UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização da trealase solúvel de *Spodoptera*
frugiperda (Lepidoptera)**

MARIA CICERA PEREIRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DRA. CLÉLIA FERREIRA

ORIENTADORA

SÃO PAULO
2003

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Maria Cicera Pereira da
S586c Caracterização da trealase solúvel de *Spodoptera*
frugiperda (Lepidoptera) / Maria Cicera Pereira da
Silva. -- São Paulo, 2003.
73p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Ferreira, Clélia

1. Enzimologia 2. Enzima : Cinética : Bioquímica
I. T. II. Ferreira, Clélia, orientador.

574.1925 CDD

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005348

“Caracterização da Trealase Solúvel de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)”

**MARIA CICERA PEREIRA DA
SILVA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

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

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ – USP

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

SÃO PAULO
25 DE FEVEREIRO 2003.

*Aos meus pais Cicero
e Lindaura e ao meu marido
Edmilson pela
atenção e carinho.*

AGRADECIMENTOS

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

À Dra. Clélia Ferreira pela orientação, sempre tão cuidadosa, e pela tão valiosa amizade durante o meu mestrado.

Ao Dr. Walter Terra pelas discussões e amizade

Aos colegas de Laboratório: Adriana Rios Lopes, Alcides Batista Júnior, Ana Guilhema Gomes Duran, Alexandra Frealdo Dumont, Dr. Alexandre Hamilton P. Ferreira, Daniela Tatiane Soltys, Érica Hotz Almeida, Fernando Ariel Genta, Lucas Blanes, Lucas Guerra, Dr. Pedro Jorge Chimoy, Dr. Plínio Tadeu Cristofolletti, Renata Bolognesi, Dr. Sandro Roberto Marana pelas festas, discussões e amizade; e principalmente por tornar o ambiente de trabalho tão divertido.

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

Às minhas queridas amigas Hell, Lia, Cakes, Amandita e Fernanda pelos longos almoços.

À FAPESP pela bolsa concedida.

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

RESUMO

No epitélio do intestino médio de *S. frugiperda* encontra-se 90% da atividade de trealase solúvel.

A trealase solúvel foi purificada até a homogeneidade por uma série de passos cromatográficos.

A enzima possui um sítio hidrofóbico adjacente ao sítio ativo. Mudanças conformacionais aparentemente ocorrem quando metil- α -glicosídeo liga-se ao sítio ativo.

A trealase solúvel é inibida competitivamente por amigdalina ($K_i=0,21$ mM), prunasina ($K_i=0,92$ mM), mandelonitrila ($K_i=1,14$ mM), metil- α -glicosídeo ($K_i=89$ mM), metil- α -manosídeo ($K_i=6,2$ mM) e salicina ($K_i=19$ mM). Florizina é um inibidor incompetitivo hiperbólico da trealase solúvel ($K_i=0,087$ mM, $\alpha=\beta=0,35$) e seu aglicone floretina é um inibidor não competitivo ($K_i=0,029$ mM). Tris e mandelonitrila ligam-se a regiões diferentes da enzima enquanto mandelonitrila e floretina não podem ligar-se concomitantemente à enzima.

Os pKs da enzima livre (pKe) e do complexo enzima substrato (pKes) foram determinados a partir de valores de K_m e V_{max}/K_m obtidos em vários pHs. Os valores encontrados foram: pKe₁=4,47; pKe₂=8,01; pKes₁=4,83; pKes₂=7,59.

A trealase solúvel não perde a atividade quando incubada com reagentes que modificam grupos sulfidril, tiol e fenol.

Com modificador de grupo imidazol, a enzima perde 60% da atividade somente na presença de metil- α -glucosídeo (inibidor competitivo da trealase). Essa modificação é protegida por trealose, indicando a presença de uma Histidina não essencial para catálise.

Modificadores de grupo carboxila e guanidino inativam a enzima, com pKs de, respectivamente, 4,87 e 7,84. a similaridade desses pKs com os determinados cineticamente sugere que os resíduos envolvidos em catálise são uma arginina e um asparto ou glutamato.

β -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e seus aglicones inibem trealoses presentes em diferentes órgãos de várias ordens de insetos. Essa inibição foi menor em insetos que se alimentam somente de vegetais, provavelmente devido a uma adaptação desses organismos.

