UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**“PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CLONAGEM E
SEQÜENCIAMENTO DE β -GLICOSIDASES DE
TENEBRIO MOLITOR (COLEOPTERA).”**

ALEXANDRE HAMILTON PEREIRA FERREIRA

TESE DE DOUTORADO

DRA. CLÉLIA FERREIRA TERRA

ORIENTADORA

SÃO PAULO – SP

2001

**“Purificação, Caracterização, Clonagem e
Sequenciamento de β -Glicosidasas Digestivas
de *Tenebrio molitor* (Coleoptera)”**

ALEXANDRE HAMILTON PEREIRA FERREIRA

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

Aprovado por:

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ - USP

Prof. Dr. ANTONIO GILDO DE BIANCHI
IQ - USP

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS LEONE
FFCL - RP - USP

Prof. Dr. JOÃO ATÍLIO JORGE
FFCL - RP - USP

SÃO PAULO
14 DE MARÇO 2001.

Aos meus pais
Sônia e Hamilton

AGRADECIMENTOS

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

À professora Dra. Clélia Ferreira pela amizade e a pronta orientação durante o meu doutorado.

Ao professor Dr. Walter Ribeiro Terra pela discussão e ajuda na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Alberto de Freitas Ribeiro e aos técnicos Waldir Caldeira e Márcio Valentin Cruz pela contribuição no estudo de imunocitoquímica.

À professora Dra. Ana Cláudia R. da Silva e à técnica Izaura Nobuko Toma pela contribuição na técnica de seqüenciamento de DNA.

Ao professor Dr. Massuo J. Kato e ao técnico Leandro Ribeiro Latorre pela contribuição na realização da técnica de espectrometria de massa.

Às técnicas Luiza Nakabayashi e Maria Ivanilde Marcelino pelo auxílio prestado na realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório: Adriana Rios Lopes, Alcides Batista Dias Jr., Ana Maria Fraga, Denise Taffarello, Érika Hotz Almeida, Fernando Ariel Genta, Lucas Blanes, Maria Cícera Pereira da Silva, Marisa Moura Momoli, Dr. Plínio Tadeu Cristofolletti, Renata Bolognesi, Sandra Cristina R. Costa, Dr. Sandro R. Marana e Tamara Rezende de Azevedo, pelas discussões, amizade e ajuda na realização desse trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química - USP pela manutenção das condições ótimas para a realização desse trabalho.

Aos muitos amigos do Instituto de Química – USP pelos valiosos momentos de distração e incentivo à realização desse trabalho.

À CNPq e FAPESP, pelas bolsas concedidas.

Durante a elaboração desse trabalho o laboratório contou com auxílios concedidos pela FAPESP, CNPq e PRONEX.

RESUMO

No lúmen do intestino médio da larva de *Tenebrio molitor* existem 4 β -glicosidases (denominadas 1, 2, 3a e 3b), que não estão presentes na comida do animal. Elas foram purificadas usando-se técnicas de eletroforese e cromatografias de troca iônica e interação hidrofóbica.

A β -Glicosidase 1 (Mr 59.000) é instável a 30 °C mas é estabilizada na presença do substrato. Ela praticamente não tem atividade sobre galactosídeos e cliva di- e oligossacarídeos. A enzima possui apenas 1 sítio ativo que apresenta 4 subsítios para ligação de glicose. Seu papel fisiológico deve ser o da clivagem de oligo- e principalmente dissacarídeos.

A β -Glicosidase 2 (Mr 67.000) é muito instável a 30°C e hidrolisar com maior eficiência galactosídeos sintéticos, cliva muito mal lactose e é incapaz de clivar glucosídeos. Ela apresenta dois sítios ativos sendo que um deles cliva MU β Dgal e lactose, que é ativado por Triton X-100, enquanto o outro não é ativado pelo detergente e hidrolisa NP β Dgal e NP β Dfuc. O papel fisiológico para esta enzima não está claro, mas imagina-se que ela esteja envolvida na digestão de glicolipídeos.

As β -Glicosidases 3a e 3b (Mr 59.000) parecem ser isoformas, uma vez que elas têm parâmetros cinéticos semelhantes, perfis de eluição, de peptídeos gerados por clivagem proteolítica, em HPLC idênticos e a mesma sequência de aminoácidos para um peptídeo interno comum. Um anticorpo específico produzido contra a β -Glicosidase 3a reconhece a β -Glicosidase 3b, mas não reconhece as β -Glicosidases 1 e 2. Dois clones foram obtidos usando esse anticorpo para selecionar uma biblioteca de cDNA obtida dos mRNAs do intestino médio de *Tenebrio molitor*. O resultado final mostrou um cDNA de 1.570 pb codificando para uma proteína madura de 485 aminoácidos. As proteínas codificadas pelos dois cDNAs têm somente 4 aminoácidos de diferentes e podem corresponder às β -Glicosidases 3a e 3b. As sequências mostraram uma alta similaridade com proteínas da família 1 de glicosídeo hidrolases e codificam todos os peptídeos sequenciados a partir da clivagem das β -Glicosidases 3a e 3b purificadas. Através de imunocitocalização usando o anticorpo que reconhece as β -Glicosidases 3a e 3b, foi mostrado que essas são secretadas na parte posterior do intestino médio por uma via exocítica. Essas enzimas tem quatro subsítios para a ligação da glicose e podem hidrolisar di- e oligossacarídeos, alquil glicosídeos e glicosídeos tóxicos de plantas. Experimentos de competição entre substratos, mostraram que elas têm só um sítio ativo responsável para a hidrólise de todos os substratos. Seu papel deve ser principalmente a digestão intermediária de hemiceluloses e celulose.

Palavras chave: insetos, digestão, *Tenebrio molitor*, enzimas digestivas, β -glicosidases, cinética enzimática.

SUMMARY

In the midgut lumen of *Tenebrio molitor* larvae there are 4 β -glycosidases (named 1, 2, 3a and 3b), not present in the animal food. They were purified with electrophoresis, ion exchange and hydrophobic chromatographies.

β -glycosidase 1 (relative molecular weight - Mr 59,000) is unstable at 30 °C but is stabilized by substrates. The enzyme hydrolyses di- and oligoglucosides and has a residual activity against galactosides. It has 4 subsites for glucose binding in the active site and its physiological role is the hydrolysis of oligo- and mainly disaccharides.

β -glycosidase 2 (Mr 67,000) is unstable at 30 °C and hydrolyses efficiently only synthetic galactosides, has poor activity against lactose and is unable to use glucosides as substrates. This enzyme has two active sites. One of them is activated by Triton X-100 and hydrolyses MU β Dgal. The other active site is not activated by the detergent and act upon NP β Dgal and NP β Dfuc. The physiological role of this enzyme may be the digestion of galactolipids.

The β -glycosidases 3a and 3b (Mr 59,000) are likely isoforms, since they have similar kinetic parameters, identical HPLC peptide elution patterns after proteolytic cleavage and the same amino acid sequence of an internal peptide. A specific antibody raised against β -glycosidase 3a recognizes β -glycosidase 3b, but not β -glycosidase 1 and 2. Two clones were obtained screening a cDNA library, from *Tenebrio molitor* midgut mRNA, with this antibody. The final result showed a cDNA of 1,570 pb coding for 485 amino acids in mature protein. The protein sequences showed high similarity with family 1 glycoside hydrolases and have the same amino acid sequence determined for peptides obtained after proteolytic hydrolysis of β -glycosidase 3a and 3b. The immunocytolocalization with this antibody showed that β -glycosidase 3a and 3b are secreted by exocytosis of small vesicles present in posterior midgut. These enzymes have four subsites for glucose binding and can hydrolyse di- and oligosaccharides, alkyl glucosides and toxic plant glucosides. Substrate competition experiments showed that they have only one active site responsible for the hydrolysis of all substrates. Their role may be mainly the intermediate digestion of hemicelluloses and cellulose.

LISTA DE ABREVIACÕES

AP β Dglu	para aminofenil beta D glicopiranosídeo
APS	persulfato de amônio
BLAST	“Basic Local Alignment Search”
BSA	albumina sérica bovina
CAPS	(3-[ciclohesilamino]-1-ácido propanosulfônico)
CMC	concentração micelar crítica
DTT	ditiotreitol
DEPC	dietilpirocarbonato
DO ₆₀₀	absorbância a 600 nm.
EDTA	etilenodiaminotetracetato de sódio
fenil β Dglu	fenil beta D glicopiranosídeo
FPLC	“Fast Protein Liquid Chromatography”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
indoxil β Dglu	indoxil beta D glicopiranosídeo
IPTG	isopropiltiol beta D galactopiranosídeo
IUB	“International Union of Biochemistry”
k _{cat}	constante catalítica
K _i	constante de inibição
k _{int}	constante catalítica intrínseca
K _m	constante de Michaelis
K _s	constante de dissociação
LB	meio de cultura de Luria-Bertani
LPH	lactase-florizina hidrolase
MOPS	ácido morfolinopropano sulfônico
Mr	massa molecular relativa
mRNA	RNA mensageiro
mU	miliunidades
MU β Dgal	metilumbeliferil beta D galactopiranosídeo
MU β Dglu	metilumbeliferil beta D glicopiranosídeo
NO β Dglu	orto nitrofenil beta D glicopiranosídeo
NP β Dcelobiosídeo	para nitrofenil beta D celobiosídeo
NP α Lara	para nitrofenil alfa L arabinopiranosídeo
NP β Lara	para nitrofenil beta L arabinopiranosídeo
NP β Dfuc	para nitrofenil beta D fucopiranosídeo
NP β Dgal	para nitrofenil beta D galactopiranosídeo
NP β Dglu	para nitrofenil beta D glicopiranosídeo
NP β Dgluc	para nitrofenil beta D glicoronídeo
NP β Dman	para nitrofenil beta D manopiranosídeo
NP β Dxil	para nitrofenil beta D xilopiranosídeo
NZ-amina	caseína hidrolisada enzimaticamente
NZY	meio de cultura com NZ-amina
ONSA	“Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis”
PBS	tampão fosfato salina
PBS-BSA	tampão fosfato salina contendo albumina sérica bovina
PCR	reação em cadeia da polimerase

PEG	polietileno glicol
pb	pares de bases
pfu	unidades formadoras de placa
pI	ponto isoeletrico
PIPES	Piperazina-N'N'-bis(2-etano ácido sulfônico)
PM	peso molecular
poli(A) ⁷	presença de poliadenilação
PTH	fenilisotiocianato
PVDF	polivinilideno difluoreto
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SBTI	inibidor de tripsina de soja
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SM	meio de suspensão
TAE	Tampão tris acetado EDTA
TBS	Tampão tris salina
TBS-BSA	Tampão tris salina com albumina sérica bovina
TLC	cromatografia em camada delgada
Tris	tris(hidroximetil) amino metano
V _{max}	Velocidade máxima
Xgal	5-bromo-4-cloro-3-indoyl beta D galactopiranosídeo

ÍNDICE DE TEXTO

1	INTRODUÇÃO	1
1.01	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1.02	ESTRUTURA DO TUBO DIGESTIVO DOS INSETOS	2
1.03	O PH DO TUBO DIGESTIVO E SUA IMPORTÂNCIA NA DIGESTÃO DO ALIMENTO PELOS INSETOS	4
1.04	ESTRUTURA DO TUBO DIGESTIVO E ORGANIZAÇÃO DO PROCESSO DIGESTIVO EM <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	6
1.05	SECREÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS EM <i>TENEBRIO MOLITOR</i> E OUTROS INSETOS	9
1.06	β -GLICOSIDASES	12
1.06.1	<i>Nomenclatura das glicosídeo hidrolases</i>	12
1.06.2	<i>β-Glicosidases de mamíferos</i>	14
1.06.3	<i>β-Glicosidases de insetos</i>	16
1.07	IMPORTÂNCIA DAS β -GLICOSIDASE	19
1.07.1	<i>As glicosidases, os glicosídeos tóxicos e a interação inseto-planta</i>	19
1.07.2	<i>Uso de β-glicosidases na síntese de glicosídeos</i>	21
1.08	CLASSIFICAÇÃO DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES DE ACORDO COM SUA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA	24
1.09	MECANISMO DE CATÁLISE DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES	27
1.10	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS GLICOSÍDEO HIDROLASES E SUA EVOLUÇÃO	32
1.11	OBJETIVOS DESTE TRABALHO	35
2	MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.01	ANIMAIS	36
2.02	PREPARAÇÃO DO MATERIAL PRESENTE NO CONTEÚDO LUMINAL DO INTESTINO MÉDIO	36
2.03	PREPARAÇÃO DO MATERIAL SOLÚVEL DE FARELO DE TRIGO	37
2.04	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	37
2.05	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
2.06	DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE	38
2.07	DIÁLISE	38
2.08	FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA	38
2.09	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA PARA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNA	39
2.09.1	<i>Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)</i>	39
2.09.2	<i>Eletroforese em condições nativas (PAGE)</i>	40
2.09.3	<i>Eletroforese preparativa</i>	40
2.10	DETECÇÃO DE PROTEÍNA E ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE NOS GÉIS	40
2.11	CÁLCULO DO PESO MOLECULAR ATRAVÉS DE ELETROFORESE	41
2.12	CROMATOGRAFIAS	41
2.12.1	<i>Cromatografia para dessalinização de amostra</i>	41
2.12.2	<i>Cromatografia de troca iônica</i>	42
2.12.3	<i>Cromatografia de interação hidrofóbica</i>	42
2.12.4	<i>Cromatografia de gel filtração</i>	43
2.13	PURIFICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE 1	43
2.14	PURIFICAÇÃO DA β -GLICOSIDASE 2	44
2.15	PURIFICAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES 3A E 3B	44
2.16	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DAS ENZIMAS PURIFICADAS	45

2.17	TENTATIVAS DE ESTABILIZAÇÃO E EFEITO DE VÁRIOS COMPOSTOS NA ATIVIDADE DA β -GLICOSIDASE 1	45
2.18	ESTUDOS CINÉTICOS.....	46
2.19	CÁLCULOS DA AFINIDADE DOS SUBSÍTIOS	47
2.20	DETECÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSGLICOSILAÇÃO.....	47
2.21	PADRÃO DE AÇÃO PARA A CLIVAGEM DE LAMINARINA	48
2.22	DISTRIBUIÇÃO DE β -GLICOSIDASES NO INTESTINO MÉDIO DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	48
2.23	PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL	49
2.24	WESTERN BLOT	50
2.25	TRANSFERÊNCIA DAS β -GLICOSIDASES DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i> PARA MEMBRANA DE PVDF.....	51
2.26	DETERMINAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS β -GLICOSIDASES DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	52
2.27	MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE BACTÉRIA E TAMPÕES USADOS NAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	52
2.28	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE INTESTINO MÉDIO E DETECÇÃO POR ELETROFORESE.....	52
2.29	CONFEÇÃO DE BIBLIOTECA DE CDNA DE INTESTINO MÉDIO DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i> ...	53
2.30	PLAQUEAMENTO E SELEÇÃO PRIMÁRIA NA BIBLIOTECA DE CDNA	54
2.31	SELEÇÃO SECUNDÁRIA DOS CLONES POSITIVOS	55
2.32	EXCISÃO <i>IN VITRO</i> DO PLASMÍDIO BLUESCRIPT.....	55
2.33	REAÇÃO EM CADEIA COM DNA POLIMERASE EM TERMOCICLADOR (PCR).....	56
2.34	LIGAÇÃO DO FRAGMENTOS DE DNA A PLASMÍDIOS VETORES	57
2.35	PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES.....	57
2.36	TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES	58
2.37	PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIOS A PARTIR DE CULTURA DE BACTÉRIAS.....	58
2.38	DIGESTÃO DE DNA USANDO A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>ECORI</i>	58
2.39	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	59
2.40	COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS E ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE SEQUÊNCIAS	59
2.41	IMUNOCITOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	59
2.42	IMUNOCITOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL	60
3	RESULTADOS.....	61
3.01	COMPARAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i> COM AS ENZIMAS PRESENTES EM SUA DIETA	61
3.02	A β -GLICOSIDASE 1 DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	61
3.02.1	<i>Purificação da β-Glicosidase 1</i>	61
3.02.2	<i>Estabilidade da β-Glicosidase 1</i>	67
3.02.3	<i>Especificidade da β-Glicosidase 1</i>	70
3.03	A β -GLICOSIDASE 2 DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	75
3.03.1	<i>Purificação da β-Glicosidase 2</i>	75
3.03.2	<i>Especificidade da β-Glicosidase 2</i>	81
3.04	AS β -GLICOSIDASES 3A E 3B DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	86
3.04.1	<i>Purificação das β-Glicosidases 3a e 3b</i>	86
3.04.2	<i>Caracterização física das 3a e 3b</i>	90
3.04.3	<i>Comparação de peptídeos entre as β-Glicosidases 3a e 3b</i>	95
3.04.4	<i>Especificidade das β-Glicosidases 3a e 3b</i>	98
3.04.5	<i>Caracterização do sítio ativo das β-Glicosidases 3a e 3b</i>	102

3.04.6	Clonagem e seqüenciamento das β -Glicosidases 3a e 3b	107
3.04.7	Imunocitocalização das β -Glicosidases 3a e 3b de <i>Tenebrio molitor</i>	116
3.04.8	Distribuição de atividade de β -glicosidase no intestino médio de <i>Tenebrio molitor</i>	119
4	DISCUSSÃO	119
4.01	ORIGEM E LOCAL DE AÇÃO DA β -GLICOSIDASES DIGESTIVAS EM <i>TENEBRIO MOLITOR</i> ..	119
4.02	PURIFICAÇÃO DAS β -GLICOSIDASES DIGESTIVAS DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	123
4.03	ESPECIFICIDADE DA β -GLICOSIDASE 1	124
4.04	CARACTERÍSTICAS DA β -GLICOSIDASE 2	125
4.05	ESPECIFICIDADE DAS β -GLICOSIDASES 3A E 3B	126
4.06	ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DAS β -GLICOSIDASES 3A E 3B	128
4.07	SECREÇÃO DAS β -GLICOSIDASES 3A E 3B	133
4.08	PAPEL DAS β -GLICOSIDASES DIGESTIVAS DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	134
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
6	CURRICULUM VITAE	146

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

1 TABELAS

TABELA 01	65
TABELA 02	71
TABELA 03	73
TABELA 04	77
TABELA 05	79
TABELA 06	82
TABELA 07	84
TABELA 08	88
TABELA 09	99
TABELA 10	103

2 FIGURAS

FIGURA 01	3
FIGURA 02	14
FIGURA 03	28
FIGURA 04	29
FIGURA 05	33
FIGURA 06	35
FIGURA 07	62
FIGURA 08	64
FIGURA 09	66
FIGURA 10	68
FIGURA 11	69
FIGURA 12	74
FIGURA 13	76

FIGURA 14 78

FIGURA 15 80

FIGURA 16 85

FIGURA 17 87

FIGURA 18 89

FIGURA 19 91

FIGURA 20 92

FIGURA 21 94

FIGURA 22 96

FIGURA 23 97

FIGURA 24 101

FIGURA 25 105

FIGURA 26 106

FIGURA 27 108

FIGURA 28 110

FIGURA 29 112

FIGURA 30 113

FIGURA 31 114

FIGURA 32 117

FIGURA 33 118

FIGURA 34 120

FIGURA 35 121

FIGURA 36 129

1 Introdução

1.01 Considerações iniciais

Os insetos representam um grupo de animais que passou a ocupar os mais diversos nichos ecológicos durante a sua longa história evolutiva. Isso resultou em uma irradiação de diversidade muito grande, no que diz respeito a aspectos morfológicos e fisiológicos, nesse grupo de animais. Por isso, generalizações não podem ser feitas a partir do estudo de apenas uma ordem de inseto. Dessa forma, para a compreensão de uma determinada característica em insetos é necessário que se estude várias ordens e, muitas vezes, diferentes espécies de uma mesma ordem.

O número de espécies de insetos é estimado em 1 milhão, (Barnes & Rupert, 1996). Das espécies vivas de animais conhecidas, cerca de 70 % são insetos. Uma das características que levaram os insetos a tamanho sucesso evolutivo foi a sua capacidade de minimizar a competição intraespecífica, adotando hábitos alimentares distintos quando larva e quando adulto. Outro fator importante para esse sucesso foi a capacidade de dispersão desse grupo que se deve a capacidade desses de se adaptar a novos ambientes.

Existem diversas ordens de insetos, sendo que os coleópteros são os que mais se destacam com relação ao número de espécies. Cerca de 40 % dos insetos e 30 % dos animais são besouros (Richards & Davis, 1977). A possível explicação para o número tão grande desses animais talvez esteja no fato de que eles foram o primeiro grupo de holometábolos a evoluir e, assim, puderam ocupar os nichos ecológicos abundantes que antes estavam desocupados. Provavelmente os besouros retiveram várias das suas características primitivas devido a este sucesso prematuro. Características essas que tem levado alguns taxonomistas a classificá-los entre as ordens ortopteróides. Assim, os besouros são provavelmente o grupo ideal para se procurar as origens evolucionárias dos sofisticados sistemas digestivos encontrados entre Diptera e Lepidoptera. Um dos mais bem conhecidos besouros é o *Tenebrio molitor*, que é uma importante praga cosmopolita de alimentos estocados. Esse inseto tem sido o objeto de numerosos estudos sobre fisiologia digestiva e nutrição. Além disso, algumas enzimas digestivas, como amilase e tripsina, têm sido purificadas e caracterizadas. Porém, existem numerosas questões ainda a serem resolvidas a respeito da fisiologia e bioquímica da digestão nesse inseto.

O fato dos insetos serem muito bem sucedidos na ocupação de novos nichos ecológicos, deve-se, entre outras coisas, à sua capacidade de alimentar-se de variadas dietas e também a sua capacidade de readaptar-se a cada nova estratégia desenvolvida pelas plantas no sentido de

diminuir a predação realizada por esses animais. Essas características tornaram os insetos objetos de estudo extremamente interessantes.

Um maior conhecimento sobre as propriedades das enzimas digestivas (que diferem entre os vários grupos de insetos) e sobre a sua distribuição no canal alimentar, pode auxiliar no planejamento da produção de novas plantas transgênicas para o controle de pragas (para revisão ver Schuler *et al.*, 1998). Outros métodos de controle podem ser visualizados usando o conhecimento crescente sobre digestão em insetos.

Ultimamente, têm sido produzidas plantas transgênicas que expressam inibidores de enzimas digestivas e toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Hilder *et al.*, 1987; Shade *et al.*, 1994; Alstad & Andow, 1995; Jouanin *et al.*, 1998) para o controle de pragas. As toxinas de *Bacillus thuringiensis* foram usadas inicialmente contra Lepidoptera, Diptera e Coleoptera e agora seu espectro de ação expandiu-se para outras ordens (ver Bauer, 1995). Recentemente, observou-se no campo o desenvolvimento de resistência à toxina de *Bacillus thuringiensis*. Essa resistência já havia sido demonstrada em laboratório, onde se verificou que ela tem bases genéticas. Os experimentos mostram também, que a seleção para uma ou mais toxinas de *Bacillus thuringiensis* causa resistência para as outras toxinas (ver Bauer, 1995). A observação de que os insetos adquirem resistência também a plantas transgênicas, reforçou a idéia de que técnicas diversificadas de ataque as pragas devem ser utilizadas e que a eficácia dessas plantas só será preservada aumentando outros fatores de mortalidade (Mc Gaughey & Whalon, 1992; Bauer, 1995).

1.02 Estrutura do tubo digestivo dos insetos

Um esquema geral do intestino dos insetos está apresentado na Figura 01 (para maiores detalhes ver Chapman, 1985). O intestino anterior começa na boca e inclui a cavidade bucal (no qual as glândulas salivares liberam sua secreção), a faringe, o esôfago e o papo. O papo é um órgão de estoque e, em alguns insetos, também serve como um sítio para a digestão. O intestino anterior é coberto por cutícula e em alguns casos ele pode ser reduzido a um pequeno tubo. O proventrículo pode ser um órgão triturador em alguns insetos e, na maioria das espécies, costuma desempenhar um papel de válvula para entrada do alimento no intestino médio.

O intestino médio representa a porção mais importante do intestino na digestão do alimento pelos insetos. Ele consiste de um tubo simples que pode apresentar extensões em forma de sacos com fundo cego, presentes normalmente no início do intestino médio, denominados de cecos gástricos. Na maioria dos insetos, no interior do intestino ocorre uma estrutura

membranosa, em forma de tubo, de constituição quitino-proteica. Essa membrana é denominada de membrana peritrófica e divide o lúmen do intestino médio em dois espaços: um dentro da membrana, denominado espaço endoperitrófico, e outro entre a membrana e o epitélio do intestino médio, denominado ectoperitrófico. Na região do esfíncter que separa o intestino médio e o posterior, o piloro, desembocam os tubos de Malpighi, estruturas responsáveis pela excreção nesses animais.

Figura 01 - Esquema geral do tubo digestivo dos insetos. Copiado de Terra & Ferreira (1994).

O intestino posterior, como o anterior, também é coberto por uma cutícula. Ele inclui o íleo e o reto, que são estruturas envolvidas na absorção de água, e termina no reto. Em alguns insetos essa estrutura é reduzida a um tubo fino, em outros ele pode ser modificado em câmaras de fermentação ou rume. Nessas duas ocorre a presença de microorganismos que podem ajudar na digestão da celulose.

O epitélio que reveste o intestino médio é formado por uma camada simples de células de diferentes tipos. As células colunares são o tipo mais abundante e podem apresentar diferentes formas (Ribeiro *et al.*, 1990). Elas podem estar envolvidas na absorção e secreção de água, na secreção de enzimas, na digestão através de enzimas ligadas à membrana microvilar e na absorção de nutrientes. Células regenerativas são encontradas na região basal do epitélio inserida entre os outros tipos celulares. É encontrado um tipo celular, cuja função ainda não está esclarecida, que Chapman (1985) sugere possa estar envolvida em uma regulação endócrina das funções do intestino médio. São encontrados também outros tipos especializados de células

como: Células caliciformes, encontradas em lepidópteros e responsáveis pelo transporte ativo de íons potássio da hemolinfa para o lúmen do intestino (Harvey *et al.*, 1983); células oxínticas, que se acredita estarem envolvidas no bombeamento de prótons dentro do lúmen do intestino médio de larvas de dípteros *Cyclorhapha* (Terra *et al.*, 1988).

1.03 O pH do tubo digestivo e sua importância na digestão do alimento pelos insetos

Como revisado por Terra & Ferreira (1994) o pH luminal das diferentes regiões do intestino dos insetos em geral corresponde ao pH ótimo das enzimas encontradas nas respectivas regiões. O pH do conteúdo do intestino é também o mais importante parâmetro afetando a atividade das enzimas digestivas. A manutenção de um certo valor de pH no tubo digestivo dos insetos é de muita importância na digestão do alimento por esses animais.

O intestino anterior em Dictyoptera, Orthoptera e Coleoptera é um importante sítio para a digestão do alimento, região essa que é abastecida com enzimas vindas do intestino médio (Terra, 1990). Isso explica o fato de que, nesses animais, o pH do intestino anterior é similar ao do intestino médio, contudo o pH pode ser um pouco mais ácido devido a uma contribuição da comida. Dos insetos que apresentam cecos gástricos, somente alguns podem ter o seu pH medido por apresentarem essa estrutura grande o suficiente. Os poucos valores de pH obtidos para os cecos gástricos mostram que essa estrutura possui um pH um pouco mais ácido do que o pH obtido para a região anterior do intestino médio. O conteúdo se mostra ácido na região anterior e quase neutro ou alcalino na região posterior do intestino médio em Dictyoptera, Orthoptera e a maioria das famílias de Coleoptera (Terra & Ferreira, 1994). Associado com esses gradientes de pH está a ocorrência de uma alta atividade de carboidrases na região anterior e uma alta atividade de proteases na região posterior do intestino médio. Essa regionalização da presença dessas enzimas provavelmente se deve a instabilidade das carboidrases na presença de enzimas proteolíticas (Terra, 1990). Como na maioria dos coleópteros, *Tenebrio molitor* apresenta um pH ácido na região anterior do intestino médio (pH = 5,6) e a região posterior tem o pH próximo à neutralidade (pH = 7,9) (Terra *et al.*, 1985).

Algumas famílias de coleópteros têm um pH uniformemente ácido em todo o intestino médio, o que pode representar uma divergência do estado ancestral. Até o momento não está claro que tipo de adaptação levou a essa situação, sendo essa condição observada em famílias onde a maioria das espécies alimenta-se de animais (Carabidae) ou de plantas (Cucujidae).

Famílias Scarabaeoidea (Scarabaeidae e Passalidae) de coleópteros tem um conteúdo intestinal muito alcalino, principalmente na porção média e posterior do intestino médio.

Imagina-se que o pH alcalino esteja envolvido na desorganização das fibras de celulose presentes no alimento ingerido pelos Scarabaeidae. A digestão da celulose, por sua vez, ocorre principalmente na câmara de fermentação (intestino posterior) através da ação provável de enzimas de origem bacteriana (Terra *et al.*, 1988; Terra, 1990).

Hemiptera e Hymenoptera apresentam um pH ácido no conteúdo do intestino médio, sendo que esses valores de pH decrescem a medida que se caminha para a porção posterior. Famílias de dípteros Nematocera (Sciaridae, Culicidae e Simuliidae) tem uma região anterior do intestino médio alcalina e uma região posterior menos alcalina. Essa alcalinidade deve ser necessária na digestão de alimentos por esses animais uma vez que esses se alimentam freqüentemente de materiais de difícil digestão, por exemplo o húmus. Já as famílias de dípteros Cyclorrhapha (Muscidae, Calliphoridae e Tephritidae) apresentam a porção anterior e posterior do intestino médio próximas da neutralidade e uma região média muito ácida. Acredita-se que o ancestral de Cyclorrhapha fosse saprófita e ingeria uma grande quantidade de bactérias durante a alimentação, hábito alimentar esse encontrado atualmente em Muscidae. A região média ventricular seria a responsável pela lise e digestão das bactérias contando com o auxílio de enzimas semelhantes a catepsina D e de uma lisozima ácida (Espinosa-Fuentes *et al.*, 1987; Lemos & Terra, 1991a e b). Essa região ácida também ocorre em grupos que apresentam hábitos alimentares diferentes do ancestral Cyclorrhapha, como os Calliphoridae que são carnívoros e os Tephritidae que se alimentam de frutas. Lepidópteros, por sua vez, apresentam um conteúdo do intestino médio muito alcalino especialmente na região média. Esses altos valores de pH podem ser uma adaptação de um ancestral de lepidóptero que se alimentava de folhas, para permitir a extração e digestão da hemicelulose das paredes celulares (Terra *et al.*, 1988).

Normalmente imagina-se que o pH do intestino médio seja resultado de uma adaptação de um inseto ancestral a uma dieta específica. Contudo, pode ocorrer também a adaptação de um inseto para o consumo de diferentes dietas mantendo as condições de pH do inseto ancestral. Dessa forma, não é necessário que exista uma correlação entre o pH do intestino médio e a dieta, como mostrado por Terra & Ferreira (1994).

Diversos exemplos têm mostrado que o processo digestivo em insetos deve ser estudado levando em conta não só a dieta do inseto de interesse, mas também considerando a história evolutiva do grupo ao qual ele pertence. Isso pode ser dito uma vez que os dados de distribuição de enzimas, padrão geral da digestão e da ultraestrutura do intestino médio correlacionam-se melhor com a posição filogenética do inseto do que com sua dieta (Terra *et al.*, 1988; Terra, 1990; Terra & Ferreira 1994). Assim, insetos dentro de um mesmo táxon e que apresentam

hábitos alimentares diferentes possuem a mesma organização geral da digestão. Em contraste, insetos apresentando um hábito alimentar semelhante, mas de grupos distintos, apresentam diferentes organizações espaciais da digestão, apesar da existência de numerosas características convergentes.

1.04 Estrutura do tubo digestivo e organização do processo digestivo em *Tenebrio molitor*

A morfologia geral do intestino de larvas de *Tenebrio molitor* e a maioria das características ultraestruturais das células do intestino médio já estão bem descritas na literatura (Koefoed & Zerahn, 1982; Berdan *et al.*, 1985; Koefoed, 1987; Cristofolletti *et al.*, 2001). Dando uma visão geral dessa estrutura, temos que larvas desenvolvidas de *Tenebrio molitor* (0,12 g de peso fresco) possuem um intestino medindo por volta de 27 ± 3 mm, sendo esse dividido em intestino anterior ($0,8 \pm 0,2$ mm), intestino médio (18 ± 2 mm) e o intestino posterior (8 ± 2 mm). A estrutura do intestino de *Tenebrio molitor* se mostra muito simples, sendo o intestino anterior reduzido a um pequeno tubo que encaminha o alimento ingerido para o intestino médio. O intestino médio apresenta aproximadamente o mesmo diâmetro ao longo de toda a sua extensão. Ele não apresenta cecos gástricos sendo apenas um tubo simples onde o conteúdo luminal encontra-se envolvido por uma membrana peritrófica. Nessa região do intestino encontra-se uma grande quantidade do protozoário simbiote gregarina. O intestino posterior é fino e alongado, não estando envolvido na manutenção de uma flora de microorganismos simbiotes.

Como determinado por Terra *et al.* (1985) a passagem da comida por todo o tubo digestivo demora cerca de 135 minutos em larvas crescidas (de aproximadamente 0,12 g de peso fresco). Foram também determinadas a distribuição no tubo digestivo e as propriedades de diversas hidrolases como: amilase, aminopeptidase, celulase, α -glucosidase, β -glucosidase e tripsina. Essas enzimas se mostraram estáveis a até 140 min de incubação em meios tamponados em pH 5,6 e 7,9 a 25 °C. Esse resultado mostra que essas enzimas são estáveis nas condições encontradas no lúmen do intestino médio de *Tenebrio molitor*.

A glândula salivar de *Tenebrio molitor* parece não conter enzimas digestivas, sendo a maior parte dessas enzimas encontradas no intestino médio (Terra *et al.*, 1985). Apenas a atividade de celulase é recuperada em quantidade significativa no farelo de trigo usado na alimentação das larvas de *Tenebrio molitor*. Assim, praticamente todo processo digestivo deve ocorrer sob a ação das hidrolases secretadas pelo intestino médio, como é comum em insetos. Não é encontrado também nenhum tipo de ativador ou inibidor nas células dos tubos de

Malpighi, nem nas células nem no conteúdo do intestino médio de *Tenebrio molitor*, que possam afetar a atividades das hidrolases (Terra *et al.*, 1985).

A aminopeptidase é restrita ao tecido da região posterior do intestino médio onde está ligada à membrana plasmática que cobre a superfície das microvilosidades (Terra *et al.*, 1985; Ferreira *et al.*, 1990). A pequena quantidade de enzima presente no conteúdo do intestino médio pode ser devido a contribuição da aminopeptidase presente no alimento ou pela contaminação dessa preparação com fragmentos de tecidos gerados durante a dissecação (Terra *et al.*, 1985). A atividade de celulase parece ser derivada de fungos que contaminam o farelo de trigo usado como alimento para as larvas de *Tenebrio molitor*, uma vez que essa atividade é encontrada somente no conteúdo da membrana peritrófica em quantidades semelhantes a celulase encontrada no farelo de trigo (Terra *et al.*, 1985). A aquisição de celulases de fungos pela alimentação parece ser um fenômeno largamente distribuído entre os insetos (Martin, 1983). Amilase, α -glicosidase, β -glicosidase, trealase e tripsina, quimotripsina e cisteína proteinases são secretadas no espaço ectoperitrófico e então passam para o espaço endoperitrófico onde promovem a digestão do alimento (Terra *et al.*, 1985). Calculando o diâmetro de diversas enzimas capazes de atravessar a membrana peritrófica de *Tenebrio molitor*, Terra *et al.* (1985) sugeriram que os poros dessa membrana devam ter um diâmetro de pelo menos 8 nm.

Dados de excreção de enzimas digestivas obtidas para *Tenebrio molitor* (Terra *et al.*, 1985) mostram que muito pouco da enzima secretada no intestino médio do inseto é perdida nas fezes. Esse resultado vem confirmar um mecanismo de recuperação de enzimas digestivas nesse animal. Mecanismo esse que envolve uma circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas no intestino dos insetos, promovida por um movimento de fluídos gerado por uma secreção de água da região posterior do intestino médio e uma absorção de água na região anterior (Terra & Ferreira, 1994).

Como mostrado no trabalho de Terra *et al.* (1985), todas as carboidrases que tiveram a sua distribuição determinada localizam-se principalmente na região anterior e média do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Assim, acredita-se que a digestão de carboidratos (celulose, amido e dissacarídeos) nesse animal ocorreria nessas regiões do intestino médio. Idéia essa reforçada pelo fato das carboidrases se encontrarem no pH onde a sua atividade é máxima nessa região do intestino médio (ver tópico 1.03). Nessa região é encontrada também uma cisteína proteinase (Terra & Cristofolletti, 1996) o que sugere que aí ocorre o início da digestão de proteínas. A maior parte da digestão de proteínas ocorreria na região posterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*, que concentra a maior parte da atividade de quimotripsina (Terra &

Cristofolletti, 1996), a tripsina (Terra *et al.*, 1985) e a aminopeptidase (Ferreira *et al.*, 1990). Ao contrário das carboidrases, a digestão final de proteínas ocorre na superfície das células do intestino médio uma vez que a aminopeptidase está restrita a essa região. O valor de pH (ver tópico 1.03) encontrado na região posterior (duas unidades acima da região anterior) leva a uma compartimentalização da digestão dos carboidratos e de proteínas, que está possivelmente relacionada a uma proteção das enzimas ligadas à digestão de carboidratos da hidrólise por proteases digestivas.

O intestino médio do *Tenebrio molitor* é coberto por um epitélio simples composto de células colunares. Nos primeiros dois terços do intestino médio (região anterior e médio do intestino médio) essas células são alongadas (altura, cerca de 54 μm ; largura, cerca de 5,3 μm) e apresentam longas microvilosidades (cerca de 4,1 μm). O epitélio tende a ficar ainda mais alto e alongado (altura, de 58 a 97 μm ; largura, de 4,2 a 2,8 μm) e com microvilosidades mais longas (cerca de 5 μm) ao longo da região posterior do intestino médio (Cristofolletti *et al.*, 2001). O epitélio do intestino médio é mais dobrado nas regiões anterior e média onde esse se encontra sobre uma lâmina basal muito grossa (cerca de 2 μm).

Células regenerativas e algumas poucas células endócrinas são vistas na região basal do epitélio ao longo de todo o intestino médio. Células endócrinas, que ocorrem em insetos de várias ordens, tipicamente mostram um citoplasma com uma grande quantidade de pequenas vesículas com conteúdo que pode ser claro ou escuro, e não possuem invaginações basais (Nishiitsuji-Uwo & Endo, 1981; Zitnan *et al.*, 1993; Raes & Verbeke, 1994). Em *Tenebrio molitor*, as células endócrinas mostram vesículas contendo conteúdo claro (Cristofolletti *et al.*, 2001).

Pode ser observado que algumas células do intestino médio, principalmente na região anterior, estão associadas com gregarinas. Essa associação parece não afetar a estrutura da célula do inseto (Cristofolletti *et al.*, 2001). As células das regiões anterior e média apresentam as membranas plasmáticas basais e a região basal das membranas plasmáticas laterais altamente invaginadas formando canais longos e finos com abertura para a lâmina basal (Cristofolletti *et al.*, 2001). Células contendo labirinto basal bem desenvolvido estão normalmente associadas à absorção de água (ver Terra *et al.*, 1988). Esse resultado confirma a proposição de Terra *et al.* (1985) que indica que em *Tenebrio molitor* a região anterior do intestino médio seria responsável pela absorção de água.

Nas regiões anterior e média do intestino médio aparecem células apresentando extrusões apicais (Cristofolletti *et al.*, 2001), que estão dispostas em um padrão aproximadamente regular. No intestino posterior também ocorre esse tipo de célula, embora em uma quantidade bem menor. As células que apresentam as extrusões apicais mostram um labirinto basal menos desenvolvido (Cristofolletti *et al.*, 2001).

1.05 Secreção de enzimas digestivas em *Tenebrio molitor* e outros insetos

As primeiras hipóteses feitas a respeito do mecanismo de secreção de enzimas digestivas em insetos foram baseadas em observações citológicas em microscopia óptica. Nessa, foi observado células apresentando extrusões apicais que foram propostas como responsáveis pela secreção apócrina ou holócrina de enzimas digestivas. As células que não mostravam alterações citológicas foram ditas como estando em um estado quiescente (Wigglesworth, 1972). O uso do microscópio eletrônico mostrou que muitas células do intestino, ditas anteriormente como quiescentes, na verdade eram responsáveis por realizar secreção exocítica de enzimas digestivas (para revisão ver, Terra & Ferreira, 1994). Após essas observações, alguns autores mantiveram a interpretação inicial de que as extrusões apicais seriam uma forma de secreção apócrina, enquanto outros passaram a acreditar que essas extrusões estariam representando células morrendo durante a renovação do epitélio (Terra & Ferreira, 1994). Essa última hipótese foi reforçada pela observação de que essas células estavam localizadas longe dos ninhos de células regenerativas e, dessa forma, deveriam ser células velhas, sendo observado também que o citoplasma apical dessas células tinham uma aparência desestruturada.

