobenzóico

AFC: aminofluorometilcumarina B-R-MCA: benzoil-arginina 7-amida-4-metil cumarina

DABCYL: 4-(4-dimetilaminofenilazo)-benzóico

DIFP: diisopropilfosforidato

DMSO: dimetilsulfóxido

EDANS: ácido 5-[(2-aminoetil)-amino]naftaleno-1-sulfônico

EDDnp: N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamino

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil

HCl: ácido clorídrico

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

MCA: 7-amino-4 metil-cumarina

NaCl: cloreto de sódio

PMSF: fenol-metil-sulfonil-fluoreto

SBTI: soybean trypsin inhibitor do tipo Kumitz

SDS: dodecil-sulfato de sódio

Suc-AAF-MCA: succinil ala-ala-phe7-amida-4-metil cumarina

Suc-AAPF-MCA: succinil-ala-ala-pro-phe7-amida-4-metil cumarina

Suc-LY-MCA: succinil-leu-tyr7-amida-4-metil cumarina

Suc-LLVY-MCA: succinil-leu-leu-val-tyr7-amida-4-metil cumarina

TLCK: tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK: tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

Tris: tris-hidroximetil amino metano

Z-GGR-MCA: carbobenzoxi-gly-gly-arg7-amida-4-metil cumarina

Z-FR-MCA: carbobenzoxi-phe-arg7-amida-4-metil cumarina

Resumo

Quimotripsinas (EC 3.4.21.1) são serina proteinases que possuem 245 resíduos de aminoácidos arranjados em dois domínios duplo β -barril, sendo que o sítio ativo está localizado entre esses dois domínios. O estudo da especificidade das endopeptidases foi facilitado pelo conceito de sítio de ligação do substrato, que corresponde ao sítio ativo daquelas enzimas. Porém, sobre as quimotripsinas de insetos, praticamente não existe informação a respeito da especificidade dos diferentes subsítios dessas enzimas. O estudo da especificidade dos subsítios das quimotripsinas dos insetos *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentaram maior eficiência de hidrólise sobre substratos que apresentam um resíduo Tyr em P1, embora as razões Phe/Tyr para os diferentes insetos sejam bastante variadas. Estas diferenças indicam diferentes especificidades para as quimotripsinas de insetos em P1. No entanto, estas diferenças parecem não seguir a posição ocupada pelo inseto na escala evolutiva e são menos evidentes do que as verificadas para as tripsinas dos mesmos insetos, onde há troca de especificidade primária. A quimotripsina de *Periplaneta americana* como a de *Diatraea saccharalis* preferencialmente clivam substratos com Pro em P2. Porém, o mesmo não acontece com a quimotripsina de *Tenebrio molitor*, que apresentou maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Ala em P2, essa preferência pode estar relacionada à conformação da Pro que difere dos demais resíduos por ser um iminoácido. Porém, as três quimotripsinas estudadas apresentaram maior k_{cat}/K_m para o peptídeo Ile em P3 indicando que esse subsítio possui um papel fundamental na discriminação dessas enzimas por substratos com resíduos de aminoácidos específicos nessa posição. As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* apresentaram maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Ser em P1', evidenciando que a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral da Ser e o baixo volume da cadeia lateral do resíduo, torna o subsítio dessas enzimas mais seletivo que a quimotripsina de *Tenebrio molitor* que apresentou maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Ala. Dessa forma, esse estudo colabora para um melhor conhecimento da especificidade dos subsítios das endopeptidases digestivas de insetos pode dar diretrizes para a purificação ou síntese de inibidores mais eficazes com ação direta nas enzimas digestivas de insetos e serem utilizados na produção de plantas transgênicas ou utilizados como bioinseticidas

Índice

	Pg.
1. Introdução	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Serina-endopeptidases	3
1.3. Especificidade de quimotripsinas	4
1.4. Quimotripsinas de insetos	7
1.5. Substratos para caracterização dos subsítios das quimotripsinas de insetos	9
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Insetos	15
3.1.1 <i>Periplaneta americana</i>	15
3.1.2 <i>Diatraea saccharalis</i>	15
3.1.3 <i>Tenebrio molitor</i>	15
3.2. Preparo das amostras	16
3.2.1 <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	16
3.3. Ensaio enzimáticos e determinação de proteína	16
3.4. Purificação parcial da quimotripsina digestiva de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	17
3.5. Diálise em microtubos	17
3.6. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS	18
3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos	18
3.7.1. Determinação dos parâmetros cinéticos com substratos de fluorescência direta	18
3.7.2. Determinação da especificidade dos subsítios S1', S1, S2 e S3 da quimotripsina de diferentes insetos com substratos de fluorescência apagada	18
3.8. Determinação da hidrofobicidade dos subsítios das quimotripsinas parcialmente purificadas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	20
3.9. Titulação das quimotripsinas parcialmente purificadas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com SBTI	20
3.10. Determinação da energia de ativação total livre (ΔG^{\ddagger}_T) e energia livre de ligação (ΔG_s)	20
3.11. Inativação térmica da quimotripsina parcialmente purificada de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	21
3.12. Modificação química da quimotripsina parcialmente purificada de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> na presença de TPCK	21
3.13. Determinação do efeito do pH sobre a atividade das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	22
4. Resultados	23
4.1. Purificação parcial das quimotripsinas digestivas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	23
4.2. Determinação do efeito do pH sobre a atividade das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	30
4.3. Titulação e determinação da constante de dissociação aparente da quimotripsina de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com inibidor de soja SBTI	30
4.4. Modificação da quimotripsina de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> por TPCK	34
4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos com substratos fluorogênicos	34

4.6. Caracterização do subsítio S1 das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com substratos de fluorescência apagada	38
4.7. Caracterização do subsítio S2 das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com substratos de fluorescência apagada	40
4.7.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)	40
4.7.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar não carregada (Gln e Ser)	43
4.7.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)	43
4.7.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)	43
4.8. Caracterização do subsítio S3 para as quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com substratos de fluorescência apagada	44
4.8.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)	44
4.8.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia polar que apresenta uma amida (Gln)	46
4.8.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)	46
4.8.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)	47
4.9. Caracterização do subsítio S1' para as quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> com substratos de fluorescência apagada	47
4.9.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)	47
4.9.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia polar sem carga (Gln e Ser)	49
4.9.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)	49
4.9.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)	50
4.10. Determinação da energia de ativação total livre (ΔG_T^\ddagger) e energia livre de ligação (ΔG_s) dos diferentes substratos em relação às quimotripsinas em estudo	50
4.11. Índice de hidrofobicidade dos subsítios de ligação das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	54
5. Discussão	56
5.1. Características gerais das quimotripsinas de insetos	56
5.2. Especificidade por substrato das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	59
5.3. Propriedades dos subsítios do sítio ativo das quimotripsinas de <i>Periplaneta americana</i> , <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	63
5.4. Papel dos subsítios de quimotripsinas na catálise	64
5.5. Envolvimento das quimotripsinas no desenvolvimento de resistência a dietas	66

na presença de inibidores e a importância do estudo de especificidade
6. Referências Bibliográficas

1. Introdução:

1.1. Considerações gerais

A evolução das plantas transformou o ambiente terrestre em uma fonte valiosa para a comunidade terrestre. Nos ecossistemas naturais, plantas e insetos são alguns dos organismos que estão interagindo continuamente de uma maneira complexa. Esses dois organismos estão intimamente associados desde que os insetos tenham várias atividades benéficas como defesa e polinização enquanto as plantas contribuem com três principais fatores para a proliferação dos insetos: proteção, locais de oviposição e alimento (Panda e Khush, 1995).

Por outro lado, cerca de 70% das espécies animais descritas pertencem ao grupo dos insetos (Figura 1) e estes podem ser considerados os principais competidores do homem na Terra. Eles são responsáveis pela destruição de uma porcentagem importante de plantações, de alimentos armazenados, e, além disso, são vetores de um grande número de doenças que afetam o homem e animais de criação (Gillot, 1995).

Há séculos o controle dos insetos tem demandado um grande esforço, várias estratégias têm sido empregadas (Gillot, 1995) e atualmente, com o aumento da consciência ecológica, o controle dos insetos tem se voltado para o fortalecimento do próprio sistema de defesa das plantas contra a herbivoria.

Com o reconhecimento de que uma das maiores áreas de contato do inseto com o meio ambiente é o sistema digestivo, uma maior ênfase tem sido dada na produção de plantas transgênicas capazes de expressar compostos que desorganizam as funções digestivas dos insetos. Dessa forma, muitas plantas transgênicas resistentes ao ataque dos insetos já foram produzidas (Shah *et al.*, 1995; Alstad e Andow, 1995).

Apesar dos crescentes estudos para a caracterização do sistema digestivo dos insetos e a plasticidade de adaptações de suas enzimas a diferentes dietas muitas informações ainda são necessárias para a utilização deste como um alvo para o controle de pragas agrícolas.

Porém, a expressão diferencial de proteinases nos insetos que entram em contato com inibidores protéicos levou a uma situação de difícil resolução devido ao fato das novas proteinases não serem susceptíveis aos inibidores (Jongsma e Bolter, 1997; Mazumdar-Leighton *et al.*, 2000; Mazumdar-Leighon e Broadway 2001; Brito *et al.*, 2001).

Neste contexto, estudos detalhados das tripsinas e quimotripsinas, que são as principais proteinases digestivas dos insetos (Terra e Ferreira, 1994), são necessários.

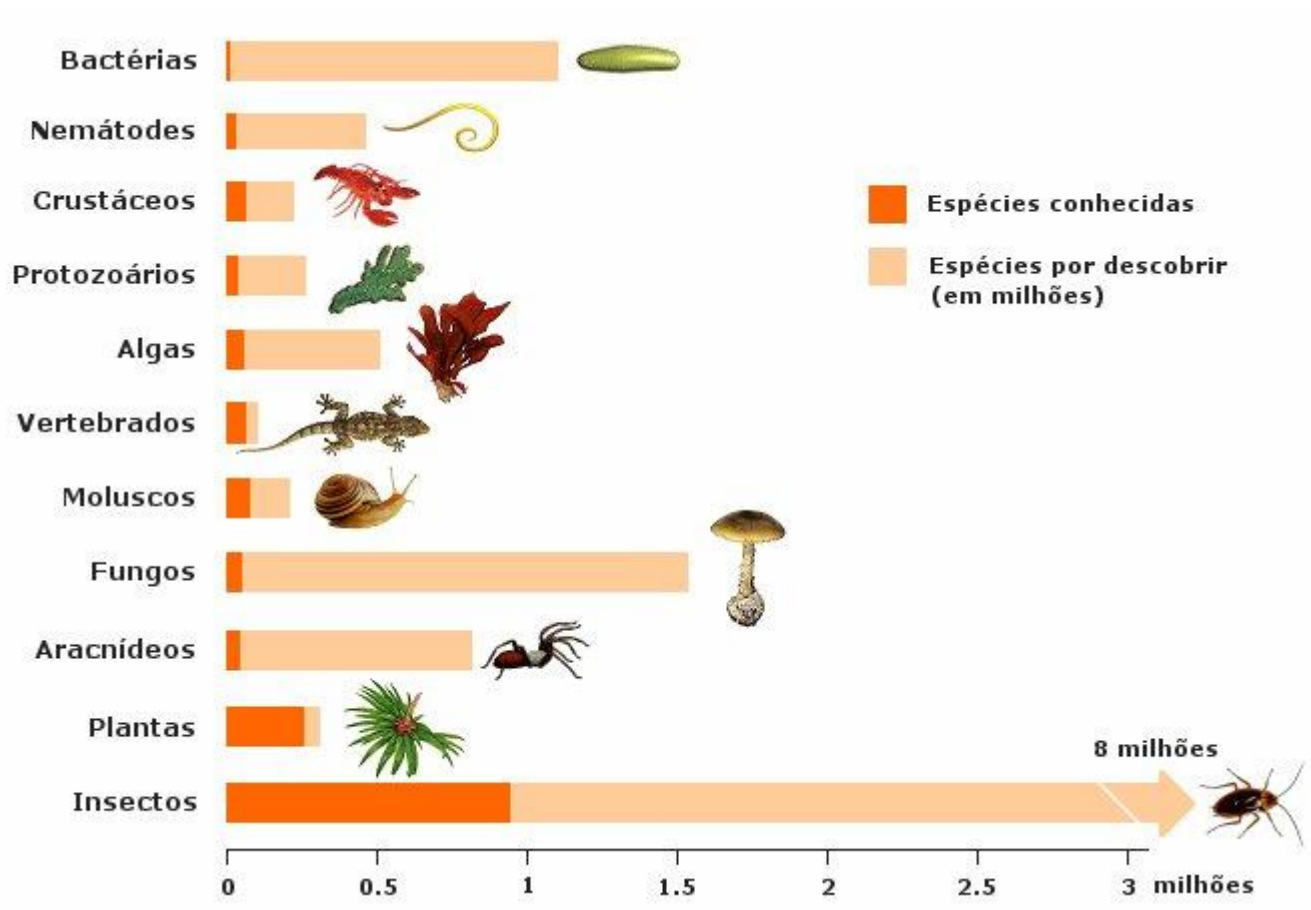


Figura 1: Representação gráfica da distribuição de espécies animais descritas. (<http://www.cientic.com>)

1.2. Serina-endopeptidases

Serina-endopeptidases são enzimas que hidrolizam as ligações peptídicas internas de polipeptídeos, cujo mecanismo catalítico depende da hidroxila de um resíduo de serina atuando como nucleófilo. Além da serina, são necessários um resíduo que será o doador de prótons, que para os clãs SA, SB, SC e SH são resíduos de histidina, e um resíduo de aminoácido para a orientação correta do anel imidazol presente na cadeia lateral do resíduo de histidina. Para o clã SA, que contém as quimotripsinas e tripsinas, este resíduo é um ácido aspártico. O clã SA é o mais representativo dentre as serina endopeptidases e apresenta uma estrutura em β -barril e a seqüência de sua tríade catalítica é His, Asp e Ser encontrados na interface entre os dois domínios. Neste clã estão agrupadas várias famílias, sendo que a família S1 inclui representantes como tripsinas e quimotripsinas (Barrett *et al*, 2004).

As investigações iniciais das serinas proteases começaram com enzimas que podem ser facilmente obtidas em grandes quantidades: quimotripsina e tripsina bovina e elastase de porco (Hedstrom, 2002).

Os grupos importantes da tríade catalítica das serina endopeptidases foram descobertos em quimotripsina bovina utilizando estudos de modificação química específica. A serina 195 pode ser diagnosticada como resíduo presente no sítio ativo pela sua reação com diisopropilfosforidato (DIPF), sendo que esta reatividade é exclusiva da serina catalítica, inativando irreversivelmente a enzima (Shaw *et al.*, 1965). O fator limitante para a utilização deste modificador é a sua alta toxicidade, dado que este composto é neurotóxico por reagir com a serina do sítio ativo de acetilcolinesterase, uma esterase serínica que catalisa a hidrólise de acetilcolina. Um substituto para este composto sugerido na literatura é o composto APMSF (Cole *et al.*, 1989). A histidina da posição 57 de quimotripsina foi caracterizada por modificador que apresenta afinidade pelo sítio ativo da enzima. Para isto, é utilizado TPCK (tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) que se liga à hidroxila da serina catalítica formando um intermediário tetraédrico análogo ao intermediário formado durante a catálise pela presença do resíduo de fenilalanina do substrato peptídico e a presença da clorometil cetona leva a alquilação da histidina reativa. Esta mesma inativação pode ser realizada para tripsinas com a utilização de TLCK (tosil-L-lisina clorometil cetona) (Shaw *et al.*, 1965). A confirmação do envolvimento dos resíduos de His e Ser, assim como a presença do resíduo de ácido aspártico na posição 102 na catálise se deu com a cristalização da α -quimotripsina de mamífero, que demonstrava que a serina 195 estava próximo o suficiente da histidina 57 para que se formasse uma ponte de hidrogênio e que o sítio catalítico da quimotripsina continha

em seu interior um resíduo de ácido aspártico ligado à histidina por uma ponte de hidrogênio, a qual, por sua vez, faz uma ponte de hidrogênio com a serina. A polarização do sistema devido à carga negativa do ácido aspártico torna a hidroxila da serina extremamente nucleofílica e extremamente reativa sobre ligações amida e ésteres (Blow *et al.*, 1969). Este resultado foi posteriormente comprovado pela substituição do resíduo de ácido aspártico da posição 102 por uma asparagina, o que altera completamente as constantes catalíticas sobre a hidrólise dos substratos testados e a reatividade da serina 195 por DIPF (Craik *et al.*, 1987).

1.3. Especificidade de quimotripsinas

Quimotripsinas (EC 3.4.21.1) são serina proteinases que possuem 245 resíduos de aminoácidos arranjados em dois domínios duplo β -barril, sendo que o sítio ativo está localizado entre esses dois domínios (Figura 2). Sua estrutura é geralmente dividida entre domínio de ativação, domínio de reconhecimento do substrato e domínio de ativação do zimógeno, componentes que são comuns às proteinases do clã SA (Barrett *et al.*, 2004).

O estudo da especificidade das endopeptidases foi facilitado pelo conceito de sítio de ligação do substrato, que corresponde ao sítio ativo daquelas enzimas.

Esse sítio de ligação como o definido por Schechter e Berger (1967) (Figura 3), pode ser dividido em subsítios, sendo que cada um interage com um único resíduo de aminoácido do substrato. As propriedades de cada subsítio determinam quais resíduos de aminoácidos do substrato podem se ligar, providenciando a base da especificidade do subsítio. A natureza das interações pode ser testada por mutagênese sítio-dirigida e modificação química, porém é um pré-requisito que os subsítios sejam mapeados cuidadosamente (Breddam *et al.*, 1992).

A especificidade de quimotripsina para a hidrólise de ligações peptídicas formados pelo grupo carboxílico de Tyr, Phe, Trp e Leu é reconhecida há algum tempo (Bergmann e Fruton, 1941; Neurath, 1957; Desnuelle, 1960).

A digestão quimotríptica de muitos peptídeos e proteínas tem sido examinado em detalhes. Além da hidrólise em aminoácidos aromáticos e leucina, também tem sido encontrados hidrólise em ligações formadas por asparagina, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, treonina e valina. Clivagem nesses sítios não são extensas e dependem fortemente do resíduo na posição P1' (Hill, 1965).

As interações entre os subsítios Sn...S2, S1, S1', S2',...Sn do sítio ativo da enzima e os resíduos de aminoácidos Pn...P2, P1, P1', P2',...Pn do substrato asseguram o alinhamento preciso do substrato na tríade catalítica (Barrett *et al.*, 2004).