ABSTRACT

The epithelium of *S. frugiperda* midgut has a trehalase activity that is mainly soluble (90%).

The soluble trehalase was purified by several chromatographic steps.

The enzyme has an hydrophobic site near the active site. Conformational changes apparently occur in the enzyme when methyl- α -glucoside binds to the active site.

Trehalase has a $K_m=0.37$ mM and is competitively inhibited by methyl- α -glucoside ($K_i=89$ mM); methyl- α -mannoside ($K_i=6.2$ mM); amygdalin ($K_i=0.21$); prunasin ($K_i=0.92$ mM); mandelonitrile ($K_i=1.14$ mM); Tris ($K_i=0.55$ mM) and salicin ($K_i=19$ mM). Phlorizin is an hyperbolic acompetitive inhibitor ($\alpha=\beta=0.35$; $K_i=0.0087$ mM), whereas its aglycon, phloretin, is a non-competitive inhibitor ($K_i=0.029$ mM). Tris and mandelonitrile bind at the same region in the active site. On the other hand, mandelonitrile and phloretin cannot be bound to the enzyme at the same time.

Enzyme pKs (pKe) and enzyme substrate pKs (pKes) were determined from K_m and V_{max}/K_m values obtained at different pHs. The values are: $pK_{e1}=4.47$; $pK_{e2}=8.01$; $pK_{es1}=4.83$; $pK_{es2}=7.59$.

Trehalase is not inactivated when incubated with compounds that react with thiol, imidazole or phenol groups.

Trehalase lose 60% of its activity in the presence of methyl- α -glucoside (a competitive inhibitor) plus a compound that reacts with imidazole groups. This inactivation is decreased by trehalose, indicating that there is a non-essential histidine in the active site substances that react with carboxyl guanidine groups inactivate the enzyme. The modified groups have pH of respectively, 4.87 and 7.84. The resemblance of these pKs with the one determined from K_m and V_{max} values suggest that the prototropic groups of the enzyme are in residues of arginine and aspartic acid or glutamic acid.

Toxic β -glucosides from plants and their aglycons inhibit trealase from different organs of insects from several orders. This inhibition is lower in herbivorous insects, possibly due to their adaptation in ingesting vegetal tissues.

ABREVIATURAS

CHAPS	Sulfonato de (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano
EDC	1-etil-3-(Dimetilamino-propil) Carbodiimida
DEPC	Dietilpirocarbonato.
FPLC	Fast protein liquid chromatography
Heppes	(N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico)
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis
$K_{m \text{ app}}$	Constante de Michaelis aparente
K_{obs}	Constante de inativação
mU	Miliunidades
MOPS	Ácido Morfolinopropanosulfônico
PTC	Fenil tio urea
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TGO	Tris glicose-oxidase
TNM	Tetranitrometano
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
U	Unidades
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
$V_{\text{máx app}}$	Velocidade máxima aparente

ÍNDICE

ÍNDICE DE TEXTO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2 O TUBO DIGESTIVO DOS INSETOS.....	2
1.3 TREALOSES E TREALASES.....	3
1.4 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DAS TREALASES	5
1.5 O SÍTIO ATIVO DAS TREALASES.....	6
1.6 LOCALIZAÇÃO DAS TREALASES INTESTINAIS DE INSETOS.....	9
1.7 β -GLICOSÍDEOS TÓXICOS DE ORIGEM VEGETAL.....	10
1.8 OBJETIVOS.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	12
2.1.1 <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	12
2.1.2 <i>PERIPLANETA AMERICANA</i>	12
2.1.3 <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	13
2.1.4 <i>MUSCA DOMESTICA</i>	13
2.1.5 <i>DIATRAEA SACCHARALIS</i>	13
2.2 DISSECÇÃO DOS INSETOS E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	14
2.2.1 <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	14
2.2.1.1 PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E DE MEMBRANA DO EPITÉLIO DO VENTRÍCULO.....	14
2.2.1.2 PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E DE MEMBRANA DE TRÊS REGIÕES DISTINTAS DO EPITÉLIO DO VENTRÍCULO.....	14
2.2.1.3 PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DE DIFERENTES ÓRGÃOS.....	15
2.2.2 <i>PERIPLANETA AMERICANA</i>	16
2.2.3 <i>TENEBRIO MOLITOR</i>	17
2.2.4 <i>MUSCA DOMESTICA</i>	17
2.2.5 <i>DIATRAEA SACCHARALIS</i>	18