Um avanço importante no estudo dos mecanismos de secreção de enzimas em insetos vieram dos dados de imunocitocalização das enzimas digestivas no epitélio do intestino médio para diversos insetos. Essas técnicas já foram empregadas em Lepidoptera e em Diptera, mostrando que o mecanismo de secreção das células do tubo digestivo desses animais varia com a região do intestino médio observada. Foi mostrado que em mosquitos adultos (Graf *et al.*, 1986), nas larvas de mosca (Jordão *et al.*, 1996a) e em larvas de Lepidoptera (Jordão *et al.*, 1999) a tripsina é secretada pela região posterior do intestino médio por meio de exocitose. Já na região anterior do intestino médio de larvas de lepidópteros essa enzima seria secretada por mecanismo microapócrino (Santos *et al.*, 1986; Jordão *et al.*, 1999). Secreção essa que consiste na eliminação de pequenas vesículas contendo membrana plasmática simples ou dupla que brotam do ápice das microvilosidades das células dessa região.

O intestino médio de *Tenebrio molitor* apresenta células mostrando extrusões apicais, principalmente na sua região anterior. Contrariando a idéia de que essas células representariam células sofrendo um processo de morte celular, tem sido mostrado que a secreção de amilase é feita por esse tipo de células através de uma via apócrina (Cristofolletti *et al.*, 2001). Essas células são marcadas fortemente no citoplasma apical pelo anticorpo específico para essa enzima. Por dados de imunocitocalização obtidos por microscopia eletrônica é possível detectar a presença de amilase em certas regiões do complexo de Golgi e dentro de grandes grânulos de secreção próximos ao ápice celular, onde o citoplasma mostra sinais de desorganização ultraestrutural (Cristofolletti *et al.*, 2001).

O dado imunocitoquímico está de acordo como o trabalho feito por Ferreira *et al.* (1990). Esses autores determinaram enzimas ligadas à membrana microvilar, enzimas associadas fracamente e fortemente ao glicocálix, enzimas presentes dentro ou ligadas à membrana de vesículas de diferentes tamanhos e, finalmente, enzimas ocorrendo livres no citossol. Para isso foram usados procedimentos de fracionamento celular por centrifugação diferencial. Os resultados obtidos sugerem que a amilase ocorreria em vesículas grandes no intestino anterior sendo encontrada na região posterior do intestino médio apenas associada com o glicocálix dos enterócitos. A soma desses resultados dá uma evidência forte de que ocorreria uma secreção apócrina de amilase na região anterior do intestino médio. Esse mecanismo apócrino contrastaria com o conhecido em vertebrados. Nesses animais, proteínas secretadas por vias apócrinas são transportadas dentro da célula sem a participação do complexo de Golgi e grânulos de secreção (Aumüller *et al.*, 1999), enquanto em *Tenebrio molitor* essas estruturas estão envolvidas (Ferreira *et al.*, 1990; Cristofolletti *et al.*, 2001).

Secreção não exocítica de enzimas digestivas em insetos já foi verificada também para outras ordens. Estudos de imunocitoquímica obtidos com adultos de *Stomoxys calcitrans* mostraram que vesículas contendo tripsina são descarregadas, juntamente com organelas celulares, pelas células da zona opaca. Isso sugere que essa enzima seria secretada por uma via holócrina (Jordão *et al.*, 1996b).

Se realmente ocorre uma secreção apócrina por células da região anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*, pode ser imaginado que as microvilosidades das células nessa região teriam um citoesqueleto menos rígido e mais fácil de ser removido do que das membranas microvillares das células do intestino posterior. Isso porque durante essa secreção deve ocorrer uma desorganização do citoplasma apical da célula, que leva ao desaparecimento das microvilosidades das células secretoras. Existem evidências de que essa afirmação seja correta.

Tem sido mostrado que microvilosidades da região anterior do intestino médio, preparadas por precipitação diferencial com cálcio, parecem perder o seu citoesqueleto. Isso pode ser dito uma vez que as atividades específicas de enzimas marcadoras nessas preparações são tão altas quanto membranas que foram tratadas com Tris hiperosmótico, tratamento esse descrito para retirar o citoesqueletos de microvilosidades (Jordão *et al.*, 1995). Em contraste, a região posterior do intestino médio de *Tenebrio molitor*, quando microvilosidades são submetidas a tratamento por Tris hiperosmótico, apresentam um incremento de três vezes na atividade específica de enzimas marcadoras em relação as preparações feitas por precipitação por cálcio (Jordão *et al.*, 1995).

Ferreira *et al.* (1990) mostraram por técnicas bioquímicas que no ventrículo posterior de *Tenebrio molitor* as enzimas ocorrem em pequenas vesículas. Cristofolletti *et al.* (2001) verificaram por técnicas de imunocitoquímica que a tripsina é secretada ao longo dessa região por exocitose a partir de pequenas vesículas que são encontradas principalmente ao redor do núcleo e no citoplasma apical da célula.

Pode ser dito, a partir dos dados obtidos até o presente, que as enzimas digestivas de insetos são normalmente secretadas por meio de exocitose na região posterior do intestino médio, enquanto que mecanismos alternativos podem ser observados na região anterior do intestino médio. Entre esses mecanismos alternativos encontrados na região anterior existiriam: (i) a secreção microapócrina de vesículas a partir das microvilosidades dos enterócitos, visto em *Erinnyis ello* (Santos *et al.*, 1986) e *Spodoptera frugiperda* (Jordão *et al.*, 1999) e (ii) a extrusão da região apical da célula por meio de uma secreção apócrina, vista em *Tenebrio molitor* (Cristofolletti, *et al.*, 2001). Com base apenas em dados morfológicos (como por exemplo em *Manduca sexta*, Cioffi, 1979) pode ser dito que o mecanismo de secreção microapócrina deva ser generalizado em Lepidoptera. Secreção apócrina é observada em alguns Orthoptera (Heinrich & Zebe, 1973) e em muitas outras espécies de Coleoptera além de *Tenebrio molitor* (Bayon, 1981; Silva & Souza, 1981; Baker *et al.*, 1984).

A secreção apócrina e microapócrina de enzimas digestivas pelas células da região anterior do intestino médio de insetos, feita através da liberação de vesículas contendo enzimas, pode ser uma adaptação para aumentar a dispersão do conteúdo da vesícula no lúmen do intestino médio em uma região que apresenta tecidos envolvidos na absorção de água. O movimento de fluídos em direção às células da região anterior do intestino médio poderia diminuir a difusão uniforme de um material secretado por exocitose. Como na região posterior do intestino médio existem células secretoras de fluídos, não haveria problema na dispersão de enzimas secretadas por exocitose. Baseado em exemplos conhecidos nos tecidos absorptivos de

água do ventrículo, o mecanismo apócrino parece ocorrer em insetos representantes de ordens surgidas há mais tempo na evolução, enquanto que insetos de ordens mais recentes usariam um mecanismo microapócrino.

Entretanto existem exceções a essa regra. Em larvas de dípteros Cyclorrhapha (incluindo *Musca domestica*) não ocorre o mecanismo de secreção apócrino/microapócrino na região anterior da parte posterior do intestino médio, região essa que corresponde ao intestino médio dos outros insetos (Terra *et al.*, 1988). As células dos cecos gástricos do intestino médio do gafanhoto *Abracris flavolineata*, região responsável pela absorção de água nesse animal, secreta por exocitose grânulos compactos de material de secreção. Esse material é disperso longe das células que fizeram a secreção (Marana *et al.*, 1997), desempenhando assim as mesmas funções das vesículas secretadas pelas vias apócrina/microapócrina.

1.06 β -Glicosidases

1.06.1 Nomenclatura das glicosídeo hidrolases

O nome genérico de glicosídeo hidrolases é dado para todas as enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas. Entre essas, torna-se necessário esclarecer a nomenclatura usada para certas atividades enzimáticas para a melhor compreensão desse trabalho. No geral será usando o termo genérico glic- (ex.: glicosidase, glicanase, etc...) para enzimas que clivem ligações glicosídicas sem levar em conta o monossacarídeo do qual a ligação glicosídica é clivada. Se forem feitas referências a enzimas que atuam sobre substratos contendo um tipo específico de monossacarídeo; como glicose, manose, galactose, etc, usaremos os termos glucosidase, manosidase e galactosidase. As glicosídeo hidrolases se mostram enzimas extremamente específicas para uma determinada configuração da ligação glicosídica. Enzimas que clivam ligações na configuração β não são capazes de clivar ligações na configuração α e vice-versa, exceto em alguns casos especiais. Desta forma é necessário indicar na nomenclatura sob qual tipo de ligação glicosídica a enzima é ativa, exemplo: β -glicosidase, para glicosidases que clivam ligações glicosídicas na configuração β e α -glicosidase, que clivam ligações na configuração α .

O termo glicanase será usado para enzimas que clivem polissacarídeos. O termo exoglicanase será usado para enzimas que atuem em polímeros retirando resíduos de oligossacarídeos ou monossacarídeos. As endoglicanases, por sua vez, seriam as enzimas que clivam no meio da cadeia do polissacarídeo, diminuindo o tamanho dessas. Algumas hidrolases

de polímeros possuem nomes especiais relativos ao polímero sobre os quais essas enzimas são ativas. Por exemplo, uma enzima que cliva no interior da cadeia de celulose, polímero de glicose β 1,4 glicose, pode ser denominada de β -endoglucanases ou, simplesmente, celulase.

As glicosidase são enzimas que atuam sobre di- ou oligossacarídeos retirando resíduos de monossacarídeo da extremidade não redutora do substrato. Para enzimas de especificidade pouco conhecida será usada a nomenclatura de acordo com a capacidade para a clivagem de um determinado substrato, como: enzimas que clivam celobiose, denominada de celobiase; que clivam glucocerebrosídeos, glucocerebrosidases. Em casos especiais poderá ser usada a nomenclatura pela qual a enzima é descrita na literatura, como a lactase-florizina hidrolase de mamíferos (β -glicosidase digestiva desses organismos). Frequentemente uma mesma β -glicosidase é capaz de hidrolisar glicosídeos com diferentes monossacarídeos na extremidade não redutora. Neste caso, o termo β -glucosidase é usado para se referir as enzimas que removem mais eficientemente glicose; β -galactosidase, para as que removem principalmente galactose, etc...

Outro ponto que necessita de esclarecimento é a nomenclatura usada para denominar os subsítios do sítio ativo das glicosídeo hidrolases. Essas enzimas são enzimas capazes de clivar di-, oligo- e polissacarídeos. O acúmulo de dados estruturais, seja por cristalografia ou por cálculos de energia de interação entre o substrato e a enzima, tem levado a proposição de que o sítio ativo das glicosídeo hidrolases seria dividido em subsítios responsáveis pela interação com os diferentes resíduos de monossacarídeos presentes no carboidrato. A nomenclatura para esses subsítios foi unificada por Davies *et al.* (1997) que propuseram que o ponto de clivagem da ligação glicosídica seria o ponto de partida para a numeração desses subsítios (Figura 02). Assim, os subsítios que interagiriam com os monossacarídeos da região não redutora do substrato teriam uma numeração negativa ($-n$) decrescente a partir do ponto de clivagem, já os da região redutora teriam uma numeração positiva ($+n$) crescente.

As endoglicanases são enzimas que costumam apresentar diversos subsítios para a interação de monossacarídeos na região não redutora do carboidrato. As glicosidases, por definição, apresentam apenas 1 subsítio (-1) para a interação com resíduos de monossacarídeos na ponta não redutora do carboidrato, daí a sua capacidade de liberar apenas monossacarídeos pela clivagem enzimática do substrato. Esse subsítio poderá ser denominado aqui como subsítio para a ligação do glicone, uma vez que esse interage apenas com os resíduos de monossacarídeo. Os subsítios que interagem com os resíduos da extremidade redutora podem variar muito em

número nas β -glicosidases. Esses subsítios podem ser denominados, de uma forma geral, de subsítio para a ligação do aglicone, pelo fato de que esses subsítios podem interagir com grupos aril e alquil e vários outros além de interagir com resíduos de monossacarídeos.

Figura 02 - Desenho esquemático dos subsítios para a ligação de glicose em glicosídeo hidrolases, segundo Davies *et al.* (1997).

1.06.2 β -Glicosidases de mamíferos

A β -glicosidase digestiva de mamíferos é uma proteína ligada a membrana dos enterócitos intestinais e é chamada muitas vezes de lactase-florizina hidrolase. Muito é conhecido sobre a síntese e processamento dessa enzima. Ela é sintetizada como um precursor de cerca de 220.000 Da, da qual, depois, é clivado em dois polipeptídeos dando origem a enzima madura, que possui um peso molecular de cerca de 130.000 Da. Essa clivagem ocorre após a passagem da proteína pelo complexo de Golgi, antes dela ser inserida na membrana plasmática. A enzima madura e a pró-enzima apresentam a mesma atividade, indicando que a clivagem não ativa a enzima, como ocorre com as peptidases. O polipeptídeo não enzimático aparentemente tem importante papel no dobramento correto da enzima, funcionando como uma chaperona intramolecular. Essa β -glicosidase apresenta dois sítios ativos em uma só cadeia polipeptídica. Um dos sítios hidrolisa lactose (com baixo K_m e alta velocidade), celobiose, oligocelodextrinas e tem atividade muito baixa sobre celulose. O outro hidrolisa preferencialmente florizina (um aril glicosídeo presente em plantas), além de outros glicosídeos hidrofóbicos tais como β -glucosilceramidas e β -galactosilceramidas (ver Van Beers *et al.*, 1995).

Recentemente, um trabalho realizado com lactase-florizina hidrolase de rato põe em dúvida as especificidades desses dois sítios (Neele *et al.*, 1995). Os autores utilizam lactose e NO β Dglu como substrato. É feita mutação sítio dirigida de modo a tornar inativo um ou outro sítio (substituindo um resíduo de glutamato essencial para catálise por um resíduo de glicina). Desse modo os autores observam que um sítio cliva 100 % da lactose e 75 % do NO β Dglu, enquanto o outro sítio não cliva lactose e hidrolisa cerca de 15 % do NO β Dglu, nas condições de

ensaio utilizadas. Os autores põem em dúvida trabalhos anteriores e postulam que um dos sítios seria o responsável pela maior parte da hidrólise de todos os substratos.

Contudo temos que analisar esse dado com certo cuidado uma vez que só podemos dizer que um sítio ativo hidrolisa em maior ou menor quantidade um substrato se compararmos os valores de k_{cat}/K_m para os dois sítios. Caso isso não seja feito, só sabemos o que ocorre naquelas condições especificadas de ensaio, pois a maior ou menor hidrólise vai depender dos valores de K_m e da concentração de substrato utilizada. Como o trabalho em questão não utiliza esse valor, não é possível afirmar qual sítio cliva melhor o substrato. Além disso, seus resultados não devem ser válidos para todas as enzimas desse tipo encontradas em mamíferos, uma vez que Skovbjerg *et al.* (1981), utilizando a enzima humana, mostraram que Tris inibe competitivamente a hidrólise de lactose com um K_i de 12 mM, enquanto que a inibição da hidrólise de florizina é quase imperceptível, embora o K_m para lactose seja muito maior (21 mM) que o K_m para florizina (0,44 mM). Uma vez que o K_i é a constante de dissociação do complexo enzima/inibidor, se a florizina fosse majoritariamente hidrolisada pelo mesmo sítio que a lactose, uma inibição de sua hidrólise por Tris deveria ter sido detectada. Além disso, nesse mesmo trabalho, quando a enzima é ensaiada com uma mistura de lactose mais florizina, não se verifica inibição da formação de floretina (liberada pela clivagem da florizina), embora a hidrólise de lactose seja diminuída.

Freund *et al.* (1991) verificaram que a florizina hidrolase de rato é capaz de hidrolisar laminaribiose e gentobiose, que são dissacarídeos derivados de β -glucanas de plantas, entre elas laminarina, o principal polissacarídeo de reserva de algas e importante constituinte da parede celular de fungos. Freund *et al.* (1991) propuseram que filogeneticamente a lactase-florizina hidrolase de mamíferos estaria relacionada à β -glucanase de invertebrados, sugerindo que o gene ancestral dessa codificaria uma enzima envolvida na hidrólise de paredes celulares de fungos e plantas.

Uma outra β -glicosidase de mamíferos é encontrada no citoplasma de células de vários tecidos (inclusive intestino), mas localiza-se principalmente em fígado e rim (Trumbo *et al.*, 1990; Pócsi & Kiss, 1989; Gopalan *et al.*, 1992). Essa enzima apresenta uma ampla especificidade podendo utilizar β -D-glucosídeos, β -D-xilosídeos, β -D-galactosídeos e β -L-arabinosídeos como substrato (La Marco & Glew, 1986), mas não hidrolisa glicosilceramidas (ver Van Weely *et al.*, 1993). Essa enzima é ativada por álcoois primários e verificou-se que há dois sítios para a ligação dessas substâncias: Um com alta afinidade, e um com baixa afinidade, que provavelmente faz parte de um domínio hidrofóbico do sítio ativo (Gopalan *et al.*, 1989). A

função fisiológica dessa enzima ainda não foi esclarecida. Gopalan *et al.* (1992) mostraram que a enzima de fígado pode clivar glicosídeos fenólicos e cianogênicos presentes em vegetais e sugeriram que essa enzima pode ser envolvida em desintoxicação.

Outra β -glicosidase presente nesses organismos é a glucocerebrosidase ligada a membrana de lisossomos presente em todos os tecidos. Além de glucocerebrosídeos, ela cliva o glicolípido 2,3-ditetradecil β -D-glucosil D-glicerol. Embora essa enzima aparentemente só clive substratos muito hidrofóbicos, demonstrou-se que o sítio ativo da β -glicosidase citossólica possui um subsítio muito mais hidrofóbico que o presente na glucocerebrosidase lisossômica (Gopalan *et al.*, 1989).

Mais recentemente uma segunda glucocerebrosidase não lisossômica foi encontrada. Ela está firmemente ligada a membranas de um compartimento com densidade bem menor que os lisossomos. Suas propriedades diferem daquelas da enzima lisossômica e nem sua localização celular nem sua função são claras (Van Weely *et al.*, 1993).

1.06.3 β -Glicosidases de insetos

Características gerais já podem ser delineadas para as β -glicosidases digestivas encontradas em insetos (ver Terra & Ferreira, 1994). No geral elas apresentam um peso molecular que varia de 27.000 a 170.000 Da; os pIs já determinados mostram que essas enzimas apresentam características de ácidas a neutras com esse parâmetro variando de 3,6 a 7,2 e o pH ótimo está na faixa de 4,5 a 6,2. Entretanto, em Lepidoptera essas enzimas apresentam um pH ótimo mais alto do que o encontrado em outros insetos variando de 6 a 7.

Embora poucos trabalhos tenham sido realizados caracterizando as β -glicosidases de insetos, Terra & Ferreira (1994) observaram que essas enzimas podem ser divididas em três grupos, baseando-se em suas especificidades pelo substrato. O primeiro inclui as enzimas com atividade de glicosil β -glicosidase, ativas sobre di- e oligossacarídeos, e com atividade sobre aril β -glicosídeos, que são monossacarídeos ligados a um resíduo hidrofóbico que não é um carboidrato (classe 1). Essas enzimas clivariam com eficiência, por exemplo, celobiose, NP β Dglu, NP β Dgal, lactose, etc. O segundo grupo inclui enzimas somente com atividade de glicosil β -glicosidase (classe 2). Finalmente, temos as enzimas com atividade somente sobre aril (ou alquil) β -glicosídeos (classe 3).

Enzimas da classe 1 das β -glicosidases de insetos foram descritas para *Erinnyis ello* (Santos & Terra, 1985) e *Rhynchosciara americana* (Ferreira & Terra, 1983). Essa classe de

enzimas combina as atividades de uma enzima da classe 2 e da 3. Por isso é interessante verificar se esses substratos são todos clivados em um mesmo sítio ativo ou se a enzima apresentaria um sítio ativo com atividade da classe 2 e o outro com atividade da classe 3. Para *Erinnyis ello* (Santos & Terra, 1985) tem sido mostrada a presença de uma única β -glicosidase que apresenta apenas um sítio ativo capaz de clivar diferentes substratos, desde glicosil β -glicosídeos a aril β -glicosídeos.

β -glicosidases da classe 2 foram descritas em *Abracris flavolineata* (Marana *et al.*, 1995), *Locusta migratoria* (Morgan, 1975) e *Sitophilus oryzae* (Baker & Woo, 1992). As enzimas das classes 1 e 2, embora apresentem uma especificidade diferente, podem ser classificadas como β -glicosidases típicas (EC 3.2.1.21). Essas seriam as enzimas importantes na digestão final de produtos gerados da degradação de celulose e hemiceluloses, na clivagem de cadeias de carboidratos de glicoproteínas e na digestão de dissacarídeos.

As enzimas da classe 3 já foram descritas em *Abracris flavolineata* (Marana *et al.*, 1995), *Locusta migratoria* (Morgan, 1975), *Sitophilus oryzae* (Baker & Woo, 1992) e *Diathraea saccharalis* (Ferreira *et al.*, 1998) entre outros. Uma vez que essas enzimas preferencialmente hidrolisam monossacarídeos ligados a um aglicone hidrofóbico, tem sido proposto que o seu substrato natural seriam glicolipídeos tais quais as glicosilceramidas (Terra & Ferreira, 1994). Assim, é possível que β -glicosidases de insetos pertencentes à classe 3 seriam glicosilceramidases (EC 3.2.1.62).

Outro importante grupo de β -glicosidases encontrado em insetos é o das β -galactosidases. A atividade de β -galactosidase pode estar inteiramente associada com a atividade de β -glucosidase, como é o caso de *Erinnyis ello* (Santos & Terra, 1985), mas pode também ser distinta, em uma enzima clivando apenas β -galactosídeos. Enzimas com atividade apenas sobre β -galactosídeos são encontradas em adultos de *Locusta migratoria* (Morgan *et al.* 1975), adultos de *Abracris flavolineata* (Marana, Terra & Ferreira, dados não publicados) e larvas de *Tenebrio molitor* (Ferreira *et al.*, 1998). A enzima de *Locusta migratoria* apresenta pH ótimo de 5,5 e Mr de 65.000, enquanto a de *Abracris flavolineata* apresenta pH ótimo de 4,5 e Mr de 72.000. Essas enzimas hidrolisam bem NP β Dgal e são praticamente inativas sobre lactose e β -glucosídeos. Assim, o substrato natural dessas aril β -galactosidases são provavelmente galactolipídeos tais como 2,3 diacil 1 β -D-galactopiranosil D-glicerol (monogalactosil diglicerídeo) ou 2,3 diacil 1 (α -D-galactopiranosil (1,6)- β -D-galactopiranosil)-D-glicerol (digalactosil diglicerídeo). Esses lipídeos são os majoritários dos tecidos fotossintéticos

(Harwood, 1980). Eles são rapidamente hidrolisados no lúmen do intestino médio de vários insetos e a galactose e o ácido gráxo resultante são absorvidos e utilizados (ver Turunen, 1992). Digalactosil diglicerídeos podem ser convertidos em monogalactosil diglicerídeo pela ação de α -galactosidases (Grossmann & Terra, 2001)

Todas as β -glicosidases de insetos comentadas até agora são encontradas na forma solúvel dentro do lúmen do intestino do inseto. Somente em *Rhynchosciara americana* (Ferreira & Terra, 1983) foi descrita uma β -glicosidase da classe 1 ligada à membrana microvilar dos enterócitos, o que é comum para enzimas de digestão final nesses insetos. A localização de enzimas de digestão final junto à membrana microvilar do intestino médio é uma tendência evolutiva encontrada nas ordens de insetos surgidas mais recentemente durante a evolução e é importante para gerar uma compartimentalização da digestão do alimento (Terra, 1990). Todas as β -glicosidases comentadas até o momento tiveram alguns parâmetros físicos determinados (tais como peso molecular e pI) e alguma caracterização cinética, normalmente determinando a especificidade para alguns substratos. Em *Spodoptera frugiperda* essa caracterização foi mais profunda, onde foi feita uma tentativa de descrever o papel de vários aminoácidos na ligação do substrato e na catálise enzimática. Essa também foi a primeira β -glicosidase de insetos a ser clonada (Marana *et al.*, 2001).

O número de β -glicosidases no tubo digestivo de insetos pode variar. Alguns insetos possuem apenas uma β -glicosidase capaz de clivar vários substratos, enquanto outros possuem várias dessas enzimas com especificidade diferente para os diversos substratos. Quando várias enzimas estão presentes, suas especificidades são diferentes e, quando somente uma enzima está presente, ela possui especificidade ampla cobrindo as especificidades de todas aquelas enzimas presentes nos insetos que possuem duas a quatro dessas proteínas (Ferreira *et al.*, 1998). O fato dos insetos possuírem várias β -glicosidases pode ser uma adaptação do inseto ancestral de diferentes taxa a dietas contendo glicosídeos de planta, onde a separação da atividade sobre glicosídeo e aril β -glicosídeos seria importante para uma regulação diferencial da expressão das enzimas responsáveis por essas atividades (Terra & Ferreira, 1994). Desse modo, o organismo poderia diminuir a clivagem de glicosídeos tóxicos sem afetar a digestão de sacarídeos derivados das hemiceluloses, como será mostrado a seguir.

1.07 Importância das β -glicosidase

1.07.1 As glicosidases, os glicosídeos tóxicos e a interação inseto-planta

Plantas e insetos têm coexistido por pelo menos 100 milhões de anos, o que levou a evolução de uma variedade de interações deletérias e benéficas entre eles (ver revisão em, Stotz *et al.*, 1999). A polinização é um exemplo de interação onde tanto a planta quanto os insetos são beneficiados. Plantas carnívoras aprisionam insetos em órgãos especiais com o intuito de obter uma fonte extra de nitrogênio e fósforo em ambientes pobres em nutrientes. Mais frequentemente, entretanto, ocorre a predação de plantas por insetos.

Todas as plantas possuem um certo grau de resistência à predação por insetos. Logo somente um número limitado de herbívoros é capaz de se alimentar de uma determinada espécie de planta. Essa resistência é baseada em vários mecanismos de defesa, incluindo uma ampla gama de metabólitos nocivos produzidos pela planta.

Durante a evolução as plantas necessitaram desenvolver defesas físicas e químicas contra o ataque de herbívoros, tornando-se, em boa parte delas, não palatáveis para a maioria dos animais (Whittaker & Feeny, 1971). Podemos ver diversos exemplos, tais como espécies de plantas que produzem protoanemina, uma substância irritante que pode produzir convulsões fatais no gado; outras produzem esteróides cardíacos, que levam vertebrados que ingerem essas plantas a desenvolver ataques convulsivos do coração. Podem produzir também o tanino, uma substância que se liga a proteínas formando complexos indigeríveis que contribuem na inibição do crescimento de vertebrados e larvas de Lepidoptera. A produção de tanino protege as plantas também de ataques de fungos. Várias espécies de plantas (a maioria gimnospermas) são conhecidas por conter grandes quantidades de hormônios reguladores de crescimento de insetos, ou análogos com alta atividade, que atuam alterando o período de desenvolvimento de forma a acelerar fatalmente a metamorfose desses animais. Os hormônios juvenis também são encontrados em algumas plantas e atuam atrasando o desenvolvimento do inseto de forma a prevenir o aparecimento de formas adultas. Existem plantas que produzem hipericina, uma substância responsável por uma intensa fotossensibilidade que leva a insetos que se alimentaram dela a desenvolver uma cegueira que acaba levando à morte. Além disso, elas podem produzir alcalóides, glicosídeos cianogênicos, fenólicos e triterpenoides, aminoácidos não protéicos, e outros compostos (para referência ver Yu, 1989).

Os glicosídeos de ocorrência natural em plantas são compostos que apresentam ligações β -O-glicosídicas. Devido à sua abundância em plantas eles se tornam muito importantes como

fonte alimentar para os herbívoros. Desta forma, entre os diversos tipos de defesas citadas acima os glicosídeos tóxicos parecem desempenhar um importante papel na resistência de plantas a insetos. Yu (1989) mostrou que a presença de tomatina e rutina parece conferir a resistência do tomate a *Heliothis zea*. O mesmo se observa para maizina, um glicosídeo flavanóide, que confere a resistência do milho à *Heliothis zea*. Outro exemplo é a sinigrina, um glucosinolato, que atua como barreira para o crescimento de *Papilio polyseus* em plantas de mostarda. Insetos da ordem Lymantriidae quando alimentados com folhas de *Populus tremuloides*, que apresenta grandes quantidades de salicina, salicortina, tremuloidina e tremulacina (glicosídeos fenólicos), apresentaram uma alteração no crescimento ocorrendo um prolongamento do primeiro instar e um reduzido crescimento durante o quarto instar (Lindroth & Hemming, 1990).

A ação dos glicosídeos tóxicos parece realmente ser devido à liberação do aglicone durante a clivagem enzimática pelas β -glicosidases. Isso pode ser dito devido ao fato geral de que todos os aglicones resultantes da hidrólise dos glicosídeos tóxicos são mais tóxicos do que os últimos, com exceção da tomatina, um glicosídeo alcalóide (Yu, 1989). A digestão de glicosídeos pelas β -glicosidases dos insetos representa um passo chave da interação inseto-planta. O estudo dessas enzimas em insetos permitiria entender os mecanismos de toxidez desenvolvidos pelas plantas e os de resistência desenvolvidos pelos insetos, e como esses surgiram durante a evolução.

Ferreira *et al.* (1997) propuseram que insetos podem desenvolver tolerância a glicosídeos cianogênicos através da diminuição da atividade aril β -glicosidase e sugerem que esse controle de atividade enzimática pode ser possível se essa atividade e a atividade de enzimas responsáveis pela hidrólise de oligossacarídeos ocorrerem em enzimas separadas. Desta forma, um decréscimo na atividade de aril β -glicosidases (responsável por liberar o aglicone tóxico) pode não significar necessariamente o decréscimo na atividade de β -glicosidases responsáveis pela digestão final de hemicelulose, glicoproteínas e celulose. Nesse trabalho foi mostrado que *Diathraea saccharalis* apresenta três β -glicosidases em seu tubo digestivo e que, quando submetida a dietas ricas em glicosídeos cianogênicos, ocorre uma alteração do nível de atividade entre essas três enzimas. Isso permite uma diminuição na produção do aglicone tóxico, sem que afete extremamente a digestão de di- e oligossacarídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Lindroth (1988a), que observou que *Papilio glaucus canadensis* apresenta uma diminuição na atividade de suas β -glicosidases quando expostos a glicosídeos fenólicos, enquanto *P. glaucus glaucus* não apresenta essa modificação. Isso pode estar relacionada a resistência do primeiro e a susceptibilidade do

segundo a glicosídeos fenólicos. Yu (1989) citou que *Synanthedon pictipes* tem a habilidade de metabolizar prunasina e seu metabólito tóxico, HCN, através de β -glicosidases e β -cianoalanina sintase, permitindo que se alimentem de *Prunus persica*. Nesse caso é possível até se observar que as β -glicosidases são estimuladas pela presença de um glicosídeo cianogênico como a amigdalina.

Desta forma podemos imaginar que o estudo de β -glicosidases em insetos fitófagos é importante não só para entender o papel dessas enzimas na digestão do alimento pelo inseto, mas também no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de pragas. Sabendo a especificidade das β -glicosidases, quais os mecanismos envolvidos em sua regulação e as consequências da hidrólise de glicosídeos tóxicos em insetos fitófagos, poderemos desenvolver variedades de plantas com um maior sistema defensivo, seja selecionando as variedades de plantas que possuem altos níveis de fatores de resistência (glicosídeos que são facilmente degradados ou rapidamente ativados) ou utilizando técnicas de engenharia genética para transferir seletivamente genes de toxinas de uma planta para outra de forma a torná-la mais resistente a ataque de insetos.

1.07.2 Uso de β -glicosidases na síntese de glicosídeos

Um grande número de carboidratos desempenha papel importante nos mais fundamentais processos dos organismos vivos (Varic, 1993). A elucidação da função desses carboidratos de interesse, na maioria das vezes, depende da resolução de suas estruturas. Embora esses carboidratos sejam formados por um número limitado de monossacarídeos, o grande número possível de ligações diferentes entre seus monômeros representa uma dificuldade importante no que diz respeito a sua síntese por métodos convencionais (Dan *et al.* 1995).

Embora tenha havido um grande desenvolvimento de novos e eficientes métodos para a síntese química de estruturas glicosídicas, ainda é muito custosa a síntese de oligossacarídeos complexos. Isso se deve ao fato de que, ainda é necessário empregar um grande número de passos de proteção, desproteção e acoplamento para se gerar uma ligação glicosídica entre os dois sacarídeos (ver Vic *et al.*, 1996).

Recentemente esse problema tem sido suplantado pela aplicação de enzimas para a síntese de carboidratos (ver Scigelova *et al.*, 1999). A formação de uma ligação glicosídica por catálise enzimática ocorre em um único passo, evitando as diversas seqüências de proteção e desproteção, sendo também obtido um controle completo da configuração do novo centro

anomérico gerado. Outro fator interessante está na diminuição brusca do tempo e do esforço requeridos para a síntese de um oligossacarídeo. Glicosidases podem ser usadas de duas formas diferentes na síntese de glicosídeos, sendo elas: síntese por transglicosilação ou por hidrólise reversa.

No processo que usa a transglicosilação como apresentado por Yoon & Ajisaka (1996) para a síntese de glicosídeos, é usado um glicosídeo doador do grupo glicosil que tem aglicones que são grupos deixantes muito bons (ex. NP β Dglu) juntamente com um nucleófilo (ex. álcoois) para o qual o grupo glicosil, que está ligado covalentemente a enzima, será transferido. Esse nucleófilo passará a ser o aglicone do glicosídeo sintetizado por transglicosilação. Segundo Vic *et al.* (1996) o sucesso dessa técnica vai depender da taxa de hidrólise do glicosídeo, produto da transglicosilação, ser menor que a hidrólise do glicosídeo utilizado como doador do grupo glicosil. Esse método tem sido mais freqüentemente descrito em literatura e tem sido aplicado com sucesso na síntese de numerosos glicosídeos (Vic *et al.* 1996).

Vic *et al.* (1996) descreveram que existem duas possibilidades para a síntese de glicosídeos através de transglicosilação. Pode ser usada uma glicosídeo transferase ou uma glicosidase como biocatalisadores para a transglicosilação. A primeira oferece uma transferência para regiões seletivas da molécula sendo também obtidas grandes recuperações na glicosilação. Entretanto, essas enzimas são também altamente seletivas com respeito aos sacarídeos aceptores sendo raramente ativas sobre os substratos modificados ou exógenos. Essas enzimas também apresentam uma ocorrência menos abrangente na natureza quando comparadas com as glicosidases.

As glicosidases, por sua vez, acomodam substratos mais simples e facilmente utilizáveis (Scigelova *et al.*, 1999). Entretanto, na presença da água como nucleófilo competidor, a recuperação da transglicosilação é menos expressiva. Por outro lado as glicosidases são bem robustas e podem ser manuseadas facilmente em um laboratório de química orgânica. Sua ocorrência em tecidos animais e de plantas é abrangente e elas são abundantemente produzidas por um grande número de microorganismos (Scigelova *et al.*, 1999).

Tem sido mostrado (Yoon & Ajisaka, 1996) que para uma glicosidase, a formação de um determinado tipo de ligação por transglicosilação está relacionada à sua especificidade para a clivagem sendo esperado que quanto mais eficiente é a hidrólise de uma ligação glicosídica de um dissacarídeo por uma glicosidase, mais eficientemente essa ligação é formada por transglicosilação. Entretanto isso não é uma regra uma vez que a estrutura do acceptor usado na transglicosilação pode alterar a especificidade para a formação da ligação glicosídica. Temos

então que as interações estéricas entre o acceptor e a glicosidase podem ser um fator relevante que afetam a especificidade para a formação da ligação glicosídica. Assim fica claro que o conhecimento profundo da especificidade de uma β -glicosidase é fundamental para sua aplicação em práticas de síntese enzimática de carboidratos.

Apesar da facilidade do manuseio das glicosidases, tem sido observado que, para preparação de oligossacarídeos complexos, as glicosídeo transferases são freqüentemente preferidas às glicosidases. Isso nem tanto pela alta recuperação da glicosilação, mas sim por sua seletividade restrita pela região da formação da ligação glicosídica. Atualmente têm sido realizados estudos com o intuito de mostrar que glicosidases, que apresentam as qualidades de serem facilmente obtidas e de terem uma grande resistência, também podem apresentar especificidade para uma reação de transglicosilação.

Scigelova *et al.* (1999) caracterizaram a atividade de transglicosilação para diversas glicosidases de diferentes origens. Para obter taxas de transglicosilação razoáveis, foi usado o substrato sintético NP β Dglu (substrato que apresenta um bom grupo deixante) e uma concentração cinco vezes maior do glicosídeo acceptor (lactose, lactosamina, entre outros). Os aceptores usados não eram substratos para a enzima a ser testada. Os glicosídeos obtidos por transglicosilação deixam claro que essas enzimas, em alguns casos, são capazes de uma transferência específica para uma região da molécula acceptora. No futuro, uma caracterização mais profunda dessas enzimas permitirá a obtenção de enzimas específicas para a formação de um grande número de estruturas oligossacarídicas. Uma vez que essas são ferramentas baratas, será possível obter grandes quantidades de oligossacarídeos complexos que poderão suprir a demanda para pesquisas avançadas em biologia e medicina.

O trabalho realizado por Yoon & Ajisaka (1996) também mostra que β -galactosidases de diferentes origens podem promover transglicosilação gerando ligações glicosídicas específicas. Contudo, parte dessas enzimas não apresenta essa especificidade, gerando mais de um tipo de ligação glicosídica para um dado acceptor usado na transglicosilação. Foi mostrado também que a especificidade para a formação de um tipo de ligação por uma dada enzima não deve ser alterada devido a presença de solventes orgânicos no meio de reação. Outro dado interessante observado nesse trabalho é que a formação de uma ligação β 1-6 entre dois monossacarídeos é obtida com mais facilidade do que outras ligações durante a síntese biocatalisada por diversas β -galactosidases. Isso pode ser explicado pelo fato da hidroxila presente no carbono seis das moléculas acceptoras (ex. glicose, galactose e seus derivados) apresentar alta reatividade sendo

uma boa aceptora para a ligação glicosídica. As recuperações da síntese de glicosídeos por transglicosilação mostradas nesse trabalho chegaram a 40 %.

O procedimento de hidrólise reversa é baseado no deslocamento do equilíbrio da reação catalisada por uma glicosidase do sentido da hidrólise (que normalmente é favorecida em meio aquoso) para o da síntese da ligação glicosídica. Considerações termodinâmicas indicam que isso pode ser alcançado pelo aumento da concentração dos produtos da hidrólise da ligação glicosídica (hexose e nucleófilo) e diminuição da quantidade de água disponível no meio (diminuição da atividade da água). Os resultados (Vic *et al.*, 1996) têm mostrado que para β -glicosidases a quantidade de água que deve estar presente no meio para a reversão da hidrólise de um glicosídeo deve estar entre 8 a 20 %. Apesar dessa técnica estar sendo pouco usada, Vic *et al.* (1996) acreditam que esse procedimento pode fornecer uma síntese eficiente de glicosídeos mostrando-se muito simples e de baixo custo, o que o torna muito atrativo para uma síntese em escala industrial.

Vic *et al.* (1997) mostraram que a β -glicosidase extraída de amêndoa pode ser utilizada em uma alta concentração de solventes orgânicos (80 a 90 % v/v) para a promover a síntese de glicosídeos através de hidrólise reversa sem que haja uma perda significativa da atividade enzimática. A quantidade de glicosídeos recuperada por essa síntese alcançou valores de 20 %. Foi mostrado também (Vic & Crout, 1995) que a recuperação pode ser aumentada se álcool for usado como solvente para o meio de reação. Nesse estudo foram obtidas recuperações para a síntese de alquil e benzil β -D-glicopiranosídeo de 62 a 42 %, respectivamente. Um estudo estendido para diversas β -glicosidases de diversas origens utilizando uma grande variedade de nucleófilos para a formação da ligação glicosídica (Vic *et al.*, 1996) tem mostrado a utilidade desse procedimento para a síntese de diversos glicosídeos em uma escala preparativa. Os glicosídeos obtidos por esse estudo se mostraram muito úteis, seja para serem utilizados em técnicas de síntese de carboidratos, seja para a produção de ligantes de significados fisiológicos importantes.