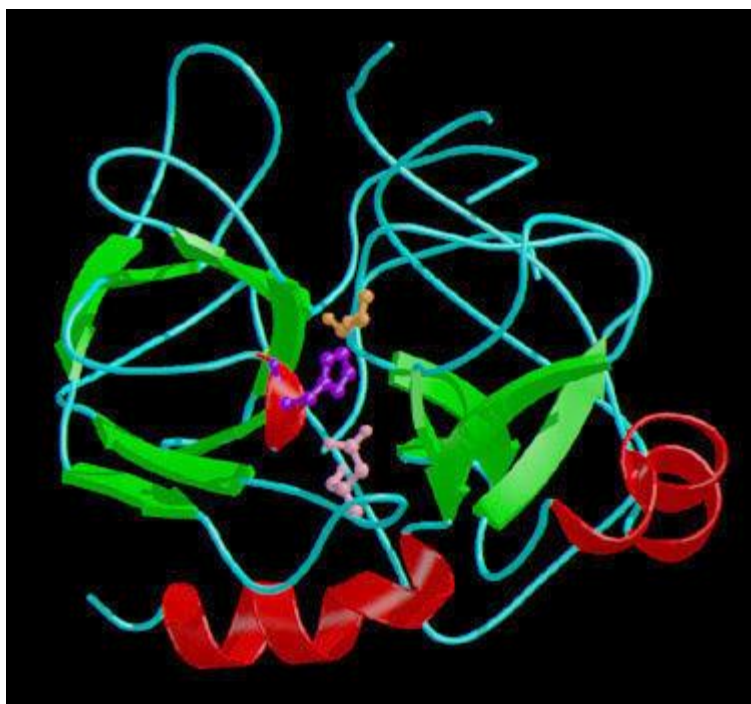


Figura 2: Modelo da estrutura tridimensional da quimotripsina bovina. Os resíduos catalíticos estão mostrados em forma de bola e bastão, His57 em roxo, Asp102 rosa e Ser195 laranja. (<http://merops.sanger.ac.uk/>)

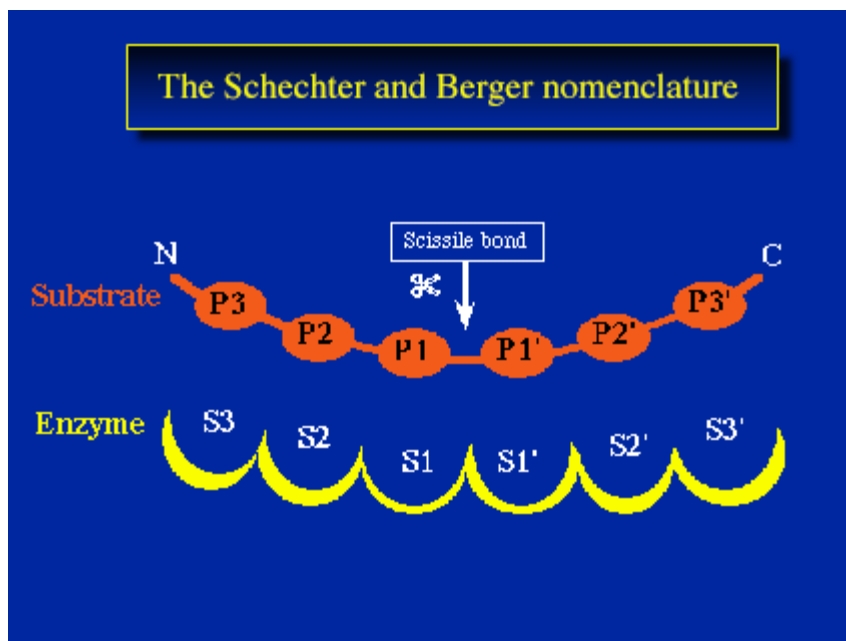


Figura 3: Nomenclatura de Schechter e Berger (1967).
(<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/des.html>)

Diferente de tripsina cuja especificidade por resíduos positivamente carregados é explicada pela presença do resíduo de Asp 189 na base do sítio S1, na quimotripsina este resíduo é substituído por uma serina o que cria um sítio mais hidrofóbico levando a especificidade desta enzima por Trp/Tyr/Phe (Steitz *et al.*, 1969).

Porém, estudos de mutação sítio dirigida demonstraram que este modelo não está propriamente correto, a troca do resíduo Asp 189 por uma Ser não converte a tripsina em quimotripsina, mas sim em uma proteinase pouco eficiente e não específica (Graf *et al.*, 1988).

Quimotripsinas hidrolisam preferencialmente substrato que apresentam Arg/Lys em P1'. Esta preferência é atribuída a interações eletrostáticas com os resíduos Asp 35 e Asp 64 (Schellenberger *et al.*, 1994).

1.4. Quimotripsinas de insetos

Quimotripsinas clivam preferencialmente as cadeias peptídicas da porção carboxílica de aminoácidos aromáticos, diferente das tripsinas que clivam cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos básicos como lisina ou arginina (Barrett *et al.*, 2004).

Quimotripsinas de insetos possuem peso molecular entre 20-30 kDa como quimotripsina de *Locusta migratoria* com peso de 24 kDa (Sakal *et al.*, 1988), *Vespa cabro* 25 kDa (Jany *et al.*, 1978b), *Manduca sexta* 24 kDa (Peterson *et al.*, 1995). Possuem pH ótimo entre 8-9, são freqüentemente instáveis em pH ácido e são fortemente inibidas pelo inibidor tripsina de soja (SBTI) (Terra e Ferreira, 1994).

Ao todo estão descritas 63 sequências completas registradas no GenBank correspondendo a 22 espécies. Todas as seqüências contêm um peptídeo sinal, um peptídeo de ativação, a tríade catalítica característica das serinas endopeptidases, três pares de cisteínas, porção N-terminal conservada e Ser/Gly/Tyr na posição 189 que confere especificidade de quimotripsina.

Lee e Anstee (1995) demonstraram que as quimotripsinas de insetos apresentam um sítio estendido, hidrolisando preferencialmente substratos peptídicos com um número de resíduos igual ou superior a três, no entanto, quimotripsinas de mamíferos hidrolisam substratos como B-Y-pNa, apesar de também apresentarem sítio estendido.

Na literatura várias são as descrições da falta de modificação da quimotripsinas de insetos por TPCK: *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 são pertencentes à família Noctuidae da ordem Lepidoptera e essa falta de modificação foi atribuída ao fato de este modificador apresentar um único resíduo de aminoácido, que não seria suficiente para interagir com a quimotripsina desses insetos. Contudo, as quimotripsinas de *Locusta migratoria* (Sakal *et al.*, 1988) bem como a de *Solenopsis invicta* (Withworth *et al.*, 1998) foram modificadas por TPCK.

A análise das seqüências de quimotripsinas de insetos foram agrupadas por NJ (“Neighbor Joining”) (Lopes, 2004) e o resultado indica uma tendência de agrupamentos dessas enzimas de acordo com cada ordem de inseto, seguindo a morfologia baseada em caracteres morfológicos (Wheller *et al.*, 2001). Nessa análise, 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. Ao contrário dos Noctuidae, os insetos da família Pyralidae, *Plodia interpunctella* e *Sciporhaga incertulas* encontram-se separados por dois ramos independentes. Todos os insetos da família Noctuidae e Sphingidae, cuja seqüências foram analisadas, bem como *Plodia interpunctella*, são insetos polívoros os quais alimentam-se de pelo menos 20 famílias diferentes de plantas (<http://www.nhm.ac.uk>). No entanto, *Sciporhaga incertulas*, assim como *Diatraea saccharalis* (Pyralidae) são insetos que se alimentam de gramíneas (Lopes, 2004).

Devido a um alto processo autolítico, quimotripsinas de insetos podem ser purificadas por cromatografia em coluna DEAE-celulose seguida de uma cromatografia de afinidade em coluna fenilbutilamina-agarose, como a quimotripsina de *Locusta migratoria* (Sakal *et al.*, 1988) ou também por cromatografia em coluna benzamida-sefaroze seguida de uma coluna DEAE-sefaroze (Lam *et al.*, 1999). Quimotripsina de *Manduca sexta* pode ser purificada através de duas cromatografias de afinidade seguidas: uma em coluna benzamida-sefaroze e uma outra coluna de afinidade D-tirosina (Peterson *et al.*, 1995).

Apesar de sua importância fisiológica, as quimotripsinas de insetos são enzimas menos caracterizadas quanto as suas atividades do que as tripsinas e algumas foram purificadas como a quimotripsina 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 migratória* (Sakal *et al.*, 1995); algumas foram

clonadas como *Rhizoperta dominica* (Zhu e Baker, 2000), *Plodia interpunctilla* (Zhu *et al.*, 1997), *Helicoverpa zea* e *Agrotis ipsilon* (Mazundar-Leighton e Broadway, 2001).

No entanto, apenas um trabalho resolve a estrutura 3D. Botos *et al* (2000) purificaram a quimotripsina a partir de larvas de *Solenopsis invicta* com peso molecular de 24 kDa. A análise da seqüência de aminoácidos mostrou que ela tem 51% de identidade com a quimotripsina de vespa e 36% de identidade com a α -quimotripsina bovina. Comparado com outras quimotripsinas, há a presença da Gly 189, no fundo do subsítio S1, o resíduo 189 está em uma posição determinada que define a ligação do substrato e a especificidade. Além do resíduo 189, o subsítio S1 está circundado pelos resíduos Val213, Gly216, Asp226, Ala190 e Tyr228 nos quais definem o tamanho e forma da entrada da bolsa S1. Um exame do sítio de ligação (P4-P4') revela uma rede de cargas positivas em diferentes lócus devido a substituições por Lys-Arg-His nas posições 40, 41 e 142 respectivamente e uma carga negativa introduzida nos sítios S5-6 pelo Glu224.

Porém, sobre as quimotripsinas de insetos, praticamente não existe informação a respeito da especificidade dos diferentes subsítios dessas enzimas. A especificidade da quimotripsina de *Manduca sexta* foi determinada através da clivagem de glucagon e cadeia β de insulina, sendo que os pontos de clivagem desses substratos pela quimotripsina purificada desse inseto foram determinados através da análise dos fragmentos gerados por HPLC. A quimotripsina de *Manduca sexta*, cliva preferencialmente ligações peptídicas do lado carboxílico de aminoácidos como Tyr, Phe, Trp, Leu, His, Thr e Gly (Peterson *et al*, 1995).

1.5. Substratos para caracterização dos subsítios das quimotripsinas de insetos

O desenvolvimento dos substratos sintéticos para as enzimas proteolíticas, onde uma ligação peptídica é clivada, permite estudos bastante precisos sobre a especificidade de várias peptidases (Bergmann e Fruton, 1941; Bergmann, 1942). O conhecimento da especificidade das enzimas é muito importante para compreendermos sua função biológica, sendo isto possível graças aos estudos cristalográficos e cinéticos.

A vantagem em se utilizar substratos sintéticos em relação aos substratos naturais, baseia-se no fato de que é possível variar os aminoácidos de maneira específica, substituindo sistematicamente cada aminoácido e estudando o efeito dessa substituição no mecanismo de catálise.

O conhecimento estrutural dos sítios catalíticos, utilizando os modelos estruturais e as seqüências peptídicas baseadas em inibidores protéicos naturais, podem igualmente dar

diretrizes na escolha dos aminoácidos favoráveis para a interação enzima-substrato (ou enzima inibidor) (Cohen *et al.*, 1991; Gauthier *et al.*, 1993).

A medida da atividade enzimática foi bastante simplificada com o desenvolvimento dos substratos cromogênicos (Fukal e Kasafirek, 1988). Nesse tipo de substratos, a extremidade carboxi-terminal é marcada com um agente cromóforo, grupo químico que absorve luz em um comprimento de onda específico. A detecção da hidrólise enzimática é possível pela clivagem da ligação amida e liberação do agente cromogênico detectável por fotômetros no comprimento de onda de absorção.

Os substratos fluorogênicos foram desenvolvidos a partir do conceito do substrato cromogênico (Zimmerman *et al.*, 1976, 1977; Alves *et al.*, 1996), utilizando uma molécula que apresenta um deslocamento nos comprimentos de onda máximos de emissão e excitação, ao se ligar pelo grupo amino à alfa-carboxila da seqüência peptídica. Os dois grupos fluorogênicos mais utilizados são os derivados do AFC e MCA. Após a clivagem, os substratos apresentam diferenças espectrais entre os substrato intacto e o produto de hidrólise, que pode ser então acompanhada no fluorímetro através da liberação do agente fluoróforo.

No início da década de 90, substratos com supressão interna de fluorescência foram desenvolvidos para estudar diferentes peptidases (Chagas *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1992). A transferência de energia por ressonância, também conhecida como transferência de energia não-radioativa, é um mecanismo de supressão no qual um fluoróforo excitado (o doador) transfere sua energia de excitação para um cromóforo aceptor. Esta transferência não é mediada por contato direto entre cromóforos e fluoróforos. A teoria da transferência de energia por ressonância foi formulada por Foster (1948), que demonstrou que a eficiência desta transferência dependia diretamente da superposição do espectro de emissão do doador com o espectro do receptor. Esses substratos possuem suas extremidades amino e carboxi-terminais bloqueadas por um composto fluorogênico e um agente aceptor.

Os substratos peptídicos com o amino grupo N-terminal bloqueado pelo radical Abz e o grupo C-terminal pelo grupo supressor de fluorescência EDDnp, são substratos que permitem o monitoramento direta da velocidade de hidrólise, aumentando a capacidade de detecção e identificação dos fragmentos gerados pela ação enzimática. A Figura 4 mostra o esquema de funcionamento destes compostos.

Por ser um ensaio fluorimétrico, a sensibilidade do método de detecção é maior e permite que utilizemos concentrações de enzimas de 100 a 1000 vezes menores, quando comparado aos métodos fotométricos utilizando pNAs. Uma vantagem em relação aos substratos cumarínicos, cujo monitoramento da hidrólise é feito através da leitura de

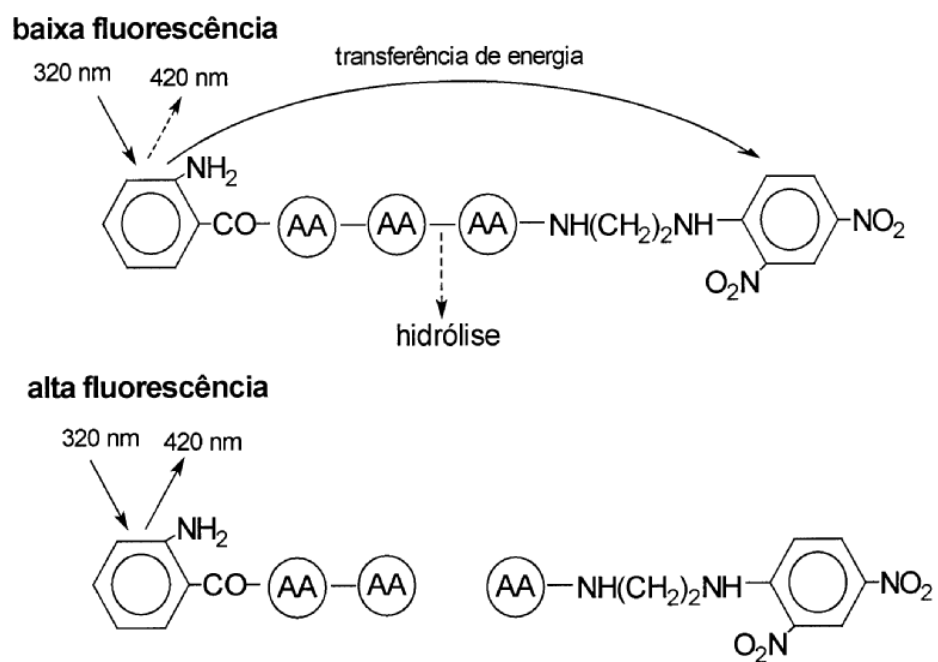
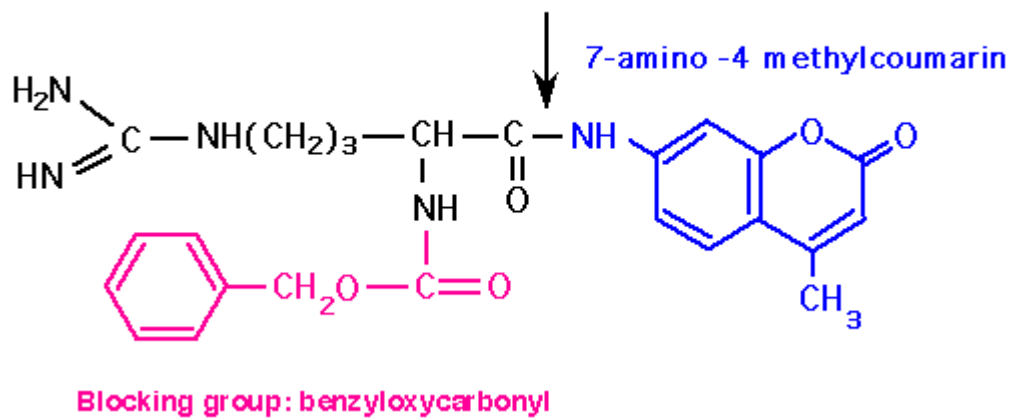


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de funcionamento de substratos de fluorescência apagada. Na extremidade N-terminal está o grupo fluorescente (Abz) e na extremidade C-terminal o apagador (EDDnp).

fluorescência da cumarína livre; trata-se de uma única ligação clivada monitorada sendo que a ligação amida faz-se entre o aminoácido da posição P1 e a cumarina (Figura 5); é que os substratos com supressão interna de fluorescência podem ser hidrolisados em qualquer ponto da seqüência peptídica, permitindo estudar as posições Pn e Pn' dado que os substratos com supressão interna de fluorescência podem ser hidrolisados em qualquer ponto da seqüência peptídica enquanto os substratos cumarínicos só permitem estudos das posições Pn (Alves, 2001).

Z-Arg-MCA



Abz-EDDnp substrate

Abz:
o.aminobenzoyl

EDDnp:
éthylène diamine 2, 4 dinitrophényl

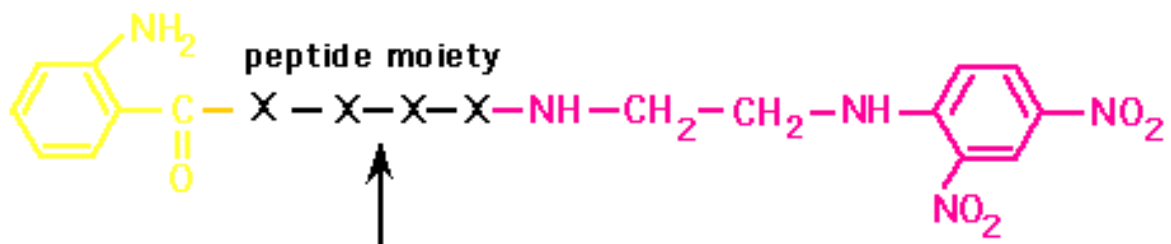


Figura 5: Comparação entre os substratos cumarínicos e os de fluorescência apagada internamente. A seta indica a ligação a ser clivada. (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/fluoro.html>).

2.0. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo a purificação e das quimotripsinas digestivas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* e a caracterização dos subsítios de seus sítios ativos, em relação à especificidade pelo substrato quanto o seu papel na ligação do substrato e ao estado de transição.

3. Materiais e Métodos

3.1. Insetos

3.1.1. *Periplaneta americana*

Machos adultos de *Periplaneta americana* (barata: Dictyoptera) foram adquiridos do setor de Nutrição da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e adaptados por duas semanas a uma dieta de aveia em flocos (Quaker). Água foi fornecida através de algodão umedecido acondicionado em placa de Petri.

Para a obtenção do intestino total, adultos machos de *Periplaneta americana* foram transferidos para uma caixa de isopor na qual foi adicionada CO₂, e depois de imobilizados foram transferidos para um caixa de isopor com gelo. A dissecação do tubo digestivo foi realizada em placa de parafina em solução de NaCl 220 mM gelada sob estereomicroscópio, O intestino foi removido e apenas o intestino anterior e médio foram utilizados para o preparo das amostras.

3.1.2. *Diatraea saccharalis*

Larvas de *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar; Lepidoptera: Pyralidae) criadas com dieta artificial (Parra e Mihsfeldt, 1992) foram fornecidas pelo Prof ° Dr °. José R.P. Parra do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Apenas os insetos no último estágio larval com o tubo digestivo cheio de alimento foram utilizados.

As larvas de *Diatraea saccharalis* foram imobilizados em gelo e dissecadas em solução de NaCl 125 mM gelada sob estereomicroscópio. O intestino médio foi subdividido em conteúdo luminal e epitélio ventricular, porém apenas o conteúdo luminal foi utilizado como fonte de quimotripsina.

3.1.3. *Tenebrio molitor*

Larvas de *Tenebrio molitor* (besouro da farinha, Coleoptera: Tenebrionidae) são mantidas em cultura em nosso laboratório em dieta de farelo de trigo, a uma temperatura de

25° C e umidade relativa do ar de 70-75%. Foram utilizadas larvas no último estágio larval com o tubo digestivo cheio de alimento.