2.3 SOLUBILIZAÇÃO COM PAPAÍNA DAS FORMAS DE TREALASE LIGADAS À MEMBRANA DO EPITÉLIO VENTRICULAR DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	19
2.4 SOLUBILIZAÇÃO COM FOSFOLIPASE D DAS FORMAS DE TREALASE LIGADAS À MEMBRANA DO EPITÉLIO VENTRICULAR DE <i>S. FRUGIPERDA</i>	19
2.5 SOLUBILIZAÇÃO COM TRITON X-100 DAS FORMAS DE TREALASE LIGADAS À MEMBRANA DO EPITÉLIO VENTRICULAR DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	20
2.6 SOLUBILIZAÇÃO COM CHAPS DAS FORMAS DE TREALASE LIGADAS À MEMBRANA DO EPITÉLIO VENTRICULAR DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	20
2.7 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO SOLÚVEL DO VENTRÍCULO DE <i>S. FRUGIPERDA</i>	20
2.8 CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA	21
2.9 CROMATOGRAFIA EM COLUNA FASTDESALTING USANDO SISTEMA DE FPLC.....	21
2.10 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA MONOQ USANDO SISTEMA DE FPLC.....	22
2.11 CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA RESOURCE ISOPROPYL USANDO SISTEMA DE FPLC.....	22
2.12 ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE).....	23
2.13 ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	23
2.14 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.....	23
2.15 EXPERIMENTOS DE INIBIÇÃO.....	24
2.16 EXPERIMENTOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA.....	24
2.17 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO EM RELAÇÃO AO MODIFICADOR.....	25
2.18 DETERMINAÇÃO DE PK POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA.....	26
2.19 DETERMINAÇÃO DO PK DOS GRUPOS ENVOLVIDOS EM CATÁLISE.....	26
3. RESULTADOS.....	28
3.1 DISTRIBUIÇÃO DAS FORMAS DE TREALASE AO LONGO DO TUBO DIGESTIVO DE <i>S. FRUGIPERDA</i>	28
3.2 TREALASE LIGADA A MEMBRANA.....	29
3.3 PURIFICAÇÃO DA TREALASE SOLÚVEL.....	29
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA TREALASE SOLÚVEL.....	34

3.5 INIBIÇÃO DAS TREALASES DE DIFERENTES INSETOS POR GLICOSÍDEOS TÓXICOS PRODUZIDOS POR PLANTAS.....	52
4. DISCUSSÃO.....	57
4.1 DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE TREALÁSICA NO INTESTINO MÉDIO.....	57
4.2 SOLUBILIZAÇÃO DA TREALASE LIGADA A MEMBRANA.....	57
4.3 CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA TREALASE SOLÚVEL.....	58
4.4 RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PRESENTES NA REGIÃO DO SÍTIO ATIVO.....	62
4.5 INIBIÇÃO DAS TREALASES POR GLICOSÍDEOS TÓXICOS PRODUZIDOS POR PLANTAS.....	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
6. CURRICULUM VITAE.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	2
FIGURA 2.....	4
FIGURA 3.....	7
FIGURA 4.....	31
FIGURA 5.....	31
FIGURA 6.....	32
FIGURA 7.....	32
FIGURA 8.....	33
FIGURA 9.....	35
FIGURA 10.....	37
FIGURA 11.....	39
FIGURA 12.....	41
FIGURA 13.....	44
FIGURA 14.....	45
FIGURA 15.....	47
FIGURA 16.....	47
FIGURA 17.....	49
FIGURA 18.....	50
FIGURA 19.....	50

FIGURA 20.....	51
FIGURA 21.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I.....	28
TABELA II.....	29
TABELA III.....	34
TABELA IV.....	36

1. Introdução:

1.1. Considerações gerais:

Os insetos compreendem 75% da espécie de animais conhecidos e correspondem a uma importante fração da biomassa. Esse número é impressionante principalmente quando comparado aos vertebrados, que perfazem somente 4,5% das espécies animais conhecidas (Roos et al., 1982).