1.08 Classificação das glicosídeo hidrolases de acordo com sua seqüência primária

Glicosídeo hidrolase é nome genérico dado para todas as enzimas capazes de clivar ligações glicosídicas. Esse grupo engloba grupos de enzimas como amilases, celulasas, xilanasas, α -glicosidases, β -glicosidases, entre outras. Na atual classificação da nomenclatura da “International Union of Biochemistry” (IUB) as glicosídeo hidrolases são classificadas com a

seguinte numeração: 3.2.1.x; onde os primeiros três dígitos indicam que essas são enzimas que hidrolisam ligações O-glicosídicas enquanto o último indica o substrato clivado pela enzima e, algumas vezes, refletem o mecanismo molecular da catálise.

Essa classificação vem se mostrando muito útil pois evita a ambigüidade e a proliferação de nomes triviais, provendo uma classificação única. Contudo, ela não leva em conta os eventos evolucionários e os aspectos estruturais das enzimas estudadas. Eventos evolucionários como a divergência evolutiva, que pode levar enzimas à mudanças de especificidade e, algumas vezes, até mesmo mudanças no tipo de reação, ou a convergência evolutiva, que pode forçar diferentes proteínas a catalisar uma reação sobre o mesmo substrato. Como um exemplo de evolução divergente é o caso das mirosinases (tioglucosidases) que são classificadas como EC 3.2.3.1, porém apresentam a seqüência de aminoácidos, estrutura terciária e mecanismo de catálise muito semelhante ao das O-glucosidases, enzimas essas classificadas como EC 3.2.1.21 (Henrissat & Davies, 1997).

Atualmente uma nova classificação para as glicosídeo hidrolases foi proposta baseada na similaridade da seqüência de aminoácidos (Henrissat, 1991). A idéia foi a de fazer uma classificação, baseada no número crescente de seqüências disponíveis em bancos de dados, que refletisse as correlações estruturais e evolutivas dessas enzimas de uma forma mais confiável e eficiente do que a oferecida pela classificação através da especificidade enzimática. Isso ajudaria a revelar as relações evolucionárias entre essas enzimas, e proveria uma ferramenta convencional para inferir informações mecanísticas. Análises realizadas da comparação da similaridade entre seqüências de diversas glicosídeo hidrolases (ver Henrissat, 1991) permitiu que as enzimas fossem agrupadas em famílias.

O resultado obtido por esse tipo de classificação mostrou que as famílias obtidas por similaridade de seqüência podem agrupar enzimas de diversos números de E.C. e enzimas com especificidades para o mesmo substrato podem pertencer a famílias não correlatas, por apresentarem seqüência primária diferente. Em uma continuação de seu trabalho, Henrissat & Bairoch (1993) partiram do pressuposto de que existe uma correlação entre similaridade da seqüência de aminoácidos e similaridade da estrutura tridimensional das proteínas (Chothia & Lesk, 1986). Desse modo, sugeriram que enzimas de uma mesma família devem apresentar estruturas terciárias e mecanismo de catálise semelhante. Nesse ponto, foram propostas um total de 45 famílias de glicosídeo hidrolases com base em 181 seqüências proteicas disponíveis naquele momento.

O fato de que o dobramento de proteínas é melhor conservado que suas seqüências sugere que famílias apresentando diferença considerável na seqüência primária podem ter dobramentos similares constituindo assim grupos maiores. Henrissat & Romeu (1995) agruparam essas famílias com estruturas semelhantes em grupos maiores que foram denominados de clãs. Sugeriram também que outras relações formando outras famílias poderiam ser confirmadas à medida que novas seqüências fossem determinadas. Essas relações poderiam ser mostradas também a partir do momento que a sensibilidade dos métodos de comparação de seqüência aumentarem mostrando similaridades que até o momento não eram evidentes. E, finalmente, quando as determinações estruturais demonstrarem a semelhança do dobramento tridimensional entre membros de famílias diferentes.

Com o crescente número de glicosídeo hidrolases que tem tido sua seqüência de aminoácidos determinada, tem sido possível um constante aperfeiçoamento da classificação dessas enzimas. A última versão da classificação (Coutinho & Henrissat, 2000) já conta com 83 famílias, sendo que algumas dessas estão relacionadas entre si formando 10 clãs (A até J). O clã A é formado pelas famílias 1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 51 e 53, enquanto que todos os demais clãs são formados por apenas duas diferentes famílias. Algumas dessas famílias foram recentemente agrupadas nos clãs usando apenas métodos mais eficientes de procura de similaridade entre famílias distintas.

Os resultados do agrupamento das glicosídeo hidrolases pela classificação de acordo com a seqüência primária sugerem que talvez a classificação proposta pela IUB tenha que ser repensada de forma a indicar essa outra propriedade. A sugestão dada por Henrissat (1991) seria a de acrescentar mais um número ao E.C., que passaria a ser: 3.2.1.x.y; onde o x teria o atual significado e o y seria a representação da família baseada na similaridade de seqüência.

A existência de um grande número de famílias polifuncionais indica que a aquisição de novas especificidades para glicosídeo hidrolases é um evento evolucionário comum. Isso provavelmente se deve ao fato de que os novos substratos surgidos na evolução apresentavam uma semelhança estereoquímica grande com os substratos usuais para essas enzimas. Dessa forma, seriam necessárias apenas pequenas mudanças estruturais em uma enzima para que essa tenha a sua especificidade alterada de forma a se adaptar ao novo substrato. É possível imaginar que o surgimento de novas enzimas pode estar intimamente relacionado ao surgimento de novos carboidratos durante a evolução. Pode ser proposto um mecanismo evolutivo onde basicamente existam duas pressões evolucionárias sobre uma enzima: a primeira seria a otimização da eficiência catalítica para o substrato original e a segunda seria a divergência para adquirir uma

nova especificidade e assim abranger o metabolismo dos novos carboidratos que surgiram durante a evolução. A duplicação gênica, frequentemente observada entre glicosídeo hidrolases, pode colaborar com tais eventos. Uma cópia poderia continuar clivando o substrato original e a outra poderia se adaptar ao novo substrato, esteroquimicamente similar (Henrissat, 1991). Assim sendo, devido a sua ocorrência nos três maiores reinos, as glicosídeo hidrolases podem servir como marcadores úteis, não somente para estudo de evolução e de especificidade enzimática, mas também para o estudo de uma evolução do metabolismo de carboidratos.

A análise detalhada da composição de estruturas primárias de diversas proteínas permite comparar resíduos de aminoácidos conservados entre elas. Essa conservação de resíduos de aminoácidos está intimamente relacionada com a conservação de estrutura e, desta forma, de mecanismo de ação. Todas as glicosídeo hidrolases agem por um mecanismo geral de catálise ácido/básica no qual dois resíduos de aminoácidos participam em uma reação ou de substituição simples, que resulta na inversão da configuração do carbono anomérico ou de uma substituição dupla, que não inverte a configuração do carbono anomérico (ver Henrissat, 1991). Assim, podemos deduzir que a composição de aminoácidos da região do sítio ativo das glicosídeo hidrolases deve apresentar uma alta similaridade, e essa é ainda mais acentuada dentro de uma mesma família. Isso permite que sejamos capazes de inferir os potenciais resíduos catalíticos para uma enzima que apresenta regiões de alta similaridade com outras enzimas da mesma família que já tiveram os seus resíduos catalíticos determinados (ver Henrissat, 1991). O exemplo está na família de celulasas (família 5), onde a análise dos resíduos de aminoácidos invariantes permite a predição direta do resíduo catalítico. Esse tipo de análise pode se tornar o passo inicial para experimentos de mutações sítio dirigidas, que, por sua vez, dão uma inferência direta de quais são os resíduos catalíticos para enzimas onde esses ainda são desconhecidos.

1.09 Mecanismo de catálise das glicosídeo hidrolases

White & Rose (1997) fizeram um belo trabalho revendo o mecanismo geral de catálise para as β -glicosidases que liberam os produtos da clivagem com a retenção da configuração do centro anomérico. Evidências sugerem que o mecanismo catalítico para essas enzimas envolve um intermediário covalente glicosil-enzima e um intermediário semelhante a um oxycarbônio.

O intermediário glicosil-enzima seria formado e, em seguida, liberado via um estado de transição semelhante a um oxycarbônio. O nucleófilo catalítico seria um carboxilato de uma cadeia lateral de aminoácido, exceto por uma única exceção onde esse é uma histidina. Tipicamente um segundo carboxilato da cadeia lateral de outro aminoácido provê a assistência

catalítica ácido/base, inicialmente doando o próton ao oxigênio da ligação glicosídica e, em seguida, retirando o próton da molécula de água que entra no sítio ativo após a saída do aglicone. Essa molécula de água reage com o estado de transição para formar o produto. O sítio de ligação que acomoda o resíduo de monossacarídeo que fica a esquerda do ponto de clivagem é denominado subsítio -1 e o que fica a direita de +1 (Davies *et al.*, 1997). Nas enzimas que retêm a configuração do carbono anomérico a cadeia lateral do nucleófilo e a do doador de prótons catalíticos são separadas por aproximadamente 5,5 Å e, nas que invertem a configuração, a distância entre os resíduos catalíticos é de aproximadamente 9,5 Å (ver Davies & Henrissat, 1995). A Figura 03 ilustra as diferenças básicas de mecanismo de catálise entre essas enzimas.

Figura 03 - Diferentes mecanismos para a hidrólise da ligação glicosídica por glicosidases. (a) glicosidases que retêm a configuração do carbono anomérico. (b) glicosidases que invertem a configuração do carbono anomérico. Copiado de Henrissat & Davis (1995)

Resultados recentes de cristalografia de raio X e outras técnicas tem permitido avanços na compreensão dos eventos durante a catálise em β -glicosídeo hidrolases que retêm a configuração do carbono anomérico. Esses resultados têm sugerido que, durante a catálise, o sacarídeo ligado ao subsítio -1 adota a conformação de “barco torcido”, em seguida se deformando para uma estrutura de “sofá” em um estado de transição semelhante a um oxicarbônion e, finalmente, passa para uma conformação de “cadeira” no intermediário glicosil/enzima. Os passos finais do mecanismo envolveriam a reversão dessa série de

conformações. Acredita-se também que pode haver uma deformação do centro catalítico da enzima com a ligação do substrato, sugerindo um mecanismo de ativação tipo “ajuste induzido”. Isso foi sugerido para a endoglucanase CelC de *Clostridium thermocellum*, onde o aminoácido doador de prótons na catálise se localiza em uma alça da estrutura secundária dessa enzima que, possivelmente, dobraria sobre o sítio ativo com a ligação do substrato (ver White & Rose, 1997). Um esquema ilustrativo mais detalhado usando as informações mais confiáveis a respeito do mecanismo de catálise das glicosidases que clivam a ligação glicosídica retendo a configuração do carbono anomérico está mostrada na Figura 04.

Figura 04 - Mecanismo de catálise para β-glicosidases que retêm a configuração do carbono anomérico. Copiado de White & Rose (1997).

Sobre as modificações de conformação sofridas pelo substrato durante a catálise, tem sido mostrado em estudos cristalográficos de alta resolução para a lisozima de ovo que ocorre uma distorção do sacarídeo ligado à enzima, em uma forma de “sofá”, que se aproxima à do estado de transição. Análises desse tipo tem dado evidência da possível ocorrência de outras conformações para os sacarídeos durante a ligação e formação de intermediários catalíticos em glicosídeo hidrolases. Tem sido proposto que em β-glicosídeo hidrolases o sacarídeo que se liga ao subsítio -1, adotaria inicialmente uma conformação de “barco”. Porém, as evidências

experimentais disponíveis não podem nem suportar nem excluir a possibilidade da ocorrência dessa conformação. Já foi descrita uma forma não usual de “barco” para o ácido siálico quando esse está ligado a neuraminidase do vírus da influenza (ver White & Rose, 1997). Análises cristalográficas da endocelulase E1 ligada a uma celotetraose sugerem que os sacarídeos podem não se ligar em uma forma de cadeira relaxada ao subsítio -1, porém, a natureza dessa deformação não foi ainda identificada. A estrutura cristalina de alta resolução da endoglucanase CelA de *Clostridium thermocellum* (ver White & Rose, 1997) complexada a oligossacarídeos mostra que a unidade sacarídica deva sofrer alguma deformação para se encaixar no subsítio -1. A estrutura cristalina refinada com resolução 1,9 Å da quitobiase de *Serratia maracens* ligada a uma molécula de di-N-acetil-glucosamina em um complexo não produtivo, mostra que o sacarídeo na posição -1 apresenta-se na forma de um “barco torcido”. O fato desse complexo não ser produtivo não permite dizer que essa conformação ocorra no substrato natural. A adoção dessa conformação pelo sacarídeo parece permitir que: (i) o oxigênio da ligação glicosídica fique mais próximo do doador de prótons; (ii) alivie o impedimento estérico entre C1 e o nucleófilo catalítico; (iii) exiba o aglicone na posição axial. Esse último pode ter implicações estereoeletrônicas favoráveis para a catálise (White & Rose, 1997).

Outro fato importante para a catálise da clivagem de ligações glicosídicas é o auxílio promovido pelo resíduo doador de prótons. O papel duplo desse resíduo durante a catálise só é possível com a modulação do estado de ionização da sua cadeia lateral. Estudos cinéticos para a β -glucosidase de *Agrobacterium faecalis* mostram que o pK_a do resíduo doador de prótons catalítico muda seu valor em até três unidades de pH durante a catálise (ver White & Rose, 1997). Estudos de determinação do pK_a para um aminoácido são difíceis uma vez que o pK_a é um indicador do estado de ionização de um aminoácido e dentro de uma proteína existem diversos aminoácidos ionizáveis. Assim, trata-se de distinguir valores para aminoácidos específicos. Um meio de resolver esse problema tem sido o de usar experimentos de 2D NMR em marcações de cadeias laterais específicas. Um estudo elegante combinando 2-deoxy-2-fluoro-sacarídeos e espectroscopia ^{13}C -NMR para a xilanase de 20 kDa de *Bacillus circulans*, permitiu a observação de mudanças nas propriedades químicas de cadeias laterais de resíduos pH dependentes específicos (Lawson *et al.*, 1997). Nesse trabalho foi mostrado que o pK_a para o nucleófilo catalítico (Glu78) seria de 4,6 e de 6,7 para o doador de prótons (Glu172). O pK_a do Glu172 diminui para 4,2 no intermediário glicosil-enzima, onde o sacarídeo se liga covalentemente ao Glu78. Se a carga do Glu78 é abolida em um mutante, é observado um pK_a menor (4,2) para o Glu172 na ausência do substrato. Isso sugere que o estado de ionização do

nucleófilo catalítico modula o valor do pK_a do resíduo doador de prótons catalítico. A proximidade dos dois resíduos catalíticos, como mostrado na estrutura cristalina da endoglucanase E1, explicaria a grande mudança no pK_a para o doador de prótons durante a catálise. A diminuição exagerada do pK_a desse resíduo parece ser comum para as glicosídeo hidrolases que retêm a configuração do carbono anomérico.

Tem sido muito visada a localização dos aminoácidos catalíticos para as novas glicosídeo hidrolases caracterizadas, a fim de deduzir seus mecanismos catalíticos. Uma técnica muito utilizada é comparação de muitas enzimas similares, mesmo aquelas com pouca identidade de sequência de aminoácidos, o que pode ajudar a identificar o resíduo catalítico através da observação dos resíduos potenciais (ácidos glutâmicos e ácidos aspárticos) que são conservados. Porém, a sequência de aminoácidos sozinha não é suficiente para se identificar o nucleófilo catalítico uma vez que mais de uma cadeia carboxílica é conservada nas β -glicosídeo hidrolases similares que atuam retendo a configuração do carbono anomérico.

Como uma estratégia direta para identificar o nucleófilo catalítico, têm sido usados sacarídeos derivados de compostos epóxido como um agente marcador. Tais compostos contêm duas partes: um grupo reativo epoxi, que forma uma ligação covalente irreversível com a cadeia lateral do nucleófilo, e a cadeia sacarídica, que provê especificidade para a ligação. Estudos de cristalografia de raio X de complexos entre β -glicosídeo hidrolases que retêm a configuração do carbono anomérico e tais inibidores irreversíveis tem confirmado a ligação covalente desses compostos a carboxilas de cadeias laterais de aminoácidos da enzima. Tais compostos oferecem a possibilidade de localizar o sítio ativo da enzima, mas não fornecem informação confiável sobre o mecanismo catalítico da enzima por três razões: (i) átomos adicionais nesses compostos que não estão presentes no substrato natural podem mediar a ligação com a enzima e dado o espaço restrito do sítio ativo de uma enzima esses átomos adicionais podem complicar qualquer possível interpretação estrutural para o mecanismo de catálise; (ii) devido à sua alta reatividade, o sítio da ligação covalente pode variar dependendo do composto epóxido utilizado; (iii) a ligação covalente de epóxidos leva a um complexo irreversível (ver White & Rose, 1997).

Os problemas observados anteriormente podem ser contornados com a utilização de 2-fluor-sacarídeos para aprisionar o nucleófilo catalítico. Esses compostos apresentam a mesma estrutura do substrato, onde foram feitas apenas pequenas modificações. Após a clivagem por uma β -glicosidase, formam uma espécie covalente específica com o nucleófilo catalítico que é muito próxima, estrutural e funcionalmente, à glicosil-enzima formada naturalmente. Outra

vantagem vem do fato de que tem sido mostrado que o complexo formado é competente cataliticamente, ou seja, o produto pode ser liberado em pequena velocidade (ver White & Rose, 1997).

1.10 Estrutura tridimensional das glicosídeo hidrolases e sua evolução

Como mostrado anteriormente, o trabalho de Henrissat (1991 e 1993) compara todas as seqüências de glicosídeo hidrolases (EC 3.2.1.x) descritas na época. Nesse foi usado uma análise de “clusters” hidrofóbicos que permitiu a classificação dessas enzimas em famílias, cada uma contendo enzimas que claramente tenham divergido de um ancestral comum. Relações entre essas famílias têm sido sugeridas à medida que a estrutura tridimensional para enzimas representantes de cada família é elucidada. A Figura 05 mostra estruturas tridimensionais representativas que já foram determinadas para as diversas famílias das glicosídeo hidrolases. O melhor exemplo está na família de enzimas com um dobramento semelhante a da lisozima de ovo. Para essas enzimas tem sido proposto que as famílias 19, 22, 23 e 24 formariam uma superfamília com o dobramento conservado. Jenkins *et al.* (1995), por sua vez, mostraram que as β -glucosidases (família 1) e β -galactosidases (família 2) formam uma superfamília juntamente com enzimas das famílias 5 (família da Celulase A), 10 (família da xilanase F) e 17 (β -glucanases). As enzimas presentes nessas famílias agem pelo mecanismo de retenção da configuração do carbono anomérico e apresentam um dobramento $(\beta/\alpha)_8$ barril, onde o grupo doador de prótons está sempre localizado no final da fita β 4 e o carboxilato nucleófilo no final de fita β 7. Segundo Coutinho & Henrissat (2000) essa superfamília (ou clã) seria denominada como GH-A.

É específico do clã GH-A a ocorrência de certos resíduos de aminoácidos tais como uma asparagina seguida de um glutamato (doador de próton catalítico) próximos do final da fita β 4 e o glutamato (nucleófilo catalítico) presente no final da fita β 7 (Jenkins *et al.*, 1995). Outras proteínas que também apresentam a estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril não apresentam essa característica (por exemplo, a xilose isomerase, ribulose 1,5 bisfosfatocarboxilase e a triose fosfato isomerase).

Aprofundando na estrutura dessas enzimas, podemos dizer que o domínio $(\beta/\alpha)_8$ barril consiste de oito fitas β paralelas rodeadas por sete ou oito K-hélices. As fitas β paralelas no interior da proteína formam uma rede de ligações de hidrogênio com as duas fitas β vizinhas. Como exemplo temos que a fita β 1 formaria um esqueleto de ligações de hidrogênio com as fitas β 2 e 8. Cada fita β é usualmente conectada com fita β vizinha por meio de uma única α -hélice.

Por sua vez, uma fita β é conectada a uma α -hélice por dobras da cadeia principal (Farber & Petsko, 1990).

Figura 05 - Estruturas cristalográficas já determinadas para as diferentes famílias de glicosídeo hidrolases. Copiado de Davis & Henrissat (1995).

Embora a estrutura para essas proteínas seja chamada de barril, a seção horizontal desse é usualmente mais elíptica do que circular. Enzimas com domínios $(\beta/\alpha)_8$ barril, frequentemente podem apresentar outras estruturas (α -hélices, fitas β ou até mesmo domínios completos) que precedem, interrompem ou seguem o barril. O tamanho do barril também varia consideravelmente, de pequeno (triose fosfato isomerase) a grande (xilose isomerase) (Farber & Petsko, 1990).

A estrutura de $(\beta/\alpha)_8$ barril ocorre em grande número de proteínas, além da superfamília de glicosídeo hidrolases descritas por Jenkins *et al.* (1995), que apresentam funções extremamente diferentes. Assim, torna-se interessante tentar entender a história evolutiva para enzimas com esse tipo de dobramento. Readon & Farber (1995) analisaram dados para trinta proteínas que já haviam sido descritas como apresentando a estrutura $(\beta/\alpha)_8$ barril, com o intuito de explicar como essas enzimas podem ter evoluído. Foi sugerido também que o número de proteínas com essa estrutura deve crescer com a elucidação da estrutura tridimensional de outras proteínas, uma vez que pelo menos outras quarenta proteínas já descritas apresentam similaridade suficiente para assegurar que elas também apresentam esse dobramento.

No geral, as proteínas da família $(\beta/\alpha)_8$ barril são enzimas que podem apresentar uma grande gama de especificidades para substratos, requerimento de co-fatores e mecanismos de catálise. Somando essas observações com o fato de que no geral proteínas com esse dobramento apresentam uma pequena similaridade de sequência, tem sido sugerido que essas proteínas possam ter sofrido uma evolução convergente a um dobramento estável (Farber & Petsko, 1990).

No trabalho de Readon & Farber (1995), por sua vez, é sugerido que, ao invés de uma evolução convergente, todas as proteínas apresentando o dobramento de $(\beta/\alpha)_8$ barril teriam divergido de um ancestral comum. A baixa similaridade entre essas proteínas poderia ser explicada pelas observações de que a estrutura tridimensional evolua mais lentamente que a estrutura primária. Assim, a falta de similaridade de sequência pode ser devida ao fato de que a enzima ancestral seria muito antiga. Porém, essa afirmação não tem um embasamento forte, uma vez que existem poucas evidências que possam suportar qualquer proposição a cerca da idade evolutiva dessas proteínas. As evidências mais aceitáveis para uma evolução divergente seriam: (i) a localização conservada do sítio ativo na região carboxi-terminal em todos os membros da família; (ii) a clara indicação de ocorrência de duplicação gênica seguida por especialização dentro de várias famílias de proteínas.

Como mostrado anteriormete, embora tenham sido determinados muitos tipos diferentes de dobramentos nas 22 famílias de glicosídeo hidrolases que tiveram a sua estrutura tridimensional elucidada, a topologia do sítio ativo dessas enzimas pertence sempre a somente três tipos de classes diferentes (Davis & Henrissat, 1995). Essas três estruturas podem ser na forma de bolso, fenda ou túnel e estão representadas na Figura 06. A forma de bolso é ótima para o reconhecimento de extremidades não redutoras de sacarídeos e é encontrada em enzimas que retiram apenas um resíduo de monossacarídeo de seu substrato, como as β -glucosidases, β -

galactosidases, sialidases, neuraminidases, glucoamilases e β -amilases. Já o sítio ativo em fenda é uma estrutura aberta que permite a ligação randômica de vários tipos de substratos poliméricos. Ela é normalmente encontrada em endoglicanases como lisozima, endocelulases, quitinases, α -amilase, xilanase, β -1,3-1,4-glucanases e β -1,3-glucanases. Finalmente, a forma de túnel se assemelha ao sítio ativo em fenda onde a proteína desenvolveu longos braços em forma de dobras da cadeia principal que cobriram parte da fenda. Esse tipo de sítio ativo é encontrado apenas em celobiohidrolases, sendo que a sua topologia permite que essa enzima libere o produto mas continue firmemente ligada à cadeia do polissacarídeo, continuando a clivá-la. Fica a dúvida se esse braço poderia se abrir para permitir a ligação com o substrato ou se o substrato entraria dentro do túnel como em exoglicanases.

Figura 06 - Tipos de sítios ativos encontrados em glicosil hidrolases. (a) forma de bolso; (b) forma de fenda; (c) forma de túnel. Copiado de Davis & Henrissat (1995)

1.11 Objetivos deste trabalho

Foi verificado em nosso laboratório que diferentes insetos apresentam um número variável de β -glicosidases digestivas, que podem ir de uma a quatro dessas enzimas. Quando várias β -glicosidases estão presentes sua especificidade é mais restrita e, quando somente uma dessas enzimas está presente, ela cobre toda a gama de especificidade apresentada nessas outras.

Notou-se também que há uma tendência evolutiva para a presença de somente uma β -glicosidase no tubo digestivo dos insetos (Ferreira *et al.*, 1998).

Intrigado com esse resultado, nosso laboratório traçou como um de seus objetivos estudar as β -glicosidases de vários insetos, tanto do ponto de vista enzimático (determinando sua especificidade e as características de seu sítio ativo), como seqüenciando as proteínas purificadas e realizando mutações sítio dirigidas para tentar encontrar as bases estruturais para essa especificidade diferencial.

O objetivo desse trabalho é o de purificar, caracterizar cineticamente, clonar e seqüenciar as β -glicosidases presentes no tubo digestivo da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera). A determinação de suas especificidades pode permitir também a inferência de seu papel fisiológico na digestão do alimento por esse animal.

Além de inserir-se nesse objetivo maior do grupo, o presente trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento sobre as β -glicosidases de insetos. Pretendemos também verificar a rota de secreção dessas enzimas, e verificar se é semelhante à secreção descrita para amilase e tripsina nesse animal (Cristofolletti *et al.*, 2001).

2 Materiais e métodos

2.01 Animais

Culturas estoque de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), foram mantidas em farelo de trigo a temperatura de 24-26 °C, a uma umidade relativa de 70-75 %. Larvas desenvolvidas (cada uma pesando cerca de 0,12 g) de ambos os sexos foram utilizadas nas preparações.

2.02 Preparação do material presente no conteúdo luminal do intestino médio

As larvas de *Tenebrio molitor* foram anestesiadas em gelo, sendo em seguida dissecadas em solução NaCl 2 % (p/v). O tubo digestivo foi retirado e o intestino médio separado. O epitélio foi descartado e a membrana peritrófica e seu conteúdo foram homogeneizados em água bidestilada com o auxílio de um homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado obtido foi centrifugado (25.000x g; 30 min; 4 °C) e o sobrenadante resultante filtrado em lã de vidro. Esse material foi usado com fonte de enzima. Todos os passos foram realizados sob refrigeração.

2.03 Preparação do material solúvel de farelo de trigo

Foram pesados 3 g de farelo de trigo seguido do acréscimo de um volume de tampão citrato/fosfato, pH 6,0, 20 mM, o suficiente para submergir o material. Essa mistura foi sonicada em um sonicador Branson 250, com a potência acertada em 3, através de três pulsos de 30 s com intervalos de 30 s. Em seguida esse material foi homogeneizado em Omni-Mixer (Sorvall) a uma velocidade de 6.000 rpm, em três pulsos de 30 s com intervalos de 30 s. O homogeneizado foi centrifugado (3.000x g; 5 min; 4 °C), sendo o sobrenadante retirado. Esse foi novamente submetido a uma centrifugação (25.000x g; 15 min; 4 °C) e o sobrenadante resultante foi usado como fonte de enzima. Todos os passos foram realizados sob refrigeração.

2.04 Determinação de atividades enzimáticas

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando a mistura de reação em banho termostático (30 °C) por diferentes períodos de tempo. Foram usados controles sem enzima (brancos de enzima) e sem substrato (branco de substrato) que foram incubados do mesmo modo que os experimentais. As atividades sobre os substratos alquil β -D-glicopiranosídeos, amigdalina, AP β Dglu, celobiose, esculina, florizina, fenil β Dglu, gentiobiose, helicina, indoxil β Dglu, lactose, laminaribiose, laminarina, liquenana, linamarina, NO β Dglu, NP β Dcelobiosídeo, n-octil β -tio-D-glicopiranosídeos, oligocelodextrinas, prunasina, salicina e sinigrina, foram medidas através de detecção de glicose segundo Dahlqvist (1968). As atividades sobre MU β Dglu e MU β Dgal foram medidas através de detecção de metilumbeliferona segundo Baker & Woo (1992). As atividades sobre carboximetilcelulose e laminarina foram detectadas pela liberação de poder redutor segundo Noelting & Bernfeld (1949). Finalmente, os substratos NP α Lara, NP β Lara, NP β Dfuc, NP β Dgal, NP β Dglu, NP β Dgluc, NP β Dman e NP β Dxil, tiveram a clivagem determinada pela dosagem da liberação de p-nitrofenol segundo descrito por Terra *et al.* (1979).

Em geral os substratos usados aqui foram ensaiados em uma concentração de 10 mM e variações nessas concentrações estão indicadas nas legendas das figuras. Alguns substratos foram usados nas concentrações que se seguem: carboximetilcelulose - 0,5 % (p/v), esculina - 2,5 mM, florizina - 5 mM, liquenana - 0,25 % (p/v), MU β Dglu - 1 mM e MU β Dgal - 0,5 mM. Os substratos n-decil, n-undecil e n-dodecil β -D-glicopiranosídeos foram solubilizados em concentrações acima de sua CMC, usando o método descrito por Dinur *et al.* (1984). As atividades enzimáticas foram expressas em miliunidades. Uma unidade corresponde a quantidade de enzima que processa 1 μ mol de substrato (ou ligação) por minuto.

2.05 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteína presente na amostra foi feita usando o método descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton & Evans (1992), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina; ou o descrito por Bradford (1976), usando uma curva padrão de albumina de ovo. Todas as amostras obtidas em uma marcha de purificação (inclusive o homogeneizado) foram cromatografadas em coluna Fast Desalting (Pharmacia) contra água milli-Q® (Millipore), a fim de retirar as substâncias de baixo peso molecular que poderiam interferir na dosagem de proteína.

2.06 Determinação do peso molecular por ultracentrifugação em gradiente de densidade

Foi usado um gradiente de 10 ml, variando de uma concentração de 10 a 30 % (p/v) de glicerol preparado em tampão citrato/fosfato 5 ou 100 mM, pH 5,5. O homogeneizado de *Tenebrio molitor* (0,1 mg de proteína) foi aplicado em um volume de 200 µl em gradientes de alta e baixa força iônica. O tubo foi centrifugado (25 h; 96.000x g; 4 °C) em rotor HITACHI RPS 50.2. Frações de 200 µl foram coletadas a partir do fundo do tubo, de forma a iniciar a coleta pelas frações com uma maior concentração de glicerol. A Mr das enzimas foi calculada segundo Martin & Ames (1961), utilizando como padrões de peso molecular a hemoglobina (Mr 64.500) e catalase (Mr 232.000). As frações contendo hemoglobina foram detectadas adicionado-se 1 ml de água aos tubos que apresentavam coloração, sendo a absorbância a 545 nm determinada. A catalase foi ensaiada segundo Martin & Ames (1961), onde 10 µl de cada fração foram incubados com 145 µl de H₂O₂ 0,4 % preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, durante 40 segundos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 2 ml de uma solução de KI 10 % (p/v) e as frações que continham catalase detectadas pelo decréscimo de absorbância a 425 nm.

2.07 Diálise

A diálise foi feita para eliminar o sal presente nas amostras antes de enviá-las para o sequenciamento de peptídeos internos. Essa foi feita contra 100 volumes de água milli-Q®, sendo realizadas três trocas. A membrana utilizada tinha o limite de exclusão de 12.000 Da.

2.08 Focalização isoeétrica em géis de poliacrilamida

A focalização isoeétrica foi realizada como descrito por Terra, *et al.* (1978), em géis cilíndricos de poliacrilamida 7,0 % contendo 1 % de anfolito pH 3-10 (Pharmalite). Após pré-

focalização (30 min a 31 V/cm) as amostras foram aplicadas sob uma solução de glicerol 8 % e anfolito 4 % previamente colocada no topo do gel. Essa solução tem como intuito proteger a amostra da solução de NaOH presente no banho superior. Em um dos cilindros foram aplicados 40 µl do homogeneizado de conteúdo luminal de intestino médio de *Tenebrio molitor* e no segundo 100 µl de homogeneizado de farelo de trigo, as duas preparadas em 10 % de glicerol. Em um terceiro gel não foi aplicada amostra, com o intuito de se determinar o gradiente de pH formado durante a focalização isoeletrica. A focalização foi feita por 2 h a 4 °C, nas mesmas condições da pré-focalização.

Terminada a focalização isoeletrica, os dois primeiros géis foram fracionados em tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 5,5, usando um fracionador de géis de poliacrilamida (Autogeldivider Savant Instruments, EUA). Frações de 230 µl foram coletadas e mantidas por 3 h a 4 °C para em seguida serem usadas como fonte de enzima. O gel onde não foi aplicada amostra foi fracionado com água bidestilada em frações do mesmo tamanho dos anteriores. Depois de mantido por 3 h a temperatura ambiente, essas frações tiveram o seu pH determinado.

2.09 Eletroforese em gel de poliacrilamida para separação de proteína

2.09.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras a serem separadas eletroforeticamente, tiveram o sal retirado através de cromatografia em Fast Desalting (Pharmacia), foram secas através de centrifugação à vácuo, ressuspenas em 20 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2 % p/v; 2-β-mercaptoetanol 0,36 M; glicerol 10 % v/v; azul de bromofenol 0.0025 % p/v) e finalmente mantidas por 1 min em banho em ebulição.

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida na presença de SDS utilizando-se o sistema descontínuo de tampões descrito por Laemmli (1970). Foram usados géis de corrida em concentrações de poliacrilamida variável e o gel de empilhamento na concentração de 4 %, ambos contendo SDS 0,1 %. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 200 V a temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente, estivesse na borda inferior da placa. Para a detecção de atividade essa eletroforese era realizada em voltagem constante de 100 V a 4 °C.

2.09.2 Eletroforese em condições nativas (PAGE)

As amostras a serem submetidas à eletroforese nativa, tiveram o sal retirado através de cromatografia em Fast Desalting (Pharmacia), foram secas através de centrifugação à vácuo e, em seguida, ressuspensas em 20 µl de tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; glicerol 10 % v/v; azul de bromofenol 0.0025 % p/v).

A eletroforese foi realizada em placa fina de poliacrilamida utilizando o sistema descontínuo de tampões descrito por Laemmli (1970). Foram usados géis de separação apresentando concentrações de poliacrilamida variadas e gel de empilhamento na concentração de 4 %. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 100 V a 4 °C, até que o azul de bromofenol, utilizado como marcador de frente estivesse a na borda inferior da placa.

2.09.3 Eletroforese preparativa

Foi realizada como descrito por Davis (1964) usando a modelo 491 Prep Cell (Bio Rad). A fração solúvel do material presente na membrana peritrófica mais conteúdo de *Tenebrio molitor*, preparada como descrito no item 2.02, teve a sua concentração de glicerol acertada para 10 % (v/v) e submetida a eletroforese em um gel de corrida com 6,5 cm de altura preparado em uma concentração de 10 % de poliacrilamida. As proteínas eluídas, após a linha de frente ter saído do gel, foram coletadas através de um fluxo de tampão de corrida de 1 ml/min em frações de 1 ml. A eluição da atividade enzimática foi monitorada após a eletroforese, usando o substrato NPβDgal.

2.10 Detecção de proteína e atividade de β-glicosidase nos géis

Após a eletroforese, o gel a ser corado para evidenciar proteína era fixado em solução contendo metanol 50 % (v/v), ácido acético 12 % (v/v) e formaldeído 0,025 % (v/v) e submetidas ao método de coloração por prata desenvolvido por Blum *et al.* (1987). O gel a ser corado para evidenciar atividade de β-glicosidase era lavado a 4 °C com três trocas de 50 ml de tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5 a cada 10 min. Essa lavagem tem como intuito eliminar dos géis o Tris que é um inibidor de β-glicosidases, inclusive de insetos (Ferreira & Terra, 1983; Santos & Terra, 1985) e o SDS presente nos géis. A lavagem com tampão serviu também para equilibrar o ambiente no pH ótimo para a atividade dessa enzima. Após isso, o gel foi incubado na presença de MUβDglu 2 mM ou em MUβDgal 1 mM, preparados em tampão citrato/fosfato

50 mM, pH 5,5, por 40 min a 30 °C. O produto da atividade enzimática pode ser evidenciado em transiluminador de UV 312 nm (Manchenko, 1994).

2.11 Cálculo do peso molecular através de eletroforese

O peso molecular de proteínas em SDS-PAGE foi determinado através de uma curva padrão traçada do logaritmo de peso molecular contra a mobilidade relativa das seguintes proteínas padrões: fosforilase B – Mr 97.400; BSA - Mr 66.200; ovalbumina – Mr 45.000; anidrase carbônica – Mr 31.000; SBTI – Mr 21.500; lisozima - Mr 14.400.

Para proteínas migrando em eletroforese nativa (PAGE) e para algumas proteínas separadas por SDS-PAGE, empregou-se o tratamento matemático apresentado por Andrews (1995). Neste, proteínas padrões e de interesse são submetidas a eletroforeses em géis contendo diversas concentrações de poliacrilamida. Para cada padrão é traçado um gráfico da migração relativa obtida contra a porcentagem de poliacrilamida do gel. Da inclinação obtida é traçado um gráfico em função do peso molecular de cada um dos padrões, sendo essa reta utilizada para determinar o peso molecular de amostras onde esse é desconhecido. Os padrões usados para a determinação do peso molecular para eletroforese nativa foram: tiroglobulina - Mr 355.000; β -amilase - Mr 200.000; β -galactosidase - Mr 130.000; catalase - Mr 57.500; ovalbumina - Mr 45.000; carboxipeptidase B - Mr 34.4000; anidrase carbônica - Mr 31.000. Já em SDS-PAGE foram utilizados os padrões: β -galactosidase - Mr 130.000; catalase - Mr 57.500; BSA – Mr 66.290; ovalbumina - Mr 43.000; carboxipeptidase B - Mr 34.400; tripsina - Mr 23.300.

2.12 Cromatografias

2.12.1 Cromatografia para dessalinização de amostra

Foi usada a coluna Fast Desalting HR 10/10 (Pharmacia). A coluna foi acoplada ao sistema de FPLC, sendo a cromatografia realizada a temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre os substratos NP β Dglu ou NP β Dgal.

A cromatografia foi realizada em fluxo de 3 ml/min e as frações coletadas de 0,4 ml. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de solvente antes das cromatografias. Para preparar amostra para dosagem de proteína, foram aplicados 0,5 ml de amostra e a cromatografia realizada em água milli-Q®. Quando o intuito era equilibrar a amostra para a cromatografia em Mono Q, era

aplicado um volume de 1 ml de amostra e a cromatografia realizada no tampão utilizado no início da cromatografia em Mono Q.

2.12.2 Cromatografia de troca iônica

Foi usada a coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia). A coluna foi acoplada ao sistema de FPLC, sendo a cromatografia realizada a temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre os substratos NPβDglu ou NPβDgal.

O fluxo utilizado foi de 1 ml/min e as frações coletadas de 0,4 ml. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão antes das cromatografias. A amostra foi eluída com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl. Para a purificação das β-glicosidases 1, 3a e 3b de *Tenebrio molitor* foi utilizado o tampão piperazina 20 mM, pH 5,5. Para a purificação da β-glicosidase 2 era acrescentado 10 % de glicerol a esse tampão.

2.12.3 Cromatografia de interação hidrofóbica

Foi realizada usando a coluna Econo-Pac Methyl HIC (Bio Rad), apresentando um volume de 1 ml, acoplada ao aparelho Econo System (Bio Rad). A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente em tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5, sendo usado um fluxo de 0,7 ml/min e frações de 0,5 ml coletadas. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão antes da cromatografia. A amostra foi eluída com um gradiente de 1,7 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações coletadas foram analisadas quanto a sua atividade sobre os substratos NPβDglu, NPβDgal e celobiose.