Os insetos foram imobilizados em gelo e o intestino médio foi retirado sob estereomicroscópio em solução gelada de NaCl 343 mM. O intestino médio foi subdividido em ventrículo anterior, ventrículo médio e ventrículo posterior, sendo que, apenas o ventrículo posterior foi utilizado como fonte de quimotripsina.

3.2. Preparo das amostras

3.2.1. Periplaneta americana, Tenebrio molitor e Diatraea saccharalis

Os tubos digestivos foram homogeneizados em água bi-destilada gelada utilizando homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado resultante foi centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para remoção do excesso de gorduras. Os homogeneizados foram mantidos a -20°C até o uso.

3.3. Ensaio enzimático e determinação de proteína

A determinação fluorimétrica da atividade de quimotripsina nas preparações dos homogeneizados e nos eluidos das cromatografias foi realizada com a utilização de substrato cumarínico: Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amida-4-metil-cumarina (Suc-AAPF-MCA-Calbiochem Biochemicals).

A determinação da atividade de tripsina contaminante nos eluidos das cromatografias foi realizada utilizando o substrato Z-Gly-Gly-Arg-7-amida-4-metil-cumarina (Z-GGR-MCA-Sigma). Esses substratos foram preparados na concentração de 1 mM em dimetilsulfóxido (DMSO). As reações foram preparadas em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 e 10 µL de substrato na concentração de 1mM foi adicionado e 10 µL de enzima foi adicionada. As reações para todas as metodologias foram interrompidas com 200 µL ácido acético 30%. A detecção dos produtos de hidrólise foi realizada em espectrofluorímetro (F2000-Hitachi), utilizando comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para detecção da emissão de fluorescência (Alves *et al.*, 1996). A determinação de proteína das amostras foi realizado pelo método de Smith *et al.*, (1985) e modificado por Morton e Evans (1992) ou pelo método de Krystal *et al.*, (1995), utilizando ovoalbumina como padrão.

3.4. Purificação parcial da quimotripsina digestiva de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

A quimotripsina dos diferentes insetos foi parcialmente purificada a partir do filtrado da porção solúvel do homogeneizado dos diferentes insetos. Posteriormente, 1 mL deste material foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de fenilbutilamina-agarose (Figuras 6, 7 e 8). Essa coluna foi acoplada a uma bomba peristáltica, equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM por 45 minutos em um fluxo de aproximadamente 1,2 mL por minuto. Após o equilíbrio da coluna, 1 mL do homogeneizado foi aplicado e deixado em repouso por 15 minutos para que a amostra interagisse com a coluna e após esse tempo o fluxo foi novamente ligado e 20 frações de 1,2 mL cada foram coletadas, exceção foi para o homogeneizado de *Periplaneta americana* onde frações de 3,6 mL cada foram coletadas. A eluição da atividade de quimotripsina foi realizada utilizando tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 NaCl 200 mM contendo 0,1 M de fenilbutilamina em um fluxo de aproximadamente 1,2 mL por minuto e 25 frações de 1,2 mL cada foram coletadas. As frações foram ensaiadas com Z-GGR-MCA para verificar o padrão de eluição de tripsina. As frações contendo atividade de quimotripsina (determinadas com a utilização de Suc-AAPF-MCA como substrato) foram reunidas, fervidas, dialisadas durante 10 horas em água milli Q por pelo menos 100 volumes, concentradas por centrifugação a vácuo e submetidas imediatamente a SDS-PAGE e coloração por prata.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, uma alíquota do reunido ativo foi passado em coluna Hitrap desalting para a remoção do inibidor e troca de tampão.

3.5. Diálise em microtubos

Um volume de 500 uL da amostra de interesse foi colocada em microtubo de 1,5 mL no qual foi retirada a tampa. A abertura do microtubo foi selada com um pedaço de membrana de diálise de 3x3 cm previamente equilibrada por uma hora em água Milli-Q (Millipore, EUA) e presa com um anel de silicone. O microtubo é invertido (com a amostra em contato direto com a membrana) e acoplado em uma bóia. A diálise foi realizada contra pelo menos 100 volumes de água Milli-Q e deixadas por pelo menos 10 horas sob agitação.

3.6. Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS 0,1% foi realizada segundo Laemmli (1970), utilizando-se o equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA). As amostras das diversas frações obtidas após a marcha de purificação foram misturadas ao tampão de amostra (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 200 V a temperatura ambiente. Para a coloração dos géis após a eletroforese foi utilizada a metodologia de coloração por prata (Blum *et al.*, 1987).

3.7. Determinação dos parâmetros cinéticos

3.7.1. Determinação dos parâmetros cinéticos com substratos de fluorescência direta

Peptídeos derivados de cumarina específicos para a determinação da atividade de quimotripsina foram adquiridos da Sigma e possuem a seguinte seqüência N-Succinil-Leu-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (Suc-LY-MCA), N-Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-metilcumarina (Suc-LLVY-MCA) e N-Succinil-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-metilcumarina (Suc-AAF-MCA), o substrato Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-amido-4-metilcumarina (Suc-AAPF-MCA) foi adquirido da Calbiochem. Esses peptídeos foram ensaiados em espectrofluorímetro termostaticado (Hitachi F-2000) á 30 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. A variação de fluorescência foi monitorada continuamente em $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm. A concentração de enzima para a determinação da velocidade inicial corresponde à quantidade que hidrolisasse menos que 5% do substrato adicionado.

A concentração de substrato para a determinação dos parâmetros cinéticos ficou entre dois valores acima e abaixo do valor de K_m obtido. Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} foram calculados no programa *Grafitt 5* (Leatherbarrow, 2001-Erithacus Software Ltd.).

Os valores de pKa foram determinados através dos dados plotados nos gráficos de % atividade versus pH através do ajuste feito pelo programa *Grafitt 5* (Leatherbarrow, 2001-Erithacus Software Ltd.).

3.7.2. Determinação da especificidade dos subsítios S1', S1, S2 e S3 da quimotripsina de diferentes insetos com substratos de fluorescência apagada

Substratos baseados no princípio de apagamento da fluorescência intramolecular foram sintetizados pela Prof^a Maria A. Juliano (Infar-UNIFESP) através do método descrito por Hirata *et al.* 1994. Soluções estoques dos peptídeos foram preparados em DMSO e as concentrações foram medidas espectrofotometricamente utilizando o coeficiente de extinção molar de $17,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ do composto Abz a 365 nm.

Os substratos para a determinação da especificidade do subsítio S1 foram sintetizados com a seguinte seqüência Abz-AGG**X**GAGQ-EDDnp, sendo X, o aminoácido variante na posição P1, Tyr, Phe ou Leu. Os substratos para a determinação da especificidade dos subsítios S1', S2 e S3 foram sintetizados com a seguinte seqüência Abz-AXX**F**XAQ-EDDnp, sendo X um dos aminoácidos naturais nas posições P1', P2 e P3.

Esses peptídeos foram ensaiados em espectrofluorímetro termostatizado (Hitachi F-2000) à 30 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. A mudança de fluorescência foi monitorada continuamente em $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$. A concentração de enzima para a determinação da velocidade inicial foi escolhida em uma quantidade que hidrolisasse menos que 5% da quantia de substrato adicionado.

A concentração de substrato para a determinação dos parâmetros cinéticos ficou entre dois valores acima e abaixo do valor de K_m obtido.

O efeito do apagamento intermolecular em altas concentrações de substrato (acima de 10 μM) foi corrigida pela equação empírica descrita por Liu *et al.* (1999):

$$\text{Corr\%} = f_{\text{EDDnp}} (\text{uma concentração conhecida de substrato}) / f_{\text{EDDnp}} (\text{na ausência de substrato})$$

Onde f = fluorescência.

Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} foram calculados através de regressão não-linear no programa *GrafIt 5* (Leatherbarrow, 2001-Erithacus Software Ltd.). Os fragmentos resultantes da hidrólise desses peptídeos foram isolados por HPLC em coluna Ultrasphere C-18 (5 μM , 4.6 mm x 150 mm) (Figura 9) e os pontos de clivagem foram identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF usando um Tof-Spec-E (Micromass, Manchester, UK).

3.8. Determinação da hidrofobicidade dos subsítios das quimotripsinas parcialmente purificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

A determinação do índice de hidrofobicidade de cada subsítio (H) da quimotripsina isolada dos insetos *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* caracterizados foi realizada Lopes *et al.* (2005) utilizando a seguinte equação:

$$H = \sum n \{ [(k_{cat} x / K_m x) / A] \cdot HP_x \}$$

onde x é qualquer resíduo de aminoácido que ocupa o subsítio estudado; A é a soma das razões k_{cat}/K_m calculada para cada x; HP_x é o índice de hidropaticidade (Kyte and Doolittle, 1982) para x.

3.9. Titulação das quimotripsinas parcialmente purificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com SBTI

Uma solução estoque de inibidor de soja SBTI 100 nM em água milli Q foi submetida a uma série de diluições em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Para cada diluição uma alíquota de enzima foi adicionada e levada para uma cubeta de quartzo na qual foi acoplada em espectrofluorímetro termostaticado (Hitachi F-2000) á 30 °C e pré incubada por 5 minutos. Após a pré incubação, uma alíquota de substrato Suc-AAPF-MCA de volume e concentração conhecida foi adicionada para que a solução de reação ficasse em concentração de substrato pelo menos 10 vezes acima do K_m , a variação de fluorescência foi monitorada continuamente em $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm. Os dados de concentração de Et (enzima total) e o valor de K_D foi determinado no programa *Grafit 5* (Leatherbarrow, 2001, Erithacus Software Ltd.) .

3.10. Determinação da energia de ativação total livre (ΔG^\ddagger_T) e energia livre de ligação (ΔG_s)

Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat}/K_m foram usados para calcular a energia livre de ligação e a energia de ativação total livre de acordo com as seguintes equações:

$$\Delta G_s = - RT \ln 1 / K_m$$

$$\Delta G^{\ddagger}_T = -RT \ln (k_{cat}/K_m) + RT \ln (K_B T/h)$$

onde $T = 303 \text{ K}$, R é a constante dos gases, K_B é a constante de Boltzman e h é a constante de Planck.

Os valores de ΔG^{\ddagger}_T e ΔG_s determinados foram plotados em um gráfico (Excel, Microsoft) de ΔG^{\ddagger}_T versus ΔG_s e uma reta foi obtida por regressão linear.

O valor da inclinação (n) indica qual é o papel de cada subsítio: favorecimento da ligação do substrato ($n < 1$) ou de ligação do estado de transição ($n > 1$) (Marana et al., 2002).

3.11. Inativação térmica da quimotripsina parcialmente purificada de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

Um volume do reunido ativo da marcha da purificação em coluna fenilbutilamina-agarose (item 3.4) da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* passado em coluna Hitrap desalting para remoção do inibidor e troca de tampão foi incubado à 60°C (*Periplaneta americana*) ou 65°C (*Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*). Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 5 ou 10 minutos e atividade determinada contra substrato fluorimétrico para quimotripsina (Suc-AAPF-MCA).

O mesmo procedimento foi realizado para verificar a atividade de tripsina contaminante com o substrato Z-GGR-MCA.

Os valores da % atividade quimotriptica remanescente foram plotados em gráfico semilog versus tempo, com auxílio do programa Excel (Microsoft) .

3.12. Modificação química da quimotripsina parcialmente purificada de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* na presença de TPCK

As frações ativas da cromatografia em coluna fenilbutilamina após eluição em coluna Hitrap desalting (item 2.4.) foram reunidas. O reunido ativo foi adicionado na diluição 1:1 com TPCK 2mM (final 1 mM) em DMSO. Esta mistura foi levada à banho 30°C e alíquotas em diferentes intervalos de tempo foram retiradas e ensaiadas com Suc-AAPF-MCA.

3.13. Determinação do efeito do pH sobre a atividade das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

Para a determinação do efeito do pH sobre a atividade da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* um tampão com 4 componentes foi utilizado: 25 mM Mes, 25 mM glicina, 25 mM ácido acético e 75 mM de Tris. O tampão foi titulado até o pH desejado com HCl 6N ou NaOH 2N e um volume do tampão foi retirado para o ensaio a cada valor de pH desejado (Polgár, 1999). Todos os ensaios foram realizados em espectrofluorímetro termostaticado à 30 °C (F-2000 Hitachi) e a quantidade de substrato Suc-AAPF-MCA foi adicionada para que a reação ocorresse pelo menos 10 vezes acima do valor de K_m . A variação da fluorescência foi monitorada $\lambda_{ex} = 380$ nm e $\lambda_{em} = 460$ nm. Os dados de % atividade versus pH foram plotados no programa *Grafit 5* (Leatherbarrow, 2001, Erithacus Software Ltd.).

4. Resultados

4.1. Purificação parcial das quimotripsinas digestivas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

Devido a um alto processo autolítico, as quimotripsinas dos insetos estudados foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna fenilbutilamina-agarose (Figuras 6, 7 e 8).

Amostra das frações solúveis intestinais de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* (item 3.2.1) foram submetidas a uma cromatografia de afinidade em coluna fenilbutilamina-agarose. O eluído ativo sobre Suc-AAPF-MCA foi reunido e aplicado à coluna Hitrap desalting (Pharmacia) para retirada do inibidor e troca de tampão. Todas as caracterizações foram realizadas a partir deste material.

Mesmo que a cromatografia de afinidade em coluna fenilbutilamina-agarose tenha se mostrado um método eficiente para a purificação da quimotripsina, há a presença constante de uma atividade residual de tripsina quando esta é quantificada utilizando Z-GGR-MCA como substrato. No entanto, a atividade residual de tripsina encontrada nos eluídos ativos de quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* representam 0,008%, 0,01% e 0,002% das atividades de tripsina medida nas preparações originais destes insetos também utilizando-se Z-GGR-MCA como substrato. Porém, esta atividade residual não afetou as caracterizações cinéticas das quimotripsinas dos três insetos, fato comprovado pelas análises de HPLC (exemplo: Figura 9) onde os peptídeos que possuem Arg ou Lys em qualquer uma das posições variantes não sofreram hidrólise dupla pela presença da atividade tríptica.

O reunido ativo da cromatografia em coluna fenilbutilamina-agarose a partir da porção solúvel do homogeneizado de tubos digestivos de *Periplaneta americana* foi submetido a um SDS-PAGE (Figura 10) resultando na separação de duas bandas de pesos moleculares próximos (31 e 29 kDa), além de outras menores de 14 kDa. O mesmo tipo de resultado foi verificado para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* (Figura 11) com bandas de peso 27 e 24 kDa. A presença dessas bandas poderia estar associada a três fatores importantes:

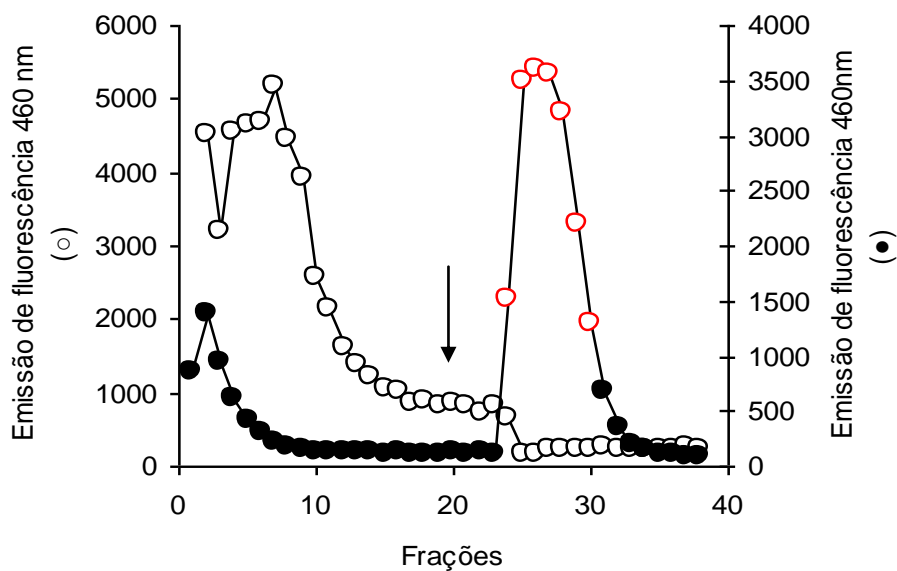


Figura 6: Cromatografia da fração solúvel do intestino médio de *Periplaneta americana* (item 3.4) em coluna fenilbutilamina-agarose, equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM. A seta indica início da eluição com 25 mL de tampão de equilíbrio contendo fenilbutilamina 0,1 M pH 8,0. As frações ativas (sobre Suc-AAPF-MCA) foram reunidas (24-30), fervidas e submetidas a diálise e gel SDS-PAGE. (●), atividade de quimotripsina utilizando Suc-AAPF-MCA como substrato; (○) atividade de tripsina utilizando Z-GGR-MCA como substrato; (◐) frações reunidas.

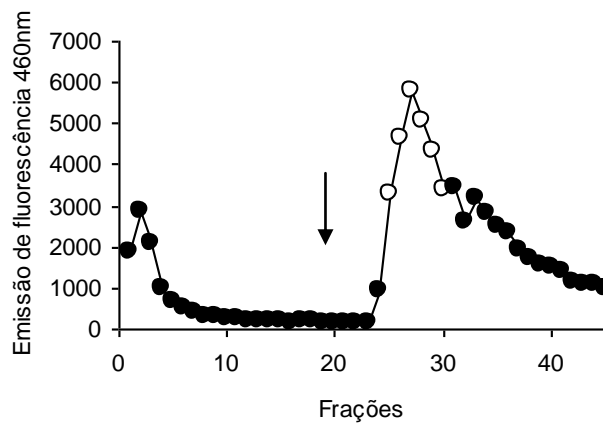


Figura 7: Cromatografia da fração solúvel do intestino médio de *Tenebrio molitor* (item 3.4) em coluna fenilbutilamina-agarose, equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM. A seta indica início da eluição com 25 mL de tampão de equilíbrio contendo fenilbutilamina 0,1 M pH 8,0. As frações ativas (sobre Suc-AAPF-MCA) foram reunidas (25-31), fervidas e submetidas a diálise. (●), atividade de quimotripsina utilizando Suc-AAPF-MCA como substrato; (○) frações reunidas.

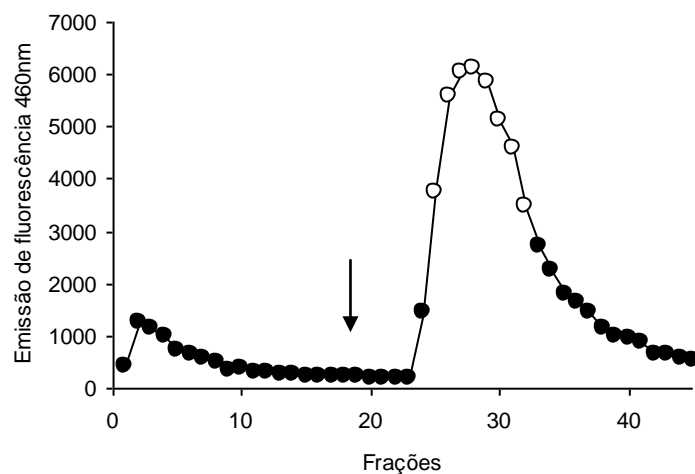


Figura 8: Cromatografia da fração solúvel do intestino médio de *Diatraea saccharalis* (item 3.4) em coluna fenilbutilamina-agarose, equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM. A seta indica início da eluição com 25 mL de tampão de equilíbrio contendo fenilbutilamina 0,1 M pH 8,0. As frações ativas (sobre Suc-AAPF-MCA) foram reunidas (25-32), fervidas e submetidas a diálise. (●), atividade de quimotripsina utilizando Suc-AAPF-MCA como substrato; (○) frações reunidas.