Os insetos causam danos ao homem, seja por transmissão de patógenos animais, ou por danos econômicos. No que se refere à agricultura, os danos causados por insetos são grandes, seja por herbivoria ou por transmitirem patógenos vegetais. Um pequeno exemplo dessas perdas é o causado pela larva da broca de cana de açúcar, *Diatraea saccharalis*, no estado de São Paulo. As perdas só neste estado eram de US\$ 100 milhões por ano, o que foi reduzido para US\$ 20 milhões por ano com a introdução de uma vespa parasitóide do inseto (Parra et al., 2002). Devido ao grande dano causado por esse animais e a capacidade que esses organismos têm de se adaptar à condições adversas, a investigação de processos fisiológicos que possam ser manipulados no inseto, com a finalidade de minimizar as perdas de culturas agrícolas, é um importante passo para o manejo de pragas.

O tubo digestivo é a maior e mais desprotegida superfície de contato entre o inseto e o meio ambiente. Sendo assim, estratégias de controle de insetos podem ser planejadas visando desorganizar alguma de suas funções. Embora algumas dessas técnicas já existam (por exemplo a utilização de toxinas de *Bacillus thuringiensis* e de plantas que expressem inibidores de enzimas digestivas não comuns àquela espécie vegetal), a capacidade de criar resistência por parte dos insetos é grande, e preconiza-se que um número mais variado possível de estratégias de controle deve se usado para não exercer uma pressão seletiva muito grande (ver Mc Gaughey & Whalon, 1992; Bauer, 1995).

Os insetos são organismos muito diversificados. As diferenças encontradas entre as várias ordens são bem maiores que as encontradas entre os mamíferos. Desse modo,

qualquer generalização que se deseje fazer deve levar em conta o estudo feito em diferentes ordens e as vezes até em diferentes famílias de uma mesma ordem.

1.2. O tubo digestivo dos insetos:

O intestino dos insetos pode ser dividido em três partes intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Fig. 1).

Figura 1: Esquema geral do intestino de insetos.

O intestino anterior inicia-se na boca e inclui a cavidade bucal (aonde chega a secreção da glândula salivar), a faringe, o esôfago e o papo. Este, o papo, é apenas um órgão de armazenamento em muitos insetos e em outros serve como um sítio de digestão. O proventrículo pode ser um órgão triturador, bem como servir como uma válvula que controla a entrada de comida no intestino médio.

O intestino médio é o principal centro de digestão, em muitos insetos ele é constituído somente por um tubo simples denominado de ventrículo e em outros insetos ele possui cecos, de fundo cego, na porção anterior. O intestino médio da maioria dos insetos é recoberto por uma estrutura quitinosa a membrana peritrófica, qual separa o lúmen em dois compartimentos o espaço endoperitrófico (onde se encontra o alimento)

e o espaço ectoperitrofico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do ventrículo).

A região do esfíncter separa o intestino médio do intestino posterior, nesta região encontram-se os túbulos de Malpighi, os quais são órgãos excretórios. O intestino posterior inclui o íleo e o reto, os quais estão envolvidos na absorção de água e íons. Em muitos insetos o intestino posterior se resume a um tubo estreito e em outros insetos pode ser modificado em câmaras de fermentação abrigando microorganismos que auxiliam na digestão de celulose.

O epitélio que reveste o intestino médio é formado por uma camada simples de células de diferentes tipos. As células mais abundantes são as colunares, as quais podem apresentar diversas formas (Ribeiro et al., 1990) e estão envolvidas na absorção e secreção de água, na secreção de enzimas, absorção de nutrientes e na digestão através das enzimas ligadas às membranas microvilares. Na região basal do epitélio são encontradas células regenerativas. E em Lepidoptera são encontradas células calciformes, as quais realizam o transporte ativo de íons de potássio da hemolinfa para o lúmen do intestino (Harvey et al., 1988).

1.3 Trealose e trealases:

Trealose é um dissacarídeo não redutor (glicose α 1,1 glicose) (Fig. 2) sintetizado, estocado e utilizado por microorganismos, fungos e alguns outros invertebrados (ver Bhém, 1997). Esse dissacarídeo tem sido usado como conservante de alimentos e enzimas e para preservar as células, tecidos e embriões viáveis. A trealose parece substituir a água fazendo pontes de hidrogênio através de suas hidroxilas com lipídios componentes de membranas, impedindo a desnaturação (ver Bhém, 1997 e Castro & Tunnacliffe, 2000). Desse modo, é como se a trealose substituísse a água. Outra vantagem da utilização desse açúcar é que ele é não redutor, o que diminui sua reatividade.