Quando realizada em sistema de FPLC, foram usadas as colunas Phenyl Superose e Alkyl Superose HR 5/5 (Pharmacia). A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas analisadas quanto a sua atividade sobre os substratos NPβDglu ou NPβDgal. O fluxo usado foi de 0,5 ml/min, sendo coletadas frações de 0,4 ml. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão antes das cromatografias. A amostra foi eluída com um gradiente de 1,7 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para a purificação das β-glicosidases 1, 3a e 3b de *Tenebrio molitor* foi utilizado o tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 6,5. Para a purificação da β-glicosidase 2, por sua vez, foi utilizado o tampão piperazina 50 mM, 10 % (p/v) glicerol, pH 5,5.

2.12.4 Cromatografia de gel filtração

Foi usada a coluna Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia). A coluna foi acoplada ao sistema de FPLC, sendo a cromatografia realizada a temperatura ambiente. A eluição de proteína foi monitorada pela leitura a 280 nm e as frações obtidas foram analisadas quanto a sua atividade sobre os substratos NPβDglu ou NPβDgal.

A cromatografia foi realizada em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5, sendo o fluxo utilizado de 1 ml/min e as frações coletadas de 0,4 ml. A coluna foi previamente equilibrada com 2 volumes de tampão antes das cromatografias. A Mr das enzimas cromatografadas pode ser determinada usando as proteínas padrão: tiroglobulina - Mr 355.000; β-amilase - Mr 200.000; ovalbumina - Mr 43.000; mioglobina - Mr 17.200; citocromo C - Mr 11.700. Essas proteínas são cromatografadas e o volume de eluição obtido é diretamente proporcional ao logaritmo do peso molecular.

2.13 Purificação da β-Glicosidase 1

Ao sobrenadante do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi adicionado sulfato de amônio para 1,7 M, usando para isso uma solução concentrada de 4 M desse sal em tampão citrato/fosfato 200 mM, pH 5,5. Esse material foi então centrifugado (25.000x g; 30 min; a 4 °C) e o sobrenadante aplicado na coluna Econo-Pac Methyl HIC (Bio Rad). As frações do primeiro pico eluído, correspondente a β-Glicosidase 1 e contendo atividade sobre NPβDglu e celobiose, foram reunidas. Esse material foi concentrado de um volume de 15 ml para aproximadamente 3 ml com o auxílio do concentrador de amostra Centriplus (Millipore). Esse concentrado era então filtrado (Membrana HV (Durapore) em PVDF; poro de 0,45 μm; Millipore) e equilibrado para o tampão de início da cromatografia de troca iônica através de uma cromatografia em coluna Fast Desalting (Pharmacia). As frações contendo atividade eluídas dessa coluna foram filtradas do mesmo modo e aplicadas na coluna Mono Q. As frações ativas eluídas dessa coluna, que recuperavam a maior parte da atividade da β-Glicosidase 1, foram reunidas e tiveram sulfato de amônio adicionado para uma concentração final de 1,7 M, como feito para o homogeneizado. Esse material foi então filtrado e cromatografado em Phenyl Superose (Pharmacia) e o material obtido dessa cromatografia utilizado como fonte da β-Glicosidase 1 purificada.

2.14 Purificação da β -Glicosidase 2

Ao sobrenadante do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi adicionado glicerol para 10 % (v/v) e, em seguida, aplicado em uma eletroforese preparativa em Prep Cell (Bio Rad). As frações eluídas que continham a atividade majoritária sobre NP β Dgal, correspondente à β -Glicosidase 2, foram reunidas, filtradas (filtro com poro de 45 μ m; Millipore) e, finalmente, aplicadas na coluna Mono Q. As frações contendo atividade enzimática obtidas dessa cromatografia foram reunidas e adicionou-se sulfato de amônio para a concentração final de 1,7 M, usando para isso uma solução concentrada de 4 M desse sal em tampão citrato/fosfato 200 mM, pH 5,5. Esse material foi filtrado e, finalmente, cromatografado em Alkyl Superose (Pharmacia). O material obtido dessa cromatografia foi utilizado como fonte da β -Glicosidase 2 purificada.

2.15 Purificação das β -Glicosidases 3a e 3b

O primeiro passo cromatográfico em Econo-Pac Methyl HIC (Bio Rad) foi idêntico ao usado para purificar a β -Glicosidase 1 (item 2.13). As frações correspondentes ao último pico eluído da coluna, que corresponde às β -Glicosidases 3a juntamente com a 3b e apresentam atividade sobre NP β Dglu, celobiose e NP β Dgal, foram reunidas. Esse material foi concentrado de um volume de 15 ml para aproximadamente 3 com o auxílio do concentrador de amostra Centriplus (Millipore). Esse concentrado era então filtrado (filtro com poro de 45 μ m; Millipore) e equilibrado para o tampão de início da cromatografia de troca iônica através de uma cromatografia em coluna Fast Desalting (Pharmacia). As frações contendo atividade eluídas dessa coluna foram filtradas (filtro com poro de 45 μ m; Millipore) e aplicadas na coluna Mono Q. Para finalizar, nas frações ativas eluídas dessa coluna, que recuperavam a maior parte da atividade da β -Glicosidase 3, adicionou-se sulfato de amônio para uma concentração final de 1,7 M, usando para isso uma solução concentrada de 4 M desse sal em tampão citrato/fosfato 200 mM, pH 5,5. Esse material foi então filtrado (filtro com poro de 45 μ m; Millipore) e cromatografado em Alkyl Superose (Pharmacia), onde a atividade das β -Glicosidases 3a e 3b eram separadas. Os dois picos de atividade obtidos dessa cromatografia foram usados como fonte das β -Glicosidases 3a e 3b purificadas.

2.16 Determinação do pH ótimo das enzimas purificadas

Essa determinação foi realizada usando preparações purificadas das β -Glicosidases de *Tenebrio molitor*. A atividade enzimática foi determinada usando os substratos MU β Dglu 1 mM, MU β Dgal 0,5 mM e NP β Dglu 10 mM, preparados em diversos tampões na concentração de 50 mM, para as β -Glicosidase 1, 2, 3a e 3b respectivamente. O experimento foi realizado através de um ensaio de quatro tempos, sendo a inclinação da reta para cada ponto determinada. A atividade foi expressa em porcentagem da maior atividade obtida. Cada pH foi determinado em uma mistura de reação igual a dos tubos experimentais, mantidos também a 30 °C. Esse cuidado é necessário uma vez que a temperatura pode afetar a ionização de grupos presentes no tampão.

2.17 Tentativas de estabilização e efeito de vários compostos na atividade da

β -Glicosidase 1

Para verificar o efeito de vários grupos na estabilidade da β -Glicosidase 1, a enzima foi pré-incubada a 30 °C em tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 5,5, na presença de diversos compostos estabilizantes. No grupo controle a enzima foi pré-incubada apenas com tampão. O tempo de pré-incubação variou, sendo aliquotas retiradas do tempo zero a até vinte e quatro horas de incubação. Foram utilizados os seguintes compostos: Glicerol (2,7 M); Na₂SO₄ (2 M); (NH₄)₂SO₄ (2 M); Trealose (1 M); PEG (50 mM). Depois de decorrido o tempo de incubação, aliquotas de 50 μ l de enzima foram retiradas e acrescentaram-se 50 μ l MU β Dglu 2 mM preparado em água bidestilada. A atividade remanescente após pré-incubação com cada composto foi calculada em relação à atividade observada no grupo controle (onde só havia tampão) no tempo zero de pré-incubação.

Foi verificado também o efeito desses compostos sobre a atividade da β -Glicosidase 1 de *Tenebrio molitor*. Para isso, essa enzima foi incubada em 5 concentrações diferentes do substrato MU β Dglu (0,4 a 0,04 mM) para testar o efeito dos seguintes compostos: Glicerol 1 M; MgSO₄ 1 M; Na₂SO₄ 1M; (NH₄)₂SO₄ 1 M; Trealose 0,5 M; PEG 50 mM; Sacarose 1 M. As concentrações de substrato usadas foram escolhidas em uma faixa que cobria de 0,2 a 2 vezes o K_m para a sua clivagem pela β -Glicosidase 1. No grupo controle a enzima era incubada apenas com tampão.

2.18 Estudos cinéticos

Esses experimentos foram realizados usando preparações purificadas das β -Glicosidases 1, 2, 3a e 3b de *Tenebrio molitor*. Para determinação de K_m , a velocidade de hidrólise foi determinada usando pelo menos dez concentrações diferentes para cada substrato. Para a determinação do K_i as enzimas foram incubadas em 5 concentrações diferentes de substrato (escolhidas em uma faixa que cobria de 0,2 a 2 vezes o K_m para a clivagem do substrato escolhido) em 5 concentrações diferentes de inibidor. As velocidades de hidrólise do substrato foram determinadas e usadas para traçar o gráfico de Lineweaver-Burk. As inclinações obtidas desses gráficos são traçadas em função das respectivas concentrações de inibidor permitindo assim a determinação do K_i do complexo enzima/inibidor (Segel, 1993). Os experimentos para a determinação do K_i para γ galactona lactona e glucono δ lactona foram realizados em tempos curtos de incubação evitando a degradação desses compostos. O programa Enzfitter (Elsevier Biosoft, Cambridge, UK; ver Oestreicher & Pinto, 1983) foi usado para determinar K_m , K_i e V_{max} .

Quando era observada uma inibição por altas concentrações de substrato, os parâmetros cinéticos foram calculados de acordo com o esquema abaixo:

Para determinar o efeito de Triton X-100 na atividade enzimática das β -glicosidases de *Tenebrio molitor*, as enzimas foram incubadas em 5 diferentes concentrações de substrato. A preparação purificada da β -Glicosidase 2 foi ensaiada com o substrato MU β Dgal para se verificar o efeito do Triton X-100 (2,4; 1,2; 0,24; 0,12 mM) na sua atividade. As frações eluídas da cromatografia na coluna Econo-Pac Methyl HIC, correspondentes à mistura das β -Glicosidase 3a e 3b separadas das outras β -glicosidases de *Tenebrio molitor*, foram ensaiadas com NP β Dglu para verificar o efeito do Triton X-100 (2,4 mM) na atividade dessas enzimas. As alterações na atividade da enzima eram determinadas através de alterações de V_{max} e/ou no K_m para a clivagem do substrato usado.

2.19 Cálculos da afinidade dos subsítios

A afinidade dos subsítios por glicose e o k_{int} (constante catalítica independente do grau de polimerização) foram calculados a partir dos dados de k_{cat}/K_m para a hidrólise de oligocelodextrinas com graus de polimerização de 2 a 5. Os cálculos foram feitos como descrito por Hiromi *et al.* (1973).

A validade dos cálculos foi posteriormente confirmada comparando-se os valores de k_{cat}/K_m experimentais e teóricos. Os valores teóricos são obtidos de acordo com a equação:

$$(k_{cat}/K_m)_n = 0,017 \cdot k_{int} \cdot \exp\left(\sum_{i=1}^{n-1} A_i/RT\right)$$

onde n é o grau de polimerização do substrato, 0,017 corresponde à contribuição da entropia de mistura em água a 30 °C (Hiromi *et al.*, 1973), k_{int} é a constante catalítica independente do grau de polimerização das dextrinas, A_i é a afinidade no subsítio i , R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta.

Os valores experimentais e teóricos que foram calculados diferem no máximo de 2 %, o que confirma a validade das equações e das afinidades calculadas para os subsítios. A afinidade dos subsítios para outros compostos foi determinada como descrito para glicose.

2.20 Detecção da atividade de transglicosilação

Uma preparação da β -Glicosidase 3a purificada foi incubada a 30 °C com 50 mM de amigdalina em tampão piperazina 10 mM, pH 5,5. Após diferentes períodos de tempo, amostras de 100 μ l da mistura de reação eram retiradas, fervidas por 5 min e, finalmente, secas através de centrifugação à vácuo. Esse material foi então ressuscitado em 100 μ l 80 % (v/v) de acetonitrila, filtrado e aplicado na coluna Asahipak NH2P-50 (Shimadzu, sistema de HPLC). Após a cromatografia, foi possível a detecção da presença de amigdalina, prunasina, mandelonitrila, glicose e dois compostos desconhecidos. Um desses compostos teve que ser novamente cromatografado para a retirada de glicose contaminante. As condições de cromatografia foram idênticas a anterior a não ser pela fase móvel que aqui foi usada a acetonitrila 85 % (v/v). Os dois compostos desconhecidos foram então secos a 50 °C e ressuscitados em acetonitrila 50 % (v/v) para uma concentração de 0,4 mg/ml. Esses materiais tiveram os seus espectros de massa determinados com o auxílio do espectrômetro de massa Micromass Platt Form II por ionização por eletrospray no modo positivo. Para a detecção da massa, as amostras foram injetadas por infusão a 70 °C, na presença de 0,1 % (v/v) de ácido

fórmico através de um injetor Rhodyne em um fluxo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Um espectro contínuo foi obtido usando uma voltagem no cone de 25-30 e uma voltagem no capilar de 3,5 kV.

2.21 Padrão de ação para a clivagem de laminarina

Preparações purificadas da β -Glicosidases 3a foram incubadas na presença de laminarina 1 % (p/v) mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Determinou-se tanto a liberação de pontas redutoras quanto a produção de glicose livre.

Para verificar a possibilidade dessa enzima estar clivando oligossacarídeos contaminantes e não propriamente a laminarina, preparações desse substrato foram aplicadas em TLC. Foram aplicadas também amostras de laminarina que foram incubadas com a β -Glicosidase 3a. Preparações da β -Glicosidase 3a purificada foram incubadas na presença de laminarina 5 % (p/v) em tampão piperazina 10 mM, pH 5,5. Após diferentes períodos de tempo, amostras de 100 μl da mistura de reação eram retiradas e fervidas por 5 min. Essas amostras foram aplicadas na TLC.

Para a realização da TLC, 40 g de sílica G foram misturados a 80 ml de tampão acetato de sódio 20 mM e, esse material, usado na preparação de placas de 30 cm largura por 30 cm de altura em espessura de 0,25 mm. Após as placas estarem secas, 15 μl das amostras foram aplicadas na região inferior da placa em poços de 1,5 cm de largura por 3 cm de altura. As amostras foram aplicadas de 3 em 3 μl sendo que no intervalo de cada aplicação era esperado que a amostra aplicada secasse. Após as amostras aplicadas estarem secas, a placa teve a sua extremidade inferior imersa na fase móvel butanol : etanol : água (40:30:30) e a cromatografia realizada por cerca de 3h até que a linha de frente alcançasse o topo da placa.

Terminada a cromatografia, os carboidratos foram detectados aspergindo uma solução de fenol 3 % (p/v) e H_2SO_4 5 % (v/v) nas placas já secas. Essas placas foram incubadas por cerca de 10 a 15 min a 100 °C até que as bandas de carboidrato fossem visualizadas. Para a determinação dos produtos gerados foram usados como padrões oligomaltodextrinas, glicose, laminaribiose e gentiobiose.

2.22 Distribuição de β -glicosidases no intestino médio de *Tenebrio molitor*

Larvas crescidas (peso fresco aproximado de 0,12 g) foram dissecadas como descrito anteriormente (item 2.02), sendo o intestino médio isolado e dividido em três partes de tamanho semelhante representando a região anterior, média e posterior. Para cada região foi separada a

membrana peritrófica mais conteúdo e o epitélio ventricular. Cada um desses materiais foi homogeneizado em água bidestilada como o auxílio de um homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem. A suspensão obtida teve a sua concentração de proteína determinada (Bradford, 1976) juntamente com a atividade sobre celobiose (7 mM), preparada em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Foram preparados quatro lotes diferentes de animais, sendo cada um obtido a partir do material dissecado de cinco animais.

2.23 Produção de anticorpo policlonal

A produção de anticorpos específicos contra a β -Glicosidase 3a foi feita como descrito por Jordão *et al.* (1996a). Preparações purificadas dessa enzima teve o sal retirado através de uma cromatografia em Fast Desalting e, em seguida, foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE sem ser previamente tratada por fervura. A região do gel onde se encontrava a banda com maior massa de proteína foi cortada e preparada para a aplicação em coelho. A região do gel que continha uma banda com pouca quantidade de proteína (e menor peso molecular) não foi usada para a produção de anticorpos.

Antes da aplicação do material para a produção do anticorpo, foram retirados 5 ml de sangue do coelho, com o intuito de se obter o anticorpo pré-imune. Para a produção do anticorpo, foi feita uma primeira aplicação de 51 μ g de proteína. A região do gel que continha a banda, foi homogeneizada em adjuvante completo de Freund em uma diluição de 1:1 para um volume final de 5 ml. Essa emulsão foi então aplicada através de injeções subcutâneas em quatro locais diferentes das costas do coelho. Uma segunda aplicação foi feita trinta e cinco dias após a primeira, utilizando o mesmo procedimento da anterior. Nessa foram aplicados 41 μ g de proteína e o gel foi homogeneizado em adjuvante incompleto de Freund. Após treze dias, o sangue do coelho foi retirado para se obter o anticorpo imune.

Para obter as preparações de anticorpo semi-purificado foi utilizada a técnica descrita por Jordão *et al.* (1996a). O sangue coletado antes da aplicação (pré-imune) e o sangue coletado após as aplicações (imune) foram deixados por 1 h a 37 °C e, em seguida, por 18 h a 4 °C. Esse material foi então centrifugado (3.000x g; 10 min; 4 °C). Ao sobrenadante resultante (soro) foi acrescentada uma solução de sulfato de amônio saturada preparada em tampão fosfato, 200 mM, pH 6,7, em uma proporção de 1:1. Após permanecer 18 horas a temperatura ambiente, a suspensão obtida foi centrifugada (12.000x g; 15 min; 4 °C). O precipitado foi então ressuspenso em solução 50 % saturada de sulfato de amônio pH 6,7 e novamente centrifugado

nas condições anteriores. Este passo foi então repetido novamente e o precipitado final obtido ressuspendido em 0,125 M de NaCl. Esse material foi dialisado por 20 h contra 1.000 volumes de 125 mM de NaCl sendo realizada uma troca de salina. O material dialisado foi finalmente centrifugado (12.000x g; 10 min; 4 °C) e o sobrenadante resultante aliquoteado e mantido a -20 °C até o uso.

2.24 Western blot

O homogeneizado de membrana peritrófica mais conteúdo do tubo digestivo de *Tenebrio molitor*, juntamente com amostras purificadas das β -Glicosidase 1, 2, 3a e 3b, foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE 12 % em placa de 0,7 mm. Após a separação eletroforética, o gel foi submetido ao método de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose descrito por Towbin *et al.* (1979). Inicialmente o gel foi equilibrado por 15 min em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e contendo metanol 20 %. Em seguida, foi realizada a transferência eletroforética das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose de poro de 0,45 μ m, também previamente equilibrada por 15 min no mesmo tampão. Foi utilizado o sistema de transferência de proteínas semi-seco (Bio Rad) na presença do tampão acima nas condições indicadas pelo manual do aparelho (15V; 5,5 mA/cm² de gel; 30 min). A eficácia da transferência das proteínas foi monitorada por marcadores de peso molecular pré-corados Low-Range (Bio Rad, utilizados 4 μ l) aplicados na eletroforese. Padrões utilizados: fosforilase B – Mr 120.000; BSA – Mr 84.000; ovalbumina – Mr 53.200; anidrase carbônica – Mr 34.900; SBTI – Mr 28.700; lisozima – Mr 20.500.

Antes de serem imunoensaiadas, as membranas de nitrocelulose foram deixadas imersas em uma solução 5 % (p/v) de leite em pó desnatado dissolvido em TBS (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M) por 1 h a temperatura ambiente (ou 18h a 4 °C). Esse procedimento é útil para bloquear os sítios da membrana de nitrocelulose que não contivessem proteína transferida do gel, evitando assim ligações inespecíficas nos passos que se seguem. As membranas de nitrocelulose foram então lavadas 4 vezes por 5 min cada com TBS contendo Tween 20 0,05 % (v/v) (TBS-T) e incubadas por 2 h com o anticorpo produzido contra a banda de alto peso molecular presente na preparação da β -Glicosidase 3a purificada na diluição 1:200 em TBS-T. As membranas de nitrocelulose foram então lavadas com TBS-T 4 vezes, por 5 minutos cada, e incubadas por mais 2 h com uma solução de anti-IgG de coelho acoplada a peroxidase diluído 1:500 em TBS-T. A seguir, as membranas de nitrocelulose foram lavadas 4

vezes por 5 min com TBS e então reveladas. Para isso foram utilizados dois procedimentos. No primeiro as membranas foram incubadas com uma solução feita com 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvidas em 4 ml de metanol, à qual foi adicionada 20 ml de TBS aquecido a 37 °C e 15 µl de H₂O₂, até que bandas escuras pudessem ser visualizadas (até 15 min). Após serem extensivamente lavadas com água destilada, as membranas de nitrocelulose foram deixadas para secar entre duas folhas de papel de filtro em local arejado. O outro método foi realizado utilizando o Kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Nesse a atividade enzimática da peroxidase leva a emissão de luminescência que é detectada utilizando-se filmes de raio X (Kodak) através de tempos de exposição de 5 a 25 s.

2.25 Transferência das β-glicosidases de *Tenebrio molitor* para membrana de PVDF

A preparação de β-Glicosidase 3a e 3b purificadas foi cromatografada em Fast Desalting (Pharmacia) em água milli-Q® com o intuito de retirar o sal presente na amostra, que a seguir foi seco através de centrifugação à vácuo. Um total de 12 µg da enzima (aproximadamente 200 pmoles) foi ressuspenso em tampão de amostra e submetidas a eletroforese em SDS-PAGE em uma concentração de poliacrilamida de 12 %. Para esse experimento a amostra não foi submetida à fervura.

Após a eletroforese, as proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de PVDF segundo o método de Matsudaira (1987). Nesse, o gel foi incubado juntamente com a membrana de PVDF em tampão de transferência CAPS 10 mM, metanol 10 % (v/v). A transferência das proteínas presentes no gel foi realizada usando a célula de transferência Mini Trans-Blot® (Bio Rad). As condições da eletroforese foram de 300 mA por 2 h a uma temperatura de 4 °C. Após transcorrido o tempo de transferência, a membrana de PVDF foi lavada 3 vezes por 5 min em água bidestilada, imersa em metanol e corada em solução 0,1 % (p/v) de Coomassie Blue R-250 em 50 % (v/v) metanol por 5 min sob agitação. As bandas eram então visualizadas pela descoloração da membrana em metanol 50 % (v/v) e então secas na bancada.

Para monitorar a eficiência de transferência, o gel de poliacrilamida também foi corado utilizando-se Coomassie Blue R-250 para verificar o quanto da proteína tinha permanecido no gel. O resultado mostrou que toda a enzima havia sido transferida para a membrana de PVDF.

2.26 Determinação de seqüências de peptídeos internos das β -glicosidases de *Tenebrio molitor*

Para o seqüenciamento de peptídeos internos, 12 μ g de β -Glicosidase 3a e 3b foram dialisados e enviados liofizados para o seqüenciamento de aminoácidos realizados através do serviço oferecido comercialmente pela Universidade do Kentucky (USA). A amostra foi então submetida a digestão pela endoproteinase Lis-C e os peptídeos de cada amostra separados em HPLC. Dessa separação foram escolhidos dois peptídeos da β -Glicosidase 3b e um peptídeo da β -Glicosidase 3a para serem submetidos ao seqüenciamento de aminoácidos. É importante salientar aqui que o peptídeo seqüenciado da β -Glicosidase 3a tinha o mesmo tempo de eluição de um dos peptídeos da β -Glicosidase 3b.

A banda de alto peso molecular, observada nas preparações da β -Glicosidase 3b, que foi transferida para a membrana de PVDF como descrito no item 2.25, foi recortada e submetida a determinação da seqüência N-terminal de aminoácidos. Após prévia redução com DDT e alquilação com iodoacetamida, as amostras foram seqüenciadas usando seqüenciador automático Applied Biosystems (Perkin Elmer), baseado na reação da degradação de Edman. Os PTH aminoácidos produzidos foram identificados a cada ciclo da reação pelos volumes de eluição obtidos por cromatografias seqüenciais em coluna de fase reversa (Brownlee C18). Nessa, a coluna foi equilibrada em acetato de sódio contendo 5 % tetrahidrofurano e os peptídeos eluídos através de um gradiente de acetonitrila e propanol (78:12). Esse seqüenciamento também foi realizado pelo serviço oferecido pela Universidade do Kentucky (USA).

2.27 Meios de cultura para crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular

Os meios de cultura para o crescimento de células e os tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular foram preparados como descritos por Sambrook *et al.* (1989).

2.28 Extração de RNA total de intestino médio e detecção por eletroforese

Para a extração de RNA total das células do intestino médio de *Tenebrio molitor*, duzentos animais foram dissecados e os epitélios do intestino médio separados e lavados em salina (NaCl 2 %) preparada em H₂O-DEPC. Esse cuidado foi tomado com o intuito de evitar a ação de RNases. Durante a dissecação o material era estocado em tubos de microcentrífuga mergulhados em banho de gelo-seco em etanol e, ao final, estocados a -80 °C.

Os epitélios foram então homogeneizados em Potter-Elvehjem em 12 ml de Tryzol (Gibco). O homogeneizado obtido foi transferido para um tubo de centrifuga e permaneceu por 5 min a temperatura ambiente com o objetivo de permitir a dissociação dos complexos nucleoproteicos. Foi então adicionado 0,2 ml de clorofórmio por ml de Tryzol usado na homogeneização. O tubo foi agitado vigorosamente e deixado na bancada a temperatura ambiente por 3 minutos. Estas amostras foram centrifugadas (12.000x g; 15 min; 4 °C) para a separação de duas fases: uma inferior vermelha (orgânica) e outra superior e incolor (aquosa) onde se encontra o RNA total. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 0,5 ml de isopropanol por ml de Tryzol usado na homogeneização. Este material foi deixado a temperatura ambiente por 10 min e, em seguida, centrifugado (12.000x g; 10 min; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75 % (v/v) (1 ml por ml de Trysol usado). Em seguida este material foi seco sob fluxo de ar em uma capela e, finalmente, o RNA total dissolvido em H₂O-DEPC.

O RNA total obtido teve a sua integridade testada através de uma eletroforese em gel de agarose. O gel foi preparado para uma concentração final de 1,5 % (p/v) de agarose em tampão MOPS preparado com H₂O-DEPC contendo formaldeído 18 % (p/v). As amostras foram diluídas em tampão MOPS 5 vezes, formol 17,5 % (v/v) e formamida 50 % (v/v), aquecidas por 15 min a 65 °C e, em seguida, adicionou-se o azul de bromofenol.

A eletroforese era realizada em uma voltagem de 120 V por um período de 3 h. Ao final da eletroforese o gel foi incubado por 5 min em solução de brometo de etídio diluído e o RNA visualizado em um transiluminador de UV (312 nm). A integridade do RNA foi verificada pela presença da banda de RNA ribossômico.

2.29 Confecção de biblioteca de cDNA de intestino médio de *Tenebrio molitor*

A preparação de RNA total, isoladas do epitélio do intestino médio de *Tenebrio molitor*, foi enviada para a construção de biblioteca de cDNA pré-pronta λ Zap II não direcional, iniciadores randômicos e oligo dT (Stratagene, La Jolla, CA), confeccionada pela Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA). Essa biblioteca foi construída utilizando-se o vetor λ Zap II sendo os fragmentos de cDNA clonados não direcionalmente no sítio para enzima de restrição ECO-RI. Durante a confecção das bibliotecas, o RNA poliA⁺ purificado foi submetido à reação de transcriptase reversa onde metade da amostra foi submetida a reação usando os iniciadores randômicos e a outra metade o iniciador poliT. Logo, os cDNAs clonados nessa biblioteca representam uma mistura de produtos provenientes desses dois tipos de reação.

2.30 Plaqueamento e seleção primária na biblioteca de cDNA

Células XL1-blue MRF' foram crescidas em LB-líquido contendo maltose 0,2 % (p/v) e MgSO_4 10 mM durante cerca de 16 h, a 30 °C e sob agitação a 250 rpm. Em seguida eram precipitadas por centrifugação (2.000x g; 10 min; temperatura ambiente) e então ressuspensas em MgSO_4 10 mM para uma $\text{DO}_{600} = 0,5$. Uma alíquota de 600 μl destas células foi incubada com alíquotas da biblioteca de cDNA, contendo 5×10^3 pfu, por 15 min a 37 °C. Em seguida, eram adicionados 6,5 ml de NZY-agarose e a mistura derramada sobre uma placa NZY-ágar 150 mm. As placas de NZY-ágar permaneciam por um período de 6 h a 37 °C para o aparecimento dos primeiros sinais de placas de lise.

Uma vez com placas de lise formadas iniciava-se o procedimento de indução do promotor da β -galactosidase com IPTG. Para isso eram usadas membranas de nitrocelulose (Bio Rad), que haviam sido anteriormente embebidas em IPTG 10 mM e deixadas secar na bancada. Essas membranas eram colocadas cuidadosamente sobre o NZY-agarose de cobertura evitando a formação de bolhas. As placas eram novamente incubadas a 37 °C desta vez por um período de 4 h. As proteínas de fusão (β -galactosidase + polipeptídeo codificado pelo cDNA do inseto), gerados pela indução, ficavam aderidas às membranas. Para finalizar, as placas eram deixadas pelo menos 2 h a 4 °C para evitar que pedaços de agarose ficassem aderidos às membranas de nitrocelulose quando essas fossem retiradas da placa. Marcas eram feitas nas membranas e nas placas de NZY-ágar, com o auxílio de agulhas, com o intuito de orientar o posicionamento da membrana na placa. Esse procedimento é importante para se localizar os clones de interesse.

O procedimento de seleção de clones reconhecidos pelo anticorpo específico contra a β -Glicosidase 3a foi feita usando a técnica de Western blot descrita para a detecção de proteínas (item 2.24). De posse dos sinais positivos revelados pelo anticorpo anti- β -Glicosidase 3a nas membranas de nitrocelulose, foi feita a coleta dos clones. Utilizando-se das marcas de orientação nas placas e nas membranas, pedaços do meio que continham os clones que apresentavam reação com o anticorpo eram retirados com a ajuda de uma ponteira descartável de pipeta automática. Esses pedaços de meio eram então transferidos para 0,5 ml de tampão SM contendo 20 μl de clorofórmio. Após incubação de 1 a 2 h a temperatura ambiente a suspensão de fagos já podia ser usada para experimentos posteriores.

2.31 Seleção secundária dos clones positivos

Este procedimento foi realizado com o intuito de obter clones isolados reconhecidos pelo anticorpo anti- β -Glicosidase 3a. Ele é necessário pelo fato do procedimento na seleção primária não ser capaz de recuperar clones isolados, visto que a densidade de placas de lise por placa de cultura é muito grande nesta fase inicial. Esse procedimento é basicamente semelhante ao da seleção primária sendo as diferenças básicas: o material de partida, que aqui são os fagos do clone selecionado na seleção primária, e o número de clones usados na seleção, que aqui é muito menor.

Assim, alíquotas de 200 μ l das células XL1-blue MRF' foram incubadas juntamente com alíquotas dos fagos obtidos na seleção primária, contendo 3×10^2 pfu, por 15 min a 37 °C. Em seguida eram adicionados 2,5 ml de NZY-agarose e a mistura derramada sobre uma placa NZY-ágar 100 mm. Todos os outros procedimentos são idênticos aos descritos anteriormente (ver item 2.29).

2.32 Excisão *in vitro* do plasmídio Bluescript

Células XL1-blue MRF' e SOLR foram crescidas em LB-líquido contendo maltose 0,2 % (p/v) e MgSO_4 10 mM durante cerca de 16 h a 30 °C sob agitação de 250 rpm. Em seguida as células foram precipitadas por centrifugação (2.000x g; 10 min; temperatura ambiente) e ressuspensas em MgSO_4 10 mM para uma $\text{DO}_{600} = 1,0$.

Em seguida, 200 μ l de células XL1-blue MRF' foram co-infectadas com 30 μ l da amostra de fago λ Zap II isolada (contendo aproximadamente 1×10^5 partículas virais), obtido na seleção secundária da biblioteca de cDNA, e 1 μ l de fago "helper ExAssist". Neste passo proteínas codificadas pelo fago "helper" reconhecem especificamente regiões do DNA do fago λ Zap II e promovem a excisão e circularização de uma fita simples de DNA que contém as seqüências do plasmídio Bluescript e o inserto de cDNA contido pelo clone de interesse. Após incubação em LB-líquido a 37 °C por 16 h, o plasmídio é então encapsulado pelas proteínas do fago "helper" e eliminado pelas células XL1-blue MRF'. Para se purificar os fagos, a cultura foi incubada a 70 °C por 15 min, período esse suficiente para matar as células XL1-blue MRF' presentes no meio. Finalmente, esse material era centrifugado (2.000x g; 10 min; temperatura ambiente) e o sobrenadante, contendo os fagos carregando o plasmídio pBluescript e fagos λ Zap II, recuperados.

Para finalizar, as células SOLR foram transformadas com o plasmídio Bluescript. Para isso, 200 µl de células SOLR foram incubadas com 10 µl da preparação de fagos obtida no passo anterior. Após 15 min de incubação a 37 °C essas células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C.

Durante esse procedimento, os fagos “helper ExAssist” infectam essas células, mas não são capazes de crescer. Essas células são selecionadas negativamente em meios contendo ampicilina. Os fagos λ Zap II não são capazes de infectar as células SOLR. Células infectadas pelos fagos “helper ExAssist” contendo como material genético o plasmídio pBluescript são selecionadas positivamente em meios contendo ampicilina.

As colônias isoladas obtidas no meio LB-ágar contendo ampicilina foram crescidas em meio LB-líquido também contendo ampicilina (50 µg/ml). Em seguida foram submetidas a um procedimento de “mini-prep” (item 2.36) para extração do plasmídio Bluescript que foi, a seguir, submetido à digestão por enzimas de restrição ou a sequenciamento automático.

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

As reações de PCR eram realizadas em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01 % (p/v), Triton X-100 0,1 % (p/v), MgCl₂ 1,5 mM e dNTP 0,2 mM. Os iniciadores eram usados em uma concentração final de 100 µM juntamente com 5 U de Taq DNA Polimerase. Como DNA molde foram usadas alíquotas da biblioteca de cDNA do tubo digestivo de *Tenebrio molitor* contendo um número de aproximadamente 6×10^7 pfu. As reações foram realizadas em um termociclador Robocycler (Stratagene).

Cada reação de PCR era composta de 1 ciclo inicial onde a mistura de reação permanecia por 10 min a 94 °C sem ter sido acrescentada a Taq DNA Polimerase. Esse ciclo tinha como finalidade promover a desnaturação das proteínas da cápsula do fago e exposição do DNA viral. Em seguida era adicionada a enzima à mistura de reação e realizados mais 30 ciclos como descrito a seguir: 1 min a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 1 min em uma temperatura de pareamento dos iniciadores (escolhida de acordo com os iniciadores usados) e, finalmente, 1 min a 72 °C para alongamento da fita complementar de DNA. Para o cálculo da temperatura de pareamento dos iniciadores foi utilizada a seguinte equação: $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C)$.

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1 % (p/v) de

agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de pontencial de 80-100 V.

Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm). Os fragmentos de DNA foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração QIAEX II (Quiagen), o qual baseia-se na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA a uma resina de troca iônica.

2.34 Ligação de fragmentos de DNA a plasmídios vetores

Para a clonagem de fragmentos de DNA obtidos de amplificações por PCR, foi utilizado o Kit de ligação pGenT-Easy vector Sistem I (Promega). Nesse foi usada uma mistura de reação que consistia de T4 DNA ligase, 1 µg de plasmídio juntamente com o fragmento de PCR (purificado de géis de agarose) a ser clonado em tampão apropriado. Essa mistura foi incubada por 16 h a 4 °C. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes.

2.35 Preparação de bactérias competentes

Uma colônia isolada da *Escherichia coli* da linhagem XL1-blue MRF' foi crescida em LB-líquido durante 16 h, a 37 °C e sob agitação de 250 rpm. Em seguida 400 ml de LB líquido eram inoculados com 4 ml desta cultura inicial e mantidos nas mesmas condições anteriores de crescimento até que se atingisse uma $DO_{600} = 0,375$. As células eram então transferidas para tubos de centrifuga previamente resfriados e mantidas no gelo por 10 min. Em seguida, eram precipitadas por centrifugação (1.600x g; 7 min; temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as células era ressuscitado em 10 ml de solução previamente autoclavada de $CaCl_2$ 60 mM solubilizado em tampão PIPES 10 mM, pH 7,0 e contendo glicerol 15 % (v/v). Esse material era novamente precipitado por centrifugação (1.000x g; 5 min; temperatura ambiente), o precipitado ressuscitado em 10 ml de solução de $CaCl_2$ descrita anteriormente e mantido no gelo por 30 min. Após essa incubação realizava-se uma nova centrifugação (1.000x g; 5 min; temperatura ambiente), as células eram ressuscitadas em 2 ml de solução de $CaCl_2$, aliquotadas e mantidas a -80 °C. Estas alíquotas continham as células prontas para a transformação.

2.36 Transformação de bactérias competentes

Para a transformação de bactérias foi usada linhagem XL1-blue MRF' de *Escherichia coli* previamente preparada como descrito no item 2.34. O volume total do meio de reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor (item 2.34 - 20 µl) era adicionado a 100 µl de células competentes e mantido em gelo por 30 min. Em seguida as células eram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 2 min e retornavam ao gelo por mais 3 min. Adicionava-se então 0,5 ml de LB-líquido e as células eram mantidas a 37 °C por 1 h para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo "pGenT-Easy vector" usado na transformação). Em seguida, as células eram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml) e IPTG/Xgal (eram adicionados 100 µl de IPTG 100 mM e de Xgal 50 mg/ml às placas LB-ágar de 100 mm que eram espalhados com um alça de Drigalsky sobre a superfície da placa) e mantidas a 37 °C durante 16 h. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto cresciam nestas placas originando colônias brancas.

2.37 Preparação de plasmídios a partir de cultura de bactérias

Os plasmídios foram preparados a partir de 3 ml de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, usando o protocolo "Wizard Miniprep" (Promega). As bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase a 100 µg/ml. Em seguida, realizava-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1 % (p/v) e a solução neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8. Esta mistura era centrifugada (10.000x g; 15 min; temperatura ambiente) e o sobrenadante aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna era lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 µM e etanol 55 % (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente, o plasmídeo era eluído da coluna com água milli-Q®. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.38 Digestão de DNA usando a enzima de restrição EcoRI

Amostras contendo plasmídios (2 a 5 µg) foram digeridas com EcoRI (Promega) usando o tampão e o número de unidades indicadas pelo fabricante. A mistura de reação era incubada por 1 h a 37 °C e a reação enzimática interrompida por incubação em banho em ebulição por 3 min. Os produtos de digestão eram então separados em gel de agarose 1 % (p/v).

2.39 Reação de seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento de DNA foi utilizado o procedimento que se baseia no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxiribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). As amostras a serem seqüenciadas foram enviadas para o laboratório do Projeto Genoma *Xantomonas* associado ao grupo ONSA sob coordenação do Prof. Fernando C. Reinach (Instituto de Química – USP – São Paulo – SP). A reação de seqüenciamento foi realizada usando 500 ng de DNA molde. 1 µl de iniciador na concentração de 3.3 pmol/µl, 2 µl de “Termintor Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer), 6 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, pH 9,0, 5 mM MgCl₂ para um volume final de 20 µl. As reações foram realizadas em um termociclador em um método de 40 ciclos que consistia de incubações seqüenciais de: 10 segundos a 96 °C; 5 segundos a 50 °C; 4 minutos a 60 °C. Nessa técnica de seqüenciamento automático cada didesoxiribonucleotídeo usado apresentava-se ligado a grupos fluorescentes distintos, o que facilita a detecção dos produtos da reação de seqüenciamento no gel de poliacrilamida.

2.40 Comparação de seqüências em banco de dados e alinhamento múltiplo de seqüências

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos obtidas neste trabalho foram comparadas com outras seqüências de β-glicosidases depositadas em bancos de dados. Para isso foi feita uma consulta ao “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), onde foi utilizado o programa de alinhamento de seqüências BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Para o alinhamento múltiplo de seqüências de polipeptídeos foi usado o programa Clustal X (1.64b) na condição padrão do programa. As seqüências para comparação foram retiradas do Gen Bank™, sendo elas: β-glicosidase digestiva de *Spodoptera frugiperda* (AF052729), lactase-florizina hidrolase de *Oryctolagus cuniculus* (Z27167), β-glicosidase citossólica de *Cavia porcellus* (U50545), β-glicosidase cianogênica de *Trifolium repens* (X56733), amigdalina hidrolase de *Prunus serotina* (U26025) e β-glucosidase de *Arabidopsis thaliana* (AB0168879).