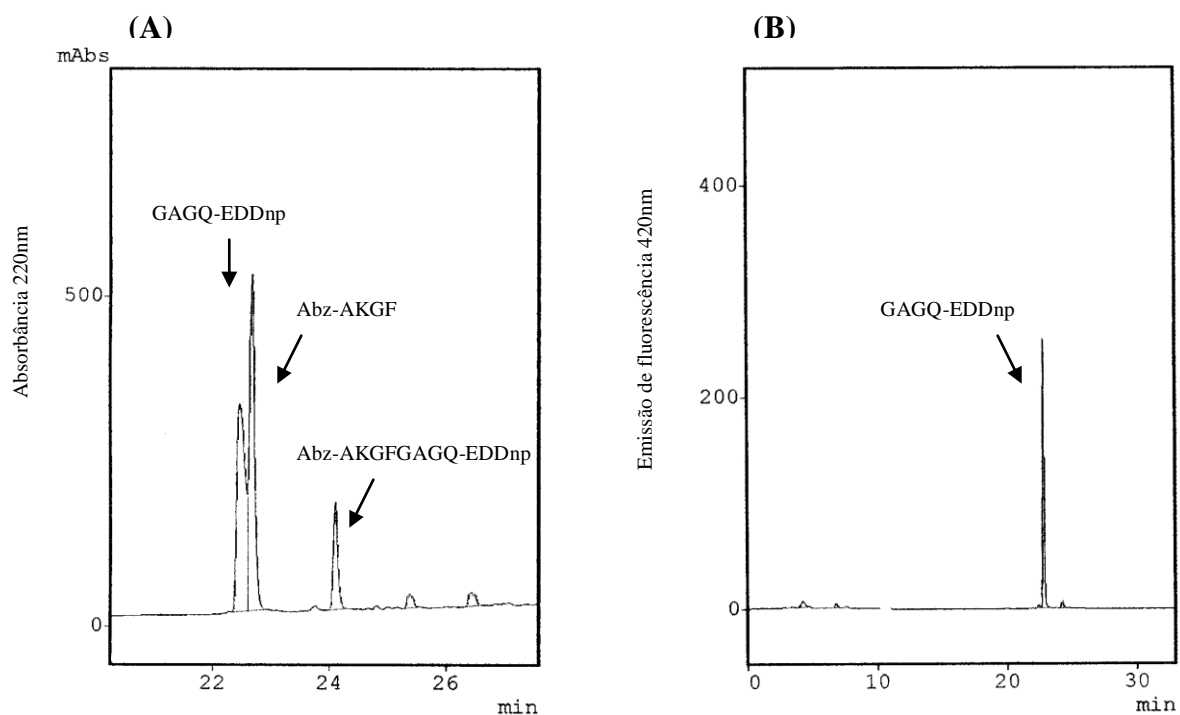


Figura 9: Exemplo de identificação do sítio de clivagem do peptídeo Abz-AKGF↓GAQ-EDDnp pela quimotripsina de *Tenebrio molitor*. A Figura (A) ilustra o perfil da fase reversa em HPLC encontrada após a clivagem do peptídeo, os picos correspondem ao peptídeo íntegro e ao peptídeo hidrolisado após 24 horas de incubação identificadas a 220 nm. A Figura (B) ilustra o perfil da fase reversa em HPLC encontrada após a clivagem do peptídeo, o pico corresponde a porção do peptídeo ligado ao fluoróforo (EDDnp) indicando apenas um sítio de clivagem a $\lambda_{ex} = 320$ nm e $\lambda_{em} = 420$ nm. As figuras acima ilustram o perfil cromatográfico obtido para todos os peptídeos testados.

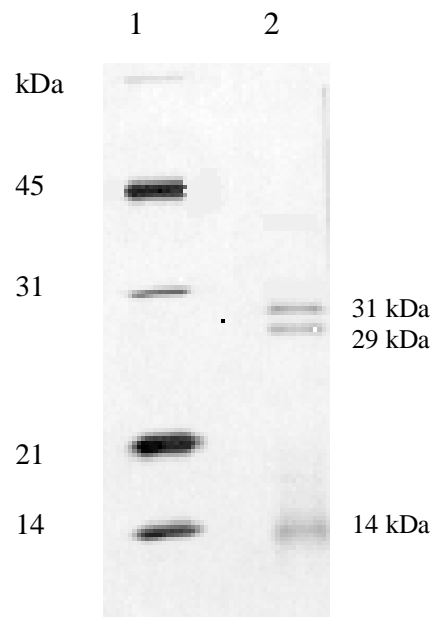


Figura 10: SDS-PAGE da quimotripsina parcialmente purificada de *Periplaneta americana*. Raia 1, marcador de peso molecular; raia 2, reunido ativo (sobre Suc-AAPF-MCA) da cromatografia fenilbutilamina –agarose.

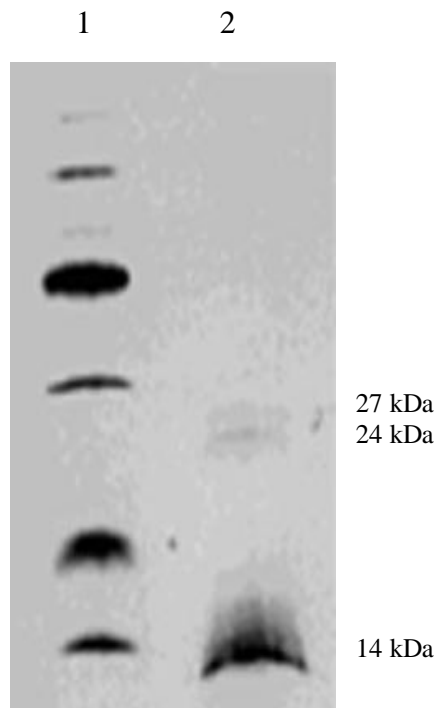


Figura 11: SDS-PAGE da quimotripsina parcialmente purificada de *Tenebrio molitor*. Raia 1, marcador de peso molecular; raia 2, reunido ativo (sobre Suc-AAPF-MCA) da cromatografia fenilbutilamina – agarose.

- presença de mais de uma quimotripsina nas preparações;
- presença de uma tripsina contaminante visto que tripsinas e quimotripsinas possuem pesos moleculares muito próximos;
- resultado de um alto processo autolítico com as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*; o que certamente é verdade para as bandas de pesos em termo de 14 kDa observadas nas Figuras 10 e 11. O SDS-PAGE para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* apresentou uma banda única de 27 kDa (Figura 12).

No entanto, os experimentos de inativação térmica para o eluído ativo de quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentam uma cinética de 1ª ordem por até 3 meias vidas, indicando a presença de uma única enzima com atividade quimotríptica (Figura 13). Os dados de atividade de tripsina indicam que esta proteína deve ser minoritária. No entanto, não está descartada a possibilidade de algumas das bandas 31 ou 29 (Figura 10) e 27 ou 24 (Figura 11) corresponderem a tripsina inativa ou ainda representarem a quimotripsina íntegra mais outra pouco autolisada com atividade não afetada.

4.2. Determinação do efeito do pH sobre a atividade das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

O efeito do pH sobre as atividades de quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* demonstra que estas enzimas apresentam um pH ótimo de 7,5; 8 e acima 10 (Figura 14 A, B e C). Os pKas dos grupos prototrópicos dos complexos enzima-substrato são: *Periplaneta americana*, 5,30 (\pm 0,03) e 9,30 (\pm 0,03); *Tenebrio molitor*, 6,5 (\pm 0,1) e 9,1 (\pm 0,1). Como a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* inativa-se acima de pH 10, não é possível calcular os pKas de seus grupos prototrópicos.

4.3. Titulação e determinação da constante de dissociação aparente da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com inibidor de soja SBTI

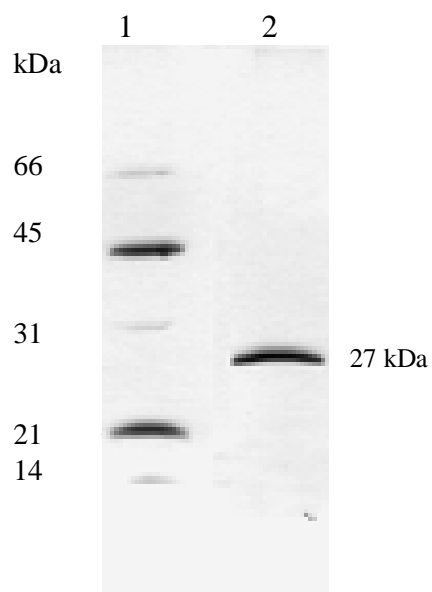


Figura 12: SDS-PAGE da quimotripsina purificada de *Diatraea saccharalis*. Raia 1, marcador de peso molecular; raia 2, reunido ativo (sobre Suc-AAPF-MCA) da cromatografia fenilbutilamina – agarose.

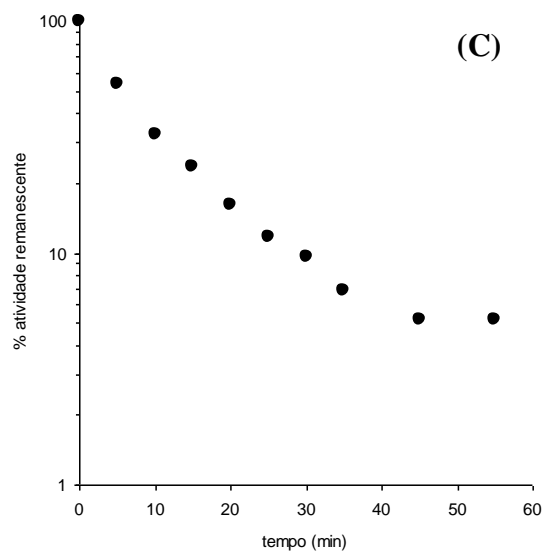
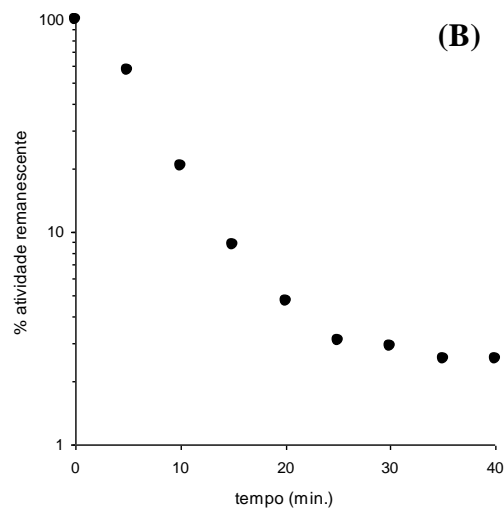
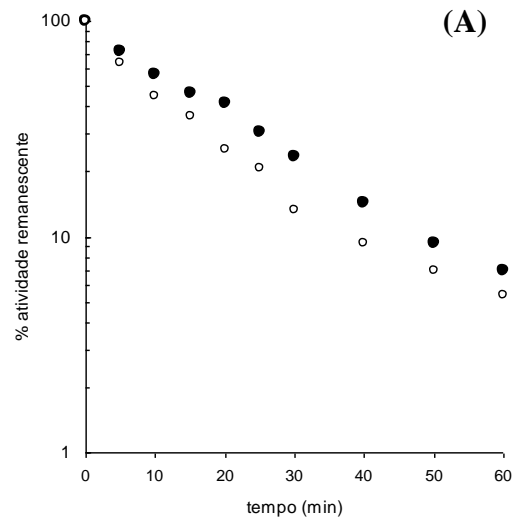


Figura 13: Inativação térmica da quimotripsina (●) e da tripsina contaminante (○) de *Periplaneta americana* à 60 °C (A), *Tenebrio molitor* à 55 °C (B) e *Diatraea saccharalis* à 65 °C (C) .

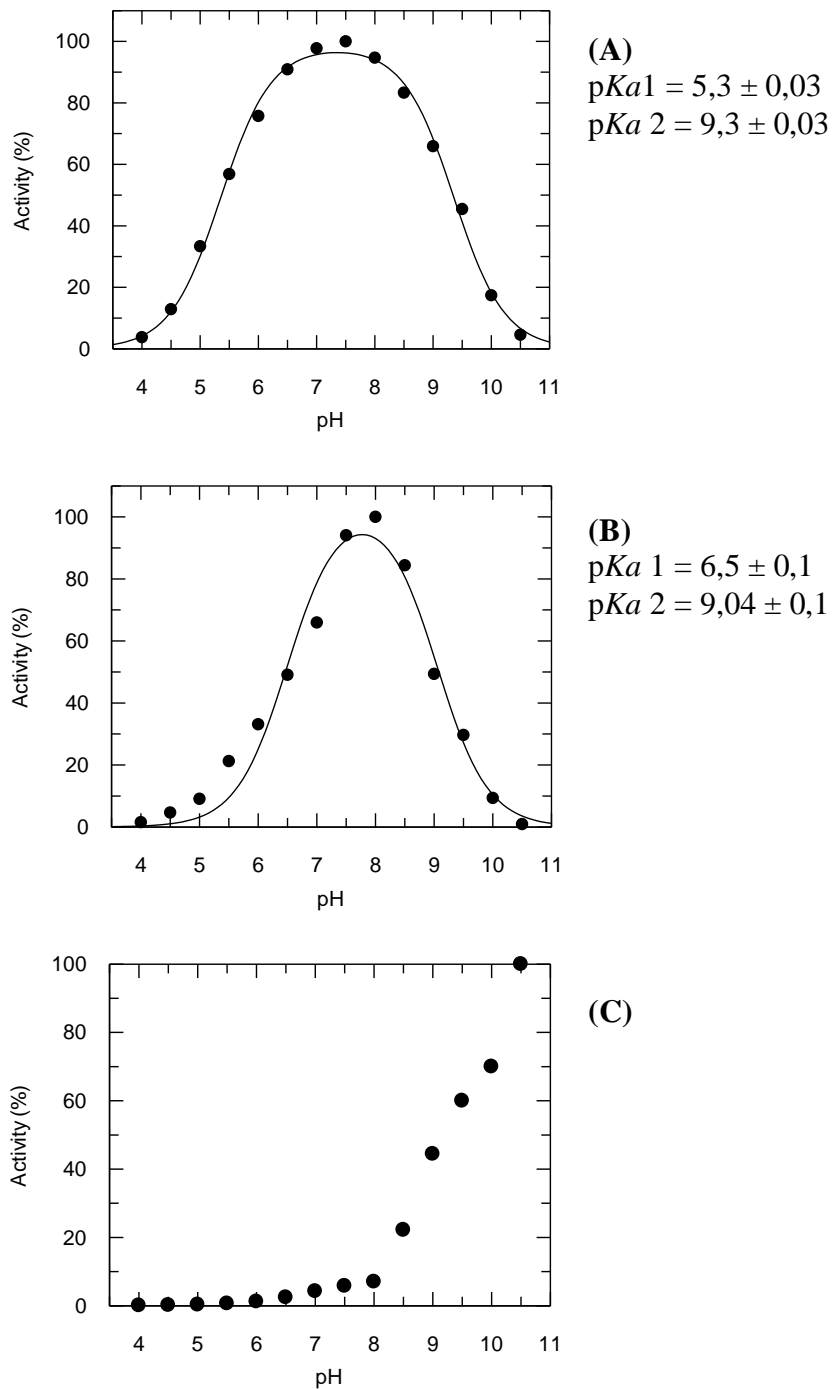


Figura 14: Efeito do pH sobre a atividade de quimotripsina de (A) *Periplaneta americana*, (B) *Tenebrio molitor* e (C) *Diatraea saccharalis*, utilizando Suc-AAPF-MCA como substrato. Detalhes estão descritos em materiais e métodos item 3.14

O inibidor da tripsina de soja do tipo Kunitz, SBTI, é um inibidor do tipo “tight-binding”. Sendo este inibidor de ligação permanente e estequiometria 1:1, é possível calcular a concentração de enzima em cada preparação e também a constante de dissociação aparente K_D enzima-inibidor.

A quimotripsina de *Periplaneta americana* apresenta um $K_D = 2,6$ nM (Figura 15 A), a de *Tenebrio molitor* um $K_D = 2,1$ nM (Figura 15 B) e a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* um $K_D = 0,73$ nM (Figura 15 C), indicando uma diferença marcante da quimotripsina de Lepidoptera em relação aos outros insetos.

A concentração de enzima foi determinada através de regressão linear no programa *Grafit 5* (Leatherbarrow, 2001-Erithacus Software Ltd.), e os valores obtidos foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos k_{cat} e k_{cat}/K_m .

4.4. Modificação da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* por TPCK

Aa três quimotripsinas testadas foram inativadas por TPCK na concentração de 1 mM (Figura 16 A, B e C). A concentração de 2% de DMSO não prejudica a atividade de das três quimotripsinas estudadas como demonstrado nos controles realizados na Figura 16 A, B e C. O k_{obs} de inativação foram *Periplaneta americana*, $53,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; *Tenebrio molitor* $30 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e *Diatraea saccharalis*, $27,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos com substratos fluorogênicos

Inicialmente as quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* foram caracterizadas quanto às suas especificidades em relação a substratos fluorogênicos comerciais derivados de cumarína. Esses substratos foram utilizados para a determinação dos parâmetros cinéticos k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m (Tabela 1).

O melhor substrato hidrolisado pela quimotripsina de *Periplaneta americana* foi Suc-AAF-MCA apresentando maior k_{cat}/K_m . O substrato Suc-AAPF-MCA foi o segundo peptídeo melhor hidrolisado, apesar de apresentar o maior valor de K_m em relação aos

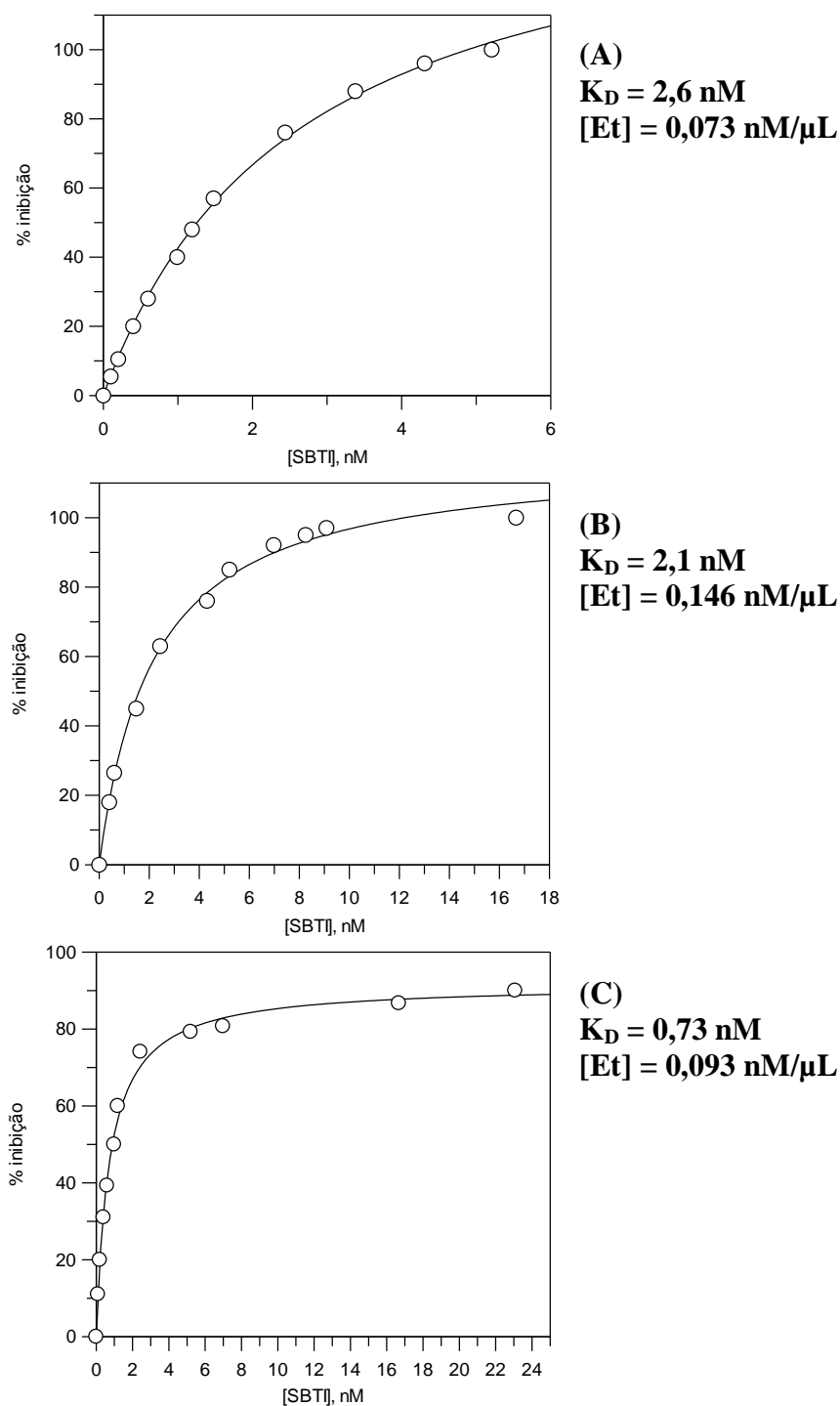


Figura 15: Titulação e determinação da constante de dissociação da quimotripsina de (A) *Periplaneta americana*, (B) *Tenebrio molitor* e (C) *Diatraea saccharalis* em relação ao inibidor de soja SBTI utilizando Suc-AAPF-MCA como substrato. Os dados de concentração de [Et] (enzima total) e o valor de K_D foram determinados no programa *Grafit 5* (Leatherbarrow, 2001-Erithacus Software Ltd.).