Figura 2: Fórmula estrutural da trealose. Segundo <http://www.cargil.com/sfi/>.

Uma vez que trealose é o açúcar circulante em insetos, a trealase desempenha um papel fundamental nesses animais e está presente em praticamente todos os seus órgãos e na hemolinfa. Ela está presente no corpo gorduroso, cérebro e também é encontrada ligada às membranas mitocondriais ou microssomais nos músculos e solúvel ou ligada a membrana no intestino médio (Terra & Ferreira, 1994; Bounias et al., 1993; Vonk & Western, 1984; Wigglesworth, 1972).

Como os insetos possuem trealose e trealase na hemolinfa, nesse local está também presente um inibidor protéico da trealase. Anticorpo preparado contra esse inibidor isolado de *Periplaneta americana* (Orthoptera) reconheceu o inibidor presente em *Bombyx mory* (Lepidoptera) (Hiraoka et al., 1995). Como essas ordens são distantes, o inibidor deve ser bastante conservado entre os insetos.

A trealase presente no corpo gorduroso dos insetos (que é um órgão que desempenha as funções de fígado e tecido adiposo) é ativada diretamente por um peptídeo semelhante à insulina que pode ser isolado de corpo gorduroso ou de cérebro de insetos. A ativação se dá por ligação direta do peptídeo no complexo trealase-trealose (Bounias et al., 1993).

Nos fungos geralmente há duas trealases, uma chamada neutra e outra ácida, devido ao seu pH ótimo. A trealase neutra está localizada no citossol, tem K_m relativamente alto entre 4,8 a 40 mM e pH ótimo entre 6,0 e 7,5; essas trealases são reguladas por fosforilação realizada por uma proteína quinase dependente de AMPc. A trealase ácida está localizada num vacúolo, tem pH ótimo entre 3,5 e 5,5 e K_m relativamente baixo entre 1,4 e 4,7 mM, não estando sujeita a regulação (ver Behm, 1997).

Kadowaki et al. (1996) verificaram que as trealases do fungo *Scytalidium thermophilum* foram ativadas por íons de Ca^{2+} e Mn^{2+} , e a trealase neutra possui um domínio N-terminal com uma sequência similar ao conhecido sítio de ligação de cálcio.

Nos mamíferos elas se encontram ligadas às membranas microvilares do intestino e dos túbulos renais. Essas enzimas têm alto K_m , pH ótimo ácido e a trealase intestinal tem função digestiva, enquanto a função da trealase renal não é conhecida (Van Beers et al., 1995).

RNA_m de trealase foi também detectado no pâncreas e foi descrito um aumento na trealase urinária em certos problemas renais. Assim propõe-se que ela poderia ser usada como diagnóstico desses problemas. Essa enzima também se eleva em pacientes com diabetes (Ishihara et. al., 1997).

Nos insetos trealases digestivas tem K_m entre 0,4 e 1,1 mM e pH ótimo entre 4,8 e 6,0, qualquer que seja o pH luminal (Terra & Ferreira, 1994). Nessas propriedades elas são semelhantes as trealases ácidas de fungos. Para as trealases dos demais tecidos de insetos não há dados suficientes para que esse tipo de generalização seja feita. É possível que as trealases do corpo gorduroso e dos outros órgãos em que essa enzima tenha função na rápida obtenção de energia, sejam reguladas por fosforilação.

Para os nemátodes há um quadro muito semelhante ao dos insetos, onde a trealase intestinal é do tipo digestiva e nada pode ser dito sobre as enzimas presentes em outros tecidos (ver Behm, 1997).

1.4. Características moleculares das trealases:

Baseando-se no número crescente de seqüências disponíveis para as glicosídeos hidrolases, Henrissat (1991) propôs uma classificação que não levasse mais em conta a sua semelhança de especificidade, mas de seqüência. Desse modo, essas enzimas foram divididas em famílias e uma vez que os dobramentos de proteínas são mais conservados que suas seqüências, Henrissat & Bairoch (1993) propuseram que dentro da mesma família as proteínas devem apresentar estruturas terciárias e mecanismos de catálise semelhantes, o que se mostrou ser verdadeiro. As famílias com estruturas semelhantes foram posteriormente agrupadas em clãs (Henrissat & Romeu, 1995). Atualmente as glicosídeo hidrolases são agrupadas em 88 famílias e 12 clãs (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

Grande parte das famílias possui membros aonde foram determinados os aminoácidos envolvidos em catálise e a estrutura tridimensional. Desse modo, por alinhamento de seqüências e por modelagem molecular é possível determinar essas propriedades para uma enzima recém seqüenciada.