2.41 Imunocitocalização por microscopia eletrônica

A imunocitocalização por microscopia eletrônica foi feita usando o anticorpo produzido contra a β-Glicosidase 3a. O epitélio do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi dissecado como descrito anteriormente (item 2.02) e dividido em três partes de tamanho aproximadamente iguais. A porção média foi descartada e as regiões dos extremos anterior e posterior do epitélio

transferidas separadamente para solução de fixação (glutaraldeído 5 % e paraformaldeído 4 % em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4). Os tecidos fixados foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol a temperatura ambiente e, finalmente, embebidos em resina acrílica L.R. White (Agar Aids, USA) por 24 h a 50 °C. Secções finas de tecido foram obtidas em ultramicrotomo e transferidas para telas de níquel.

A cada um dos cortes foi aplicada uma gota TBS (Tris 0,1 M, NaCl 0,3 M, NaN₃ 0,1 % p/v) contendo albumina sérica bovina 1 % (TBS-BSA). Após 30 min foi adicionado o anticorpo anti β -Glicosidase 3a em uma diluição de 1:100 em TBS-BSA e incubado por 90 min a temperatura ambiente. Em seguida, o corte foi lavado com TBS-BSA e incubado com anticorpo anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado a partículas de 10 nm de ouro coloidal. Esse último foi diluído na proporção de 1:15 em tampão TBS-BSA. Os cortes foram finalmente lavados com água bidestilada e corados com acetato de urânio e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Controles tiveram o anticorpo primário omitido. Todos os cortes foram visualizados em um microscópio eletrônico de transmissão Phillips 301.

2.42 Imunocitocalização por microscopia confocal

A imunocitocalização por microscopia confocal foi feita usando o anticorpo produzido contra a β -Glicosidase 3a. O intestino médio de *Tenebrio molitor* foi dissecado como descrito anteriormente (item 2.02) e o epitélio inteiro transferido imediatamente para a solução fixadora Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) onde permanecia por 16 h a 4 °C. Após lavagem em tampão PBS, as amostras foram embebidas em resina Tissue Tek (Miles Inc., USA) e congeladas em nitrogênio líquido. Secções de tecidos obtidas em criostato (14 μ m de espessura) foram recolhidas em placas de vidro cobertas com polilisina e imunoensaiadas usando o método de imunofluorescência indireta.

Para a realização da imunocitoquímica, os cortes foram imersos em tampão PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,05 M NaCl, 2 mM KH₂PO₄) contendo 0,2 % (v/v) de Triton X-100 por 2 h a temperatura ambiente, em seguida foram lavados com tampão PBS e incubados com o anticorpo anti β -Glicosidase 3a em uma diluição de 1:400 em PBS contendo 0,1 % (p/v) de albumina sérica bovina e 0,01 % de NaN₃ (PBS-BSA) por 16 h a 4 °C. Como controle, as amostras foram também incubadas com o soro pré-ímune nas mesmas condições. As amostras foram lavadas com PBS a temperatura ambiente e foram incubadas com o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho, produzido em mula, ligado a fenilisotiocianato (FITC) – (Amersham Little Chalfont, UK). Esse

anticorpo foi diluído 1:1000 em tampão PBS-BSA por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagens em PBS a temperatura ambiente, os cortes foram montados em Vectashield (Vector Labs., Inc., USA) e examinados em um microscópio confocal Zeiss LSM 410.

3 Resultados

3.01 Comparação das β -glicosidases de *Tenebrio molitor* com as enzimas presentes em sua dieta

A fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi submetido a uma focalização isoeletrica (Figura 07 A). Nessa técnica foram separadas três atividades de β -glicosidases apresentando pI de 7,4, 7,1 e 6,9. A enzima de maior pI apresentou uma atividade majoritária sobre NP β Dgal e as outras duas, por sua vez, atividade majoritária sobre NP β Dglu e celobiose. A recuperação da atividade enzimática nessa técnica se mostrou baixa (27% para a atividade sobre celobiose; 28% para a atividade sobre NP β Dglu; 18% para a atividade sobre NP β Dgal).

Para verificar se as atividades de β -glicosidases encontradas no tubo digestivo de *Tenebrio molitor* eram provenientes do farelo de trigo, usado na dieta desse animal, a fração solúvel do homogeneizado do farelo de trigo foi também submetido a uma focalização isoeletrica. O resultado (Figura 07 B) mostra que as enzimas presentes no alimento são diferentes das encontradas no intestino médio de *Tenebrio molitor*. A recuperação da atividade enzimática nessa técnica se mostrou semelhante à do homogeneizado (16% para a atividade sobre celobiose; 42% para a atividade sobre NP β Dglu; 39% para a atividade sobre NP β Dgal). Isso descarta a possibilidade de que alguma das β -glicosidases digestivas desse animal ser proveniente de sua dieta.

3.02 A β -Glicosidase 1 de *Tenebrio molitor*

3.02.1 Purificação da β -Glicosidase 1

Para a realização do passo inicial de purificação adicionou-se sulfato de amônio para concentração final de 1,7 M à fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Esse procedimento levou a precipitação de parte das proteínas

Figura 07 – Focalização isoeétrica da fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (A) e fração solúvel do homogeneizado de farelo de trigo (B). As amostras foram aplicadas em géis cilíndricos de poliacrilamida 7,0 %, contendo 1 % de anfolito pH 3-10. Os géis fracionados foram coletados em frações de 230 ml. A atividade enzimática foi determinada para os substratos celobiose 7 mM ($\square$), NP β Dglu 10 mM ($\bullet$) e NP β Dgal 10 mM ($\blacktriangle$).

contidas na preparação. Contudo, a maior parte da atividade continuou a ser recuperada na fração solúvel (90 % para a atividade sobre celobiose; 80 % para a atividade sobre NPβDglu; 84 % para a atividade sobre NPβDgal). Esse material foi então cromatografado em Econo-Pac Methyl HIC onde foram separados três picos de atividade de β-glicosidasas (Figura 08 A). A enzima eluída da coluna Econo-Pac Methyl HIC entre as frações 44 a 55, foi denominada de β-Glicosidase 1. O enriquecimento observado para a β-Glicosidase 1 durante esse passo foi de 7,5 vezes e a recuperação de atividade enzimática foi de 57 % com relação material inicial (Tabela 01). O material obtido nesse passo foi cromatografado em Fast Desalting, com o intuito de equilibrar a preparação para o passo cromatográfico posterior (dados não mostrados). A recuperação de atividade enzimática nesse passo é quase total. As frações ativas eluídas da Fast Desalting foram submetidas a uma cromatografia em Mono Q (Figura 08 B), onde a atividade de β-glicosidase elui como um único pico. A recuperação da atividade aplicada foi de 67 % e obtido um enriquecimento de 2 vezes em relação ao material anterior. Para finalizar, adicionou-se sulfato de amônio às frações coletadas e reunidas da coluna Mono Q para uma concentração final de 1,7 M e foram aplicadas na coluna Phenyl Superose (Figura 08 C). Aqui a atividade também elui em apenas um pico. A recuperação de atividade nas frações reunidas nessa cromatografia foi de 45 % e observado um enriquecimento de 2 vezes.

As frações obtidas nos passos cromatográficos principais da rotina de purificação foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE (Figura 09). As frações reunidas após eluição da coluna Econo-Pac Methyl HIC (raia 2) mostra a diminuição de um certo número de bandas de proteínas quando comparados ao homogeneizado (raia 1). Após a coluna Mono Q há um enriquecimento muito grande de bandas na faixa de Mr 75.000 e na de Mr 14.000 (raia 3). Finalmente, a preparação apresentou apenas dois polipeptídeos após a cromatografia em Phenyl Superose (raia 4). Os dois polipeptídeos são melhor visualizados durante a revelação pela coloração pela prata, pois o gel mostrado aqui ficou muito tempo em solução reveladora. Esses polipeptídeos apresentam Mr de 59.000 e 59.500. Pode ser observado também um contaminante tênue com Mr de 70.000. Na raia 5, onde foi aplicada a metade da quantidade de amostra eluída da Phenyl Superose, não é observada a presença do contaminante de Mr 70.000, sugerindo que ele seja desprezível e só foi visualizado pois o gel ficou muito tempo em solução reveladora. Outro fato interessante é que quando comparamos o material aplicado na raia 5 com o da raia 4 observamos resultados diferentes. Nas duas raias foram aplicadas amostras eluídas da Phenyl Superose e a diferença entre elas é que o material aplicado na raia 4 passou por um tratamento de

Figura 08 – Purificação da β -Glicosidase 1 de *Tenebrio molitor*. A fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi aplicada em uma cromatografia em Econo-Pac Methyl HIC (A), as frações 44 a 55 foram reunidas e cromatografadas em Mono Q (B) e, finalmente, as frações 54 a 59, eluídas nesse passo, foram reunidas e cromatografadas em Phenyl Superose (C). A atividade enzimática foi determinada para os substratos celobiose 7 mM ($\square$), NP β Dglu 10 mM ($\bullet$) e NP β Dgal 10 mM ($\blacktriangle$). Os círculos abertos correspondem às frações que foram reunidas durante a marcha de purificação.

Tabela 01 – Recuperação e enriquecimento da β -Glicosidase I de *Tenebrio molitor* durante a sua purificação

Fração	Atividade total (mU)	% de atividade total	Proteína total (mg)	Atividade específica (mU/mg)	Enriquecimento (x)
Fração solúvel do conteúdo luminal	150.000	100	517	290	1
Econo-Pac Methyl HIC	85.500	57	40	2.150	7,5
Reunido Mono Q	57.000	38	14	3.960	14
Phenyl Superose	25.500	17	4	6.560	23

A atividade enzimática foi ensaiada usando o substrato NP β Dglu 10 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. A dosagem de proteína foi realizada como descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton & Evans (1992).

Figura 09 – SDS-PAGE 12% das frações reunidas durante a marcha de purificação da β -Glicosidase 1. As amostras aplicadas nas raia 1 a 4 e PM foram submetidas a fervura antes de serem aplicadas no gel. (A) Gel corado pela prata segundo Blum *et al.* (1987) para evidenciar proteínas: PM – padrões de peso molecular; raia 1 – fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (8 μ g de proteína); raia 2 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Econo-Pac Methyl HIC (6 μ g de proteína); raia 3 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Mono Q (4 μ g de proteína); raia 4 - frações reunidas após eluição da cromatografia em Phenyl Superose (30 mU de atividade sobre NP β Dglu); raia 5 – mesma amostra da raia 4 sem tratamento por fervura (15 mU de atividade sobre NP β Dglu). (B) Gel corado segundo Manchenko (1994) para evidenciar atividade enzimática: raia 6 – mesma amostra e tratamento da raia 5 (5 mU de atividade sobre NP β Dglu).

fervura antes da eletroforese o que não aconteceu com o material aplicado na raia 5. O resultado evidencia que na amostra que não foi submetida à fervura o polipeptídeo de Mr 59.500 não está presente. Isso sugere que as duas bandas observadas em amostras fervidas possam ser a mesma proteína em formas desnaturadas um pouco diferentes. Além disso, quando o material não é submetido a fervura, outros polipeptídeos são observados entre o de Mr 27.000 e o de Mr 59.000.

Outro resultado interessante é o obtido quando a amostra que não foi tratada por fervura, é ensaiada para verificar a atividade de β -glicosidases (Figura 09, raia 6). Nessa, observa-se que um polipeptídeo com peso molecular de Mr 27.000 é o responsável pela clivagem de MU β Dglu na amostra eluída da Phenyl Superose e não o polipeptídeo de Mr 59.000, observado na coloração pela prata. Na verdade esse resultado é um artefato e, assim, devemos estar com apenas um polipeptídeo, conforme será comentado para a β -Glicosidase 3.

3.02.2 Estabilidade da β -Glicosidase 1

A β -Glicosidase 1 perde atividade em incubações a 30 °C em tampão citrato/fosfato 100 mM (Figura 10). Os dados mostram que em meia hora de incubação a enzima perde cerca de 20 % da atividade e 50 % em três horas de incubação. Com o intuito de estabilizar a atividade enzimática da β -Glicosidase 1, foram testados diversos compostos estabilizantes de proteínas em geral (Timasheff & Arakawa, 1990).

Glicerol e trealose foram capazes de manter a atividade original por até vinte e quatro horas de incubação (Figura 10 C). Sulfato de amônio e sulfato de sódio também estabilizaram a enzima, mas não tão bem, uma vez que se observa uma ligeira queda na atividade em vinte e quatro horas de incubação (Figura 10 B). Das substâncias testadas apenas o PEG não foi capaz de estabilizar a enzima, talvez pela baixa concentração usada no ensaio (Figura 10 A). Esse problema não pode ser contornado uma vez que esse composto é pouco solúvel e em concentrações mais altas sua viscosidade é grande.

Conforme mostrado (Figura 10), a presença de todos os compostos levou a uma atividade menor do que a do grupo controle em tempo zero de incubação. Esse resultado indica que estes compostos devem estar inibindo a enzima. Isso foi confirmado determinando-se a atividade da β -Glicosidase 1 em concentrações diferentes de substrato na presença e na ausência de cada um dos compostos (Figura 11). Os resultados mostram que todos os compostos ensaiados aqui inibem a atividade da β -Glicosidase 1 na concentração em que estão sendo

Figura 10 – Estabilidade da β -Glicosidase 1. A enzima purificada foi pré-incubada a 30 °C em tampão citrato/fosfato 100 mM, pH 5,5 na ausência (controle) e na presença de diversos compostos estabilizantes. Após cada tempo, alíquotas de enzima eram retiradas e tinham a sua atividade sobre MU β Dglu 1 mM determinada. Os gráficos mostram as atividades relativas remanescentes, considerando-se o tempo zero de incubação do controle. (A) Incubação na presença de PEG. (B) Incubação na presença de compostos que estabilizaram parcialmente a atividade da β -Glicosidase 1. (C) Incubação na presença de compostos que estabilizaram a atividade da β -Glicosidase 1. Todos os gráficos apresentam o resultado obtido para o controle.

Figura 11 – Efeito de vários compostos na atividade da β -Glicosidase 1. A enzima purificada foi ensaiada em cinco concentrações de MU β Dglu na presença e na ausência de compostos estabilizantes. Os dados obtidos estão mostrados em um gráfico de Lineweaver-Burk. Os efeitos podem ser notados na variação do intercepto, da inclinação, ou de ambos, quando comparado ao controle. (A) Efeito de compostos que interferem muito na atividade da β -Glicosidase 1. (B) Efeito de PEG na atividade da β -Glicosidase 1. (C) Efeitos de compostos que interferem pouco na atividade da β -Glicosidase 1.

usados.

Uma vez que esses compostos estabilizantes da atividade da β -Glicosidase 1 não poderiam ser usados na determinação dos seus parâmetros cinéticos, decidimos verificar se a presença do substrato não seria suficiente para promover essa estabilização. Para isso foram determinados os parâmetros cinéticos para diversos substratos (celobiose, NO β Dglu, NP β Dglu e prunasina) em ensaios realizados em incubação de seis e doze horas. A $V_{\max}$ obtida nesses dois tempos foram iguais com todos os substratos, contudo, as retas obtidas em incubação por 12 h eram ruins e apresentavam um valor de K_m que não era confiável (dados não mostrados). Esse resultado mostra que a β -Glicosidase 1 é estabilizada em altas concentrações de substrato, porém, em baixas concentrações de substrato estaria ocorrendo a perda da atividade enzimática resultando em retas ruins em tempos longos de ensaio. Uma vez que a caracterização cinética foi feita usando tempos de no máximo 6 h de incubação e que as curvas ruins foram descartadas, pode ser dito que os parâmetros cinéticos obtidos para essa enzima são confiáveis.

3.02.3 Especificidade da β -Glicosidase 1

A β -Glicosidase 1 teve a sua atividade testada sobre diversos substratos. Foi usado um tempo longo de incubação para verificar não só quais substratos são bem clivados pela enzima mas também os que são clivados em taxas mais lentas. Os resultados obtidos para os substratos que são melhor clivados provavelmente atingiram um ponto onde o ensaio não é linear, mas isso não pode ser dito ao certo uma vez que o ensaio foi feito em apenas um tempo de incubação. Não foi determinada também a quantidade de atividade enzimática que era perdida durante o ensaio. Assim, resultados obtidos aqui só podem ser analisados de forma qualitativa.

Os resultados obtidos (Tabela 02) mostram que: (i) amigdalina, celobiose, gentiobiose, helicina, NO β Dglu, NP β Dcelobiosídeo, NP β Dfuc, NP β Dglu e prunasina são bons substratos para a β -Glicosidase 1; (ii) AP β Dglu, fenil β Dglu, indoxil β Dglu, NP α Lara e n-octil β -D-glicopiranosídeo são substratos ruins para a β -Glicosidase 1; (iii) florizina, lactose, linamarina, NP β Lara, NP β Dgal, NP β Dgluc, NP β Dman, NP β Dxil, n-octil β -tio-D-glicopiranosídeo e sinigrina, ou são péssimos, ou não são substratos para essa enzima.

A incapacidade de clivar n-octil β -tio-D-glicopiranosídeo e sinigrina já era esperada, uma vez que esses glicosídeos são S-glicosídeos, e não um O-glicosídeo como na maioria dos substratos testados aqui. A incapacidade de clivar linamarina e a baixa atividade sobre florizina deve ser devido aos seus aglicones. No primeiro composto o aglicone deve ser pequeno para

Tabela 02 – Atividade da β -Glicosidase 1 sobre diversos glicosídeos

Substratos	Atividade (mU x 10⁻⁵)	Atividade relativa (%)
Amigdalina	1200	51
AP β Dglu	44	2
Celobiose	1080	46
Fenil β Dglu	156	7
Florizina	18	0,8
Gentiobiose	384	16
Helicina	2176	92
indoxil β Dglu	38	2
Lactose	29	1
Linamarina	0	0
NO β Dglu	237	10
NP α Lara	58	2
NP β Lara	0,5	0,02
NP β Dcelobiosídeo	2366	100
NP β Dfuc	2010	85
NP β Dgal	5,5	0,2
NP β Dglu	1180	50
NP β Dgluc	1,3	0,05
NP β Dman	0	0
NP β Dxil	3,2	0,1
n-Octil β -D-glicopiranosídeo	45	2
n-Octil β -tio-D-glicopiranosídeo	0	0
Prunasina	1879	79
Sinigrina	3	0,1

Os dados foram obtidos através da incubação da enzima β -Glicosidase 1 purificada em uma concentração de substrato de 12,5 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. O substrato cuja concentração diferiu da apresentada anteriormente foi: florizina, 5 mM. O tempo de incubação foi de 24 h de ensaio, sendo que cada ponto representa uma duplicata contendo enzima e sendo descontado o valor do branco de substrato.

posicionar a ligação glicosídica e no segundo deve ser volumoso demais para permitir o encaixe correto do substrato no sítio ativo.

A determinação de k_{cat}/K_m para diferentes glicosídeos (Tabela 03) deixa claro que a estrutura do aglicone influencia bastante a afinidade da enzima pelo substrato. MU β Dglu é o substrato pelo qual a β -Glicosidase 1 tem maior afinidade, sugerindo que o subsítio para a ligação do aglicone pode acomodar grupos maiores que uma glicose. Comparado os parâmetros cinéticos para a clivagem de celobiose, NP β Dcelobiosídeo e oligocelodextrinas pode ser visto que essa afirmação deve estar correta uma vez que o K_m diminui à medida que se aumenta o tamanho do aglicone do glicosídeo.

Comparando os valores de k_{cat}/K_m (Tabela 03) pode ser dito que a β -Glicosidase 1 cliva bem tanto os aril glicosídeos como dissacarídeos e oligocelodextrinas. Contudo, dos aril glicosídeos naturais testados aqui: amigdalina; prunasina e helicina, somente o último é clivado em taxas comparáveis aos melhores substratos para a β -Glicosidase 1. As oligocelodextrinas são bem hidrolisadas por essa enzima assim como dissacarídeos. É interessante notar também que a β -Glicosidase 1 cliva celobiose (glucosil β 1, 4 glicose) e laminaribiose (glucosil β 1, 3 glicose) em taxas muito semelhantes o que não é comum para outras β -glicosidases.

O K_m da β -Glicosidase 1 para oligocelodextrinas é decrescente até celotetraose e cresce para celopentaose, indicando que a enzima deve possuir 4 subsítios de ligação de glicose (-1, +1, +2, +3; Davies *et al.*, 1997). A afinidade dos vários subsítios para glicose foi calculada (Figura 12 A) segundo Hiromi (1972). Desse resultado foi possível obter um valor para o k_{int} para a clivagem de uma ligação glicosil β 1,4 glicose que seria de $11,9 \text{ s}^{-1}$. Esse valor é semelhante aos valores de k_{cat} observados para a clivagem de oligocelodextrinas por essa enzima, sugerindo que não deva ocorrer muitas ligações não produtivas entre o substrato e o sítio ativo. Através dessa mesma abordagem foi possível calcular também a afinidade do subsítio +2 para a ligação a p-nitrofenil usando os valores de k_{cat}/K_m para a clivagem de celobiose e NP β Dcelobiosídeo. Pode ser visto que esse subsítio apresenta maior afinidade para glicose do que pelo p-nitrofenil.

Outro resultado interessante foi observado para a clivagem de oligocelodextrinas e amigdalina. Foi observado que esses substratos apresentam uma cinética de inibição pelo substrato, onde a atividade da enzima é inibida de uma forma não competitiva em altas concentrações de substrato. As constantes de inibição pelo substrato para as oligocelodextrinas se mostraram crescentes a medida que se aumenta o número de glicoses nos oligossacarídeos testados aqui. Foram observados valores de K_i de 18 ± 5 ; $9,5 \pm 0,1$ e $2,4 \pm 0,6 \text{ mM}$ para a

Tabela 03 – Especificidade da β -Glicosidase 1 de *Tenebrio molitor*

Substratos	$k_{cat} (s^{-1}) \cdot 10^{-1}$	$K_m (mM)$	$k_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1})$	k_{cat}/K_m relativo
Dissacarídeos				
Celobiose	$9,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	1.000 ± 100	21
Laminaribiose	$10,6 \pm 0,2$	$0,71 \pm 0,05$	1.500 ± 100	31
Glicosídeos de planta				
Amigdalina	$5,4 \pm 0,3$	20 ± 3	27 ± 4	0,5
Helicina	$7,4 \pm 0,2$	$0,51 \pm 0,05$	1.400 ± 100	29
Prunasina	$8,3 \pm 0,3$	8 ± 1	100 ± 10	2
Glicosídeos Sintéticos				
MU β Dglu	$8,44 \pm 0,07$	$0,174 \pm 0,005$	4.800 ± 100	100
NO β Dglu	$10,3 \pm 0,3$	$0,41 \pm 0,03$	2.500 ± 200	52
NP β Dcelobiosídeo	$7,1 \pm 0,37$	$0,53 \pm 0,09$	1.300 ± 200	27
NP β Dfuco	$11,6 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,07$	1.800 ± 200	37
NP β Dglu	$6,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	380 ± 20	8
Oligossacarídeos				
Celotriose	$8,3 \pm 0,5$	$0,51 \pm 0,04$	1.600 ± 100	33
Celotetraose	$10,3 \pm 0,5$	$0,34 \pm 0,03$	3.000 ± 300	63
Celopentaose	8 ± 1	$0,40 \pm 0,09$	2.000 ± 500	42

Os dados foram obtidos através da incubação de enzima β -Glicosidase 1 purificada em pelo menos 10 concentrações diferentes dos substratos acima listados em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter.

Figura 12 – Afinidade dos subsítios das β -glicosidases de *Tenebrio molitor*. (A) β -Glicosidase 1. (B) β -Glicosidase 3a. As setas indicam o ponto de clivagem da ligação glicosídica.

clivagem de celotriose, celotetraose e celopentaose, respectivamente. Já para a clivagem de amígdalina o K_i observado foi de 120 ± 30 mM.

Os resultados de inibição cruzada mostram que todos os substratos inibidores apresentam um padrão de inibição competitiva linear simples (como exemplificado na Figura 13). Foram escolhidos diversos substratos para a inibição da clivagem do substrato MU β Dglu. Podemos ver que os valores de K_i para todos os substratos ensaiados (Tabela 04), se assemelham muito ao valor de seus K_m , quando esses são utilizados como substrato. Isso sugere que essa enzima apresenta um único sítio ativo.

3.03 A β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor*

3.03.1 Purificação da β -Glicosidase 2

A marcha de purificação para a β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor* usou como passo inicial uma eletroforese preparativa em Prep Cell (Bio Rad) (Figura 14 A). A recuperação da atividade enzimática obtida foi de 24 % e obtido um enriquecimento de 6 vezes em relação à fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (Tabela 05). Apesar dessa recuperação ser baixa para um passo inicial de purificação, essa técnica foi usada uma vez que todas as outras tentativas de purificação realizadas sem usar Prep Cell não foram eficientes na purificação dessa enzima. O pico com atividade exclusiva sobre NP β Dgal foi reunido e cromatografado em Mono Q (Figura 14 B) com 10 % de glicerol no tampão de eluição. A adição de glicerol teve com intuito obter uma melhor recuperação da atividade enzimática. O resultado mostra a eluição de um pico único, sendo recuperada boa parte da atividade aplicada (60 %) e com um enriquecimento de 2,5 vezes em relação ao material anterior. Dando continuidade à marcha de purificação, as frações contendo a atividade enzimática, reunidas após a eluição da coluna Mono Q, foram submetidas a uma cromatografia em Alkyl Superose (Figura 14 C). Nesse passo o tampão de corrida também continha 10 % de glicerol. Nessa cromatografia também ocorre a eluição de um pico majoritário de atividade enzimática, sendo as frações mais ativas reunidas. A recuperação de 20 % da atividade durante esse passo foi considerada aceitável, em se tratando de um passo final de purificação, porém não houve enriquecimento algum da atividade enzimática nesse passo.

As amostras obtidas nessa marcha de purificação foram submetidas a uma eletroforese desnaturante em SDS-PAGE. Pelo resultado (Figura 15) podemos observar o desaparecimento

Figura 13 – Inibição da clivagem de MU β Dglu por celobiose para a β -Glicosidase 1. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de substrato inibidor. (B) Gráfico das inclinações obtidas no gráfico de Lineweaver-Burk contra as concentrações do inibidor.

Tabela 04 – Inibição da β -Glicosidase 1 de *Tenebrio molitor*

Substrato	Inibidor	K_i (mM)	K_i/K_m
MU β Dglu	Celobiose	$0,6 \pm 0,2$	0,7
MU β Dglu	Helicina	$0,4 \pm 0,14$	0,8
MU β Dglu	Prunasina	$6,5 \pm 0,8$	0,8
MU β Dglu	NO β Dglu	$0,4 \pm 0,25$	1
MU β Dglu	NP β Dcelobiosídeo	$0,5 \pm 0,4$	0,9
MU β Dglu	NP β Dfuc	$0,8 \pm 0,2$	1,3
MU β Dglu	NP β Dglu	$1,3 \pm 0,2$	0,7

Os dados foram obtidos através da incubação de enzima β -Glicosidase 1 purificada em 5 concentrações diferentes do substrato MU β Dglu em 5 concentrações de substrato competidor preparado em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter.

Figura 14 – Purificação da β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor*. A fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi aplicado em uma eletroforese preparativa em Prep Cell (A), as frações 39 a 49 foram reunidas e cromatografadas em Mono Q (B) e, finalmente, as frações 62 a 72, eluídas nesse passo, foram reunidas e cromatografadas em Alkyl Superose (C). A atividade enzimática foi determinada para o substrato NP β Dgal 10 mM ($\blacktriangle$). Os triângulos abertos correspondem às frações que foram reunidas durante marcha de purificação.

Tabela 05 – Recuperação e enriquecimento da β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor* durante a sua purificação

Fração	Atividade total (mU)	% de atividade total	Proteína total (mg)	Atividade específica (mU/mg)	Enriquecimento (x)
Fração solúvel do conteúdo luminal	25.500	100	215	119	1
Prep Cell	4.900	24	6	825	6
Mono Q	2.000	10	0,9	2.300	19
Alkyl Superose	403	2	0,2	2.400	20

A atividade enzimática foi ensaiada usando o substrato NP β Dgal 10 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. A dosagem de proteína foi realizada como descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton & Evans (1992).

Figura 15 – SDS-PAGE 12% das frações reunidas durante a marcha de purificação da β -Glicosidase 2. Amostras aplicadas nas raias 1 a 4 e PM foram submetidas à fervura antes de serem aplicadas no gel. (A) Gel corado pela prata segundo Blum *et al.* (1987) para evidenciar proteína: PM – padrões de peso molecular; raia 1 – fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (6 μ g de proteína); raia 2 – frações reunidas após eluição da eletroforese preparativa em PrepCell (4 μ g de proteína); raia 3 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Mono Q (4 μ g de proteína); raia 4 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Alkyl Superose (1 μ g de proteína). (B) Gel corado segundo Manchenko (1994) para evidenciar atividade enzimática: raia 5 – mesma amostra que a raia 4 sem o tratamento por fervura.

de vários polipeptídeos de baixo peso molecular, presentes na fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (raia 1), após eletroforese preparativa em Prep Cell (raia 2). Na cromatografia em Mono Q ocorre um enriquecimento muito grande de bandas de Mr acima de 66.000 (raia 3). Já a preparação obtida após cromatografia em Alkyl Superose apresenta um único polipeptídeo de Mr 67.000 (raia 4). Esse último resultado mostra que, embora o enriquecimento não aumente após a cromatografia em Alkyl Superose, esse passo é necessário para que todas as proteínas contaminantes sejam removidas. O fato de não haver enriquecimento da β -Glicosidase 2 nesse passo certamente se deve à perda de atividade da enzima. Quando o material eluído da Alkyl Superose é aplicado em SDS-PAGE, sem que a amostra fosse tratada por fervura e a atividade de β -glicosidase é evidenciada no gel (raia 5), observa-se que um polipeptídeo de Mr 34.000 é o responsável pela clivagem de MU β Dgal. Quando essa amostra não fervida é corada pela prata, pode ser observados o polipeptídeo presente na raia 4 e um polipeptídeo minoritário na mesma região onde se detecta a atividade enzimática (dados não mostrados). Esse resultado é muito semelhante ao obtido para a β -Glicosidase 1 (item 3.02.1) e será estudado mais detalhadamente com a β -Glicosidase 3a.

A β -Glicosidase 2, obtida após a cromatografia em Alkyl Superose continha 10 % (p/v) de glicerol. Como será mostrado (Tabela 07), essa enzima é inibida por esse composto (K_i de 0,5 % p/v), o que desqualifica esse material para ser usado durante a caracterização cinética da β -Glicosidase 2. Devido a isso, após cromatografia em Alkyl Superose o material foi submetido a uma cromatografia em Fast Desalting (dados não mostrados) para a retirada do glicerol. Essa foi feita em tampão ótimo para a atividade enzimática (citrato/fosfato 50mM, pH 4,5) e na presença de 60 mM de $MgCl_2$, que estabiliza a atividade da β -Glicosidase 2 nessa cromatografia (dados não mostrados). Desse modo recuperou-se 65 % da atividade original aplicada na Fast Desalting.

3.03.2 Especificidade da β -Glicosidase 2

A β -Glicosidase 2 não mostrou atividade significativa sobre qualquer glicosídeo contendo glicose na extremidade não redutora, seja esse natural ou sintético (dados não mostrados). Devido a isso, poucos substratos puderam ser testados para a determinação de k_{cat} e K_m . (Tabela 06). Essa enzima, como a β -Glicosidase 1, é capaz de clivar NP α Lara, mas com velocidade muito baixa, o que impediu a determinação de qualquer parâmetro cinético.

Os resultados indicam que a β -Glicosidase 2 é muito específica para a clivagem de

Tabela 06 – Especificidade da β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor*

Substratos	k_{cat} ($10^{-1} s^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)	k_{cat}/K_m relativo
Dissacarídeo				
Lactose	$5,0 \pm 0,2$	190 ± 20	$2,6 \pm 0,3$	5
Glicosídeos Sintéticos				
MU β Dgal	$6,1 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$	5.500 ± 500	100
NP β Dfuco	$4,7 \pm 0,7$	36 ± 9	13 ± 3	0,2
NP β Dgal	20 ± 1	$3,0 \pm 0,4$	660 ± 80	12

Os dados foram obtidos através da incubação de enzima β -Glicosidase 2 purificada em pelo menos 10 concentrações diferentes dos substratos acima listados em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 4,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter.

galactosídeos. Contudo, ela cliva muito mal o único galactosídeo natural ensaiado aqui, a lactose (galactosil β 1, 4 glicose). A baixa clivagem de lactose se dá devido o alto K_m dessa enzima para esse substrato. Esse dado juntamente com a capacidade da β -Glicosidase 2 em clivar bem aril galactosídeos, como MU β Dgal e NP β Dgal, sugere que o substrato natural para essa enzima deva apresentar um aglicone hidrofóbico.

Os resultados de inibição por outro substrato (Tabela 07) mostraram um padrão de inibição competitiva linear simples da clivagem de MU β Dgal (experimento semelhante ao apresentado na Figura 13). Quando dois substratos são clivados no mesmo sítio ativo, o K_m é igual ao K_i , uma vez que esses dois parâmetros estão representando o mesmo tipo de ligação. Analisando os valores obtidos para a inibição encontrada para os substratos inibidores testados para a β -Glicosidase 2, pode ser dito que lactose deve ser clivada no mesmo sítio de MU β Dgal. Contudo, NP β Dgal e NP β Dfuc parecem ser clivados, na sua maioria, em um sítio ativo diferente do responsável pela clivagem de MU β Dgal. Os valores de k_{cat} semelhantes para MU β Dgal e lactose também sugerem que esses dois substratos são clivados pelo mesmo sítio ativo.

A β -Glicosidase 2 é relativamente instável a 30 °C na ausência de substrato. Inativação térmica realizada nessa temperatura com MU β Dgal e NP β Dgal foram idênticas (dados não mostrados). Esse resultado sugere que, caso haja realmente dois sítios ativos na β -Glicosidase 2, eles devem estar em um mesmo domínio na proteína.

A β -Glicosidase 2 é inibida por n-octil- β -tio-D-galactopiranosídeo com um K_i de 0,68 mM quando o substrato usado é o MU β Dgal (Tabela 07). Essa inibição mostra que essa enzima apresenta uma alta afinidade para se ligar a galactosídeos cujo aglicone é hidrofóbico. A enzima é também inibida por glicerol, porém somente em altas concentrações dessa substância. (Tabela 07). Na presença de 10 CMC de Triton X-100 há uma ativação da β -Glicosidase 2 para a clivagem de MU β Dgal, devido a um aumento na V_{max} da enzima (Figura 16). Na presença de NP β Dgal 10 mM essa ativação não foi observada. Talvez o sítio ativo responsável pela clivagem de MU β Dgal seja susceptível à ativação por Triton X-100 e aquele que cliva NP β Dgal não o seja. O baixo valor de inibição por γ galactona lactona sugere que a clivagem do substrato envolve a passagem por um oxcarbônium durante o estado de transição (Tabela 07).

Tabela 07 – Inibição da β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor*

Substrato	Inibidor	K_i (mM)	K_i/K_m
MU β Dgal	Lactose	190 ± 20	1
MU β Dgal	NP β Dgal	$0,27 \pm 0,09$	0,09
MU β Dgal	NP β Dfuco	8 ± 1	0,2
MU β Dgal	Glicerol	60 ± 20	—
MU β Dgal	n-Octil β -tio-D-galactopiranosídeo	$0,68 \pm 0,04$	—
MU β Dgal	γ galactona lactona	$0,04 \pm 0,01$	—

Os dados foram obtidos através da incubação da enzima β -Glicosidase 2 purificada em 5 concentrações diferentes do substrato MU β Dglu em 5 concentrações de substrato competidor preparado em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 4,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter.

- ◆ Controle
- Triton X-100 (2,4 mM)
- ▲ Triton X-100 (1,2 mM)
- ◇ Triton X-100 (0,24 mM)
- Triton X-100 (0,12 mM)

Figura 16 – Efeito de Triton X-100 sobre a atividade da β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor*. A enzima purificada foi ensaiada com MU β Dgal em cinco concentrações desse substrato na presença e na ausência de diferentes concentrações de Triton X-100.

3.04 As β -Glicosidases 3a e 3b de *Tenebrio molitor*

3.04.1 Purificação das β -Glicosidases 3a e 3b

O passo de purificação inicial usado aqui foi o mesmo usado para purificar a β -Glicosidase 1, ou seja, cromatografia em coluna Econo-Pac Methyl HIC. As frações 78 a 92 do terceiro pico de atividade enzimática eluído (Figura 17 A) foram reunidas e esse material denominado de β -Glicosidase 3. Aqui a recuperação foi de 42 % da atividade enzimática e o enriquecimento de 10 vezes com relação à fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (Tabela 08). Esse material foi a seguir submetido a uma cromatografia em Fast Desalting, para equilibrar a preparação para o passo cromatográfico posterior. Como para a β -Glicosidase 1, a recuperação durante esse passo pode ser considerada total (dados não mostrados). As frações contendo a atividade enzimática sobre NP β Dglu eluídas da Fast Desalting foram reunidas e submetidas a uma cromatografia em Mono Q (Figura 17 B). Nessa, a atividade elui como um único pico, sendo obtidos uma recuperação de 70 % e um enriquecimento de 2,8 vezes com relação ao material aplicado. Para finalizar, foi adicionado sulfato de amônio, para uma concentração final de 1,7 M, nas frações contendo a atividade enzimática reunidas após a cromatografia em coluna Mono Q e, esse material, aplicado na coluna Alkyl Superose (Figura 17 C). Aqui a atividade é eluída em dois picos, sendo esses reunidos separadamente. A enzima contida no primeiro pico eluído nessa cromatografia foi denominada β -Glicosidase 3a e a segunda β -Glicosidase 3b. Com relação ao passo anterior, a recuperação da β -Glicosidase 3a é de 30 % e seu enriquecimento de 5 vezes. Já para a β -Glicosidase 3b a recuperação é de 25 % e o enriquecimento de 6,5 vezes.

As frações obtidas nos passos cromatográficos da rotina de purificação foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE (Figura 18). É possível notar o enriquecimento de diversas bandas após a cromatografia na coluna Econo-Pac Methyl HIC (raia 2) quando comparado à fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (raia 1). O mesmo acontece após cromatografia em Mono Q, onde as bandas de Mr entre 31.000 e 50.000 estão extremamente enriquecidas (raia 3). Finalmente, os materiais presentes nos dois picos de atividades obtidos após cromatografia em Alkyl Superose (raia 4 e 5) apresentam somente um polipeptídeo cada, sendo que os dois apresentam a mesma Mr de 59.000. Essas enzimas foram denominadas de β -Glicosidases 3a e 3b, respectivamente.

O mesmo fenômeno observado para as β -Glicosidases 1 e 2, onde o polipeptídeo

Figura 17 – Purificação da β -Glicosidases 3a e 3b de *Tenebrio molitor*. A fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* foi aplicado em uma cromatografia em Econo-Pac Methyl HIC (A), as frações 78 a 92 foram reunidas e cromatografadas em Mono Q (B) e, finalmente, as frações 61 a 66, eluídas nesse passo, foram reunidas e cromatografadas em Alkyl Superose (C). Os círculos abertos correspondem às frações que foram reunidas durante marcha de purificação. Na Alkyl Superose (1) corresponde a β -Glicosidase 3a e (2) corresponde a β -Glicosidase 3b. Os círculos abertos (frações 36 a 41) e os losangos abertos (frações 52 a 55) correspondem às frações reunidas no final da purificação. A atividade enzimática foi determinada para os substratos celobiose 7 mM ($\square$), NP β Dglu 10 mM ($\bullet$) e NP β Dgal 10 mM ($\blacktriangle$).

Tabela 08 – Recuperação e enriquecimento β -Glicosidase 3a e 3b de *Tenebrio molitor* durante a sua purificação

Preparação	Atividade total (mU)	% de atividade total	Proteína total (mg)	Atividade específica (mU/mg)	Enriquecimento (x)
Fração solúvel do conteúdo luminal	191.068	100	641	298	1
Econo-Pac Methyl HIC	80.890	42	25	3.210	10
Mono Q	58.165	30	6	8.553	28
Pico 1 Alkyl Superose	19.667	10	0,4	44.534	149
Pico 2 Alkyl Superose	14.778	7,7	0,3	55.253	185

A atividade enzimática foi ensaiada usando o substrato NP β Dglu 10 mM em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. A dosagem de proteína foi realizada como descrito por Smith *et al.* (1985) e modificado por Morton (1992).