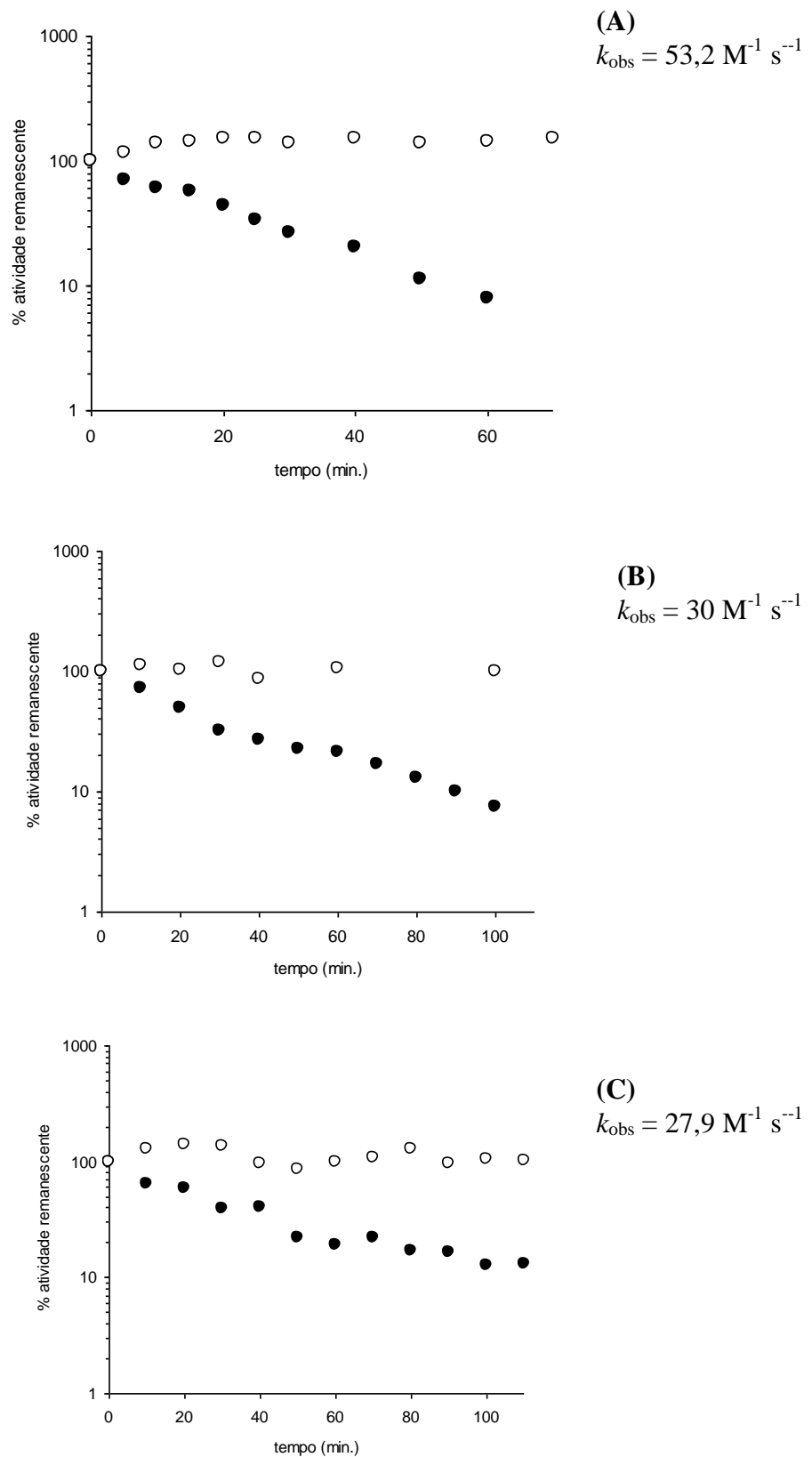


Figura 16: Inativação da quimotripsina de *Periplaneta americana* (A), *Tenebrio molitor* (B) e *Diatraea saccharalis* (C) na presença de 1 mM de TPCK (●) e 2% de DMSO (○).

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da hidrólise dos peptídeos derivados de cumarina pela quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis**

Substrato	<i>Periplaneta americana</i>				<i>Tenebrio molitor</i>				<i>Diatraea saccharalis</i>			
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)
Suc-LY-MCA	12	0,004	0,3	0,03	18,1	0,019	1,0	0,02	NH	NH	NH	NH
Suc-LLVY-MCA	10,5	0,03	2,9	0,3	16,8	0,398	23,7	0,66	3,5	0,003	0,9	100
Suc-AAF-MCA	2,2	2,15	978,2	100,0	12	0,053	4,4	0,12	3,5	0,001	0,4	44
Suc-AAPF-MCA	19,4	0,85	43,8	4,5	2,7	9,636	3568,8	100	20,6	0,003	0,1	11

* Condições de hidrólise estão descritas em Materiais e Métodos (item 3.7.1)

NH = Não hidrolisado de acordo com a padronização experimental

outros peptídeos. Os substratos que apresentam Tyr na posição P1 apresentaram os menores valores de k_{cat}/K_m relativo sendo: Suc-LLVY-MCA = 0,3% e Suc-LY-MCA= 0,03%.

Para a quimotripsina de *Tenebrio molitor*, o substrato melhor hidrolisado foi Suc-AAPF-MCA, com um valor de K_m baixo em relação aos substratos que apresentam Tyr na posição P1. O segundo substrato mais eficientemente hidrolisado foi Suc-LLVY-MCA, apresentando o segundo valor k_{cat}/K_m mais alto. O menor k_{cat}/K_m obtido foi para o substrato Suc-LY-MCA.

Para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*, o substrato Suc-LLVY-MCA foi o melhor substrato verificado pelo maior valor de k_{cat}/K_m , indicando uma preferência desta enzima por peptídeos com P1-Tyr. Para o substrato Suc-LY-MCA de acordo com a padronização experimental não foi detectado produto de hidrólise.

4.6. Caracterização do subsítio S1 das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com substratos de fluorescência apagada.

Quimotripsinas hidrolisam preferencialmente ligações peptídicas pela porção carboxílica de aminoácidos hidrofóbicos como Phe e Tyr (Barrett *et al*, 2004). Com o intuito de caracterizar o subsítio S1 das quimotripsinas semipurificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*, substratos baseados no princípio do apagamento intramolecular foram sintetizados pela Prof^a Maria A. Juliano (Infar – Unifesp).

Para a análise inicial do subsítio S1, substratos com a seqüência Abz-AGGXGAGQ-EDDnp, onde X representa um dos três resíduos de aminoácidos Phe, Tyr ou Leu, foram sintetizados e submetidos aos ensaios cinéticos (Tabela 2).

Para a quimotripsina de *Periplaneta americana* os valores de k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m mostraram-se muito próximos para os substratos que contêm Phe ou Tyr na posição P1, havendo uma preferência sutil desse subsítio pelo substrato com P1-Tyr, com uma relação Tyr/Phe = 1,3 vezes. Esse resultado é diferente do encontrado para os substratos cumarínicos que mostrou uma preferência clara da quimotripsina de *Periplaneta americana*

Tabela 2: Parâmetros cinéticos da hidrólise do peptídeo Abz-AGG**X**GAGQ-EDDnp pelas quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* para a caracterização da especificidade do subsítio S1*

X	<i>Periplaneta americana</i>				<i>Tenebrio molitor</i>				<i>Diatraea saccharalis</i>			
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)
F	8,8	0,03	3,3	77,3	10	1,67	166,7	14,8	5	0,01	1,7	49,1
Y	8,6	0,04	4,3	100	8,9	10	1123,6	100	4,7	0,02	3,4	100

*Condições de hidrólise estão descritas em Materiais e Métodos (item 3.8.2).
Todas as enzimas clivaram a ligação peptídica entre os resíduos X↓G como verificado nas análises por HPLC e

espectrometria de massa dos hidrolisados após ensaio.

por substratos que contenha P1-Phe (Tabela 1), indicando a importância da sequência de aminoácidos adjacentes a posição P1 e também o tamanho da cadeia peptídica.

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisa preferencialmente o substrato P1-Tyr apresentando uma relação Tyr/Phe de 6,7 vezes. Esse resultado é bastante diferente do resultado para os substratos cumarínicos, onde essa enzima apresentou maior k_{cat}/K_m para o substrato Suc-AAPF-MCA sendo este valor 150 vezes maior que para o substrato Suc-LLVY-MCA.

A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* apresentou resultados similares aos encontrados para as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* em relação à preferência por substratos que apresentam Tyr em P1. No entanto a razão de hidrólise Tyr/Phe para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* é de 2 vezes, muito menor que a razão verificada para a quimotripsina de *Tenebrio molitor*, porém próximo do valor da relação Tyr/Phe para a quimotripsina de *Periplaneta americana*. O resultado encontrado concorda com o obtido para os substratos cumarínicos, onde maior k_{cat}/K_m foi verificada sobre o substrato com Tyr em P1.

A presença de uma hidroxila na cadeia lateral da Tyr e as diferenças de volume dos resíduos nas posições variantes dos peptídeos pode ser, em primeira análise, fator determinante da especificidade dessas enzimas, evidenciando a influência da natureza dos resíduos adjacentes a posição P1 nos peptídeos testados.

Para o substrato com Leu em P1, de acordo com a padronização experimental não foi detectado produto de hidrólise.

4.7. Caracterização do subsítio S2 das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com substratos de fluorescência apagada.

4.7.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)

Ao contrário da quimotripsina de *Tenebrio molitor* que apresenta uma maior preferência pelo peptídeo com Ala em P2, as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e

Diatraea saccharalis apresentam maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Pro em P2. A especificidade diferencial da quimotripsina de *Tenebrio molitor* pelo peptídeo com Ala em P2, em relação as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*, é afetada principalmente pelo k_{cat} e não necessariamente pela ligação da enzima ao substrato. A quimotripsina de *Tenebrio molitor* não hidrolisou o peptídeo com Pro em P2 (Tabela 3).

O curioso deste resultado é que em relação aos substratos cumarínicos, a quimotripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisa 833 vezes melhor o substrato Suc-AAPF-MCA que o substrato Suc-AAF-MCA, enquanto que as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* hidrolisam melhor o substrato Suc-AAF-MCA 22 e 4 vezes melhor respectivamente em relação ao substrato Suc-AAPF-MCA (Tabela 1).

Comparando-se os peptídeos com Val e Leu em P2, a ligação enzima-substrato não foi afetada, contudo, nota-se que para esses dois peptídeos que possuem volumes dos resíduos de aminoácidos muito próximos, o K_m obtido tem o mesmo valor, porém o k_{cat} é 2,5 vezes maior para o substrato com Val em P2. Quimotripsina de *Periplaneta americana* bem como a de *Diatraea saccharalis* não hidrolisaram o peptídeo com Trp em P2, no entanto entre os peptídeos com aminoácidos hidrofóbicos variantes em P2, a quimotripsina de *Tenebrio molitor* apresentou o menor k_{cat}/K_m relativo (Tabela 3).

A análise dos peptídeos com Leu e Ile em P2 mostra que o valor de k_{cat}/K_m foi afetado pelo valor de K_m . Apesar de ambos resíduos Leu e Ile possuírem mesmo volume, a estrutura atômica da cadeia lateral do resíduo de Ile parece influenciar até 3 vezes mais o valor de K_m para a quimotripsina de *Periplaneta americana*. O mesmo não acontece para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* onde se verifica que o K_m não é praticamente afetado, porém nota-se uma diferença de quase 2 vezes no valor k_{cat} para os dois peptídeos com Leu e Ile em P2.

A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisou o peptídeo com Leu em P2, e apresentou o menor valor de K_m para o peptídeo com Ile em relação a quimotripsina de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Apesar do peptídeo com Ala em P2 ter sido melhor hidrolisado pela quimotripsina de *Tenebrio molitor*, para a quimotripsina de *Periplaneta americana* foi o 4º melhor substrato e para a de *Diatraea saccharalis* foi o 3º melhor substrato hidrolisado.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos da hidrólise do peptídeo Abz-AGXFGAQ-EDDnp pelas quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* para a caracterização da especificidade do subsítio S2*

	<i>Periplaneta americana</i>				<i>Tenebrio molitor</i>				<i>Diatraea saccharalis</i>			
X	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)
F		$\dagger k_{cat}/K_m = 47,2$	\downarrow	\downarrow 70%; 30%	10,7	1,44	134,8	38,5	2,3	0,02	9,8	45,1
W	NH	NH	NH	NH	4,8	0,11	22,7	6,5	NH	NH	NH	NH
A	5,5	0,39	70,8	18,8	8,7	3,04	349,9	100,0	5,4	0,07	12,4	57,1
V	3,2	0,56	174,1	46,2	6,2	1,09	176,0	50,3	9	0,08	8,6	39,4
L	3,2	0,22	67,8	18,0	5	0,66	131,2	37,5	NH	NH	NH	NH
I	10,4	0,17	16,1	4,3	4,5	1,25	278,1	79,5	1,7	0,02	10,4	47,7
P	2,9	1,09	377,3	100,0	NH	NH	NH	NH	3	0,07	21,8	100,0
Q	0,9	0,08	90,0	23,9	5,2	0,36	69,3	19,8	NH	NH	NH	NH
S	3,5	0,12	33,0	8,7	5,3	0,36	68,0	19,4	3,2	0,02	7,6	35,0
E	NH	NH	NH	NH	7,2	0,09	13,1	3,8	7,4	0,04	5,7	26,3
K	5	0,08	15,2	4,0	8,3	0,66	78,9	22,6	NH	NH	NH	NH
R	2,1	0,08	36,5	9,7	7,5	0,36	48,1	13,8	NH	NH	NH	NH
H	NH	NH	NH	NH	3,6	0,24	67,0	19,1	1,3	0,02	17,4	79,8

k_{cat}/K_m aparente para os substratos hidrolisados em mais de uma ligação
 k_{cat}/K_m para cada clivagem.

Para o peptídeo com Phe em P2 apenas a quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou hidrólise dupla na Phe que corresponde a posição P2, o resultado mostra que a enzima desloca sua especificidade primária para a Phe adjacente a Gly na porção carboxílica (-EDDnp) o que indica a importância da natureza dos resíduos de aminoácidos adjacentes a posição P1 (Tabela 3).

4.7.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar não carregada (Gln e Ser)

As quimotripsinas dos insetos analisados apresentaram diferenças significativas para os peptídeos com aminoácidos polares de cadeia lateral alifática polar não carregada. Dentre os substratos desse grupo, a quimotripsina de *Periplaneta americana* possui maior k_{cat}/K_m para o substrato com Gln em P2, essa diferença em relação ao substrato com Ser em P2 deve-se principalmente pelo baixo valor de K_m (Tabela 3). A quimotripsina de *Tenebrio molitor* não apresentou diferenças nos parâmetros cinéticos obtidos em relação aos peptídeos com Gln e Ser, e a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* não apresentou hidrólise sobre o substrato com Gln em P2 sendo mais restritiva em relação a esse substrato, porém apresentou menor k_{cat}/K_m para o substrato com Ser em P2 dentre os peptídeos desse grupo em relação as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* (Tabela 3).

4.7.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)

A quimotripsina de *Periplaneta americana* de acordo com a padronização experimental não hidrolisou o peptídeo com Glu em P2. As quimotripsinas de *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentaram valores de K_m semelhantes. Porém, o valor de k_{cat}/K_m foi afetado pelo k_{cat} sendo este peptídeo 2 vezes melhor para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* do que para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* (Tabela 3).

4.7.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)

A quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou valores semelhantes de k_{cat} no entanto, o valor de k_{cat}/K_m foi afetado principalmente pelos valores de K_m , o que levou a enzima a uma maior preferência para o peptídeo com Arg em P2 dentre os peptídeos desse grupo. A mesma enzima não foi capaz de hidrolisar o peptídeo com His em P2 (Tabela 3).

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi capaz de hidrolisar os três peptídeos desse grupo. Ao contrário da quimotripsina de *Periplaneta americana*, a enzima de *Tenebrio molitor* apresentou menor K_m para o peptídeo com His em P2, no entanto apresentou maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Lys em P2, afetado principalmente pelo maior valor de k_{cat} em relação aos outros peptídeos.

A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* obteve menor valor de K_m para o substrato com His em P2, e não foi capaz de hidrolisar os peptídeos com Lys e Arg em P2. Esse resultado é interessante quando comparado com as enzimas dos outros dois insetos, a enzima de *Diatraea saccharalis* foi capaz de hidrolisar o peptídeo com His em P2 com valor de k_{cat}/K_m relativo de 80% sendo o segundo melhor peptídeo para essa enzima.

4.8. Caracterização do subsítio S3 para as quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com substratos de fluorescência apagada.

4.8.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)

As quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentaram maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Ile em P3 (Tabela 4).

As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* não foram capazes de hidrolisar os peptídeos com Pro em P3 e a enzima de *Tenebrio molitor* obteve um k_{cat}/K_m relativo de 1,2 % para esse mesmo peptídeo. A enzima de *Tenebrio molitor* apresentou para o peptídeo com Leu em P3 o pior valor de k_{cat}/K_m , indicando que a

Tabela 4: Parâmetros cinéticos da hidrólise do peptídeo Abz-AXGFGAQ-EDDnp pelas quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* para a caracterização da especificidade do subsítio S3*

X	<i>Periplaneta americana</i>				<i>Tenebrio molitor</i>				<i>Diatraea saccharalis</i>			
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)
F		$\dagger k_{cat}/K_m = 41,2$ (F	65%;	35%)		$\dagger k_{cat}/K_m = 238,1$ (F	57,5%;	42,5%)		$\dagger k_{cat}/K_m = 28,5$ (F	62%;	38%)
W	NH	NH	NH	NH	10,3	0,20	19,2	1,9	NH	NH	NH	NH
A	5	0,10	21,0	11,4	6,6	0,98	148,4	14,5	2,3	0,04	17,2	14,9
V	5,9	0,53	89,1	48,4	4,4	1,65	375,5	36,7	1,3	0,11	84,5	73,2
L	6,8	0,58	85,9	46,7	9,17	0,10	10,8	1,1	4,6	0,12	25,4	22,1
I	3	0,55	184,0	100,0	6,5	6,66	1024,0	100,0	3,9	0,45	115,4	100,0
P	NH	NH	NH	NH	3,4	0,04	12,3	1,2	NH	NH	NH	NH
Q	7,3	0,20	27,2	14,8	2,7	0,62	230,1	22,5	4,3	0,09	21,5	18,6
E	8,7	0,08	9,7	5,3	5,5	0,79	143,0	14,0	7	0,04	5,8	5,0
K	3,8	0,63	165,6	90,0	7,2	1,56	216,6	21,2	3,6	0,10	27,0	23,4
R	5,3	0,46	86,2	46,8	2,8	0,84	301,5	29,4	7	0,19	26,5	23,0
H	4,4	0,08	19,2	10,4	5,7	0,80	139,7	13,6	5,5	0,06	11,3	9,8

k_{cat}/K_m aparente para os substratos hidrolisados em mais de uma ligação
 k_{cat}/K_m para cada clivagem.

preferência do subsítio S3 desta enzima não está apenas relacionado a natureza do resíduo de aminoácido.

Tanto as quimotripsinas de *Periplaneta americana* como a de *Diatraea saccharalis* não hidrolisaram o substrato com Trp em P3. E para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi o 3º pior substrato, indicando uma maior seletividade desse subsítio na quimotripsina de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* em relação a determinados resíduos desse grupo bem como o subsítio S2.

Para os peptídeos com Phe em P3 houve um deslocamento de especificidade verificado para todas as três enzimas testadas. Todas as três enzimas tiveram maior preferência, verificada pela porcentagem dos picos obtidos no HPLC, pela hidrólise na Phe adjacente a Gly na porção carboxílica (-EDDnp), havendo um segundo ponto de clivagem na Phe adjacente a Ala no lado N-terminal (Abz-) (Tabela 4), no entanto quando ocorre esse deslocamento quem ocupa o subsítio S3 passa a ser o grupo Abz.

4.8.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia polar que apresenta uma amida (Gln)

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi a que melhor hidrolisou o peptídeo com Gln em P3, e o valor de K_m foi o menor que o obtido em relação a quimotripsina de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*. No entanto, as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* apresentaram um k_{cat}/K_m relativo de 14,8% e 18,6% respectivamente (Tabela 4).

4.8.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi a que melhor hidrolisou o peptídeo com Glu em P3 em relação as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*. No entanto, a quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou valor de k_{cat}/K_m quase duas vezes maior que a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*. Contudo, as duas enzimas apresentaram k_{cat}/K_m relativo de 5% (Tabela 4).

4.8.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)

A quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou o segundo maior k_{cat}/K_m relativo (90%) para o peptídeo com Lys em P3. A quimotripsina de *Tenebrio molitor* apresentou maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Arg em P3 dentre os peptídeos com resíduos de aminoácidos desse grupo. Os valores de k_{cat}/K_m para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* ficaram com valores muito próximos, porém sendo o melhor o peptídeo Lys em P3. Para as três enzimas o pior peptídeo desse grupo foi o que possui His em P3 (Tabela 4).

4.9. Caracterização do subsítio S1' para as quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* com substratos de fluorescência apagada.

4.9.1 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral apolar (Phe, Trp, Ala, Val, Leu, Ile e Pro)

O peptídeo com Pro em P1' não foi hidrolisado, de acordo com a padronização experimental, pelas três quimotripsinas estudadas (Tabela 5).

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* obteve maior k_{cat}/K_m relativo para o peptídeo com Ala em P1'. Entre os peptídeos com resíduos de aminoácidos desse grupo a enzima de *Periplaneta americana* obteve maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Ile em P1' seguido do peptídeo com Ala, já a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* teve o maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Ala em P1'.

A enzima de *Periplaneta americana* não foi capaz de hidrolisar o peptídeo com Leu em P1' e a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisou os peptídeos com Val e Leu em P1', entretanto, a quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou o menor k_{cat}/K_m relativo para o peptídeo com Val em P1' (Tabela 5).

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi capaz de hidrolisar o peptídeo com Leu em P1' em dois pontos de clivagem. A especificidade primária dessa enzima acabou sendo

Tabela 5: Parâmetros cinéticos da hidrólise do peptídeo Abz-AGGF~~X~~AQ-EDDnp pelas quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* para a caracterização da especificidade do subsítio S1^{1*}

	<i>Periplaneta americana</i>				<i>Tenebrio molitor</i>				<i>Diatraea saccharalis</i>			
X	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo (%)
F	9,8	0,15	14,9	12,6					NH	NH	NH	NH
W	3,6	0,04	12,2	10,4	4,2	0,32	77,0	34,6	3,2	0,01	4,5	13,8
A	5,6	0,30	53,1	45,1	3	0,67	222,5	100,0	3,8	0,04	10,5	32,4
V	7	0,08	11,2	9,5	3	0,19	62,0	27,9	NH	NH	NH	NH
L	NH	NH	NH	NH					NH	NH	NH	NH
I	2,5	0,16	63,8	54,3	4	0,73	183,3	82,4	6,5	0,01	2,0	6,2
P	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
Q	NH	NH	NH	NH	7,2	0,47	65,8	29,6	8,7	0,05	5,5	17,0
S	6,6	0,78	117,6	100,0	4,4	0,83	188,6	84,8	4	0,13	32,5	100,0
E	NH	NH	NH	NH	1	0,04	36,0	16,2	NH	NH	NH	NH
K	10,9	0,27	25,1	21,3	6,3	0,66	105,2	47,3	4,6	0,04	7,7	23,8
R	3,5	0,09	24,5	20,8	8	0,86	107,1	48,1	4,1	0,04	9,6	29,6
H	6,8	0,10	14,5	12,3	7,3	0,003	0,4	0,2	3,9	0,03	6,7	20,5

k_{cat}/K_m aparente para os substratos hidrolisados em mais de uma k_{cat}/K_m para cada clivagem.

deslocada pela presença de uma Ala adjacente a Leu, indicando que a presença de uma Ala na posição P1' se torna um fator determinante da especificidade do subsítio S1' da quimotripsina de *Tenebrio molitor*.

Para o peptídeo com Phe em P1' apenas a quimotripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisou o substrato em dois pontos diferentes (Tabela 5). A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisou o peptídeo com Phe em P1', mas foi capaz de hidrolisar os peptídeos com Trp em P1'. Entretanto, o peptídeo com Trp em P1' foi hidrolisado pelas três enzimas estudadas.

4.9.2 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia polar sem carga (Gln e Ser)

Para os peptídeos com aminoácidos desta classe na posição P1', a quimotripsina de *Periplaneta americana* não hidrolisou o peptídeo com Gln.

As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* obtiveram k_{cat}/K_m relativo de 100% para o peptídeo com Ser em P1'. O mesmo não acontece para a enzima de *Tenebrio molitor*, porém foi o segundo melhor peptídeo com k_{cat}/K_m relativo de 84,8% (Tabela 5).

A presença de um grupo OH na cadeia lateral do resíduo de aminoácido da Ser pode ser o fator determinante do maior valor de k_{cat}/K_m encontrado para as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*, no entanto a ausência deste grupo na cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala, parece ser fundamental para um maior k_{cat}/K_m obtido para a quimotripsina de *Tenebrio molitor*.

4.9.3 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada negativamente (Glu)

As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* não hidrolisaram o peptídeo com Glu em P1'. A quimotripsina de *Tenebrio molitor* apresentou o menor K_m para este peptídeo hidrolisado entre todos os outros testados, no entanto esse

baixo valor de K_m não proporcionou um melhor valor de k_{cat}/K_m relativo (16%) que foi afetado pelo valor de k_{cat} .

4.9.4 Peptídeos com resíduo de aminoácido de cadeia lateral alifática polar carregada positivamente (Lys, Arg e His)

Quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou valores de k_{cat}/K_m próximos para os peptídeos com Arg ou Lys em P1', no entanto para o peptídeo com His o valor de k_{cat}/K_m foi afetado principalmente pelo valor de K_m reduzindo a eficiência catalítica quase pela metade (Tabela 5).

Essa diferença foi maior para o peptídeo com His em P1' para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* com um k_{cat}/K_m relativo de 0,2% (Tabela 5), o valor mais baixo encontrado em relação a todos os peptídeos testados.

A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* não apresentou diferenças marcantes nos valores de k_{cat}/K_m obtidos, porém igualmente encontrado para os outros dois insetos modelo, essa enzima obteve menor k_{cat}/K_m para o peptídeo com His em P1'.

4.10. Determinação da energia de ativação total livre (ΔG^{\ddagger}_T) e energia livre de ligação (ΔG_s) dos diferentes substratos em relação às quimotripsinas em estudo.

Os dados das Figuras 17, 18 e 19 e Tabela 6 permitem prever a tendência de cada subsítio das quimotripsinas estudadas em favorecer a ligação do substrato ou do estado de transição. O valor da inclinação (n) de cada reta obtida indica qual é o papel de cada subsítio: ligação ao substrato ($n < 1$) ou favorecimento da catálise por ligação do estado de transição ($n > 1$) (Marana *et al.*, 2002).

Os resultados mostram que o subsítio S2 das três quimotripsinas: *Periplaneta americana* $n = 0,7$ (Figura 17 A); *Tenebrio molitor* $n = -0,3$ (Figura 17 B) e *Diatraea saccharalis* $n = 0,3$ (Figura 17 C) favorece a ligação ao substrato.

O subsítio S3 da quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou $n = 2$ (Figura 18 A), indicando que este subsítio liga o estado de transição com o dobro de energia em relação à ligação do substrato, diferindo da quimotripsina de *Tenebrio molitor* e *Diatraea*

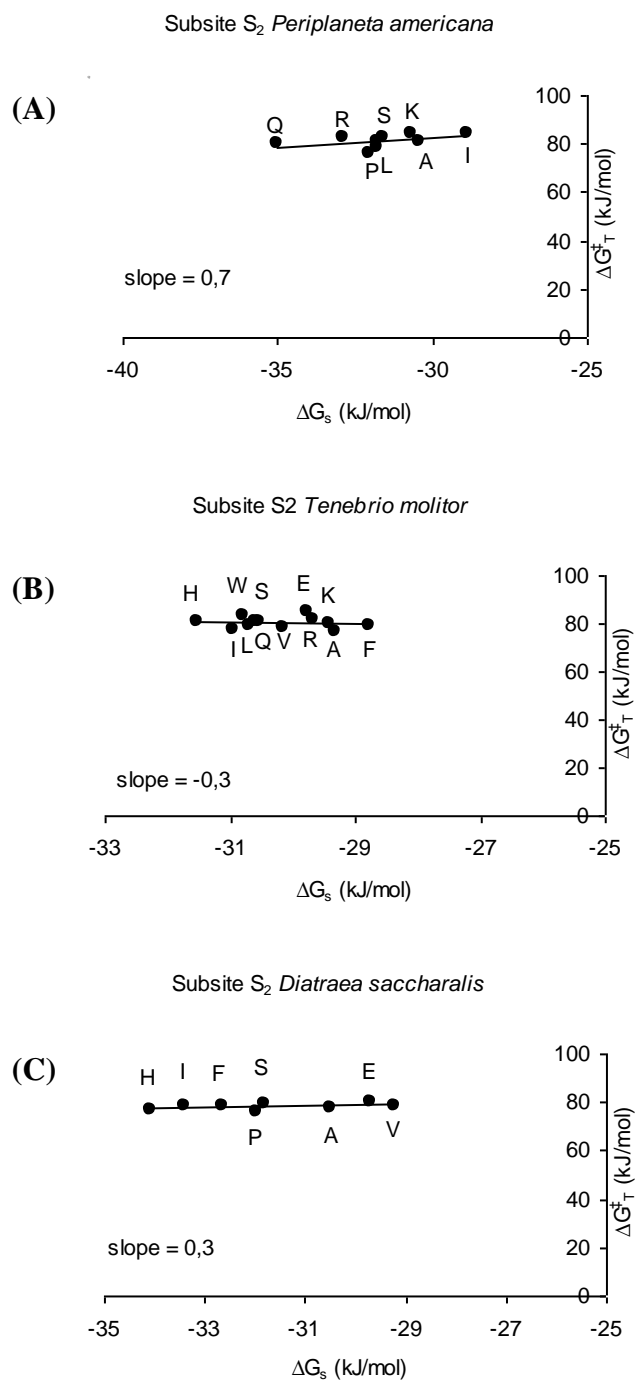


Figura 17: Energia de ativação total (ΔG^{\ddagger}_T) versus energia de ligação do substrato (ΔG_s) para o subsítio S₂ da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. Cada ponto na reta representa um substrato no qual um aminoácido (identificado por uma letra) foi trocado. Detalhes em Materiais e Métodos item 3.10.

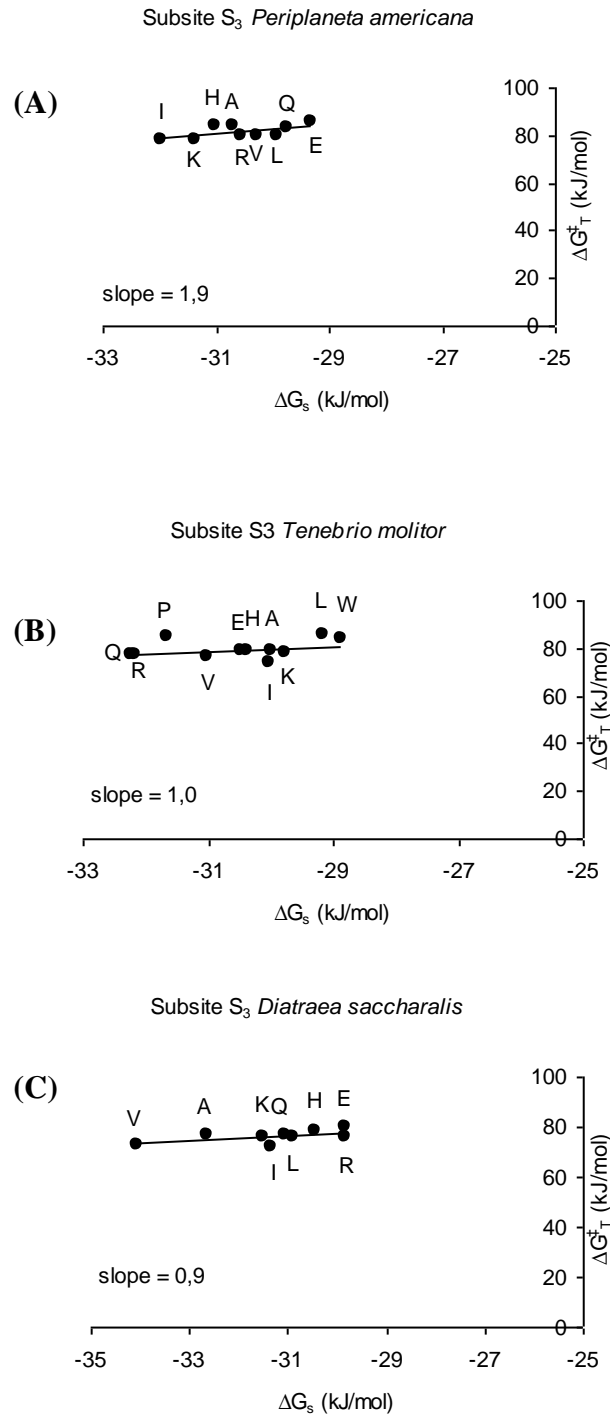


Figura 18: Energia de ativação total (ΔG^{\ddagger}_T) versus energia de ligação do substrato (ΔG_s) para o subsítio S₃ da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. Cada ponto na reta representa um substrato no qual um aminoácido (identificado por uma letra) foi trocado. Detalhes em Materiais e Métodos item 3.10.

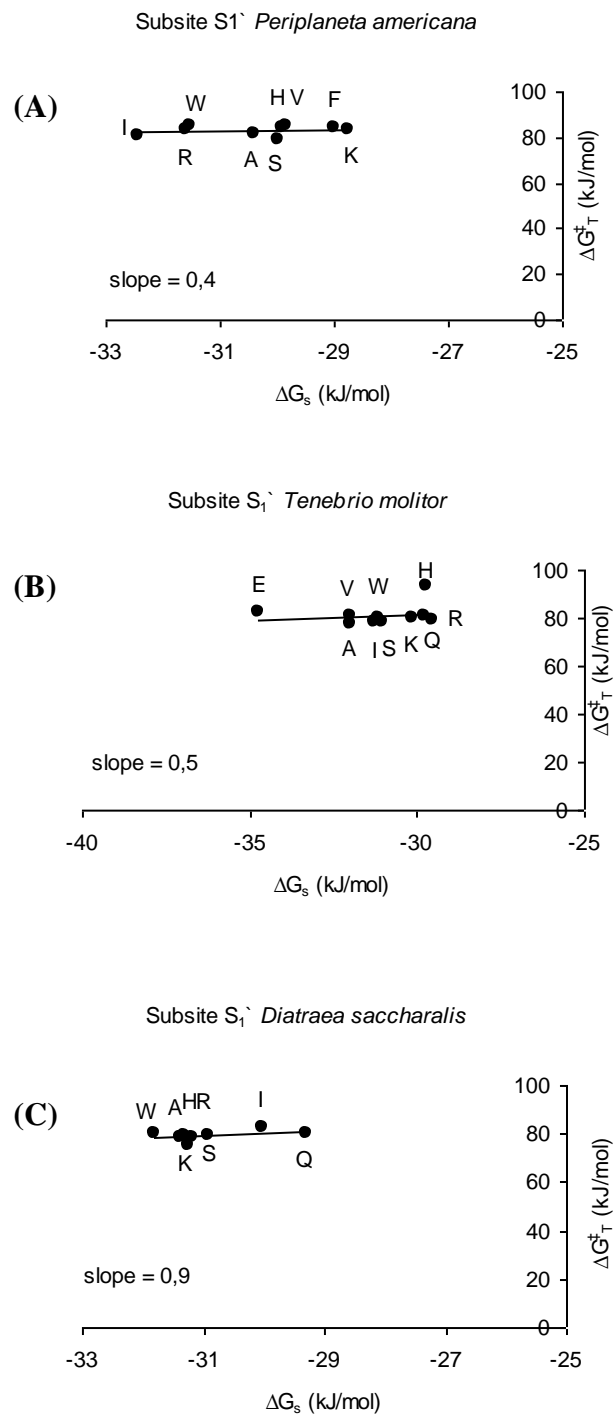


Figura 19: Energia de ativação total (ΔG^{\ddagger}_T) versus energia de ligação do substrato (ΔG_s) para o subsítio S1' da quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. Cada ponto na reta representa um substrato no qual um aminoácido (identificado por uma letra) foi trocado. Detalhes em Materiais e Métodos item 3.10.

saccharalis (Figuras 18 B e C) ambas com $n = 1$, indicando que este subsítio liga o substrato e o estado de transição com energia similar.

Os subsítios S1' da quimotripsina de *Periplaneta americana* $n = 0,4$ e *Tenebrio molitor* $n = 0,5$ (Figuras 19 A e B respectivamente) favorecem a ligação ao substrato, enquanto o subsítio S1' da quimotripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta $n = 1$ (Figura 19 C), indicando que este subsítio liga substrato e estado de transição com energia similar.

4.11. Índice de hidrofobicidade dos subsítios de ligação das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

O índice de hidrofobicidade dos subsítios de ligação das quimotripsinas dos insetos caracterizados indicou um aumento de hidrofobicidade (Figura 20) do subsítio S3 acompanhando a posição do inseto na escala evolutiva, o inverso foi observado em relação ao subsítio S1'.

O subsítio S2 não apresentou um padrão aparente de hidrofobicidade que pode estar relacionada com a posição do inseto na escala evolutiva, embora, os subsítios S2 das quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* são mais semelhantes entre si em termos de hidrofobicidade do que com *Tenebrio molitor* (Figura 20).