Figura 18 – SDS-PAGE 12% das frações coletadas durante a marcha de purificação das β -Glicosidases 3a e 3b. Gel corado pela prata segundo Blum *et al.* (1987) para evidenciar proteína: PM – padrões de peso molecular; raia 1 – fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (6 μ g de proteína); raia 2 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Econo-Pac Methyl HIC (4 μ g de proteína); raia 3 – frações reunidas após eluição da cromatografia em Mono Q (4 μ g de proteína); raia 4 - frações reunidas após eluição da cromatografia em Alkyl Superose correspondentes à β -Glicosidase 3a (2 μ g de proteína); e raia 5 –correspondentes à β -Glicosidase 3b (2 μ g de proteína).

majoritário corado com prata não corresponde ao polipeptídeo apresentando atividade de β -glicosidase em amostras aplicadas em SDS-PAGE, ocorre também para as β -Glicosidases 3a e 3b (Figura 19 A e B). Em géis corados para evidenciar proteínas (Figura 19 A), pode ser observado que amostras não fervidas da β -Glicosidases 3a e 3b (raias 2 e 4, respectivamente) apresentam um polipeptídeo de baixo peso molecular não observado nas preparações de enzimas que foram fervidas (raia 1 para β -Glicosidase 3a e raia 3 para β -Glicosidase 3b). Esses polipeptídeos de Mr 27.000 são os responsáveis pela atividade de β -glicosidase (Figura 19 B: raia 1 para β -Glicosidase 3a e raia 2 para β -Glicosidase 3b).

Por outro lado, em eletroforese nativa em poliacrilamida (Figura 20) o polipeptídeo majoritário corado por prata apresenta também a atividade de preparações de β -Glicosidase 3a. Nessa eletroforese é evidenciado um polipeptídeo de menor migração em PAGE, cuja quantidade de proteína é muito menor do que a observada na banda majoritária. Provavelmente esse polipeptídeo minoritário represente uma forma desnaturada da β -Glicosidase 3a.

Esses resultados, em conjunto, sugerem que a preparação obtida após a cromatografia em Alkyl Superose está pura e contém apenas o polipeptídeo correspondente a β -Glicosidase 3a. Esse resultado sugere também que os dois polipeptídeos observados em SDS-PAGE, um majoritário de alto peso molecular sem atividade enzimática e um minoritário de baixo peso molecular com atividade, sejam resultado de um artefato. Contudo, o resultado apresentado aqui não esclarece o fenômeno que leva a separação de dois polipeptídeos de massas diferentes em SDS-PAGE.

3.04.2 Caracterização física das 3a e 3b

Como citado no item anterior o fato da atividade de β -glicosidase evidenciada em SDS-PAGE não ser correspondente à banda majoritária de proteínas encontradas nessas preparações é bastante intrigante. As hipóteses cogitadas foram que: (i) a proteína responsável pela atividade enzimática estava contaminada por outra proteína que seria majoritária, (ii) a forma de baixo peso molecular seria um monômero e a de alto peso molecular um oligômero inativo das β -glicosidases estudadas ou, como hipótese mais provável, (iii) o resultado observado seria um artefato da técnica SDS-PAGE. Para verificar se essa hipótese era verdadeira, as β -Glicosidases 3a e 3b tiveram suas Mr determinadas por várias técnicas de determinação de peso molecular de proteínas.

Quando a proteína é submetida a SDS-PAGE e sua migração comparada com a migração

Figura 19 – (A e B) SDS-PAGE 12% da β -Glicosidase 3a e 3b: (A) Gel corado pela prata segundo Blum *et al.* (1987) para evidenciar proteína: PM – padrões de peso molecular; raia 1 – β -Glicosidase 3a previamente fervida; raia 2 – β -Glicosidase 3a não fervida; raia 3 – β -Glicosidase 3b previamente fervida; raia 4 – β -Glicosidase 3a não fervida. (B) Gel corado segundo Manchenko (1994) para evidenciar atividade enzimática: raia 1 – β -Glicosidase 3a não fervida; raia 2 – β -Glicosidase 3b não fervida. (C) Western blot de material transferido de SDS-PAGE 12% e reconhecido pelo anticorpo anti- β -Glicosidase 3a produzido contra o polipeptídeo majoritário de alto peso molecular: raia 1 – β -Glicosidase 3a previamente fervida; raia 2 – β -Glicosidase 3a não fervida.

Figura 20 – Eletroforese em condições nativas em gel de poliacrilamida 10,5 % da β -Glicosidase 3a. (1) Gel corado pela prata segundo Blum *et al.* (1987) para evidenciar proteína. (2) Gel corado segundo Manchenko (1994) para evidenciar atividade enzimática.

dos padrões em uma só concentração de poliacrilamida, é observada uma Mr de 59.000 para a proteína majoritária e Mr de 27.000 para a proteína que apresenta atividade enzimática. Contudo, a determinação por ultracentrifugação em gradiente de densidade em alta e baixa força iônica (Figura 21), realizada com o material solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor*, resultou em uma Mr em torno de 52.000. Esse valor foi obtido determinando tanto a atividade sobre NPβDglu quanto sobre NPβDgal. Esse resultado sugere que não existe uma proteína com Mr de 27.000 apresentando atividade de β-glicosidase.

As preparações da β-Glicosidase 3a foram também usadas para determinar o peso molecular em diferentes concentrações de gel de poliacrilamida na presença e ausência de SDS. Nesse método é levada em conta a razão de migração das proteínas nas várias concentrações de gel (item 2.11). Desse modo, em géis sem SDS, foi calculado uma Mr de 47.000 para a proteína majoritária corada com prata e que apresenta atividade enzimática. Em géis com SDS, determinou-se uma Mr de 64.000 para a proteína majoritária corada pela prata e Mr de 65.000 para a proteína que apresenta atividade enzimática.

Esse último resultado mostra que a proteína com atividade apresenta o mesmo peso molecular da proteína majoritária corada pela prata e que a primeira é separada da segunda devida a uma migração anômala da enzima ativa em SDS-PAGE. Essa migração anômala, quando comparada aos padrões de peso molecular leva a um cálculo errado de peso molecular quando uma só concentração de gel é usada. A idéia de que esses dois polipeptídeos são a mesma proteína é reforçada pelo fato de que, em eletroforese nativa, na mesma preparação a proteína corada pela prata é a que apresenta atividade enzimática. Esse fenômeno parece ser geral para as β-glicosidases de *Tenebrio molitor*, conforme comentado anteriormente para a β-Glicosidase 1, β-Glicosidase 2 e β-Glicosidase 3b.

A identidade das proteínas obtidas após SDS-PAGE da β-Glicosidase 3a foi também testada usando um anticorpo, produzido em coelho, contra a proteína majoritária obtida após SDS-PAGE (Figura 19 C). O resultado mostra que a banda de Mr 27.000, presente em amostras que não foram fervidas, também é reconhecida por esse anticorpo. Esse resultado mostra que esse polipeptídeo é o mesmo presente na banda majoritária corada pela prata, que apresenta uma Mr de 59.000.

Além dos dados obtidos por centrifugação em gradiente de densidade (Figura 21), a hipótese de que haja migração anômala para as β-Glicosidase 1 e β-Glicosidase 2 em eletroforese contendo SDS foi reforçada pela determinação do peso molecular das enzimas purificadas por

Figura 21 – Ultracentrifugação em gradiente de densidade da fração solúvel do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor*. (A) Gradiente de glicerol preparado em 5 mM de tampão; (B) Gradiente de glicerol preparado em 100 mM de tampão. As flechas indicam o ponto de migração dos padrões de peso molecular no gradiente: C - catalase (Mr 232.000); H - hemoglobina (Mr 64.500). A atividade enzimática foi determinada para os substratos celobiose 7 mM ($\square$), NP β Dglu 10 mM ($\bullet$) e NP β Dgal 10 mM ($\blacktriangle$).

cromatografia em filtração em gel. Por esse método foi obtido uma Mr de 71.000 para as duas enzimas (dados não mostrados). Esse resultado está mais próximo da Mr da proteína inativada durante o SDS-PAGE.

O anticorpo obtido para a β -Glicosidase 3a se mostrou específico para essa enzima e para a β -Glicosidase 3b. Western blots usando o anticorpo pré-imune de coelho (obtido antes da imunização) contra a fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (Figura 22 A) mostrou que o coelho não apresentava nenhum anticorpo capaz de reconhecer antígenos presentes no homogeneizado antes da imunização. Western blots usando o anticorpo obtido após imunização (Figura 22 B) mostra que esse é capaz de reconhecer uma única banda na fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor* (raia 1; Figura 22 B). A Mr de 74.000 obtida se assemelha à Mr obtida para a β -Glicosidase 3a em SDS-PAGE (Mr = 59.000). O reconhecimento da banda da β -Glicosidase 3a purificada (raia 4) e o fato de que essa corresponde à banda de proteína reconhecida no homogeneizado vem mostrar que o anticorpo está realmente reconhecendo especificamente a enzima β -Glicosidase 3a.

Para verificar se as outras β -glicosidases de *Tenebrio molitor* poderiam apresentar reação cruzada com o anticorpo produzido contra a β -Glicosidase 3a, as β -Glicosidases 1, 2 e 3b também foram usadas nesse Western blot. O resultado mostra que para as β -Glicosidase 1 e 2 (raia 2 e 3) não é observado nenhum reconhecimento. Já a β -Glicosidase 3b também é reconhecida por esse anticorpo (raia 5), o que sugere que as β -Glicosidase 3a e 3b de *Tenebrio molitor* seriam isoformas de uma mesma enzima.

3.04.3 Comparação de peptídeos entre as β -Glicosidases 3a e 3b

As propriedades semelhantes entre essas duas enzimas observadas durante os passos de purificação e o reconhecimento de ambas pelo anticorpo anti- β -Glicosidase 3a indicam que elas devam ser muito semelhantes. Para confirmar essa semelhança, as β -Glicosidases 3a e 3b foram enviadas para a determinação da sequência de peptídeos internos, um serviço prestado pela Universidade de Kentucky. As β -Glicosidases 3a e 3b purificadas foram tratadas separadamente com endoproteinase Lis-C. Os peptídeos gerados de cada enzima foram separados por HPLC. Os perfis de eluição obtidos após essa separação (Figura 23) são muito semelhantes para as duas enzimas. Um peptídeo de cada enzima, eluídos com igual tempo de retenção, foi sequenciado, resultando na mesma sequência: **KGTFDFLGLNHYSSD**, indicando novamente que essas

Figura 22 – Western blot usando o anticorpo anti- β -Glicosidase 3a. O material submetido a um SDS-PAGE 12% foi transferido para membrana de nitrocelulose. (A) Soro pré ímune: PM – padrões de peso molecular; raia 1 – fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor*. (B) Anticorpo produzido contra β -Glicosidase 3a: raia 1 – fração solúvel do homogeneizado de conteúdo luminal do intestino médio de *Tenebrio molitor*; raia 2 – β -Glicosidase 1 purificada; raia 3 – β -Glicosidase 2 purificada; raia 4 – β -Glicosidase 3a purificada; raia 5 – β -Glicosidase 3b purificada.

Figura 23 – Perfis de eluição de cromatografia em HPLC dos peptídeos gerados por digestão das β -Glicosidases 3a (A) e 3b (B) de *Tenebrio molitor* pela endoproteínase Lis-C. As setas indicam os peptídeos que foram escolhidos para a determinação de seqüências de aminácidos.

proteínas são muito semelhantes. Outros dois peptídeos foram sequenciados a partir da β -Glicosidase 3b, sendo eles: **KANSLAEGYPQS** e **YLYEIL**. A sequência amino-terminal foi obtida a partir da β -Glicosidase 3b e mostrou ser: **XXPDYYFPDGFVFGA**.

3.04.4 Especificidade das β -Glicosidases 3a e 3b

As β -Glicosidases 3a e 3b não hidrolisam florizina (0,5 mM), o polissacarídeo liquenana (0,25 % p/v) e carboximetilcelulose (0,5 % p/v). Foi detectada atividade sobre esculina (2,5 mM) mas os parâmetros cinéticos para a hidrólise desse glicosídeo não foram calculados pois ele interfere no método de detecção de glicose.

As β -Glicosidases 3a e 3b tem ampla especificidade, sendo capazes de hidrolisar di- e oligossacarídeos, alquil β -glicopiranosídeos, aril β -glicopiranosídeos produzidos por plantas, aril β -glicopiranosídeos sintéticos e o polissacarídeo laminarina. Os valores de k_{cat} e K_m encontrados para as β -Glicosidases 3a e 3b são muito semelhantes para todos os substratos (dados não mostrados). Devido a essa identidade, somente aqueles obtidos para a β -Glicosidase 3a serão apresentados (Tabela 09).

A hidrólise de NP β Dcelobiosídeo pela β -Glicosidase 3 mostra que elas clivam resíduos de monossacarídeos da ponta não redutora do glicosídeo. Foi observado (dados não mostrados) que durante o início da hidrólise de NP β Dcelobiosídeo somente glicose e NP β Dglu são gerados. Uma hidrólise significativa do NP β Dcelobiosídeo leva a um aumento na concentração de NP β Dglu no meio de reação e o p-nitrofenol começa a ser gerado pela hidrólise desse último. Esses resultados confirmam que elas são realmente β -glicosidases.

A β -Glicosidase 3 é capaz de clivar tanto glucosídeos como galactosídeos. O K_m para celobiose é 15 vezes menor que para lactose e o de NP β Dglu cerca de 3 vezes menor que o de NP β Dgal. Esse resultado mostra que a disposição espacial da hidroxila do carbono 4 do monossacarídeo na posição do glicone do glicosídeo é importante para definir a especificidade pela ligação com o substrato. Já o K_m para NP β Dglu é cerca de 2,5 vezes menor que o para celobiose e o de NP β Dgal cerca de 13 vezes menor que o para lactose, o que indica que a presença do aglicone p-nitrofenol ao invés da glicose aumenta a afinidade das enzimas pelo substrato.

Os dados cinéticos mostram também que o tipo de ligação glicosídica interfere na afinidade dessa enzima pelo substrato. Podemos ver que o K_m para laminaribiose (glucosil β 1, 3 glicose) é cerca de 9 vezes menor do que para celobiose (glucosil β 1, 4 glicose) e 46 vezes

Tabela 09 – Especificidade da β-Glicosidase 3a de *Tenebrio molitor*

Substratos	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)	k_{cat}/K_m relativo
Alquil Glucosídeos				
n-Metil β-D-glicopiranosídeo	0,30 ± 0,01	29 ± 2	10,3 ± 0,8	0,003
n-Pentil β-D-glicopiranosídeo	1,32 ± 0,02	2,1 ± 0,1	630 ± 30	0,2
n-Hexil β-D-glicopiranosídeo	1,22 ± 0,03	1,5 ± 0,2	800 ± 100	0,2
n-Heptil β-D-glicopiranosídeo	0,98 ± 0,02	1,0 ± 0,1	980 ± 90	0,3
n-Octil β-D-glicopiranosídeo	1,17 ± 0,02	0,67 ± 0,03	1.700 ± 100	0,5
n-Nonil β-D-glicopiranosídeo	0,87 ± 0,02	0,93 ± 0,05	940 ± 70	0,3
n-Decil β-D-glicopiranosídeo	0,72 ± 0,02	1,6 ± 0,1	450 ± 30	0,1
n-Undecil β-D-glicopiranosídeo	0,52 ± 0,02	2,3 ± 0,1	230 ± 20	0,06
n-Dodecil β-D-glicopiranosídeo	0,23 ± 0,07	2,5 ± 0,3	90 ± 10	0,03
Dissacarídeos				
Celobiose	16,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2	6.000 ± 500	1,7
Gentiobiose	5,23 ± 0,05	17 ± 2	310 ± 40	0,09
Lactose	20,9 ± 0,7	35 ± 4	600 ± 80	0,17
Laminaribiose	15,4 ± 0,2	0,30 ± 0,01	51.000 ± 3.000	14
Glicosídeos de planta				
Amigdalina	6,0 ± 0,1	0,58 ± 0,03	10.400 ± 700	2,9
Helicina	27 ± 1	0,20 ± 0,02	140.000 ± 20.000	39
Prunasina	10,2 ± 0,3	3,2 ± 0,2	3.200 ± 300	0,9
Salicina	1,35 ± 0,02	1,50 ± 0,03	900 ± 30	0,3
Glicosídeos Sintéticos				
NPβDcelobiosídeo	50 ± 1	0,14 ± 0,01	360.000 ± 40.000	100
NPβDgal	4,68 ± 0,03	3,0 ± 0,1	600 ± 200	0,4
NPβDglu	18,0 ± 0,4	1,10 ± 0,08	16.000 ± 1.000	4,4
Oligossacarídeos				
Celotriose	19,4 ± 0,2	0,49 ± 0,02	40.000 ± 1.000	11,1
Celotetraose	20,1 ± 0,1	0,28 ± 0,01	72.000 ± 2.000	20
Celopentaose	19 ± 2	0,31 ± 0,01	61.000 ± 4.000	17
Polissacarídeo				
Laminarina	5,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3.600 ± 300	1

Os dados foram obtidos através da incubação de enzima β-Glicosidase 3a purificada em pelo menos 10 concentrações diferentes dos substratos acima listados em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter. Os mesmos resultados foram obtidos para a β-Glicosidase 3b.

menor do que o para gentiobiose (glucosil β 1, 6 glicose), possivelmente pela alteração do posicionamento espacial do aglicone. Pode ser observado também que o k_{cat} para laminaribiose e celobiose são semelhantes e cerca de 3 vezes maiores que o observado para gentiobiose. Isso indica que essa enzima hidrolisa melhor ligações glicosídicas β 1-3 e β 1-4 que as β 1-6.

Entre os alquil β -glicosídeos, n-octil β -D-glicopiranosídeo é o mais eficientemente clivado (a enzima apresenta o maior k_{cat}/K_m). O K_m para a clivagem desses glicosídeos descem até o n-octil β -D-glicopiranosídeo e voltam a subir com o aumento da cadeia alifática. Algumas concentrações n-decil, n-undecil e n-dodecil β -D-glicopiranosídeo, usadas para estimar V_{max} e K_m , foram muito altas sendo necessário adicionar Triton X-100 e taurocolato de sódio para a sua solubilização. Para determinar se esses detergentes afetariam a estimativa dos parâmetros cinéticos da β -Glicosidase 3, o V_{max} e o K_m foram estimados para a clivagem de n-nonil β -D-glicopiranosídeo na presença e na ausência desses detergentes. Os resultados obtidos foram idênticos (dados não mostrados), indicando que os parâmetros determinados para todos os alquil glicosídeos não devem estar afetados pela presença desses detergentes.

A β -Glicosidase 3 hidrolisa oligocelodextrinas com bastante eficiência (Tabela 09). O fato de que o K_m para a clivagem dessas substâncias decresce até celotetraose e aumenta para celopentaose, sugere que a enzima possui quatro subsítios para ligação de glicose. Polímeros normalmente não são substrato para β -glicosidases. A β -Glicosidase 3 é capaz de clivar laminarina com um K_m de 1,4 mM. A quantidade de poder redutor gerado durante a hidrólise é igual à quantidade de glicose formada, indicando que somente glicose é liberada pela ação dessa enzima sobre laminarina (dados não mostrados).

Resultados obtidos em TLC (Figura 24) mostram que laminarina apresenta somente um contaminante minoritário que aparentemente não é clivado pela β -Glicosidase 3a (comparar raias 1 e 2). Os dados sugerem também que laminarina usada aqui não possui contaminação significativa com cadeias com menos de dez resíduos de glicoses, que seriam discriminados nessa cromatografia. O grau de polimerização médio da laminarina usada nesse trabalho é de 35 resíduos de glicose. Dessa forma, a enzima é capaz de clivar um substrato formado por vários resíduos desse monossacarídeo. O fato de só ser uma banda de produtos de hidrólise e existirem evidências da produção de grande quantidade de glicose indica que a enzima se comporta como uma β 1-3 exoglucanase.

É interessante notar, que embora a β -Glicosidase 3 clive laminarina, ela é incapaz de clivar carboximetilcelulose, um substrato usado para ensaiar celulase, mesmo sendo capaz de

Figura 24 – Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise de laminarina pela β -Glicosidase 3a de *Tenebrio molitor*. raia 1 – controle onde a laminarina não foi incubada com enzima; raia 2 – produtos de hidrólise da laminarina pela β -Glicosidase 3a.

clivar celopentaose. Se compararmos o K_m para celobiose (glucosil β 1-4 glicose) e para laminaribiose (glucosil β 1-3 glicose) se verifica que a enzima apresenta uma afinidade cerca de dez vezes maior para o dissacarídeo unido por ligações β 1-3. Talvez isso explique o fato dela ser capaz de hidrolisar laminarina (polímero de glicose β 1-3) com um K_m 1,4 mM e não carboximetilcelulose (polímero de glicose β 1-4). Outra explicação pode ser o fato da carboximetilcelulose apresentar um certo número das hidroxilas carboximetiladas, de forma a aumentar a sua solubilidade em água. A ausência dessas hidroxilas livres poderia impedir uma ligação adequada do substrato ao sítio ativo da enzima. O fato da enzima também não apresentar atividade sobre liquenana pode ser devido a enzima não ser capaz de se ligar a um polímero onde as ligações β 1-4 e β 1-3 se alternam aleatoriamente.

3.04.5 Caracterização do sítio ativo das β -Glicosidases 3a e 3b

Os dados apresentados aqui foram obtidos para a β -Glicosidase 3a. Contudo, esses serão referidos à β -Glicosidase 3 uma vez que os mesmos são válidos tanto para a β -Glicosidase 3a quanto para a 3b.

Os resultados de inibição da β -Glicosidase 3 mostram que todos os inibidores usados apresentam um padrão de inibição competitiva linear simples para a clivagem do substrato (experimentos semelhantes ao mostrado na Figura 13). Glucono δ lactona inibe competitivamente a β -Glicosidase 3 (Tabela 10) com um baixo K_i (1,9 μ M). A glucono δ lactona mimetiza o estado de transição do substrato durante a catálise, o íon oxycarbônio, e por isso é um bom inibidor. Foram feitos também experimentos de competição entre substratos para a β -Glicosidase 3 (Tabela 10). Foi mostrado que os valores de K_i calculados para celobiose quando essa inibe a hidrólise de NP β Dglu e de NP β Dgal, se mostraram iguais ao K_m obtido para esse substrato. Isso significa que celobiose, NP β Dglu e NP β Dgal são clivados no mesmo sítio ativo. O valor de K_i para NP β Dgal quando esse inibe a hidrólise de NP β Dglu e de amigdalina também foi semelhante ao seu K_m . Esses resultados mostram que a β -Glicosidase 3 possui um único sítio ativo, capaz de clivar uma ampla variedade de glicosídeos.

Afinidades dos subsítios para a ligação de glicose, mandelonitrila e p-nitrofenol foram calculados segundo Hiromi *et al.* (1973). Todos os subsítios apresentam afinidade positiva para glicose exceto o subsítio +4 (Figura 12 B). O k_{im} , calculado também segundo Hiromi *et al.* (1973), é de 21,2 s⁻¹M⁻¹.

Quando os alquil β -glucosídeos são usados como substratos, a eficiência catalítica

Tabela 10 – Inibição da β -Glicosidase 3a de *Tenebrio molitor*

Substrato	inibitor	K_i (mM)	K_i/K_m
NP β Dglu	Celobiose	$2,4 \pm 0,4$	0,8
NP β Dgal	Celobiose	$3,0 \pm 0,5$	1
NP β Dglu	NP β Dgal	$2,7 \pm 0,6$	0,9
Amigdalina	NP β Dgal	$3,2 \pm 0,6$	1,1
NP β Dglu	Glucona δ lactona	$0,0019 \pm 0,0003$	—

Os dados foram obtidos através da incubação de enzima β -Glicosidase 3a purificada em 5 concentrações diferentes do substrato para 5 concentrações de substrato inibidor, preparados em tampão citrato/fosfato 50 mM, pH 5,5. Os parâmetros cinéticos foram determinados (média e desvio padrão da média) com a utilização do programa Enzifitter. Os mesmos resultados foram obtidos para a β -Glicosidase 3b.

aumenta e o K_m decresce conforme o número de carbonos no aglicone aumenta até oito (Tabela 09). A partir dos valores de K_m obtidos, foram calculadas as energias de ligação, expressas em função do número de carbonos no aglicone (Figura 25). A partir da inclinação da reta mostrada na figura 25 foi possível calcular a contribuição para a energia de ligação da enzima ao substrato para cada resíduo de metileno ($\Delta\Delta G^\circ/\text{resíduo de CH}_2$). Para a β -Glicosidase 3 essa contribuição é de 0,97 kJ/mol.

Comparando os modelos moleculares de oligocelodextrinas e alquil glucosídeos ficou aparente que 4 resíduos de metileno de um alquil β -glucosídeo liga-se em um subsítio de ligação de glicose. Do gráfico de k_{cat}/K_m para os alquil glucosídeos com 1, 5, 6, 7 e 8 carbonos na região do aglicone em função do número de carbono do aglicone (coeficiente de correlação linear de 0,999) foi calculado o k_{cat}/K_m para *n*-butil β -D-glicopiranosídeo. De posse dos valores de k_{cat}/K_m para os alquil β -glucosídeos de 4 a 12 carbonos no aglicone, foi possível determinar a afinidade do subsítio +2 e +3 para resíduos de butileno, do mesmo modo descrito para a determinação de afinidade para glicose (Hiromi, 1972; Figura 12 B).

As β -Glicosidases 3a e 3b mostram inibição pelo substrato quando amigdalina é usada como substrato. Um K_i de 210 ± 20 mM pode ser calculado admitindo-se que quando uma segunda molécula de substrato liga-se à enzima forma-se um complexo inativo. Outra explicação para o fenômeno observado seria que essas enzimas apresentam uma atividade de transglicosilação. Diversos trabalhos têm mostrado que as glicosidases podem transglicosilar quando há altas concentrações de glicosídeos no meio. Essa atividade corresponde à transferência do monossacarídeo retirado do glicosídeo clivado, que permanece ligado covalentemente à enzima, para outro glicosídeo ao invés de para uma molécula de água.

Para testar esse modelo foi feita uma análise por cromatografia em HPLC dos produtos de hidrólise gerados durante a clivagem da amigdalina, na concentração de 50 mM, onde era observada inibição pelo substrato. O resultado para a β -Glicosidase 3a (Figura 26) mostra que, além da amigdalina e dos produtos esperados pela sua clivagem pela β -Glicosidase 3a (glicose, prunasina e mandelonitrila), dois produtos desconhecidos são gerados. Eles foram purificados (dados não mostrados) e tiveram a suas massas determinadas por técnica de espectrometria de massa. O resultado mostrou que os dois produtos apresentavam uma massa $[M+H]^+$ igual a 620 Da. Essa massa é equivalente a de uma amigdalina à qual uma glicose foi adicionada por ligação glicosídica. A presença de dois produtos diferentes pode ser devido a formação de tipos diferentes de ligações glicosídicas durante a transglicosilação. Portanto, a cinética de inibição

Figura 25 – Energia de ligação de alquil β-D-glucopiranosídeos à diversas β-glicosidases: (◆)β-Glicosidase 3a de *Tenebrio molitor* ; (▲)β-glicosidase de *Spodoptera frugiperda*, (Marana *et al.*, 2001); (●) β-glicosidase citossólica humana e (■) glucocerebrosidase humana (Gopalan *et al.*, 1989).

Figura 26 – Produtos gerados pela clivagem de amigdalina em altas concentrações pela β -Glicosidase 3a de *Tenebrio molitor*. Preparações de enzima purificada foram incubadas por 4 h a 30 °C em 50 mM de substrato em tampão piperazina 10 mM, pH 5,5. (M) pico correspondente a eluição da mandelonitrila; (P) pico correspondente a eluição da prunasina; (A) pico correspondente a eluição da amigdalina; (G) pico correspondente a eluição da glicose. (1) e (2) picos desconhecidos gerados pela ação enzimática.

pelo substrato apresentada pela enzima deve-se a uma atividade de transglicosilação.

Embora o experimento de transglicosilação tenha sido realizado somente para a β -Glicosidase 3a, o mesmo deve ocorrer para a β -Glicosidase 3b, uma vez que as duas enzimas são idênticas em todas as outras propriedades cinéticas. Para a β -Glicosidase 3b também é observada uma inibição pelo substrato em altas concentrações de amigdalina, com K_i semelhante.

Detergentes tais como Triton X-100 podem ativar algumas β -glicosidases (Marana *et al.*, 1995). Entretanto, as β -Glicosidases 3a e 3b de *Tenebrio molitor* não foram ativadas por Triton X-100 em concentrações dez vezes a sua CMC (dados não mostrados).

3.04.6 Clonagem e seqüenciamento das β -Glicosidases 3a e 3b

O RNA extraído do tubo digestivo de *Tenebrio molitor* foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose. O resultado (Figura 27) mostra a presença da banda de RNA ribossomal, não sendo observado arraste de produtos correspondentes a degradação por RNase, mostrando a sua integridade. Diferente de mamíferos, o RNA ribossômico de insetos é separado em uma única banda em eletroforese em agarose (Ogino *et al.*, 1990). Aproximadamente 2 mg de RNA total foram enviados para a Stratagene para a confecção de uma biblioteca de cDNA, que foi usada na clonagem e seqüenciamento da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*.

A partir do RNA total a fração de RNA poli(A)⁺ foi purificada e uma parte dela submetida a reação de transcriptase reversa usando iniciador randômico e outra parte utilizada em uma reação usando um iniciador poliT. Os cDNAs obtidos, representando uma mistura de produtos provenientes desses dois tipos de reação, foram clonados não direcionalmente no vetor λ Zap II no sítio para enzima de restrição EcoRI.

Como abordagem inicial, foram selecionadas placas de lise com reação positiva para o anticorpo produzido contra a β -Glicosidase 3a a partir da biblioteca de cDNA. Dessa forma não é possível distinguir os clones que estejam codificando para as isoformas da β -Glicosidases 3a e 3b. Assim sendo, a glicosidase a ser seqüenciada será citada apenas como β -Glicosidase 3. Durante a seleção foram encontrados dois clones que interagiram com o anticorpo em uma proporção de aproximadamente um clone positivo para $1,5 \times 10^5$ clones varridos.

Na primeira seleção a partir da biblioteca de cDNA foi obtido um clone positivo denominado clone 1. Da preparação de fagos isolados foi feita a excisão do plasmídeo pBluescript em células XL1-blue MRF'. Células SOLR foram então transformadas com esses plasmídios e três colônias crescidas e estocadas a -80°C . Dessas células, foi feita uma preparação

Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% do RNA total extraído do epitélio do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Em cada raia foi aplicado um volume de 12 μ l de amostra. raia 1 – 1,5 μ g de RNA; raia 2 – 2,6 μ g de RNA; raia 3 – 5,6 μ g de RNA; e raia 4 – 7,5 μ g de RNA. O gel foi submetido ao tratamento por brometo de etídio e as bandas de DNA visualizadas em transluminador de UV. A seta indica a banda correspondente ao RNA ribossomal.

de plasmídio que foi submetida a um seqüenciamento de DNA.

Para o clone 1 foi inicialmente feito um seqüenciamento a partir de cada um dos braços do fago utilizando os iniciadores T3 e T7. O resultado indicou que a seqüência obtida com o iniciador T3 era codificante da região N-terminal de uma β -glicosidase, porém a região correspondente à seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal da β -Glicosidase 3b não estava presente. Uma vez que também não era observado o códon de iniciação (ATG), chegou-se a conclusão de que deveria ser um clone incompleto. A seqüência obtida a partir do iniciador T7 mostrou similaridade apenas com proteínas que não eram glicosidases, e indicou que estavam presentes dois insertos de cDNA em um mesmo clone. A seguir foram sintetizados os iniciadores com base na extremidade das seqüências obtidas até o momento. Esses iniciadores eram: o N-C-1 (5' ACTGGATGACTTTCAACGAG 3') e o C-N-1 (5' TCGTGAAGCGTTGAACTGTC 3'). De posse desses, foi feita uma segunda rodada de seqüenciamento que ainda não foi o suficiente para cobrir toda a região dos dois insertos. Com base na extremidade das seqüências obtidas nesse segundo seqüenciamento foram sintetizados os iniciadores: o N-C-2 (5' GCCGACGAACAAGAAATGATG 3') e o C-N-2 (5' CAATCCGCCTCTCTCTTGC 3'). Um terceiro ciclo de seqüenciamento foi realizado completando toda a seqüência desse clone.

Dois procedimentos foram realizados com o intuito de seqüenciar a região que estava faltando no clone 1. O primeiro procedimento feito para tentar obter um clone completo foi a realização de uma nova seleção a partir da biblioteca de cDNA. Dessa foi resgatado mais um clone que continha o cDNA para a β -Glicosidase 3. Esse clone foi seqüenciado e mostrou codificar a extremidade N-terminal da proteína, apesar de também não conter o códon de início de tradução e o peptídeo sinal completo.

O outro procedimento consistia em amplificar em PCR a extremidade 5' a partir da biblioteca de cDNA, utilizando um iniciador desenhado com base na região 5' da seqüência do clone 1 (5' GTGGTAGGAGTCACAAGCTATG 3') e o iniciador T7. O produto obtido na reação de amplificação foi separado em gel de agarose 1% (Figura 28), e então purificado. Esse fragmento de cDNA, contendo aproximadamente 250 pb, foi ligado ao vetor "pGenT-Easy", que foi usado para transformar células XL1-blue MRF' competentes. Cinco colônias transformantes isoladas foram selecionadas, crescidas em meio LB-líquido e submetidas a "mini-prep". Para verificar se esses plasmídios continham realmente o fragmento de PCR clonado foi feita uma digestão por enzima de restrição EcoRI (dados não mostrados). Os plasmídios que continham o

Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR da porção 5' do cDNA que codifica para a β -Glicosidase 3. PM - Padrões de peso molecular; raia 1 - produto de PCR gerado a partir da biblioteca de cDNA de *Tenebrio molitor*. Para o PCR foi utilizado o iniciador T7, que anela na região do vetor, e o iniciador 5' GTGGTAGGAGTCACAAGCTATG 3', que anela no extremo 5' da sequência obtida para o clone 1 que codifica a β -Glicosidase 3. A temperatura de anelamento utilizada na reação de PCR foi de 56 °C. O gel foi submetido ao tratamento por brometo de etídio e as bandas de DNA visualizadas em transluminador de UV. A seta indica o fragmento de DNA escolhido para ser clonado em vetor "pGenT-Easy".

fragmento clonado foram então seqüenciados e o resultado obtido acrescentou nucleotídeos codificantes de apenas mais seis aminoácidos do peptídeo sinal além dos já observados no clone 2, porém, também não foi observada a presença do códon de iniciação (ATG) e nem do peptídeo sinal completo. Dada a frequência de clones positivos obtidos por número de placas de lise total analisados durante o procedimento de seleção primária de clones positivos, pode ser dito que na reação de PCR foram usados como molde pelo menos 400 clones diferentes contendo o cDNA para essa enzima. Dado o grande número de clones disponíveis como molde nesse PCR, pode ser dito que a extremidade 5' do cDNA que codifica a β -Glicosidase 3 não está representada nessa biblioteca.

A figura 29 resume a estratégia usada para a obtenção da seqüência do cDNA codificante da β -Glicosidase 3. Os clones seqüenciados estão mostrados em escala e também a região do cDNA que é codificada por eles.

O resultado final da seqüência (Figura 30) mostra um cDNA que contém 1.570 pares de bases que codificam um polipeptídeo de 502 aminoácidos, sendo 485 da proteína madura. O cálculo de peso molecular para a proteína madura resulta em uma massa de 56.046 Da, que é semelhante ao resultado obtido nas determinações por SDS-PAGE (Mr 59.000). A seqüência do cDNA mostra também um sinal de poliadenilação (AATAAA) e uma cauda de poli(A)⁺ com 16 pares de bases.

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA desses clones apresenta todos os peptídeos que foram seqüenciados para a β -Glicosidases 3a e 3b, tanto o N-terminal quanto os peptídeos internos (Figura 30). A seqüência de aminoácidos compartilhada entre os dois clones apresenta diferenças em quatro aminoácidos. As posições Val₂₀₁, Pro₂₈₅, Glu₄₄₈ e Tre₄₆₅ presentes no clone 2 foram substituídas no clone 1 por Gli, Leu, Asp e Pro, respectivamente. Esses dois clones devem representar as β -Glicosidases 3a e 3b.

A análise de similaridade da β -Glicosidase 3 com a de outras β -glicosidases cujas seqüências estão depositadas em bancos de dados tem mostrado uma alta correlação entre a enzima de *Tenebrio molitor* e de outros animais e plantas. A maior similaridade é obtida com a β -glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (45 % de identidade de 63 % de similaridade), que foi a primeira β -glicosidase de insetos a ter sua seqüência determinada (Marana *et al.*, 2001).

O alinhamento múltiplo da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* com β -glicosidases de animais e plantas (Figura 31) mostra que muitos resíduos de aminoácidos são altamente conservados entre essas enzimas. Esses resíduos devem ser importantes para a estrutura e função

Figura 29: Representação gráfica da estratégia de clonagem e seqüenciamento do cDNA da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*. A seta em negrito representa o cDNA que codifica para a proteína madura, a região tracejada representa a seqüência parcial que codifica o peptídeo sinal e a linha pontilhada representa a extremidade 3' do cDNA que não é traduzida. As demais setas representam os iniciadores usados para o seqüenciamento dos clones. O Clone 5' foi obtido pela amplificação da região 5' do cDNA para essa enzima usando os iniciadores T7 e NT- β gly3, sendo o fragmento amplificado clonado no vetor "p-GenT Easy" e seqüenciado usando iniciadores do braço do vetor de clonagem. Os clones 1 e 2 foram obtidos a partir da varredura da biblioteca de cDNA usando o anticorpo contra β -Glicosidase 3a. Esses cDNAs foram clonados em pBluescript e seqüenciados com o auxílio dos iniciadores para o braço do plasmídeo juntamente com os iniciadores sintetizados a partir da extremidade 3' das seqüências obtidas durante esse procedimento.