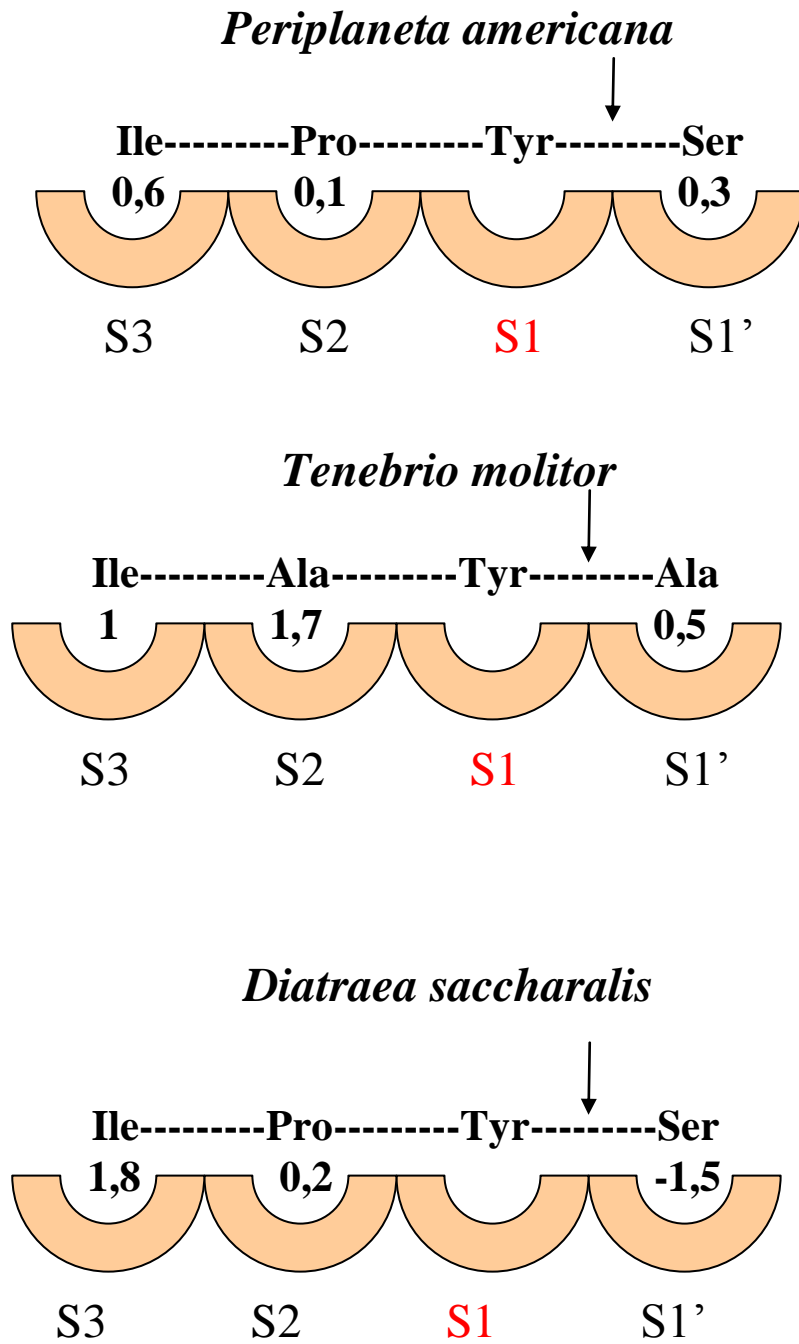


Figura 20: Peptídeos ideais desenhados e índices de hidrofobicidade para as quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*, a partir da caracterização de especificidade de cada um dos subsítios estudados para estas enzimas. A seta indica a ligação a ser clivada. Detalhes em Materiais e Métodos item 3.8.

5. Discussão

5.1. Características gerais das quimotripsinas de insetos

Devido a um alto processo autolítico, quimotripsinas de insetos podem ser purificadas por cromatografia em coluna DEAE-celulose seguida de uma cromatografia de afinidade em coluna fenilbutilamina-agarose, como a quimotripsina de *Locusta migratoria* (Sakal *et al.*, 1988) ou também por cromatografia em coluna benzamidina-Sepharose seguida de uma coluna DEAE-Sepharose (Lam *et al.*, 1999). Quimotripsina de *Manduca sexta* pode ser purificada através de duas cromatografias de afinidade seguidas: uma em coluna benzamidina-sefarose e uma outra coluna de afinidade D-tirosina-agarose (Peterson *et al.*, 1995).

No entanto, como uma primeira tentativa de se purificar a quimotripsina digestiva de *Periplaneta americana* foi realizada a combinação de dois passos cromatográficos de troca iônica. A quimotripsina é um subproduto 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 (Lopes *et al.*, 2003). A recuperação da atividade inicialmente obtida para este passo de purificação era de 30%, porém, com o intuito de diminuir o processo autolítico, era adicionado às frações eluídas da cromatografia em coluna High Q tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo SDS 0,05%, levando à recuperação da atividade dessa enzima para 100%. Esse resultado já havia sido observado (observações em nosso laboratório) 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-AAPF-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 recuperação deste último passo é de pelo menos 70%. Entretanto, apesar do SDS-PAGE apresentar uma banda única, com o início das caracterizações dos subsítios dessa enzima com substratos de fluorescência apagada, a análise dos incubados e posterior análise em HPLC indicaram a presença de mais de um pico de fluorescência levando a conclusão da presença de mais de uma endopeptidase nas preparações, o que levou a

tentativa de uma purificação alternativa para esta enzima.

O método mais eficaz para a purificação parcial da quimotripsina dos diferentes insetos foi o realizado através de cromatografia em coluna de afinidade fenilbutilamina-agarose, porém, nessa cromatografia não é possível calcular a recuperação devido à presença do inibidor fenilbutilamina no eluído ativo sobre o substrato Suc-AAPF-MCA.

As quimotripsinas de insetos possuem peso molecular entre 20-30 kDa como a quimotripsina de *Locusta migratoria* com peso de 24 kDa (Sakal *et al.*, 1988), *Vespa cabro* com 25 kDa (Jany *et al.*, 1978b), *Manduca sexta* com 24 kDa (Peterson *et al.*, 1995) e essas informações foram usadas para interpretar os resultados de SDS-PAGE de nossas preparações.

O reunido ativo da cromatografia em coluna fenilbutilamina-agarose a partir da porção solúvel do homogeneizado de tubos digestivos de *Periplaneta americana* foi submetido a um SDS-PAGE (Figura 10) resultando na separação de duas bandas de pesos moleculares próximos (31 e 29 kDa), além de outras menores de 14 kDa. O mesmo tipo de resultado foi verificado para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* (Figura 11) com bandas de peso 27 e 24 kDa. A presença dessas bandas poderia estar associada a três fatores importantes:

- presença de mais de uma quimotripsina nas preparações;
- presença de uma tripsina contaminante visto que tripsinas e quimotripsinas possuem pesos moleculares muito próximos;
- resultado de um alto processo autolítico com as quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*; o que certamente é verdade para as bandas de pesos em termo de 14 kDa observadas nas Figuras 10 e 11.

No entanto, os experimentos de inativação térmica para o eluído ativo de quimotripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentam uma cinética de 1ª ordem por até 3 meias vidas, indicando a presença de uma única enzima com atividade quimotríptica (Figura 13 A, B e C). Os dados de atividade de tripsina indicam que esta proteína deve ser minoritária. No entanto, não está descartada a possibilidade de algumas das bandas 31 ou 29 (Figura 10) e 27 ou 24 (Figura 11) corresponderem a tripsina inativa ou ainda representarem a quimotripsina íntegra mais outra pouco autolisada com atividade não afetada.

O pH do conteúdo intestinal dos insetos é uma das mais importantes propriedades que afetam as enzimas digestivas. Numerosas determinações desse pH tem sido registradas, assim como do pH ótimo de numerosas enzimas digestivas. Os resultados tem mostrado que existe correlação entre o pH ótimo das enzimas digestivas e dos pHs luminiais intestinais onde se encontram para amilase e endopeptidases, mas não para as demais enzimas (Terra e Ferreira, 1994). O pH do ventrículo anterior e posterior de insetos da ordem Dictyoptera é ao redor de 6 (Greenberg *et al.*, 1970), insetos da ordem Coleoptera da família Tenebrionidae (larvas) possuem um pH no ventrículo posterior onde as endopeptidases ocorrem em torno de 7,9 (Ferreira e Terra, 1989) e os insetos da ordem Lepidoptera possuem pH do ventrículo ao redor de 10-10,5 (Ferreira *et al.*, 1994b). O pH altamente alcalino observado nestes últimos pode ter sido um adaptação à alimentação a base de folhas do ancestral Lepidoptera para extrair hemicelulose da parede celular das plantas (Terra, 1988).

O pH ótimo da quimotripsina de vários insetos de diferentes ordens foi determinado: *Locusta migratoria* pH 8,7 (Sakal *et al.*, 1988), *Periplaneta americana* pH 8 (Baumann, 1990), *Manduca sexta* pH 11,5 (Peterson *et al.*, 1995).

O pH ótimo das quimotripsinas dos insetos estudados encontram-se de acordo com o esperado para os insetos de diferentes ordens (Figura 14), sendo pH 7 para a quimotripsina de *Periplaneta americana*, pH 7,5 *Tenebrio molitor* e pH acima de 10 para *Diatraea saccharalis*.

Apesar da presença de quimotripsina em diferentes ordens de insetos, esta enzima não está tão bem descrita quanto a tripsina devido a fatores limitantes como:

- dificuldade inicial de ensaios adequadamente as quimotripsinas. Só em 1995, Lee e Anstee demonstraram que as quimotripsinas de insetos hidrolisam preferencialmente substratos peptídicos com um número de resíduos igual ou superior a três, enquanto que as quimotripsinas de mamíferos hidrolisam bem substratos como B-Y-pNa.

- ausência na maioria dos casos de modificação por TPCK nas concentrações utilizadas para a quimotripsina de mamíferos, o que impedia a confirmação da identificação da quimotripsina.

Com o intuito de verificar se as quimotripsinas dos insetos estudados podem ser modificadas por TPCK, experimentos foram realizados na presença de TPCK 1mM e verificou-se que essas enzimas são modificadas por até três meias vidas (Figura 16).

5.2. Especificidade por substrato das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

Quimotripsinas e tripsinas de mamíferos, estão entre as enzimas mais bem estudadas (Fersht, 1995). Elas apresentam homologia em relação à estrutura primária e terciária e o papel dos subsítios *S_n* de quimotripsina e tripsina na ligação do substrato e catálise tem sido investigado (Schellenberger *et al.*, 1991c).

A especificidade de quimotripsina bovina é comumente verificada em termos da interação P1-S1. O sítio S1 é uma cavidade adjacente a Ser195, formada pelos resíduos 189-192, 214-216 e 224-228. A especificidade é determinada pelos resíduos nas posições 189, 216 e 226 (Perona e Craik, 1995). A combinação da Ser 189, Gly 216 e Gly 226 cria uma cavidade hidrofóbica profunda na quimotripsina, explicando a sua especificidade por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e volumosos (aromáticos) (Blow, 1971).

Porém, sobre as quimotripsinas de insetos, praticamente não existe informação a respeito da especificidade dos diferentes subsítios dessas enzimas. A especificidade primária da quimotripsina de *Manduca sexta* foi determinada através da clivagem de glucagon e da cadeia β de insulina, com os pontos de clivagem desses substratos determinados através da análise dos fragmentos gerados por HPLC. A quimotripsina de *Manduca sexta* cliva preferencialmente ligações peptídicas do lado carboxílico de aminoácidos como Tyr, Phe, Trp, Leu, His, Thr e Gly (Peterson *et al.*, 1995).

Com a determinação da estrutura tridimensional da quimotripsina de *Solenopsis invicta* (Botos *et. al.*, 2000) foi possível verificar diferenças entre as quimotripsinas de insetos e a quimotripsina bovina, incluindo o mecanismo de ativação e substituições no subsítio S1 e, principalmente nos outros subsítios (S4-S4'), sugerindo diferentes especificidades em relação a substratos e inibidores.

As quimotripsinas dos insetos *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* apresentaram maior eficiência de hidrólise sobre substratos que

apresentam um resíduo Tyr em P1 (Tabela 2). A especificidade da quimotripsina bovina correlacionada com a hidrobicidade do resíduo em P1, com Phe em P1 é 5000 vezes mais preferencial que Ala nessa mesma posição (Hedstrom, 2002). Além disso, as razões Phe/Tyr para os diferentes insetos são bastante variadas.

A relação Tyr/Phe mostrou-se mais marcante para a quimotripsina de *Tenebrio molitor* (6,7 vezes) que apresentou valores de K_m próximos, no entanto, a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral em Tyr levou a uma diferença de quase 6 vezes na catálise realizada por essa enzima em relação ao peptídeo com Phe em P1. Isso também ocorreu para a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*, porém numa proporção menor (Tyr/Phe = 2 vezes) evidenciando também maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Tyr em P1 determinado pelo maior valor de k_{cat} . A quimotripsina de *Periplaneta americana* não apresentou diferenças marcantes dos parâmetros cinéticos entre os dois peptídeos com uma razão Tyr/Phe = 1,3 vezes, indicando que essa enzima seria menos seletiva e que esta seletividade pode estar relacionada com a posição deste inseto na escala evolutiva e também com o hábito alimentar.

Estas diferenças indicam diferentes especificidades para as quimotripsinas de insetos em P1. No entanto, estas diferenças parecem não seguir a posição ocupada pelo inseto na escala evolutiva e são menos evidentes do que as verificadas para as tripsinas dos mesmos insetos, onde há troca de especificidade primária (Lopes *et al.*, 2004)

Não foi detectada atividade das quimotripsinas dos insetos testados sobre o substrato Abz-AGGLGAGQ-EDDnp, indicando a preferência dessas enzimas por resíduos de aminoácidos com cadeia lateral aromática e não simplesmente hidrofóbica.

No entanto, a análise cinética realizada com substratos derivados de MCA mostrou-se diferente da obtida para os peptídeos de fluorescência apagada. A quimotripsina de *Periplaneta americana* teve maior preferência pelo substrato Suc-AAF-MCA mostrando-se mais seletiva em relação a esses substratos (Tabela 1), essa diferença em relação aos substratos de fluorescência apagada pode estar relacionada à presença do bloqueador C-terminal MCA e a Pro em P2, ao contrário, a quimotripsina de *Tenebrio molitor* apresentou maior especificidade pelo substrato Suc-AAPF-MCA e Suc-LLVY-MCA como o segundo substrato mais preferencial, esse resultado evidencia que essa enzima prefere substratos mais longos em relação às outras enzimas estudadas, porém esse

resultado não é coerente com o encontrado em relação aos substratos de fluorescência apagada onde a enzima teve maior preferência pelo substrato com Tyr em P1. A quimotripsina de *Diatraea saccharalis* apresentou maior preferência pelo substrato Suc-LLVY-MCA também um substrato peptídico longo, no entanto, para essa enzima além do tamanho do peptídeo a natureza do resíduo de aminoácido na posição P1 mostrou-se mais evidente e também concorda com o resultado obtido em relação aos substratos de fluorescência apagada variante na posição P1.

Os resultados obtidos com os substratos derivados de MCA e com os de fluorescência apagada em relação à posição P1 podem evidenciar em uma primeira análise que o tamanho do substrato em relação ao número de resíduos de aminoácidos presentes na cadeia peptídica, a natureza do resíduo de aminoácido na posição P1 e o tamanho dos bloqueadores N e C-terminais podem ser fatores determinantes da especificidade primária das três enzimas estudadas.

O subsítio S2 e S3 da quimotripsina de mamífero apresenta pouca discriminação pelo substrato, o subsítio S3 possui baixa especificidade e pode mesmo acomodar D-aminoácidos. (Schellenberger, 1991).

Como verificado na Tabela 3, tanto a quimotripsina de *Periplaneta americana* como a de *Diatraea saccharalis* preferencialmente clivam substratos com Pro em P2. Porém, o mesmo não acontece com a quimotripsina de *Tenebrio molitor*, que apresentou maior k_{cat}/K_m para o peptídeo com Ala em P2, essa preferência pode estar relacionada a massa do aminoácido que ocupa o subsítio S2.

No entanto, comparando esse resultado com o da Tabela 2, a quimotripsina de *Tenebrio molitor* possui maior k_{cat}/K_m pelo substrato Suc-AAPF-MCA, enquanto que a quimotripsina de *Periplaneta americana* apresentou maior k_{cat}/K_m pelo substrato Suc-AAF-MCA e *Diatraea saccharalis* pelo Suc-LLVY-MCA. Ambas quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* não hidrolisaram o peptídeo com Trp em P2 e P3, a quimotripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisou esse peptídeo, porém apresentou baixo k_{cat}/K_m relativo. Esse resultado indica a importância das posições adjacentes não somente a posição P1, mas também a posição P2. A natureza dos resíduos ocupantes da posição P2' bem como a presença de compostos como MCA ou EDDnp na porção Sn' são em última análise fatores determinantes da especificidade dos diferentes subsítios estudados.

A quimotripsina de *Periplaneta americana* hidrolisou o peptídeo Phe-P2 em dois pontos, essa enzima desloca a sua especificidade primária quando a posição P1' passa a ser ocupada por uma Phe, o que destaca a possibilidade desse subsítio aceitar resíduos de aminoácidos hidrofóbicos com cadeia lateral aromática.

O subsítio S2 da quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi mais restritiva apenas ao peptídeo com resíduo de aminoácido com Pro, no entanto, a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* parece ser mais restritiva a resíduos de aminoácidos de diferentes grupos como Trp (hidrofóbico) ou Lys e Arg (carregados positivamente).

Porém, as três quimotripsinas estudadas apresentaram maior k_{cat}/K_m para o peptídeo Ile em P3 indicando que esse subsítio possui um papel fundamental na discriminação dessas enzimas por substratos com resíduos de aminoácidos específicos nessa posição.

As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* não hidrolisaram o peptídeo com Pro em P3 e a enzima de *Tenebrio molitor* apresentou um k_{cat}/K_m relativo de 1,2% para esse mesmo peptídeo. Em relação ao peptídeo com Phe em P3, as três enzimas hidrolisaram em dois pontos, a presença de uma Gly na posição P1' e a presença de resíduos de aminoácidos de baixo volume na posição P2 leva a um deslocamento da especificidade primária.

As quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* apresentaram maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Ser em P1', evidenciando que a presença de um grupo hidroxila na cadeia lateral da Ser e o baixo volume da cadeia lateral do resíduo torna o subsítio dessas enzimas mais seletivo que a quimotripsina de *Tenebrio molitor* que apresentou maior k_{cat}/K_m pelo peptídeo com Ala.

O peptídeo com Pro em P1' não foi hidrolisado, nas condições experimentais, pelas três quimotripsinas estudadas, sendo esse resultado esperado de acordo com Barrett *et al.*, (2004).

A quimotripsina de *Tenebrio molitor* foi capaz de hidrolisar o peptídeo com Leu em P1' em dois pontos de clivagem. Apesar de nenhuma das enzimas estudadas terem sido capazes de hidrolisar o peptídeo Abz-AGGLGAGQ-EDDnp, a especificidade primária dessa enzima acabou sendo deslocada pela presença de uma Ala adjacente a Leu, indicando

que a presença de uma Ala na posição P1' adjacente a uma Leu na posição P1 se torna um fator determinante da especificidade do subsítio S1' da quimotripsina de *Tenebrio molitor*.

A comparação dos valores de K_D do complexo formado pelas quimotripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* em relação ao inibidor de soja indicam pequena diferença da afinidade deste inibidor pela quimotripsina destes dois insetos (Figura 15A e 15B).

No entanto, a quimotripsina de *Diatraea saccharalis* apresentou maior afinidade pelo inibidor do que as enzimas dos outros dois insetos modelos, podendo este resultado estar relacionado a uma menor resistência desta enzima em relação a inibidores protéicos de plantas. 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 deste inibidor à tripsina de *Musca domestica* (Lopes, 2004). Essas diferenças de K_D podem indicar diferenças de especificidade para as quimotripsinas de insetos.

5.3. Propriedades dos subsítios do sítio ativo das quimotripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*

O índice de hidrofobicidade dos subsítios do sítio ativo das quimotripsinas estudadas indicou que há um aumento da hidrofobicidade no subsítio S3 que parece seguir a escala evolutiva. Contrariamente, há uma redução da hidrofobicidade do subsítio S1' (Figura 20). O subsítio S2 apresentou índices de hidrofobicidade próximos para a quimotripsina de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* e a enzima de *Tenebrio molitor* apresentou o subsítio S2 o mais hidrofóbico das três enzimas estudadas (Figura 20).

Estes dados são diferentes dos verificados para as tripsinas de insetos, no qual há um aumento do índice de hidrofocidade em todos os subsítios ao longo do processo evolutivo (Lopes *et al.*, manuscrito em preparação). No caso da tripsina foi demonstrado que o referido aumento tem relação com adaptações moleculares para tornarem as tripsinas menos susceptíveis à inibidores de plantas (Lopes *et al.*, 2004). Isso pode significar que as pressões seletivas sobre as quimotripsinas de insetos são de outra ordem. Comparações dos índices de

hidrofobicidade dos subsítios de quimotripsinas estudadas com os de outras quimotripsinas não é possível pela inexistência de dados.

5.4. Papel dos subsítios de quimotripsinas na catálise

Cada subsítio favorece a ligação do substrato ou a catálise (Marana *et al.*, 2002). As energias de ligação do substrato e estado de transição dos subsítios S3, S2, S1' e S2' de tripsinas de quatro ordens de insetos deram resultados aproximadamente similares (Marana *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, manuscrito em preparação). Os subsítios S1' e S2' das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* ligam substrato e estado de transição da mesma maneira, o subsítio S2 com exceção da tripsina de *Musca domestica* liga mais fortemente o substrato. O comportamento do subsítio S3 depende da origem da tripsina, em *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* esse subsítio melhora a catálise, enquanto em *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* ele favorece a ligação do substrato. O subsítio S1 tem um papel decisivo na catálise e, portanto deve ligar somente no estado de transição e tem um papel menor na ligação do substrato.

As inclinações dos plots de ΔG_T^\ddagger e ΔG_s referentes aos diferentes substratos (Tabela 6) permitiram verificar que o subsítio S2 para as três enzimas estudadas, assim como demonstrado para as tripsinas de insetos (Marana *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005), está mais envolvido em ligação ao substrato do que ao estado de transição. No entanto, o subsítio S1' de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* está mais envolvido em ligação do que na catálise, sendo que para *Diatraea saccharalis* esse está igualmente envolvido na ligação do substrato como na catálise, assemelhando-se ao encontrado para tripsina de *Diatraea saccharalis*.

No entanto, o subsítio S3 da quimotripsina de *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* estão envolvidos tanto na ligação do substrato como na catálise e esse mesmo subsítio na quimotripsina de *Periplaneta americana* está envolvido mais na catálise. O subsítio S3 de tripsina, assim como da tripsina de *Periplaneta americana* está envolvido em catálise (Marana *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005).

As observações sobre a quimotripsina de *Diatraea saccharalis*, da mesma forma que foi feita para a tripsina desse inseto (Lopes et al., 2005), podem ser combinadas com o mecanismo atualmente aceito para a catálise da tripsina e quimotripsina. De acordo com esse modelo (Robertus et al., Barret et al., 2004), no complexo enzima-substrato, o carbono trigonal da ligação susceptível é conformacionalmente impedida de ligar-se à enzima. Portanto, S1 liga o substrato somente através do bolsão de especificidade da enzima que acomoda a cadeia lateral de P1. No intermediário tetraédrico do primeiro estado de transição no caminho reativo, o agora carregado oxigênio carbonílico da ligação susceptível (o oxiânion) entra na cavidade do oxiânion, formando ligações de hidrogênio com os grupos NH da cadeia principal da Gly 193 e Ser 195. A conseqüente distorção conformacional permite ao grupo NH do resíduo precedendo a ligação susceptível a formar uma ligação de hidrogênio, até agora impossibilitada, com Gly 193 e diminuindo a interação de P3 e P2 com a enzima. Após a formação da acil enzima, o C-terminal da ligação susceptível é liberado. Finalmente, um segundo intermediário tetraédrico é formado seguindo o ataque nucleofílico da acil-enzima por uma molécula de água associada pela His 57. O intermediário tetraédrico então decompõe-se, liberando o peptídeo e regenerando a enzima. Exceto em relação ao envolvimento de S1 na catálise da quimotripsina, para qual não temos nenhum dado, os dados cinéticos relativos aos subsítios da quimotripsina concordam com o modelo descrito. Assim, S3 e S2 ligam o substrato mas a intergridade da ligação diminui no estado de transição, como esperado da descoberta de que S2 favorece a ligação do substrato em relação a catálise, embora não ocorra alteração em relação a S3, S1 liga o substrato e o primeiro estado de transição de acordo com os dados cinéticos (ele favorece a ligação tanto de substrato quanto do estado de transição). Tanto quanto sabemos, essa é a primeira vez que dados cinéticos são usados para apoiar o envolvimento dos subsítios da quimotripsina em catálise.

Não é claro porque S2 na quimotripsina (assim como na tripsina, Lopes et al., 2005) estaria preferencialmente ligando-se ao estado de transição.

O desenvolvimento desse estudo depende de estudos cristalográficos das quimotripsinas de insetos e do uso de enfoque cinético similar aplicado a enzimas de outras fontes.

5.5. Envolvimento das quimotripsinas no desenvolvimento de resistência a dietas na presença de inibidores e a importância do estudo de especificidade

Os métodos utilizados atualmente no controle de pragas agrícolas estão baseados na utilização de agrotóxicos, os quais aumentam o custo de produção, causam danos ao ambiente, contaminação dos operários durante o manuseio e levam a alguma facilidade à seleção de pragas mais resistentes. O desenvolvimento de um ambiente agrícola mais favorável é o principal alvo das pesquisas sobre o controle de insetos e a expressão de proteínas antimetabólicas em plantas transgênicas é uma estratégia atrativa para proteger várias culturas dos insetos (Paulillo *et al.*, 2000).

Os inibidores de proteases (PIs) de plantas podem inibir diferentes classes de peptidases de insetos como serina, cisteína, aspártico e metalocarboxipeptidases, no entanto, muitos PIs conhecidos são alvos para serino-proteases (Bode e Huber., 1992; Terra e Ferreira, 1994).

O crescimento e metabolismo de larvas de várias espécies de insetos são afetados significativamente após a ingestão crônica de inibidores de proteinases incorporados em dietas artificiais (Johnston *et al.*, 1993; Oppert *et al.*, 1993) ou quando presente em altos níveis em plantas (Johnson *et al.*, 1989; McManus *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1996).

No entanto, existem evidências que mostram que alguns insetos não são susceptíveis a dieta com inibidores de proteases. Por exemplo, a atividade de tripsina e quimotripsina em larvas de *Pieris rapae* e *Pieris napi* não são significativamente inibidas, *in vitro*, por inibidores de serino-proteases de couve. Além disso, a ingestão de inibidores de proteinase de couve não influenciam o crescimento e desenvolvimento dessas espécies de insetos (Broadway e Villani, 1995).

Outras evidências mostram que os insetos herbívoros são hábeis em driblar os efeitos negativos dos PIs, principalmente pela alteração das enzimas proteolíticas expressas no intestino médio (Broadway, 1995; Jongsma *et al.*, 1995). Broadway (1997) mostrou que larvas de *Agrotis ipsilon*, *Trichoplusia ni* e *Helicoverpa zea* aumentam o nível das enzimas com atividade proteolítica que não são susceptíveis a inibição pelo inibidor de tripsina de soja adicionada em dieta artificial. Paulillo *et al.* (2000) mostrou que larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo PIs de soja produz uma nova tripsina,

que é expressa quatro vezes mais que a atividade de quimotripsina. Outra estratégia desenvolvida por algumas larvas de coleópteros e lepidópteros aos PIs foi a inativação proteolítica mediada pelas próprias proteinases intestinais dos insetos (Girard *et al.*, 1998; Giri *et al.*, 1998).

No entanto, ainda não está claro como a presença de PIs no trato intestinal dos insetos levam a indução de proteinases digestivas insensíveis a esses inibidores (Broadway, 1997).

Contudo, apenas o conhecimento da ação dos PIs não é suficiente para melhorar a eficácia desses inibidores no controle de pragas agrícolas, já que para esse tipo de controle se faz necessário também um maior conhecimento á respeito da especificidade das proteinases presentes no trato intestinal dos insetos alvos.

A caracterização da especificidade da quimotripsina foi feita através de peptídeos naturais como glucagon e cadeia β -insulina (Peterson *et al.*, 1995). No entanto, esse tipo de estudo não é suficiente para determinar a especificidade dos vários subsítios presentes no sítio ativo dessa endopeptidase.

Com o desenvolvimento dos substratos de fluorescência apagada é possível fazer trocas dos resíduos de aminoácidos ao longo da cadeia peptídica e verificar a preferência por determinados resíduos de aminoácidos em cada posição. Esse tipo de metodologia não aplica-se apenas para averiguar o “melhor” substrato para determinada enzima, mas também pode-se determinar qual o “melhor” inibidor para uma enzima alvo. A determinação dos parâmetros cinéticos como k_{cat} , K_m e k_{cat}/K_m podem dar pistas à respeito da ação de determinada seqüência peptídica. Um valor de K_m muito baixo não significa necessariamente um melhor substrato, já que a preferência da enzima por uma determinada seqüência é dependente também do valor de k_{cat} , fazendo com que a especificidade seja determinada pelo valor de k_{cat}/K_m . Seqüências peptídicas que não são hidrolisadas pelas diferentes enzimas, como as encontradas nas Tabelas de 2-6, sugerem um uso possível como um inibidor para uma proteinase alvo.

Existem alguns registros sobre o isolamento, análise estrutural e síntese química de pequenos peptídeos do cérebro, hemolinfa e ovários de insetos como *Locusta migratoria* (Nakakure *et al.*, 1992; Kellenberger *et al.*, 1995; Boigegrain *et al.*, 1992) e *Schitocerca gregaria* (Hamdaoui *et al.*, 1997). Esses peptídeos consistem de 35-36 resíduos de

aminoácidos, incluindo seis cisteínas que formam três pontes dissulfeto (Malik et al., 1999). Os dados de inibição desse tipo de peptídeo extraído a partir da hemolinfa de *Schistocerca gregária* mostram que ele é um potente inibidor de quimotripsina (K_i na faixa de picomolar) e um moderado inibidor de tripsina (Malik et al., 1999).

A caracterização cinética com substratos de fluorescência apagada dos subsítios S3, S2, S1, S1' e S2' da tripsina digestiva de insetos 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 e que essa troca de especificidade pode ter um caráter altamente adaptativo, onde os inibidores de serina endopeptidases apresentam Lys em P1 no seu sítio reativo (Lopes et al., 2003).

O conhecimento da especificidade dos subsítios das endopeptidases digestivas de insetos podem dar diretrizes para a purificação ou síntese de inibidores mais eficazes com ação direta nas enzimas digestivas de insetos e serem utilizados na produção de plantas transgênicas ou utilizados como bioinseticidas.

6. Referências Bibliográficas

- Alves, L.C., Almeida, P.C., Franzoni, L., Juliano, L. and 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.
- Alves, L.C. (2001). Tese: Estudo da especificidade de uma cisteíno-peptidase recombinante da *Leishmania mexicana*-CPB 2.8 Δ CTE.
- Alstad, D. N. and Andow, D.A. (1995). Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268, 1894-1896.
- Applebaum, S.W. (1985). Biochemistry of digestion. In: *Comprehensive insect Physiology, biochemistry and Pharmacology*. Vol. 4, 279-311. Pergamon Press, New York.
- Baumann, E. (1990). Isolation and partial characterization of chymotrypsin-like endoprotease from cockroach intestinal system. *Insect Biochem.* 20, 761-768.
- Barrett, A.J.; Rawlings, N.D. and Woessner, J.F. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes* – Academic Press, Inc., London.
- Bergmann, M. and Fruton, J.S. (1941). The specificity of proteinases. *Adv. Enzymol.* 1, 63-98.
- 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.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bode, W. and Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204, 433-451.
- Boigegrain, R.A., Matras, H., Brehelin, M., Paroutaud, P. and Coletti-Previero, M.A. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 790-793.
- Botos, I.; Meyer, E.; Nguyen, M.; Swanson, S. M.; Koomen, J.M.; Russel, D. H., Meyer, E.F. (2000). The structure of insect chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* 298, 895.
- 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. and 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. B* 128, 365-375.
- Broadway, R.M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors ? *J. Insect Physiol.* 41, 107-116.

- Broadway, R.M. (1997). Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 855-874.
- Broadway, R.M. and Villani, M.G. (1995). Does host range influence susceptibility of herbivorous to non-host plant proteinase inhibitors ? *Entomol. Exp. Appl.* 76, 303-312.
- Chagas Jr., Juliano L. & Prado Es. (1991). *Anal Biochem* 192 (2), 419-425.
- Cohen Fé., Gregoret L.M., Amiri P., Aldape., Railey J. & McKerrow J.H. (1991). *Biochemistry* 30 (47), 11221-11229.
- Craik, C. S.; Roczaniak, S.; Largman, C. and Rutter, W.J. (1987). The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science* 237, 909-913.
- Desnuelle, P. (1960). Chymotrypsin. In: *The Enzymes*, vol 4. New York: Academic Press, 93-118.
- Duan, X., Li, X., Xue, Q., Abo-el-Saad, M., Xu, D. and Wu R. (1996). Transgenic rice plants harboring and introduced potato proteinase inhibitors II gene are insect resistant. *Nat. Biotech.* 14, 494-498.
- Ferreira, C. and Terra, W.R. (1989) Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochem.* 19, 383-391.
- Ferreira, C., Capella, A.N., Sitnik, R. and Terra, W.R. (1994b). Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26, 299-313.
- Fersht, A.R. (1995). Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implicatios. *Proc Natl Acad Sci.* 21;92(24):10869-73.
- Foster T. (1948). Intermediate molecular energy migration and fluorescence. *Ann Phys* 2, 55.
- Fukal L., & Kasafirek E. (1988). *Biotechnol Appl Biochem* 10 (5), 473-475.
- Gatehouse, A.M., Norton, E., Davison, G.M., Babbe, S.M., Newell, C.A. and Gatehouse, J.A. (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.
- Gauthier F., Mureau T., Lalmanach G., Brillard-Bourdet M., Ferrer-Di Martino M. & Juliano L. (1993) *Arc Biochem Biophys* 306, 304-308.
- Gillot, C.; (1995). *Entomology* 2nd ed. Plenum Press, New York. 798 pp.

- Girard, C., Picard-Nizou, A.L., Grallien, E., Zacommer, B., Jouanin, L. and Pham-Delegue, M.H. (1998). Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic res.* 7, 239-246.
- Graf, L., Jancso, A., Szilagyi, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradsky, K. and Rutter, W.J. (1988). Electrostatic complementarity within the substrate binding pocket of trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4961-4965.
- Hamdaoui, A., Schoofs, L. and De Loof, A. (1997). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 357-360.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501-4523.
- Hill, R.L. (1965). Hydrolysis of proteins. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol.20. New York: Academic Press, 68-74.
- Jany, K. D.; Pfleider, G. and 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.
- Jany, K.D., Haug, H. and Ishay, J. (1978b). Trypsin-like endopeptidases from midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabo*. *Insect Biochem.* 8, 221-230.
- Jany, K. D.; Bekelar, K.; Pfleider, G. and 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.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G. and Ryan, C. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9871-9875.
- Johnston, K.A., Gatehouse, J.A. and Anstee J.H. (1993). Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.* 39, 657-664.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D. and Stiekema, W.J. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8041-8045.
- Jongsma, M. A. and Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plants protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.
- Krystal, G.; MacDonald, C.; Munt, B. and Ashwell, S. (1985). A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Anal Biochem.* 148, 451-460.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 608-685.
- Lam, W., Coast, G.M. and Rayne, R.C. (1999). Isolation and characterisation of two chymotrypsins from midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 29(7), 653-660.
- Lee, M. J. and Anstee, J. H. (1995). Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *insect biochem. Physiol.* 43, 885-895.
- Lopes, A.R., Juliano, M.A., Marana, S.R., Juliano, L. and Terra W.R. Manuscrito em preparação. Evolutionary trends in substrate specificity of insect trypsin.
- Lopes, A.R. and Terra, W.R. (2003). Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta Americana* (Dictyoptera) adults. *Insect biochem. Mol. Biol.* 33, 407-415.
- Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L. and Terra W.R. (2004). Coevolution of insect trypsin and inhibitors. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 55, 140-152.
- Lopes, A.R. (2004). Serina endopeptidases de insetos e a interação inseto-plantas. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química. USP, São Paulo.
- Malik, Z., Amir, S., Pál, G. (1999). Proteinase inhibitors from desert locust, *Schistocerca gregaria*: engineering of both P1 and P1' residues converts a potent chymotrypsin inhibitor to a potent trypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 1434, 143-150.
- Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C. and Terra W.R. (2002). Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 494-497.
- Mazumdar-Leighton, S.; Babu, C.R. and Bennett, J. (2000). Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midgus of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 57-68.
- Mazumdar-Leighton, S. and Brodway, R. M. (2001). Transcriptional induction of diverse midgut trypsin in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31, 645-657.
- McManus, M.T., White, D.W.R. and McGregor P.G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Res.* 3, 50-58.
- Meldal, M. and Breddam, K. (1991). *Anal Biochem* 195, 141-147.
- Momoli, M.M.; Lopes, A.R. and Terra, W.R. (2002). Purification and characterization of chymotrypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) and partial isolation of

- chymotrypsin from *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera). In: Programas e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq; pp35.
- Muharsini, S.; Dalrymple, B.; Vuocolo, T.; Hamilton, S.; Willadsen, P. and 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, 1029-1040.
- Nakakure, N., Hietter, H., Van Dorsselaer, A. and Luu B. (1992). *Eur. J. Biochem.* 204, 147-153.
- Neurath, H. (1957). The activation of zymogens. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol. 12. New York: Academic Press, 319-386.
- Oliveira, M.C.F., Hirata, I.Y., Chagas, J.R., Boschcov, P., Gomes, R.A.S., Figueiredo, A.F.S. and Juliano, L. (1992). Intramolecular quenched fluorogenic peptide substrate for human renin. *Analytical Biochem.* 203, 39-46.
- Oppert, B., Morgan, T.D., Culbertson C. and Kramer K.J. (1993). Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 379-385.
- Panda, N. and Khush, G.S. (1995). *Host plant resistance to insects*. CAB International, Wallingford.
- 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.M.S., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T., Parra, J.R., Terra, W.R and Silva-Filho, M.C. (2000). Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *J. Econ. Entomol.* 93(3), 892-896.
- Perona, J.J. and Craif, C.S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteinases. *Protein Sci.* 4, 337-360.
- Peterson, A.M., Fernando, G.J.P., Wells, M.A. (1995). Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from midgut of *Manduca sexta*. *Insect biochem. Mol. Biol.* Vol. 25, 7, 765-774.
- Sakal, E., Applebaum, S.W. and Birk, Y. (1988). Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. *Int. J. Peptide. Res.* 32, 590-598.
- Schellenberger, V., Braune, K., Hofman, H.J. and Jakubke, H.D. (1991). The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *Eur. J. Biochem.* 199, 623-636.
- Schellenberger, V., Turck, C.W. and 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*. *Biochem.* 33, 4251-4257.
- Shah, D. M.; Rommens, C.M.T. and Beachy, R. N.; (1995). Resistance to disease and insect in transgenic plants: progress and application to agriculture. *Tibtech.* 13, 362-368.
- Shaw, E., Mares-Guia, M. and 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. *Biochem.* 4, 2219-2224.
- Schechter, I and Berger, A. (1967). On the size of active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.
- Steitz, T.A., Henderson, R. and 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.
- Terra, W. R. and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62.
- Wheller, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D. and Carpenter, J.M. (2001). The phylogeny of the extant hexapode orders. *Cladistics* 17, 113-169.
- Whitworth, S. T.; Blum, M. S. and 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.
- Zhu, Y. C.; Oppert, B., Kramer, K. J.; McGaughey, W. H. and Dowdy, A. K. (1997). cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 1027-1037.