1	CG	GCA	CGA	GGG	GCA	ATT	CTT	TTG	GTG	ATT	TGC	GCG	AGT	ACC	ATC	ACA	CTC	GCG	GAC	GTC	59
-17		A	R	G	A	I	L	L	V	I	C	A	S	T	I	T	L	A	D	V	2
60	CCT	GAC	TAT	TAT	TTC	CCT	GAT	GGT	TTC	GTG	TTC	GGC	GCC	GCC	ACC	GCC	GCC	TAC	CAG	GTG	119
3	P	D	Y	Y	F	P	D	G	F	V	F	G	A	A	T	A	A	Y	Q	V	22
120	GAA	GGA	GGA	TGG	GAC	GAA	GAC	GGT	AAA	GGT	GAG	AGT	ATC	TGG	GAC	CGC	GGT	ACT	CAC	GAG	179
23	E	G	G	W	D	E	D	G	K	G	E	S	I	W	D	R	G	T	H	E	42
180	CAT	GCC	GAC	TGG	GTG	GCT	GAT	AAC	TCC	AAT	GGA	GAC	ATA	GCT	TGT	GAC	TCC	TAC	CAC	AAA	239
43	H	A	D	W	V	A	D	N	S	N	G	D	I	A	C	D	S	Y	H	K	62
240	TAC	AAA	GAA	GAT	GTG	CAG	ATG	TTG	AAG	ACT	CTA	GGG	GTG	AAT	TTC	TAC	CGA	TTT	TCC	ATC	299
63	Y	K	E	D	V	Q	M	L	K	T	L	G	V	N	F	Y	R	F	S	I	82
300	GCT	TGG	TCT	AGG	GTA	CTA	CCC	ACT	GGA	AAA	GCC	GAC	GAA	GTC	AAT	CAA	GCC	GGG	ATC	GAC	359
83	A	W	S	R	V	L	P	T	G	K	A	D	E	V	N	Q	A	G	I	D	102
360	TAT	TAC	AAC	AAT	CTG	ATA	GAC	GAG	CTG	TTG	GCC	AAC	GAT	ATC	GAG	CCC	TAC	GTT	ACC	ATG	419
103	Y	Y	N	N	L	I	D	E	L	L	A	N	D	I	E	P	Y	V	T	M	122
420	TTC	CAC	TGG	GAC	CTG	CCG	CAA	CCC	CTC	CAA	GAC	GAG	GGT	GGC	TGG	CCC	GAC	AGG	AAA	CTC	479
123	F	H	W	D	L	P	Q	P	L	Q	D	E	G	G	W	P	D	R	K	L	142
480	GCA	GAC	TAC	TTC	GTC	GAC	TAC	GCC	AGA	GTG	TTG	TTT	GAA	AAC	TTT	GGC	GAT	CGA	ATC	AAG	539
143	A	D	Y	F	V	D	Y	A	R	V	L	F	E	N	F	G	D	R	I	K	162
540	TAC	TGG	ATG	ACT	TTC	AAC	GAG	ATA	ATG	CAA	ATT	TGC	GAA	GCT	GGC	TAC	TCT	GGG	GGT	AGT	599
163	Y	W	M	T	F	N	E	I	M	Q	I	C	E	A	G	Y	S	G	G	S	182
600	TTC	GCC	CCT	TAC	ATA	AGC	AAC	CCG	GGG	GTC	GGG	GGC	TAC	GAG	TGC	ACC	CAC	ACC	GTC	CTC	659
183	F	A	P	Y	I	S	N	P	G	V	G	G	Y	E	C	T	H	T	V	L	202
660	CTA	GCC	CAC	GGC	AGG	ACC	TAT	AGA	CTC	TAC	GAC	AGC	GAC	TTC	CGA	GCG	GAA	CAA	AAT	GGC	719
203	L	A	H	G	R	T	Y	R	L	Y	D	S	D	F	R	A	E	Q	N	G	222
720	CAA	ATC	GGA	ATC	GCT	ATA	GAT	TCG	TAC	TGG	CAC	GAG	CCC	AAC	TAC	GCT	GAC	CGA	GAA	ACC	779
223	Q	I	G	I	A	I	D	S	Y	W	H	E	P	N	Y	A	D	R	E	T	242
780	GAC	CAA	GAA	GCC	TCC	GAA	GTG	GAC	ATG	CAG	CTG	AAC	TAC	GGC	TGG	TTC	GTC	AAC	CCC	TTC	839
243	D	Q	E	A	S	E	V	D	M	Q	L	N	Y	G	W	F	V	N	P	F	262
840	ATC	AAC	GGC	AAC	TAC	CCC	GAA	GTG	ATG	ATC	GAA	AGG	GTC	AAG	GCC	AAC	AGT	CTT	GCC	GAA	899
263	I	N	G	N	Y	P	E	V	M	I	E	R	V	K	A	N	S	L	A	E	282
900	GGC	TAT	CCC	CAA	TCC	CGT	CTT	CCC	GAG	TTC	ACC	GCC	GAC	GAA	CAA	GAA	ATG	ATG	AAA	GGC	959
283	G	Y	P	Q	S	R	L	P	E	F	T	A	D	E	Q	E	M	M	K	G	302
960	ACT	TTC	GAT	TTC	TTG	GGT	CTC	AAC	CAC	TAC	TCT	TCG	GAC	AAG	GTT	TAC	TTC	GCC	GAA	GAC	1019
303	T	F	D	F	L	G	L	N	H	Y	S	S	D	K	V	Y	F	A	E	D	322
1020	GGC	GCA	GGA	GAC	CAT	CCG	TCT	CAC	TGG	GCC	GAC	ACC	GGT	GTC	ATA	GGT	TAC	CAA	GAC	GCG	1079
323	G	A	G	D	H	P	S	H	W	A	D	T	G	V	I	G	Y	Q	D	A	342
1080	TCT	TGG	CCT	GGT	TCC	GCT	TCG	AGC	TGG	TTG	AAA	GTG	GTA	CCG	TGG	GGT	CTC	AAC	AAA	TTA	1139
343	S	W	P	G	S	A	S	S	W	L	K	V	V	P	W	G	L	N	K	L	362
1140	CTA	GTG	TGG	ATC	AAG	GAC	CAC	TAC	GAC	AAT	CCT	CCC	GTT	TTG	ATC	ACC	GAA	AAC	GGC	TTC	1199
363	L	V	W	I	K	D	H	Y	D	N	P	P	V	L	I	T	E	N	G	F	382
1200	TCT	GAT	ACT	GGA	GAA	CTA	GAC	GAC	TAC	GAC	AGG	GCC	AAC	TAT	TAC	AAG	CAG	TAC	TTG	TAC	1259
383	S	D	T	G	E	L	D	D	Y	D	R	A	N	Y	Y	K	Q	Y	L	Y	402
1260	GAG	ATT	CTC	AAG	GCC	ATT	AAC	GAA	GAA	GAG	TGC	AAT	GTT	ATC	GGG	TAC	ACG	GCG	TGG	AGT	1319
403	E	I	L	K	A	I	N	E	E	E	C	N	V	I	G	Y	T	A	W	S	422
1320	CTG	ATG	GAT	AAT	TTC	GAA	TGG	ATG	GCG	GGA	TAC	ACG	CAA	AGG	TTT	GGC	ATG	CAT	TAT	GTC	1379
423	L	M	D	N	F	E	W	M	A	G	Y	T	Q	R	F	G	M	H	Y	V	442
1380	GAT	TTT	GAC	GAT	CCT	GAG	AGA	CCC	AGG	ACT	AGG	AAG	TTG	TCC	TCT	TAC	GTT	TAC	AAT	AAT	1439
443	D	F	D	D	P	E	R	P	R	T	R	K	L	S	S	Y	V	Y	N	N	462
1440	ATT	ATT	ACA	ACT	AGA	CAC	GTG	GAT	TGG	GAC	TAC	TAC	CCA	GAC	TGG	CCG	CCA	ACT	CAA	GAA	1499
463	I	I	T	T	R	H	V	D	W	D	Y	Y	P	D	W	P	P	T	Q	E	482
1500	AAT	AAA	AAT	TGA	ATTTAAACTCTTCATTTTT							AATAAA	GCAAGCATTTGAATAGG			AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					1570
483	N	K	N	-																485	

Figura 30 – Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA que codifica a β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*. O códon de terminação, o sinal de poliadenilação e a cauda poli(A)⁺ estão dentro das caixas. A seta indica o ponto de clivagem do peptídeo sinal, deduzido a partir da sequência N-terminal de aminoácidos obtida para a β -Glicosidase 3b. Sequências de aminoácidos idênticas àquelas obtidas sequenciando-se fragmentos da proteína pura estão sublinhadas. Os aminoácidos em negrito são os que diferem entre os dois clones sequenciados. A sequência foi depositada no GenBank™ com o ID - AF 312017.

```

      . . . . . : : : : : * * . . . : * : * * . : .
1. -----QRRF-----PDDFLFGTATASYQIEGAWDEDGKGGENIWDYMHNTPEVIRDLSNG 50
2. -----VWEKFSNQTKFERDLFYHGTF-----RDDFLWGVSSSAYQIEGAWDADGKGPSIWDNFTHTPGNGVMDNSTG 67
3. -----PEGFVWSAATAAYQIEGAWRADGKGLSIWDTFTHTPLK-IENDDIA 45
4. -----MAF-----PADLVGGLPTAAYQIEGGWDADGRGPCVWDTFTHQGGERVFKNQGT 49
5. -----FKPLPISFDDFSDLNRSCF-----APGFVFGTASSAFQIEGAAFEDGKGPSIWDFTTHKYPEKIKDRTING 65
6. -----AKTDPP-----IHCA SLNRSSFDALPEGFI FGTASAAAYQIEGAAKEDGRGPSIWDFTYTHNHSEIRIKDGSNG 66
7. MRLVLVLPFPFVVFVPLDHVSSESISRANF-----PDGFVFGTASSAYQIEGAVKEGNKGESIWDFTTKEKPGKILDFSNA 77
8. -----DVPDYF-----PDGFVFGAATAAYQIEGGWDEDGKGESIWDRTGTHEADWVADNSNG 53

```

```

* : . . *      * : : : .      * * * : : * : : *      . : * : : *      * : : * : : * : : * :
1. DIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARILPT-GMANEVNPAGIAFYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDLPPQKLQ 129
2. DIACDSYNQLDADLNLRLALKVKAYRFSLSWSRIFFT-GTNSSINSHGVYNNRLIDGLLASDIFPMVTLFHWDLPPQALQ 146
3. DVACDSYHKISEDVVALQNLAVTHYRFSISWSRILPD-GTTNYINEAGLNYYVRLIDALLAANIKPQVTLYHWDLPPQALQ 124
4. DVACGSYTLWEEDLKCIKQLGLTHYRFSISWSRLLPD-GTTGFINQKGVYNNKIIDDLLTNGVTPVVTLYHFDLPQALE 128
5. DVAIDEYHRYKEDIGIMKDMNLDAYRFSISWPRVLPKGLSGGVNREGINYNNLINEVLANGMQPYVTLYHFDVPQALE 145
6. DVAVDQYHRYKEDVRIMKKMGFDAYRFSISWSRVLPNGKVS GGVNEDGIKFYNNLINEILRNLKPFVTIYHFDLPQALE 146
7. DTTVDQYHRFHNDIDLMDLRLMDAYRFSISWSRIFFT-DGTGEVNPDGVKYNSLIDALLAKGIKPYVTLYHWDLPPQALE 156
8. DIACDSYHKYKEDVQMLKTLGVNFYRFSIAWSRVLPPT-GKADEVNQAGIDYYNNLIDELLANDIEPYVTMFHWDLPPQLQ 132

```

```

: * : . : : * * * . : : : : : * * . . . *      . *      :
1. EL-GGFANPLISDWFEYARVVFENFGDRVKMFITFNEPREICFEGYGSATKAPILNA-----TAMGAYLCAKN 197
2. DI-GGWENPSLIDLFDSYADYCFQTFGDRVKFWITLINEPTYYSWSYSGSGTFPPNVND-----PGWAPYRISHA 214
3. DV-GGWENETIVQRFREYADVLFLQRLGDKVKFWITLINEPFVIVNHGYGNGVYAPGISLR-----PGTAPYIAGHN 193
4. DQ-GGWLSEAIIEVFDKYAQFCFSTFGRNVRQWITLINEPNVLCAMGYDLGFFAPGVSQ-----IGTGGYQAAHN 196
5. DEYRGFLGRNIVDDFRDYAELCFKEFGDRVKHWITLINEPNVLSMNAYAYGTFAFGRCSDWLKLNCTGGDSGREPYLAHY 225
6. DEYGGFLSPNIVDHFDRYANLCFKKFGDRVKHWITLINEPYTFSSSGYAYGVHAPGRCSAWQKLNCTGGNSATEPYLVTHH 226
7. DRYEGWLSREVDDFEHYAFTCFKAFGDRVKYWITFNEPHGVSIQGYDTGIQAPGRCSLLGHWFCKKKGSSVEPYIVAHN 236
8. DE-GGWPRKLADYFVDYARVLFENFGDRIKYWMTFNEIMQICEAGYSGGSFAPYISN-----PGVGGYECHT 200

```

```

: : * . .      * : : * *      . : : : : * *      . *      :
1. LVTAAHAKAYLYDREFRPVQGGCGITISVNWFGPATPTPE-DEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEGGFPKELSDKIAEK 276
2. LIKAHARVYHTYDEKRYQSNGVISLSLVAQWAEPKSPDVLRDVEAADRKMQFTLGWYAHPIFK-TGDYPDAMKWKVGNR 293
3. LIKAHAEAWHLVNDVYRASQGGVISITINSWAEPRDPSNQEDVEAAMRYVQFMGGWFAHPFK-NGDYHEVMKTRIRER 272
4. MIKAHARAWHSYDSLFRKQKGMVSLSLFCIWPQENPNVSLDQKAAERAINFQDFFAKPIFI-DGDYPELVKSQIASM 275
5. QLLAHAAAARLYKTKYQASQNGIIGITLVSHWFEPASKEKA-DVDAAKRGLDFMLGWFHMLPTK--GRYPESMRYLVR-- 300
6. QLLAHAAAVKLYKDEYQASQNGLIGITLVSPWFEPASEAE--DINAAFRSLDFIFGWFMPLTN--GNYPHLMRSIVG-- 301
7. ILLSHAAAYHTYQRNFKEKQKQIGISLDAKWYEPMSDCDE-DKDAARRAMDFGLGWFMPLIN--GDYPASMKSLE-- 311
8. VLLAHGRTYRLYDSDFRAEQNGQIGIAIDSYWHEPNYADRETDOEASEVDMQLNYGWVFNPFIN--GNYPEVMIERVKAN 278

```

```

. * * . : : . : * : : * . . : * : :
1. SAQQGYPSRLPEFTEEEKAFVRGTSDLIGVNHYTAFVLVSATERKGPYPVPSLLDDVDVTGSWADDS----WLKSASAWLT 352
2. SELQHLATSRLPSFTEEEKSYIRGTADVFLNTYSSKIVQHKT--ALNPPSYEDDQELAEEDTS----WPTTAMN--R 365
3. SLAAGL NESRLPEFTESEKRRINGTYDFFGFNHMTTVLAYNLNY--PSTISSIDADRGVASITDRS----WPDSGSFWLK 346
4. SEKQGYPSRLSKFTEEEKMIKGTADFFAVQYMTTRFIRHEN--KEAELGILQDAEIELFSDPS----WKGVGWV--R 347
5. -----KRLPKFSTEEKSKELTGSFDFLGLNLYSSYYAAKAPR-IPNARPAIQTDSLINATFEHNGKPLGPMAASSWLC 371
6. -----ERLPNFTEEQSKLLKGSFDFIGLNYMTTRYASNAPK-ITSVHASIYITDPQVNATAELKGVPIGMAASGWLY 372
7. -----ERLPKITPEMYKTIKGAFDYVGINHYTTLYARNDR--TRIKLILQDASSDSAVITS-----WSSWLH 372
8. SLAEGYQSRPLPEFTADEQEMMKGTDFLGLNHYSSDKVYFAED-GAGDHPSHWADTGVIGYQDAS----WPGSASSWLK 353

```

```

. . . . : : * . . : * * *
1. LAPNSIHTALTHLNNLYNKPVFYITENGWST-DESREN---SLIDDDRIQYYRASMESLLNCLDDG-INLKGYMAWSLMD 427
2. AASFGMRLLNWIKEEYGDPIYITENGVL-TN---P---ELEDIDRIFFYKTYINEALKAYRLDGVNLRGYSASLMD 438
3. MTPFGFRILNWIKEEYNNPPIYITENGVS-HQGD--S---YLNDDTRIYYLRSYINEALKAVQQDKVDLRGYTVVTLVD 420
4. VVPWGIRKLLNLYIKDTYNNPVIYITENGFPQ-DDP--P---SIDDTQRWECFRQTFEELFKAIHVDKVNLLQLYCAWSLLD 421
5. IYPQGIKLLLYVKNHYNPNPIYITENGR---NSSTIN---TVTSRIFF----- 414
6. VYPKGIHDLVLYTKEKYNDPLIYITENGVDENDPKLSMEEALKDKNRIDFYRHLCYLQAAIKKG-SKVKGYFAWSFLD 451
7. IVPWGIRKLAVYVKDIYGNPPVFIITENGMDKNSPFIDMEKALKDDKRIGFHRDYSNLNSAAIRNDECDVRGYFVWSLLD 452
8. VVPWGLNKLVLVWIKDHYDNPVLIITENGFS--DTG-----ELDDYDRANYKQYLYEILKAINEEECNVIGYTAVSLMD 425

```

```

1. NFEWM EGYIERFGLYEVD FSDPARTRTPRKA AFVYKHIIKHRVVDY EYEPETMVMT IDEGH----- 488
2. NFEWLRGYTVKFGLYHVD FEDVNRPR TARISASYSELITNNGMPLPSE----- 487
3. NFEWAGYSDKFLHFVNYS DPSLPRI PRESAKFYASIVRCNGFPDPAEGPHP----- 473
4. NFEWNDGYSKRFLGHVDFEDPAKPRVPYTS AKEYAKIIRNNGLERPQ----- 469
5. ----- 414
6. NFEWDAGYTVRFGINYVDYND-NLKRHSKLS TYWFTSFLKKYERSTKEIQMFVESKLEHQKFESQMMNKVQSS LAVVV 528
7. NFEWNSGYTVRFGIYVVDYKN-NLTRIPKASARWFQ TILSGSSSTS DSSSKLILLEATEQQQ EYKFQEK----- 520
8. NFEWMAGYTQRFGMHYVDFDDPERPRTRK LSSVYNNIITR HVDDWYYPDWPPTQENKN----- 485

```

Figura 31 – Alinhamento de β -glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases. As seqüências listadas aqui foram retirados do GenBank™. (1) β -glicosidase madura de *Spodoptera frugiperda* (AF052729); (2) seqüência repetida 3 e (3) seqüência repetida 4 da lactase-florizina hidrolase de *Oryctolagus cuniculus* (Z27167); (4) β -glicosidase citossólica de *Cavia porcelus* (U50545); (5) β -glicosidase cianogênica de *Trifolium repens* (X56733); (6) Amigdalina hidrolase de *Prunus serotina* (U26025); (7) β -glucosidase de *Arabidopsis thaliana* (AB016879); (8) β -Glicosidase 3 madura de *Tenebrio molitor*. *, : e . indicam resíduos idênticos, altamente conservados e pouco conservados entre as seqüências, respectivamente. O alinhamento foi feito nas condições padrões do programa Clustaw. Os resíduos que diferem nas duas isoformas de β -Glicosidase 3 estão sublinhados e dentro das caixas estão os resíduos envolvidos na formação do sítio ativo.

dessas proteínas. Boa parte dos resíduos conservados estão envolvidos na formação do sítio ativo dessas enzimas, como será discutido. Esses aminoácidos conservados permitem classificar a β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* na família 1 das glicosídeo hidrolases, como já feito por Coutinho & Henrissat (2000).

3.04.7 Imunocitocalização das β -Glicosidases 3a e 3b de *Tenebrio molitor*

O anticorpo produzido contra a β -Glicosidase 3a, que também reconhece a β -Glicosidase 3b, foi usado em uma imunocitocalização dessas enzimas no intestino médio de *Tenebrio molitor*. O resultado obtido na imunocitocalização por imunofluorescência mostra que a marcação observada na região anterior (Figura 32 A e B) do intestino médio difere da observada na região posterior (Figura 32 C e D). No epitélio da região anterior ocorre a marcação de células espaçadas, sendo observada maior marcação na região apical da célula. Já no epitélio da região posterior todas as células são marcadas, sendo essa marcação encontrada em uma maior extensão e se mostra granulosa, indicando que a enzima está localizada em pequenas vesículas de secreção.

Na imunocitocalização em microscopia eletrônica de transmissão são evidenciadas partículas de ouro coloidal ligadas ao anticorpo secundário que reconhece o anticorpo anti- β -Glicosidase 3a. A pouca marcação observada nos enterócitos da região anterior do intestino médio de *Tenebrio molitor* (Figura 33, A e B) se concentra em grandes vesículas de secreção localizadas no ápice das células. Na região posterior a marcação é muito mais intensa e está presente em pequenas vesículas de secreção (Figura 33, C e D).

Por microscopia eletrônica pode ser observada uma marcação muito mais acentuada na região posterior do que na anterior, que apresenta uma marcação desprezível. Esse resultado parece não estar de acordo com os observados por microscopia confocal (comparar figuras 32 e 33). Entretanto, os resultados são coerentes uma vez que a intensidade do sinal fluorescente apresentado na figura 33 para a região anterior e posterior são muito diferentes.

Pelo resultado obtido, é possível ver que a região posterior do intestino médio de *Tenebrio molitor* é a grande responsável pela secreção da β -Glicosidase 3. Também fica claro que essas enzimas são realmente secretadas pelo animal, descartando definitivamente a possibilidade delas estarem sendo produzidas pelo protozoário simbiote gregarina ou bactérias comensais.

Figura 32 – Imunocitocalização por imunofluorescência usando o anticorpo anti- β -Glicosidase 3a nas células do intestino médio de *Tenebrio molitor*. (A e B) Região anterior do intestino médio. (C e D) Região posterior do intestino médio. (EP) Epitélio ventricular; (LU) Lúmen do intestino. A escala apresentada equivale a 10 μ m. As setas indicam as regiões com maior marcação.

Figura 33 – Imunocitocalização por microscopia eletrônica de transmissão usando o anticorpo anti- β -Glicosidase 3a nas células do intestino médio de *Tenebrio molitor*. (A e B) Região anterior do intestino médio, (C e D) região posterior do intestino médio. (VS) Vesículas de secreção; (Mv) Microvilosidades. A escala apresentada equivale a 1 μ m. As setas indicam a marcação pelo anticorpo de vesículas de secreção localizadas no ápice dos enterócitos.

3.04.8 Distribuição de atividade de β -glicosidase no intestino médio de *Tenebrio molitor*.

A membrana peritrófica mais o seu conteúdo e o epitélio ventricular foram divididos em 3 porções, onde foi determinada a atividade sobre celobiose (Figura 34). Pode ser observado que na região posterior há apenas uma pequena atividade sobre esse substrato, sendo que a maior parte é encontrada na região anterior e média da membrana peritrófica mais o seu conteúdo. Esses ensaios foram feitos no pH ótimo das β -Glicosidases 3 e portanto sua presença pode ser detectada em qualquer das regiões, mesmo que o pH do local seja incompatível com a sua atividade. O conteúdo luminal anterior tem pH 5,6 e o posterior de 7,9 (Terra *et al.*, 1985), sendo os pHs ótimos para as β -glicosidases puras de *Tenebrio molitor* apresentados na figura 35. Como o substrato usado foi celobiose, estamos vendo apenas as atividades das β -Glicosidases 1, 3a e 3b. A β -Glicosidase 2 não está sendo detectada uma vez que ela não é capaz de clivar esse substrato.

O epitélio ventricular de todas as regiões apresenta atividade muito baixa. Isso explica não ter sido detectada muita atividade no ventrículo posterior. A ocorrência dessas enzimas na região média e anterior pode ser devida a adsorção das enzimas no epitélio desses locais que são absorptivos de água. Adsorção de substâncias que não estão presentes no interior das células em sua superfície foi mostrada anteriormente em *Tenebrio molitor* (Ferreira *et al.*, 1990).

4 Discussão

4.01 Origem e local de ação da β -glicosidases digestivas em *Tenebrio molitor*

Diversos trabalhos têm mostrado que enzimas presentes no tubo digestivo de insetos podem ser provenientes do alimento por eles ingerido. Schumaker, *et al.* (1993) verificaram a existência de uma cisteína proteinase no tubo digestivo de *Scaptotrigona bipunctata* que era proveniente do pólen ingerido na dieta. Terra, *et al.* (1985) mostraram que a atividade de aminopeptidase e celulase encontrada no farelo de trigo usado na alimentação de larvas de *Tenebrio molitor* contribuía significativamente para a atividade encontradas na forma solúvel no intestino médio desse animal. Dessa forma, para assegurar que uma determinada enzima é realmente produzida pelo inseto é necessário primeiro verificar se as enzimas encontradas no tubo digestivo não seriam originárias do alimento por eles ingerido.

Figura 34 – Atividade de β -glicosidase presente em regiões do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Ensaio usando celobiose 7 mM em tampão citrato/fosfato, pH 5,5, 50 mM. Os resultados estão expressos em relação a soma da atividade encontrada em todas as frações.

Figura 35 – Determinação de pH ótimo para as β -glicosidasas purificadas de *Tenebrio molitor*. (A) β -Glicosidase 1 ensaiada com MU β Dglu 1 mM. (B) β -Glicosidase 2 ensaiada com MU β Dgal 0,5 mM. (C) β -Glicosidase 3a ensaiada com NP β Dglu 10 mM. (D) β -Glicosidase 3b ensaiada em NP β Dglu 10 mM. Foram usados os tampões citrato/fosfato, fosfato e borato na concentração de 50 mM. Os resultados estão expressos em função da maior atividade.

Os espécimes de *Tenebrio molitor* utilizados nesse trabalho foram alimentados com farelo de trigo. Dados de focalização isoeletrica descartam a possibilidade de alguma das β -glicosidases presentes no farelo de trigo contribuírem significativamente para a atividade β -glicosidásica encontrada no intestino médio desse animal. Esse resultado já havia sido sugerido por Terra *et al.* (1985) que mostram que a atividade de β -glicosidase encontrada no farelo é menor que 2 % da atividade encontrada em uma mesma massa de peso fresco do conteúdo do intestino médio de *Tenebrio molitor*. Esse resultado ainda não descarta a possibilidade de que as β -glicosidases presentes nesse inseto sejam provenientes do protozoário simbiote gregarina que vive no lúmen de seu intestino médio. Os dados de imunocitocalização para as β -Glicosidases 3a e 3b mostram que elas estão presentes em vesículas de secreção, principalmente naquelas dos enterócitos da porção posterior do intestino médio, confirmando que elas são produzidas pelo inseto. Uma vez que as β -Glicosidases 1 e 2 de *Tenebrio molitor* não são reconhecidas por esse anticorpo, não podemos descartar a possibilidade delas serem produzidas pela gregarina.

Terra *et al.* (1985) determinaram o pH da região anterior e posterior do intestino médio de *Tenebrio molitor* e encontraram valores de 5,6 e 7,9, respectivamente. No pH encontrado na região anterior, todas as β -glicosidases tem atividade próxima ao seu ótimo. A exceção é a β -Glicosidase 2 que apresenta cerca de 70 % da sua atividade máxima (Figura 35). Talvez essa enzima atue em um micro ambiente que apresente pH diferente.

Vaccaro *et al.* (1997) mostraram que a clivagem de glucosilceramida pela glucocerebrosidase lisossomal humana varia de um pH ótimo de 5,0 para 4,5 quando o substrato em solução se encontra inserido em vesículas grandes ou em vesículas pequenas de lipídeos, respectivamente. Diversos outros trabalhos têm mostrado que o pH ótimo dessa enzima muda de valores da faixa de 5,5 a 6,0 para a de 4,6 a 5,2 quando na presença de lipídeos e fatores termoestáveis ativadores dessa enzima (ver Bassu & Glew, 1984). Como será discutido adiante, tem sido proposto que a β -Glicosidase 2 deva apresentar atividade de glicosilceramidase, sendo a clivagem de MU β Dgal ativada pela presença de Triton X-100. Esse resultado sugere a presença de um sítio ativador que liga compostos hidrofóbicos como lipídeos de membrana. A ativação dessa enzima poderia ocorrer no interior do intestino médio de *Tenebrio molitor* pela ligação a lipídeos presentes em sua comida. Talvez a ligação desses lipídeos possa levar a uma alteração no pH ótimo dessa enzima. Mesmo que essas alterações não ocorram, sua curva de pH ótimo mostra que a enzima ainda é bem ativa no pH encontrado na região luminal do ventrículo

anterior. Na região posterior do ventrículo, embora essas enzimas estejam presentes, elas aparentemente não desempenham nenhum papel, devido a sua quase inatividade.

4.02 Purificação das β -glicosidases digestivas de *Tenebrio molitor*

Em todas as β -glicosidases purificadas nesse trabalho nota-se, após SDS-PAGE, uma banda de proteínas majoritária que não corresponde à banda com atividade enzimática. Nas β -Glicosidases 3a e 3b foi mostrado que essas duas bandas correspondem ao mesmo polipeptídeo porque: (i) os dois polipeptídeos apresentam o mesmo peso molecular quando várias concentrações de poliacrilamida são usadas para determinação de peso molecular em SDS-PAGE, (ii) a banda majoritária de proteína corresponde à banda de atividade em eletroforese nativa e (iii) o anticorpo gerado em coelho contra polipeptídeo majoritário de menor migração em SDS-PAGE é capaz de reconhecer o polipeptídeo com atividade enzimática.

O polipeptídeo com migração anômala em SDS-PAGE é aquele que apresenta atividade enzimática. Isso pode ser dito uma vez que o peso molecular calculado para o polipeptídeo responsável pela atividade enzimática em SDS-PAGE, quando calculado usando essa técnica em géis com diferentes concentrações de poliacrilamida e por ultracentrifugação em gradiente de densidade, se assemelha ao peso molecular obtido para o polipeptídeo sem atividade enzimática determinado em uma só concentração de poliacrilamida. Além disso, o peso molecular calculado a partir da seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA da β -Glicosidase 3, também coincide com a da proteína sem atividade após SDS-PAGE. Ainda não está claro até o presente momento o porque a proteína que retém atividade durante o SDS-PAGE apresenta uma migração maior do que a observada para a proteína que foi inativada durante o SDS-PAGE.

As β -Glicosidases 1 e 2 apresentam o mesmo fenômeno que as β -Glicosidases 3a e 3b. Após SDS-PAGE de uma amostra não previamente fervida, ocorre um polipeptídeo minoritário que é o responsável pela atividade enzimática. Os resultados obtidos com as β -Glicosidases 3a e 3b, sugerem que todas elas estejam puras e a atividade observada após a eletroforese em SDS-PAGE representa uma migração anômala dessas proteínas nessa técnica.

O rendimento obtido na purificação das β -glicosidases de *Tenebrio molitor* (17 % para a β -Glicosidase 1; 2 % para a β -Glicosidase 2; 10 % para a β -Glicosidase 3a; 7,7 % para a β -Glicosidase 3b) é, na verdade, maior, uma vez que quatro enzimas estão presentes na preparação inicial a partir do qual o rendimento foi calculado.

4.03 Especificidade da β -Glicosidase 1

A β -Glicosidase 1 praticamente não cliva substratos contendo galactose, enquanto cliva muito bem substratos contendo glicose (Tabela 02). Uma vez que esses dois açúcares só diferem quanto a posição da hidroxila no carbono 4, vemos que essa é uma região importante de interação do substrato com a enzima. Isso pode ser dito uma vez que a mudança da hidroxila da posição equatorial (glicose) para axial (galactose) praticamente abole a atividade enzimática.

A incapacidade de clivar NP β Dman pode ser explicada pela posição das hidroxilas no anel piranosídico da manose. Comparando manose com a glicose vemos que a única hidroxila alterada está no carbono 2 sugerindo que a posição axial de uma hidroxila nesse carbono impede o encaixe no sítio ativo e/ou a clivagem do substrato.

A enzima cliva muito mal AP β Dglu e NP β Dgluc mas é bem ativa sobre NP β Dglu. AP β Dglu e NP β Dglu só diferem na posição para do anel presente no aglicone. AP β Dglu possui um grupo amino nessa posição e NP β Dglu um grupo nitro. NP β Dgluc possui um grupo carboxila no carbono 6 do anel piranosídico e o NP β Dglu um grupo hidroxila. É possível que as cargas conferidas pelo grupo amino do AP β Dglu e pela carboxila do NP β Dgluc não permitam uma boa ligação ao sítio ativo, embora não possa ser afastada a possibilidade de impedimento estérico. A incapacidade da enzima em clivar NP β Lara, poderia ser o fato desse monossacarídeo ser levógeno. As ligações β nesse tipo de β -glicosídeo apresentam uma estrutura comparável a de um α -glicosídeo de monossacarídeos destrógeros. A mesma explicação pode ser dada para a clivagem de NP α Lara pela β -Glicosidase 1.

Os valores de k_{cat} para a hidrólise de diferentes glucosídeos pela β -Glicosidase 1 (Tabela 5) não variam muito. Uma vez que a natureza do aglicone não interfere no k_{cat} para a hidrólise dos diversos glucosídeos, pode ser dito que o passo limitante para a hidrólise da ligação glicosídica pela β -Glicosidase 1 é a desglicosilação da enzima.

A determinação de afinidade dos subsítios da β -Glicosidase 1 mostrou que o subsítio +2 tem uma afinidade muito maior por glicose do que pelo p-nitrofenol que é mais hidrofóbico do que a glicose (Figura 12 A). Fazendo uma comparação das afinidades dos vários subsítios para ligação de glicose, é possível observar que os subsítios -1 e +1 são os que têm a maior afinidade por glicose. Isso indica que a β -Glicosidase 1 pode ligar bem dissacarídeos em relação a oligocelodextrinas. De fato, o K_m para celobiose não é tão maior do que o observado para as oligocelodextrinas (Comparar valores entre β -Glicosidase 1 e 3; Tabelas 03 e 09). Esses

resultados indicam que a β -Glicosidase 1 deve desempenhar um papel importante na digestão de dissacarídeos.

O fato da β -Glicosidase 1 ser inibida por altas concentrações de oligocelodextrinas e amigdalina provavelmente significa que, assim como a β -Glicosidase 3a, essa enzima também tem uma atividade de transglicosilação. Os valores de K_i obtidos sugerem que essa enzima tem uma atividade de transglicosilação muito mais eficiente do que a observada para a β -Glicosidase 3a. Esse resultado não significa que essas enzimas sejam incapazes de clivar oligocelodextrinas, uma vez que esses substratos livres não devem ser encontrados em abundância e só são formados após a ação das despolimerases que atuam na digestão inicial.

4.04 Características da β -Glicosidase 2

A β -Glicosidase 2 parece ser a enzima mais peculiar entre as β -glicosidases de *Tenebrio molitor*. Isso porque os resultados indicam que essa enzima possui dois sítios ativos, o que não ocorre na β -Glicosidases 1, 3a e 3b. A lactase-florizina hidrolase, que é a β -glicosidase digestiva de mamíferos, também apresenta dois sítios ativos sendo que cada um deles está presente em um domínio diferente, constituído por polipeptídeos semelhantes (M_r 46.000 e 53.000) gerados por duplicação gênica (Mantei *et al.*, 1988). A β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor* teria os dois sítios ativos em um só polipeptídeo de M_r 67.000. Resultado semelhante foi encontrado para uma β -glicosidase digestiva de *Abracris flavolineata* que possui dois sítios ativos em um polipeptídeo de M_r 82.000 (Marana *et al.*, 1995) e para uma β -glicosidase digestiva de *Spodoptera frugiperda*, onde os dois sítios ativos estão em um polipeptídeo de M_r 47.000 (Marana *et al.*, 2000). Seria interessante obter a sequência dessa enzima e compará-la com a enzima de mamíferos para verificar se realmente os dois sítios ativos estão presentes e entender como eles estão localizados em um só domínio.

A β -Glicosidase 2 é ativada por Triton X-100. Essa ativação é observada em concentrações acima e abaixo de sua CMC, indicando que o responsável pela sua ativação é o monômero do detergente. A ativação é devida a um aumento no k_{cat} para a clivagem do substrato pela β -Glicosidase 2, enquanto o K_m continua constante.

Ativação por Triton X-100 foi mostrada na alquil glicosidase de *Abracris flavolineata* (Marana *et al.*, 1995), uma enzima que também só apresenta atividade sobre substratos sintéticos (NP β Dglu e alquil β glucosídeos). Do mesmo modo que foi proposto para a β -glicosidase de *Abracris flavolineata* a β -Glicosidase 2 de *Tenebrio molitor* deve apresentar um sítio ativador

que liga Triton X-100. Ativações por detergentes também foram observadas em β -glicosidases de mamíferos. A glucocerebrosidase lisossomal requer detergente e/ou lipídeos negativamente carregados para a sua atividade ótima (Dinur *et al.*, 1984; Qi & Grabowski, 1998) e a β -glicosidase ligada a microssomos é ativada por taurocolato e fosfatidil serina (Grabowski *et al.*, 1984).

A β -Glicosidase 2 é a β -glicosidase de *Tenebrio molitor* com atividade mais restrita. Ela só cliva galactosídeos e a hidrólise de lactose, que foi o único galactosídeo natural usado nesse trabalho, foi muito baixa. A enzima se mostra eficiente apenas sobre substratos sintéticos que apresentam aglicones hidrofóbicos (Tabela 06). Provavelmente essa enzima tenha como substrato natural galactolipídeos.

4.05 Especificidade das β -Glicosidases 3a e 3b

Os dados cinéticos obtidos para as β -Glicosidases 3a e 3b foram idênticos. Desse modo, os comentários feitos aqui são válidos para ambas.

Pode ser observado que o K_m decresce conforme o número de resíduos de glicose aumenta. É observada uma queda muito grande nesse parâmetro quando se compara celobiose e as outras oligocelodextrinas (Tabela 09). Os resultados sugerem que a β -Glicosidase 3 apresenta 4 subsítios capazes de ligar glicose. De acordo com essa hipótese está o fato das afinidades para glicose serem positivas nos subsítios -1, +1, +2 e +3 e negativa no subsítio +4 (Figura 12 B). A constante catalítica intrínseca (k_{int}), que é a constante catalítica independente do número de resíduos de glicose na oligocelodextrina, foi calculada como sendo $21,2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ para a hidrólise da ligação glicose (β -1,4) glicose. Esse k_{int} é semelhante a constantes catalíticas determinadas para as oligocelodextrinas (Tabela 09). Isso indica que complexos não produtivos praticamente não se formam (Hiromi, 1972).

O subsítio +2 tem uma maior afinidade por compostos hidrofóbicos do que por resíduos de glicose. No subsítio +1, a mesma situação deve ocorrer uma vez que os valores de k_{cat} para a hidrólise de celobiose e NP β Dglu são similares mas o K_m para celobiose é maior. Por outro lado o subsítio +3 tem maior afinidade por resíduos de glicose do que por resíduos de butileno (Figura 12 B).

Embora poucos dados estejam disponíveis a respeito de afinidades dos subsítios em glicosidases, essas costumam ser maiores nos subsítios -1 e +1 e próxima a zero ou negativa nos outros subsítios (Hrmova *et al.*, 1998, Marana *et al.*, 2001; Yazaki *et al.*, 1997). Para

endoglucanases, valores negativos são encontrados para pelo menos um dos subsítios adjacentes à ligação a ser clivada pelo substrato. Esse valor negativo pode ser resultado de alterações na conformação da glicose durante a sua ligação ao subsítio -1. Aparentemente, quando o resíduo de glicose que se liga ao subsítio -1 está na extremidade redutora do substrato ele pode acomodar-se melhor ao subsítio -1 do que um resíduo que se encontra no interior da cadeia, embora ambos devam sofrer mudanças conformacionais durante a catálise.

Embora a β -Glicosidase 3 seja capaz de hidrolisar laminarina e nesse aspecto seja semelhante a exoglucanases, o alinhamento de sua seqüência de aminoácidos com outras proteínas mostra que ela é similar à enzimas da família 1 das glicosídeo hidrolases. Não se sabe se as várias β -glicosidases já descritas na literatura são realmente incapazes de hidrolisar moléculas poliméricas, uma vez que esses substratos não são usualmente empregados para a detecção de atividade de β -glicosidase.

A energia de ligação para grupos metileno ($\Delta\Delta G^\circ/\text{resíduo de CH}_2$) é útil para comparar as regiões de ligação do aglicone em várias β -glicosidases. A β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* ($\Delta\Delta G^\circ/\text{CH}_2 = -0,97 \text{ kJ/mol}$) apresenta o sítio de ligação ao aglicone menos hidrofóbico que o de uma das β -glicosidases digestivas de *Spodoptera frugiperda* ($\Delta\Delta G^\circ/\text{CH}_2 = -1,3 \text{ kJ/mol}$; Marana *et al.*, 2001), que a glucocerebrosidase lisossômica de mamífero ($\Delta\Delta G^\circ/\text{CH}_2 = -1,9 \text{ kJ/mol}$; Gopalan *et al.*, 1989) e do que a β -glicosidase citossólica de mamíferos ($\Delta\Delta G^\circ/\text{CH}_2 = -3,0 \text{ kJ/mol}$; Gopalan *et al.*, 1989). A enzima citossólica tem o mais hidrofóbico dos subsítios de ligação ao aglicone, mas não é capaz de hidrolisar glicocerebrosídeos. É possível que a clivagem de glicocerebrosídeos dependa de um subsítio para a ligação do aglicone grande, como o que está presente na glucocerebrosidase (Figura 25; Gopalan *et al.*, 1989).

A inibição pelo substrato pode ser causada pela ligação do substrato a um sítio diferente do sítio ativo ou pela ligação do substrato ao subsítio do aglicone na forma glicosídeo enzima, que é um intermediário na clivagem da ligação glicosídica (Laidler & Bunting, 1973). A última ocorre quando a desglicosilação é o passo limitante da reação, uma vez que é nessa condição que o subsítio do aglicone fica disponível. A inibição por substrato pode também ser um artefato causado pela reação de produtos da ação da enzima com moléculas do próprio substrato. Isso parece ser o que ocorre com a β -Glicosidase 3, que é inibida por amigdalina em altas concentrações (K_i de 210 mM). Levando em consideração que a inibição por substrato é freqüentemente encontrada em glicosidases e que esse tipo de enzima pode catalisar reações de transglicosilação, é possível que a inibição pelo substrato observada para a β -Glicosidase 3

durante clivagem de amigdalina seja um artefato causado pela reação da glicose produzida pela enzima com o substrato, gerando um glicosídeo maior. De acordo com essa hipótese está o fato de termos verificado que a β -Glicosidase 3 catalisa a reação de transglicosilação nas condições em que se observa a inibição pelo substrato.

4.06 Análise da sequência das β -Glicosidases 3a e 3b

A seleção de clones reconhecidos pelo anticorpo específico para as β -Glicosidases 3, a partir da biblioteca de cDNA feita com mRNA extraído do tubo digestivo de *Tenebrio molitor*, permitiu a obtenção de dois clones contendo o cDNA para essas enzimas. Um deles continha toda a sequência da β -glicosidase madura e no outro a região N-terminal estava truncada. As β -glicosidases codificadas por esses dois cDNAs diferem em apenas quatro aminoácidos, sendo que nenhum deles se encontra em regiões conservadas entre as diversas glicosidases da família 1. Supomos que talvez um deles codifique a β -Glicosidase 3a e o outro a β -Glicosidase 3b.

Os resultados indicam que são improváveis a obtenção de todo o peptídeo sinal e o códon de iniciação para a tradução da β -glicosidase 3 a partir da biblioteca de cDNA disponível. Isso porque uma amostra da biblioteca de cDNA contendo cerca de 400 clones foi usada em uma reação de amplificação da região 5' desse cDNA e, mesmo assim, não foi possível obter a região 5' completa. Esse resultado sugere que a extremidade 5' não está representada na biblioteca de cDNA. Entretanto a sequência completa do cDNA que codifica a enzima madura foi obtida. Essa sequência foi usada para a procura de similaridade em banco de dados. O resultado mostrou uma similaridade muito grande com outras β -glicosidases pertencentes à família 1 das glicosídeo hidrolases. Essa similaridade foi observada para β -glicosidases de diversas fontes, desde β -glicosidases de insetos até de bactérias. A maior similaridade foi obtida para a β -glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (45 % de identidade e 63 % de similaridade), seguida da lactase-florizina hidrolase de mamíferos (46 % de identidade e 62 % de similaridade para a LPH de coelho) e, finalmente, β -glicosidases de plantas.

Uma vez que a estrutura terciária é mais conservada do que a primária (Chothia & Lesk, 1986) e as famílias das glicosídeo hidrolases são agrupadas com base na similaridade de sequência de aminoácidos, podemos dizer que as glicosídeo hidrolases dentro de uma mesma família compartilham a mesma estrutura terciária (Henrissat & Romeu, 1995). Uma vez que o alinhamento da sequência da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* mostrou similaridade com

proteínas da família 1 das glicosídeo hidrolases, essa enzima deve apresentar um dobramento de $(\beta/\alpha)_8$ barril, que é característico dessa família (Jenkins *et al.*, 1995).

A estrutura da β -Glicosidase 3 e a função dos aminoácidos altamente conservados de *Tenebrio molitor* podem ser preditas através de um alinhamento com proteínas pertencentes à família 1 de glicosídeo hidrolases cuja estrutura terciária já foi elucidada (β -glucosidase A de *Bacillus polymyxa* por Sanz-Aparicio *et al.*, 1998; 6-fosfo- β -galactosidase de *Lactococcus lactis* por Wiesmann *et al.*, 1997, mirosinase de *Sinapis alba* por Burmeister *et al.*, 1997; β -glucosidase termoestável de *Sulfolobus solfataricus* por Aguillar *et al.*, 1997; β -glucosidase cianogênica de *Trifolium repens* por Barrett *et al.*, 1995). Este alinhamento mostrou que muito dos aminoácidos conservados entre a β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* e β -glicosidasas da família 1 estão envolvidos na formação do sítio ativo e estão ligados diretamente ao reconhecimento do substrato e clivagem da ligação glicosídica.

A Figura 36 mostra um esquema de como seria constituído o sítio ativo da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* e a importância de cada resíduo na interação com o substrato, baseado no alinhamento da sequência dessa enzima com a sequência da mirosinase de *Sinapis alba*.

Figura 36 - Diagrama esquemático dos resíduos de aminoácidos da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* responsáveis pelo reconhecimento do anel da glicose no intermediário glucosil-enzima no sítio ativo da enzima. As linhas pontilhadas mostram as pontes de hidrogênio. Essa figura foi adaptada dos dados apresentados para a mirosinase de *Sinapis alba* (Burmeister *et al.*, 1997) e obtida através de um alinhamento da sequência dessa enzima com a da β -glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*.

As mirosinases são S-glicosidases encontradas em alguns grupos de plantas e são responsáveis pela clivagem de β -tioglucosídeos que parecem estar envolvidos no mecanismo de defesa dessas plantas contra a predação por animais herbívoros (McDanel *et al.*, 1988). Essa enzima apresenta alta similaridade com diversas O-glicosidases e acredita-se que ela tenha evoluído a partir de O-glicosidases, retendo muitas das características observadas nessas enzimas. A única alteração marcante nos resíduos envolvidos na catálise de mirosinases e O-glicosidases é a substituição do resíduo de ácido glutâmico, responsável pela catálise ácida em O-glicosidases, por uma glutamina (Henrissat *et al.*, 1995; Wang & Withers, 1995). Nas mirosinases não há um resíduo ácido que realize a assistência de protonação ao substrato. A ausência desse resíduo deve-se ao fato dos aglicones dos glucosinolatos serem ótimos grupos deixantes (apresentando baixos valores de pK_a) e, desse modo, catálise ácida é desnecessária (Burmeister *et al.*, 1997).

Entre os diversos resíduos conservados encontramos os N₁₆₈E₁₆₉ e T₃₇₈ENG₃₈₁. Esses dois grupos de aminoácidos contêm os resíduos de ácido glutâmico catalíticos (Wacker *et al.*, 1992), onde o E₁₆₉ é o doador de prótons e o E₃₇₉ é o nucleófilo. Uma evidência direta da participação do E₃₇₉ como nucleófilo durante a catálise enzimática foi obtido através de dados cristalográficos para a mirosinase de *Sinapis alba*. Foi mostrado que esse resíduo de ácido glutâmico forma uma ligação covalente com o oxigênio do carbono 1 da glicose no intermediário glicosil-enzima (Burmeister *et al.*, 1997).

Dados estruturais mostram que o resíduo de ácido glutâmico responsável pela catálise ácida (E₁₆₉) se encontra dentro de uma cavidade hidrofóbica, o que eleva o pK_a desse grupo, mantendo-o protonado na faixa ótima de atividade da enzima (Barrett *et al.*, 1995). Dados obtidos sobre a estrutura tridimensional para a β -glucosidase cianogênica de *Trifolium repens* mostram que as cadeias laterais do E₁₆₉ e E₃₇₉ estão separadas por uma distância de aproximadamente 5 Å (Barret *et al.*, 1995). Esses resíduos estão posicionados a uma distância similar do carbono anomérico do monossacarídeo do glicone, onde os grupos carboxila da cadeia lateral desses aminoácidos estão com orientações opostas. Devido a essa orientação, somente o E₃₇₉ tem o seu grupo carboxila apontado para o carbono 1 do monossacarídeo do glicone em uma posição consistente com um papel que envolva um ataque nucleofílico (Sanz-Aparicio *et al.*, 1998). Esse dado é coerente com o mecanismo de catálise que envolve a retenção da configuração do carbono anomérico (Jenkins *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995), característico das β -glicosidases da família 1 das glicosídeo hidrolases (Coutinho & Henrissat, 2000).

Na enzima livre, o ambiente em que se encontra o E₃₇₉ é constituído basicamente de resíduos polares. Um dos átomos de oxigênio presentes no grupo carboxila da cadeia lateral do nucleófilo E₃₇₉ faz uma ponte salina com a R₇₉ e o outro átomo de oxigênio faz ponte de hidrogênio com a Y₃₁₂ e com uma molécula de água (Burmeister *et al.*, 1997; Sanz-Aparicio *et al.*, 1998). Essas pontes de hidrogênio diminuem o pK_a do E₃₇₉, assegurando que esses fiquem desprotonados e prontos para agir como um nucleófilo (Barret *et al.*, 1995). Com a formação da ligação covalente entre o E₃₇₉ e o carbono 1 do monossacarídeo na forma glicosil-enzima, a ponte salina entre a R₇₉ e o nucleófilo é desfeita o que leva a uma alteração da posição da cadeia lateral desse primeiro aminoácido. Nessa nova posição a cadeia lateral da R₇₉ passa a ficar mergulhada em um ambiente hidrofóbico dentro da estrutura da β -glicosidase. A presença de uma carga em um ambiente hidrofóbico seria importante para desestabilizar o intermediário glicosil-enzima (Burmeister *et al.*, 1997).

Além da função do Y₃₁₂ na estabilização da forma ionizada do nucleófilo, tem sido proposta também função para esse resíduo durante a catálise enzimática (Wang *et al.*, 1995), contudo essa ainda é controversa. Como mostrado para a mirosinase de *Sinapis alba* a cadeia lateral desse resíduo apresenta a sua hidroxila direcionada para o oxigênio do carbono 5 do anel da glicose no intermediário glicosil-enzima (Burmeister *et al.*, 1997). Segundo Sanz-Aparicio *et al.* (1998), esse resíduo poderia estar envolvido na estabilização de espécies de oxycarbônium. Contudo, Burmeister *et al.* (1997) acreditam que esse resíduo tenha mais um papel estrutural na formação do sítio ativo.

Tem sido proposto também que o nucleófilo (E₃₇₉) seria capaz de fazer uma ponte de hidrogênio com a hidroxila do carbono 2 do monossacarídeo do glicone (Sanz-Aparicio *et al.*, 1998). Interações com a hidroxila do carbono 2 têm sido consideradas como de muita importância para a ligação da enzima ao substrato e/ou estabilização do estado de transição (Barrett *et al.*, 1995). Para a mirosinase de *Sinapis alba* tem sido proposto que o resíduo N₁₆₈ que interagiria com a hidroxila do carbono 2 (Burmeister *et al.*, 1997).

Diversos outros aminoácidos parecem apresentar uma função importante no reconhecimento do substrato na β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*. O resíduo H₁₂₄, segundo Burmeister *et al.* (1997), interagiria com a hidroxila do carbono 3. Já para a β -glicosidase de *Bacillus polymyxa* tem sido proposto que esse aminoácido faria ponte de hidrogênio com o carbono 2 (Sanz-Aparicio *et al.*, 1998). Segundo Sanz-Aparicio *et al.* (1998) o W₄₂₉ faria pontes de hidrogênio com o carbono 3 do monossacarídeo do glicone. Contudo, ou essa ponte de

hidrogênio desempenha uma função restrita ou mesmo não existe uma vez que em mirosinases esse resíduo é substituído por uma fenilalanina. Na mirosinase de *Sinapis alba*, esse o resíduo de fenilalanina parece estar envolvido com interações de van der Waals com o monossacarídeo do glicone (Burmeister *et al.*, 1997).

O resíduo E₄₂₈ interagiria com a hidroxila do carbono 4 e 6 e o resíduo Q₂₁ interagiria com a hidroxila do carbono 3 e 4 do glicone do substrato. Essas pontes de hidrogênio duplas entre as hidroxilas do carbono 3 e 4 e entre os carbonos 4 e 6 parecem ser altamente conservadas entre as β -glicosidases da família 1. Como mostrado por Vyas (1991), esse tipo de ponte de hidrogênio pode ocorrer para hidroxilas adjacentes estando as duas na posição equatorial ou uma na posição axial e outra na equatorial. Dessa forma, como demonstrado cineticamente, essa enzima seria capaz de acomodar substratos derivados tanto da glicose como da galactose e, para que as pontes de hidrogênio sejam mantidas basta ocorrer pequenas alterações no posicionamento da cadeia lateral dos resíduos de glutamina e ácido glutâmico.

Já outros aminoácidos conservados estão mais envolvidos na formação do bolso do sítio ativo. Entre eles temos o W₄₂₁ da β -Glicosidase 3 que serviria como plataforma hidrofóbica para o anel do monossacarídeo do glicone (subsítio -1). Como mostrado para a β -glicosidase cianogênica de *Trifolium repens* (Barret *et al.*, 1995) e a 6-fosfo- β -galactosidase de *Lactococcus lactis* (Wiesmann *et al.*, 1997), o W₄₂₁ da plataforma hidrofóbica faz uma ligação peptídica do tipo *cis* com um resíduo de serina. Esse tipo de ligação peptídica é raramente encontrado em proteínas e parece estar envolvida em um posicionamento rígido da cadeia lateral do W₄₂₁ para formar a plataforma sobre a qual se posiciona o anel da molécula do monossacarídeo do glicone. Já o W₁₂₅ da β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor*, está em uma posição que tem sido proposta como a do resíduo que serviria como plataforma hidrofóbica do subsítio +1. Esse resíduo é que faria as interações de van der Waals com o aglicone dos glucosinolatos que se ligam ao sítio ativo das mirosinases (Burmeister *et al.*, 1997). O F₄₂₇ também é um resíduo conservado encontrado na β -Glicosidase 3 de *Tenebrio molitor* e que, como mostrado para a β -glicosidase de *Sinapis alba*, estaria envolvido na formação do bolso do sítio ativo (Burmeister *et al.*, 1997).

Pretendemos no futuro clonar as outras β -glicosidase de *Tenebrio molitor*. Entre essas, especialmente interessante é a clonagem da β -Glicosidase 2, pois ela tem uma especificidade quase que restrita para a clivagem de galactosídeos e análises preliminares em banco de dados tem sugerido que sua sequência parcial já obtida, apresenta similaridade com uma β -galactosidase

pertencente à família 2 das glicosídeo hidrolases. Também seria interessante obter a sequência para verificar a existência dos dois sítios ativos sugeridos pelos experimentos cinéticos.

4.07 Secreção das β -Glicosidases 3a e 3b

Os dados de imunocitocalização serão referidos à β -Glicosidase 3 uma vez que o anticorpo usado nessa técnica é capaz de reconhecer tanto a β -Glicosidase 3a quanto a β -Glicosidase 3b.

A β -Glicosidase 3 é encontrada na região anterior em vesículas grandes que se originam na região do complexo de Golgi e parecem ser liberadas com o citoplasma apical desorganizado em uma secreção do tipo apócrina. Essas mesmas vesículas são as grandes responsáveis pela secreção de amilase nesse animal (Cristofolletti *et al.*, 2001), mas tem papel insignificante na secreção da β -Glicosidase 3. Essa enzima é secretada de um modo significativo pelas pequenas vesículas que se encontram na região posterior do intestino médio. Essas vesículas devem ser responsáveis por uma secreção exocítica padrão.

Embora a β -Glicosidase 3 seja secretada na região posterior do ventrículo, é na região anterior do conteúdo luminal do intestino médio que elas podem atuar, devido ao seu pH ótimo e o pH encontrado nessa região. Na verdade elas são encontradas somente na região anterior (Figura 34). Como os ensaios foram feitos no pH ótimo das enzimas, caso elas estivesse na região posterior elas seriam detectadas.

O mais interessante é que o fato de ter sido observado que as β -Glicosidases 3a e 3b são produzidas na região posterior mas são encontradas na região anterior do ventrículo é mais uma evidência da ocorrência da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas nesse animal (Terra *et al.*, 1979). Segundo esse modelo, as β -Glicosidases 3a e 3b secretadas por exocitose pelas células do conteúdo posterior seriam levadas para a região anterior do ventrículo por um fluxo de líquido gerado pela secreção de água no ventrículo posterior e sua absorção no ventrículo anterior. Na região anterior do intestino médio a β -Glicosidases 3a e 3b teria uma tendência a ficar retida no espaço endoperitrófico enquanto ligada ao seu substrato. Visto que a β -Glicosidase 3 é capaz de hidrolisar oligocelodextrinas e até mesmo polissacarídeos, o complexo enzima/substrato só passaria pelos poros dessa membrana quando o tamanho do substrato fosse bastante reduzido. Quando isso acontece, pequenas oligodextrinas e a β -Glicosidase 3 voltariam ao espaço ectoperitrófico.

O fato da β -Glicosidase 3 ser secretada na região posterior do intestino médio, embora seja ativa somente na região anterior, talvez seja para evitar uma secreção exocítica em uma região secretora de água com pH é a anterior. Por essa razão, provavelmente, a secreção de amilase na região anterior do ventrículo de *Tenebrio molitor* é feita de modo apócrino e não exocítico. Uma vez que a secreção apócrina leva a célula a um dispêndio muito maior de energia, surge a pergunta de porque a amilase não é secretada do mesmo modo que as β -Glicosidases 3a e 3b uma vez que, como elas, sua ação se dá na região anterior do intestino médio que possui o seu pH compatível com o pH em que essas enzimas são ativas. Talvez a explicação seria o fato da amilase ser uma despolimerase, uma das primeiras enzimas a agir sobre o alimento, o que não acontece com as β -Glicosidases 3a e 3b, que tem sua principal ação na digestão intermediária e final de produtos gerados por celulasas e hemicelulasas. Se a amilase fosse secretada na região posterior do ventrículo, ela poderia ser rapidamente retida pelo alimento presente no interior da membrana peritrófica enquanto estivesse sendo levada para a região anterior do intestino médio pela circulação endo-ectoperitrófica. Desse modo, pouco amido poderia ser digerido, uma vez que na região posterior a amilase seria pouco ativa devido ao pH . A secreção de amilase na região anterior assegura que a digestão de amido inicia-se assim que o alimento alcança o intestino médio.

4.08 Papel das β -glicosidases digestivas de *Tenebrio molitor*

A função das β -Glicosidases 3a e 3b envolve a digestão de di- e, principalmente, oligossacarídeos derivados sobretudo das hemiceluloses e também da celulose. Polímeros de hemiceluloses tem resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas β 1-4, β 1-6 e β 1-3, que podem ser hidrolisados por essas enzimas. A hidrólise de hemiceluloses parece ser amplamente distribuída entre os insetos (Terra & Ferrera, 1994) e a presença de enzimas que atuam sobre celulose tem sido atestadas em alguns insetos em nosso laboratório (dados não publicados).

A β -Glicosidase 1 tem uma função bastante semelhante à da β -Glicosidase 3, com pequenas variações. A β -Glicosidase 1 pode hidrolisar ligações β 1-3 e β 1-4 com uma eficiência muito semelhante, o que lhe permitiria clivar oligossacarídeos derivados de celulose (β 1-4) quase tão bem quanto os derivados de hemiceluloses, que tem ligação β 1-3. A β -Glicosidase 3 teria preferência marcante para ligações do tipo β 1-3.

Além disso, a β -Glicosidase 1 hidrolisa dissacarídeos (em relação a oligossacarídeos) de uma maneira mais eficiente que a β -Glicosidase 3 (comparar k_{cat}/K_m de celobiose e

oligocelodextrinas para a β -Glicosidases 1 e 3; Tabelas 03 e 09, respectivamente). Desse modo, a digestão de oligossacarídeos deve ser iniciada pela β -Glicosidase 3 e a digestão de dissacarídeos feita principalmente pela β -Glicosidase 1.

O fato do sítio ativo da β -Glicosidase 3 ser menos hidrofóbico do que o sítio ativo de outras β -glicosidases já descritas na literatura (ver resultados), indica que a β -Glicosidase 3 é mais adaptada para hidrolisar di- e oligossacarídeos do que glicolipídeos (como é o caso da glicocecrebrosidase de mamíferos). Devido a essas diferenças no sítio ativo, glicosídeos de plantas tais como amigdalina são substratos pouco clivados pela β -Glicosidase 3 quando comparado a oligossacarídeos (Tabela 09). Essas mesmas observações devem ser válidas para a β -Glicosidase 1, uma vez que ela tem a atividade sobre amigdalina, comparada aos oligossacarídeos, ainda mais baixa do apresentado pela β -Glicosidase 3 (Tabela 03). Nas duas β -glicosidases isoladas de *Spodoptera frugiperda*, amigdalina é mais hidrolisada que oligossacarídeos (Marana *et al.*, 2000; Marana *et al.*, 2001).

A β -Glicosidase 2 é, na verdade, uma β -galactosidase, pois somente galactosídeos são hidrolisados eficientemente por ela. A pouca clivagem de lactose e a alta eficiência de hidrólise sobre compostos hidrofóbicos nos levam a supor que ela teria como papel fisiológico a clivagem de galactolipídeos. Essas substâncias são amplamente distribuídas em folhas de plantas e ocorrem em outros tecidos vegetais. Os compostos encontrados aí são 2,3 diacil 1 β -D-galactopiranosil D-glicerol (monogalactosil diglicerídeo) ou 2,3 diacil 1 (α -D-galactopiranosil (1,6)- β -D-galactopiranosil)-D-glicerol (digalactosil diglicerídeo) (Harwood, 1980). A enzima poderia agir diretamente na primeira substância e, na segunda, removeria a galactose do digalactosil diglicerídeo após a ação de uma α -galactosidase. α -Galactosidase com característica que sugerem um papel na clivagem de digalactosil diglicerídeo já foi descrita em *Tenebrio molitor* (Grossmann & Terra, 2001)

Seria interessante comparar em detalhe a estrutura do sítio ativo dessas β -glicosidases entre si e com outras de especificidade contrastante, para entender quais as mudanças estruturais levam a diferenças em especificidade. Trabalhos em desenvolvimento no nosso laboratório com outros dois insetos, além dos dados apresentados aqui, supostamente permitirão no futuro uma discussão sobre os princípios que levam às diferenças em especificidade das β -glicosidases de insetos.

5 Referências bibliográficas

- Aguilar, C.F., Sanderson, I., Moracci, M., Ciaramella, M., Nucci, R., Rossi, M. & Peral, L.H. (1997) Crystal structure of the β -glucosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: Resilience as a key factor in thermostability. *J. Molec. Biol.* 271(5), 789-802.
- Alstad, D.N. & Andow, D.A. (1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268, 1894-1896.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment serrate tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Andrews, A.T. (1995) *Electrophoresis – theory, techniques and biochemical and clinical applications*. 2 Ed., Clarendon Press, Oxford, pp. 454.
- Aumüller, G., Wilhelm, B. & Seitz, J. (1999) Apocrine secretion – fact or artifact? *Annals of Anatomy* 181, 437-446.
- Bairoch, A. (1999) Classification of glycosyl hydrolase families and index of glycosyl hydrolase entries in SWISS-PROT in <http://expasy.hcuge.ch/cgi-bin/lists?glycosid.txt>, Release 37.0 (May).
- Baker, J.E. & Woo, S.M. (1992) β -glucosidases in the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: purification, properties and activity levels in wheat-and legume-feeding strains. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22, 499-504.
- Baker, J.E., Woo, S.M. & Byrd, R.V. (1984) Ultrastructure of the gut of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) with notes on distribution of proteinases and amylases in crop and midgut. *Can. J. Zool.* 62, 1251-1259.
- Barnes, R.D. & Rupert, E.E. (1996) *Zoologia dos invertebrados*. 6 Ed., Roca, São Paulo. Pp1029.
- Barrett, T., Surexh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J. & Huges, M.A. (1995) The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3, 951-960.
- Bassu, A. & Glew, R.H. (1984) Characterization of the phospholipid requirement of a rat liver β -glucosidase. *Biochem. J.* 224, 515-524.
- Bauer, L.S. (1995) Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomol.* 78, 414-443.
- Bayon, C. (1981) Ultrastructure de l'épithélium intestinal et flore pariétale chez la larve xylophage d'*Oryctes nasicornis* L. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 10, 359-371.
- Berdan, R.C., Lees-Miller, J.P. & Caveney, S. (1985) Lack of cell communication in an epithelium: ultrastructure and electrophysiology of the midgut epithelium of the larval mealworm, *Tenebrio molitor*. *J. Ultrast. Res.* 90, 55-70.

- Blum H., Beier, H. & Gross, H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*. 8, 93-99.
- Bradford, M.M. (1966) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Iori, R., Palmieri, S. & Henrissat, B. (1997) The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5(5), 663-675.
- Cioffi, M. (1979) The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tiss. Cell* 11, 467-479.
- Chapman, R.F. (1985) Structure of the digestive system. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds.). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol 4. Pergamon Press, New York, pp. 165-211.
- Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (2000) Carbohydrate active enzymes server. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/>
- Chothia, C. & Lesk, A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and the structure in proteins. *EMBO J.* 5, 823-826.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F. & Terra W.R. (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47, 143-155.
- Dahlqvist, A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 22, 99-107.
- Dan, A., Ito, Y. & Ogawa, T. (1995) A convergent and stereocontrolled synthetic route to the core pentasaccharide structure of asparagine-linked glycoproteins. *J. Org. Chem.* 60(15), 4680-4681.
- Davies, G.J., Wilson, K.S. & Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, 557-559.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995) Structure and mechanism of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.
- Davis, B.J. (1964) Disc. electrophoresis-II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Dinur, T., Grabowski G.A., Desnick R.J. & Gatt S. (1984) Synthesis of a fluorescent derivative of glucose ceramide for the sensitive determination of glucocerebrosidase activity. *Anal. Biochem.* 136, 223-234.
- Espinoza-Fuentes, F.P, Ribeiro, A.F. & Terra, W.R. (1987) Microvillar and secreted digestive enzymes from *Musca domestica* larvae. Subcellular fractionation of midgut cells with electron microscopy monitoring. *Insect Biochem.* 17, 819-827.
- Farber, G.K. & Petsko, G.A. (1990) The evolution of α/β barrel enzymes. *TIBS*. 15, 228-234.

- Ferreira, C. & Terra, W.R. (1983) Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound β -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana* larvae). *Biochem. J.* 213, 43-51.
- Ferreira, C. & Terra, W.R. (1986) Substrate specificity and binding loci for inhibitors in an aminopeptidase purified from the plasma membrane of midgut cells of an insect *Rhynchosciara americana* larva. *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 478-485.
- Ferreira, C., Bellinello, G.L., Ribeiro, A.F. & Terra, W.R. (1990) Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect. Biochem.* 20, 839-847.
- Ferreira, C., Parra, J.R.P. & Terra, W.R. (1997) The effect of dietary plant glycosides on larval midgut β -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 55-59.
- Ferreira, C., Torres, B.B. & Terra, W.R. (1998) Substrate specificities of midgut β -glucosidases from insects of different orders. *Comp. Biochem. Physiol.* 199, 219-225.
- Freund, J.N., Gossé, F. & Raul, F. (1991) Derivatives of plant beta-glucans are hydrolyzed by intestinal lactose-phlorizin hydrolase of mammals. *Enzyme*, 71-74.
- Gabrowiski, G.A., Gatt, S., Kruse, J.G. & Desnick, R.J. (1984). Human lysosomal β -glucosidase: Kinetic characterization of the catalytic and hydrophobic binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 144-157.
- Gopalan, V., Pastuszyn, A., Galey Jr., W.R. & Glew, R.H. (1992) Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 267, 14027-14032.
- Gopalan, V., Daniels, L.B., Glew, R.H. & Claeysens, M. (1989) Kinetic analysis of the interaction of alkylglycosides with two human β -glycosidases. *Biochem. J.* 262, 541-548.
- Graf, R., Raikhel, A.S., Brown, M.R., Lea, A.O. & Briegel, H. (1986) Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell Tiss. Res.* 245, 19-27.
- Grossmann, G.A. & Terra, W.R. (2001) Alfa-Galactosidases from the larva midgut of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 109-122.
- Harvey, W.R., Cioffi, M. & Wolfersberger, M.G. (1983). Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. *Am. J. Physiol.* 244, 163-175.
- Harwood, J.L. (1980) Plant acyl lipids. Structure, distribution and analysis. In: Stumpf P.K. (Ed.) *Biochemistry of plants: A Comprehensive treatise Vol 4. Lipids: Structure and Function*. Academic Press, New York, pp. 1-56.
- Heinrich, D. & Zebe, E. (1973). Zur Feinstruktur der Mitteldarmzellen von *Locusta migratoria* in verschiedenen Phasen der Verdauung. *Cytobiologie* 7, 315-326.

- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases bases on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P. & Davies, G. (1995) Conserved catalytic machinery and the prediction of common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7090-7094.
- Henrissat, B. & Romeu, A. (1995) Families, superfamilies and subfamilies of glucosyl hydrolase. *Biochem. J.* 311, 350-351.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-bases classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316, 395-396.
- Henrissat, B. & Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637-644.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. & Boulter, D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330, 160-163.
- Hiromi, K. (1972) Subsite affinities and action pattern of amylases. In: Funatsu, M. (Ed.) *Proteins: structure and function*. Halster, New York, 2v.
- Hiromi, K., Nitta, Y., Numata, C. & Ono, S. (1973) Subsite affinities of glucoamylases: examination of the validity of the subsite theory. *Biochim. Biophys. Acta* 302, 362-375.
- Hrmova, M., MacGregor, E.A., Biely, P., Stewart, R.J. & Fincher, G.B. (1998). Substrate binding and catalytic mechanism of a Barley, β -D-glucosidase/(1-4)- β -D-glucan exohydrolase. *J. Biol. Chem.* 272(18), 11134-11143.
- Jenkins, J., Leggio, L.L., Harris, G. & Pickersgill, R. (1995) β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulase, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily with 8-fold β /K architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. *FEBS Letters* 362, 281-285.
- Jouanin, L., Bonade-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. & Giband, M. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 131(1), 1-11.
- Jordão, B.P., Terra, W.R., Ferreira, C. (1995) Chemistry of microvillar membranes purified from brush borders isolated from the larval midgut from one Coleoptera and two Diptera species. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 417-426.
- Jordão, B.P., Lehane, M.J., Terra, W.R., Ribeiro, A.F. & Ferreira, C.F. (1996b). An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 445-453.
- Jordão, B.P., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Lehane, M.J. & Ferreira, C. (1996a). Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 337-346.

- Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F. & Ferreira, C. (1999). Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* 45, 29–37.
- Koefoed, B.M. (1987) The ability of an epithelium to survive removal of the basal lamina by enzymes: fine structure and content of sodium and potassium of the midgut epithelium of the larva of *Tenebrio molitor* after withdrawal of the basal lamina by elastase - a short note. *Tiss. Cell* 19, 65–70.
- Koefoed, B.M. & Zerahn, K. (1982) Transport of sodium and potassium across the isolated midgut of the larvae of *Tenebrio molitor* related to the fine structure of the epithelium. *J. Exp. Biol.* 98, 459–463.
- La Marco, K.L. & Glew, R.H. (1986) Hydrolysis of a naturally occurring β -glucoside by a broad-specificity β -glucosidase from liver. *Biochem. J.* 237, 469–476.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₇. *Nature* 227, 680–685.
- Laidler, K.J. & Bunting, P.S. (1973) *The chemical kinetics of enzyme action*. 2 Ed., Clarendon Press, Oxford.
- Lawson S.L., Wakarchuk, W.W. & Withers, S.G. (1997) Positioning the acid/base catalyst in a glycosidase: studies with *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* 36, 2257–2265.
- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R. (1991a) Properties and intracellular distribution of a cathepsin D-like proteinase active at the acid region of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem.* 21, 457–465.
- Lemos, F.J.A. & Terra, W.R. (1991b) Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 265–268.
- Lindroth, R.L. (1988) Hydrolysis of phenolic glycosides by midgut beta-glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. *Insect Biochem.* 18, 789–792.
- Lindroth, R.L. & Hemmig, J.D.C. (1990) Response of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) to tremulacin, an aspen phenolic glycoside. *Environmental Entomology*. 19(4), 842–847.
- Manchenko, G. P. (1994) *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton: CRC Pres, p. 226.
- Mantei, N., Villa, M., Wacker, H., Boll, W., James, P., Hunziker, W. & Semenza, G. (1988) Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* 7(9), 2705–2713.
- Marana, S.R., Terra, W.R. & Ferreira, C. (1995) Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities, and function. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, 25, 835–843.
- Marana, S.R., Terra, W.R. & Ferreira C. (2000) Purification and properties of a β -glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 1139–1146.

- Marana, S.R., Jacobs-Lorena, M., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2001) Amino acids involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1545(1-2), 41-52.
- Martin, M.M. (1983) Cellulose digestion in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, 313-324
- Martin, R.G. & Ames, B.N. (1961) A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures *J. Biol. Chem.* 1., 236, 1372-1379.
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of protein electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, 262 (21), 10035-10038.
- McDanell, R., McLean, A.E.M., Hanley, A.B., Heaney, R.K. & Fenwick, G.R. (1988) Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review. *Food Chem. Toxicol.* 26, 59-70.
- McGaughhey, W.H. & Whalon, M.E. (1992) Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258, 1451-1455.
- Morgan, M.R.J. (1975) Relationship between gut cellobiase, lactase, aryl β -glucosidase, and aryl β -galactosidase activities of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 5, 609-617.
- Morton, R.E. & Evans, T.A. (1992). Modifications of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal. Biochem.* 204, 332-334.
- Nishiitsuji-Uwo, J. & Endo, Y. (1981) Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the endocrine cells in the cockroach midgut. *Biomed. Res.* 2, 30-44.
- Noelting, G. & Bernfeld, P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques III - La amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' -amylase. *Helv. Clin. Acta* 31, 286-290.
- Ogino, K., Edafujiwara H., Fujiwara H. & Ishikawa H. (1990) What causes the aphid 28S Ribosomal-RNA to lack the hidden break. *J. Mol. Evol.* 30(6), 509-513.
- Oestreicher, E.G. & Pinto G.F. (1983) Pocket computer program for fitting the Michaelis-Menten equation. *Computers Biol. Med.* 13, 309-315.
- Pócsi, I. & Kiss, L. (1989) Kinetic studies on the broad-specificity β -D-glucosidase from pig kidney. *Biochem. J.* 256, 139-146.
- Qi, X. & Grabowski, G.A. (1998) Acid β -glucosidase: Intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. *Biochemistry* 37, 11544-11554.
- Raes, H. & Verbeke, M. (1994) Light and electron microscopical study of two types of endocrine cell in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). *Tiss. Cell* 26, 223-230.
- Readon, D. & Farber, G.K. (1995) The structure and evolution of α/β barrel proteins. *The FASEB Journal* 9, 497-503.
- Ribeiro, A.F. Ferreira, C. & Terra, W.R. (1990) Morphological basis of insect digestion. In: Mellinger, J. (Ed). *Animal nutrition and transport processes Vol. I.* Karger, Basel, 96-105.

- Richards, O.W. & Davis, R.G. (1977) *Imm's General textbook of entomology*. 10 Ed., Chapman. London, 1.354 pp.
- Sambrook, J., Fristch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning – A laboratory manual*. 2 Ed., Sprig Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Santos, C.D., Ribeiro, A.F. & Terra, W.R. (1986). Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool.* 64, 490-500.
- Santos, C.D. & Terra, W.R. (1985) Physical properties substrate specificities and a probable mechanism for a β -D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of the cassava Hornworm (*Erinnyis ello*). *Biochim. Biophys. Acta* 831, 179-185.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martinez-Ripoll, M., Lequerica, J.L. & Polaina, J. (1998) Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymixa*: Insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolase. *J. Mol. Biol.* 275,491-502.
- Schmaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T. & Terra, W.R. (1993) Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie* 24, 3-17.
- Schuler, T.H., Poppy, G.M. Kerry R.B. & Denholm, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 6, 168-175.
- Scigelova, M., Singh, S. & Crout, D.H.G. (1999) Glycosidases – a great synthetic tool. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 6(5), 483-494.
- Segel, H.I. (1993) *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzymes systems*. John Wiley & Sons, INC, New York.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgings, T.J.V. & Chnspeels, M.J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean resistant to bruchid beetles. *Biotechnol.*, 12, 793-796.
- Silva, I. & Souza, V.B.V. (1981) Ultrastructural aspects of the anterior midgut of *Oncideres s. saga* (Dalman, 1823) larva (Coleoptera: Cerambycidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 25, 103–112.
- Skovbjerg, H., Sjostrom, H. & Norén, O.(1981) Purification and characterization of amphiphilic lactase-phlorizin hydrolase from human small intestine. *Eur. J. Biochem.* 114,653-661.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985) Measurements of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Stefanini, M., De Martino, C. & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216, 173-174.

- Stotz, H.U., Kroymann, J. & Mitchell-Olds, T. (1999). Plant-insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 268-272.
- Terra, W.R., Ferreira, C. and De Bianchi, A.G. (1978) Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochim. Biophys. Acta* 524, 131-141.
- Terra, W.R., Ferreira, C. & De Bianchi, A.G. (1979) Distribution of digestive enzyme among the endo- and ectoperitrophic space and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-494.
- Terra, W.R., Ferreira, C., & Bastos, F. (1985) Phylogenetic considerations of insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 15, 443-449.
- Terra, W.R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *A. Rev. Entomol.* 35, 181-200.
- Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra, W.R. & Cristofolletti, P.T. (1996) Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 725-730.
- Terra, W.R., Espinoza-Fuentes, F.P., Ribeiro, A.F. & Ferreira, C. (1988) The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. *J. Insect Physiol.* 34, 463-472.
- Timasheff, S.N. & Arakawa, T. (1990) Stabilization of protein structures by solvents, in Creighton, T.E. (Eds.). *Protein structure – a practical approach*. Oxford University Press, England, pp. 331-347.
- Towbin, H., Stehelin, T. & Gordon, J. (1979) Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Trumbo, P.R., Banks, M.A. & Gregory III, J.F. (1990) Hydrolysis of pyridoxine-5"- β -D-glucoside by a broad-specificity β -glucosidase from mammalian tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195, 240-246.
- Turunen, S. (1992) Efficient use of dietary galactose in *Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* 38, 503-509.
- Vaccaro, A.M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Barca, A. & Scerch, C. (1997) Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *J. Biol. Chem.* 272(4), 16862-16867.
- Van Beers, E.H., Buller, H.A., Grand, R.J., Einerhand, A.W.C. & Dekker, J. (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: Structure, function, and development. *Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.* 30, 197-262.

- Van Weely, S., Brandsma, M., Strijland, A., Tager, J.M. & Aerts, M.F.G. (1993) Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 55-62.
- Varic, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3(2), 97-130.
- Vic, G. & Crout, D.H.G. (1995) Synthesis of allyl and benzyl beta-D-glucopyranosides, and allyl beta-D-galactopyranoside from D-glucose or D-galactose and the corresponding alcohol using almond beta-D-glucosidase. *Carbohydr. Res.* 279, 315-319.
- Vic, G., Hastings, J.J. & Crout D.H.G. (1996) Glycosidase-catalyzed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: application to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl-(1-4)-O- α -galactopyranoside derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* 7(7), 1973-1984.
- Vic, G., Thomas, D. & Crout, D.H.G. (1997) Solvent effect on enzyme-catalyzed synthesis of β -D-glucosides using the reverse hydrolysis method: Application to the preparative-scale synthesis of 2-hydroxybenzyl and octyl β -D-glucopyranosides. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 597-603.
- Vyas, N.K. (1991) Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 732-740.
- Wacker, H., Keller, P., Salchetto, R., Legler, G. & Semenza, G. (1992) Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Comparison with sucrase-isomaltase and with other glycosidases, the membrane anchor of lactase-phlorizin hydrolase. *J. Biol. Chem.* 267, 18774-18752.
- Wang, Q. & Withers, S.G. (1995) Substrate-assisted catalysis in glycosidases. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10130-10138.
- White, A. & Rose, D.R. (1997) Mechanism of catalysis by retaining β -glycosyl hydrolase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 645-651.
- Whittaker, R.H. & Feeny, P.P. (1971) Allelochemicals: Chemical interaction between species. *Science* 117, 757-770.
- Wiesmann, C., Hengstenberg, W. & Schulz, G.E. (1997) Crystal structure and mechanism of 6-phospho- β -galactosidase from *Lactococcus lactis*. *J. Mol. Biol.* 269, 851-860.
- Wigglesworth, V.B. (1972) *The principles of insect physiology*. 7 Ed., Methuen, London.
- Yazaki, T., Ohnishi, M., Rokushika, S. & Okada, G. (1997) Subsite structure of the β -glucosidase from *Aspergillus niger*, evaluated by steady-state kinetics with cello-oligosaccharides as substrates. *Carbohydr. Res.* 298, 51-57.
- Yoon, J.-H. & Ajisaka, K. (1996) The synthesis of galactopyranosyl derivatives with β -galactosidases of different origins. *Carbohydr. Res.* 292, 153-163.
- Yu, S.J. (1989) β -Glucosidase in four phytophagous Lepidoptera. *Insect Biochem.* 19, 103-108.

- Zitnan, D., Saman, I., Sehnal, F. (1993). Peptidergic innervation and endocrine cells of insect midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22. 113-132.

6 Curriculum vitae

NOME: Alexandre Hamilton Pereira Ferreira

Data e local de nascimento: Belo Horizonte, 18 de setembro de 1973.

EDUCAÇÃO

Colégio Pio XII – Belo Horizonte, MG, 1981-1985

Colégio da Universidade Católica de Minas Gerais – Belo Horizonte, MG, 1986-1988

Colégio São Bento – Belo Horizonte, MG, 1989-1990

Colégio Santo Agostinho – Belo Horizonte, MG, 1991

Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Bacharelado em Ciências Biológicas – Belo Horizonte, MG, 1992-1995

OCUPAÇÃO

Bolsista: CNPq, março de 1996 a outubro de 1997; FAPESP, novembro de 1997 até o presente momento.

PUBLICAÇÕES

Ferreira, A.H.P., Terra, W.R., Marana, S.R. & Ferreira, C. (2001) Purification sequencing, and properties of a β -glycosidase from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (no prelo).