As trealases pertencem às famílias 37 e 65 das glicosídeo hidrolases (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>). Na família 65 estão reunidas maltose fosforilase, trealose fosforilase, kojiobiose fosforilase e as trealases de fungos. Nessa família os grupos envolvidos em catálise são um glutamato e um fosfato e sua estrutura é $(\alpha/\alpha)_6$. A família 37 contém todas as trealases animais e está entre as famílias menos conhecidas das glicosídeo hidrolases. Nessa família estão as trealases da glândula acessória do macho de *Tenebrio molitor*, a de intestino de pupa de *Bombyx mori* e duas ORFs de *Drosophila melanogaster*. É preciso ressaltar que não há nenhum componente dessa família em que a estrutura tridimensional ou os grupos envolvidos em catálise tenham sido determinados.

1.5. O sítio ativo das trealases:

Pouco se conhece sobre o sítio ativo das trealases, e nem mesmo ao certo quais são os aminoácidos envolvidos em catálise está elucidado.

As trealases clivam só um substrato natural e catalisam com inversão da configuração do carbono anomérico. O mecanismo de catálise proposto tem sido a catálise ácido-básica feita por duas carboxilas, do mesmo modo que ocorre em outras glicosidases (Asano et al., 1996a). Um grupo sulfidrila nas proximidades do sítio ativo também foi verificado em alguns casos, mas sua participação na catálise não foi constatada (Chen et al. 1987).

As trealases podem ter sua atividade afetada por íons e podem ser inibidas por AMP, ADP e ATP (Kadowaki et al., 1966). Vários alcalóides produzidos por plantas (Pam et al., 1993; Asano et al., 1996b; Kato et al., 1999) e substâncias produzidas por bactérias (Knuesel et al., 1999) podem inibir essas enzimas. Mostrou-se também que aminas primárias podem ser inibidoras, sendo que a inibição por Tris tem sido a mais estudada (Terra et al., 1978; Nakano & Sacktor, 1984; Chen et al., 1987). Dissacarídeos,

além de outros glicídios tais como metil- α -glicosídeo, metil- β -glicosídeo e florizina também são inibitórios para essas enzimas (Terra et al., 1978; Nakano & Sacktor, 1984; Chen et al., 1987; Asano et al., 1996a).

Figura 3: Mecanismo pelo qual trealases hidrolisam trealose. Segundo <http://www.cm.utexas.Edu/robertus/>.

As trealases de insetos já caracterizadas têm pH ótimo entre 4,8 e 6,0, pesos moleculares entre 60.000 a 140.000 Da, K_m entre 0,4 a 1,1 mM e são inibidas por Tris com um K_i em torno de 60mM (ver Terra & Ferreira, 1994).

Em 1979, Terra et al. trabalharam com a trealase intestinal solúvel presente no tubo digestivo de *Rhynchosciara americana*. A enzima aparentemente apresentava duas carboxilas envolvidas em catálise. Para a carboxila que atuaria como doador de prótons na catálise, mediu-se um pK de 5,0 cineticamente (Terra et al., 1978) ou de 5,3 por modificação química (Terra et al., 1979a). Para a carboxila que atuaria como nucleófilo, determinou-se um pK de 7,7 cineticamente (Terra et al., 1978) e de 8,8 por modificação química (Terra et al., 1979a). A carboxila desprotonada não tem sua modificação protegida por substrato. Essa ausência de proteção, aliada a grande diferença de pK determinado por métodos cinéticos e por modificação química, sugere que ela deve estar próxima mas não no sítio ativo e sugeriu-se que ela poderia participar da catálise interagindo com um outro aminoácido, talvez histidina (Terra et al., 1979a). Outra indicação de que uma histidina poderia estar de algum modo envolvida na catálise da

trealase é a ocorrência de inativação por dietilpirocarbonato, encontrada em *Lymantria dispari* (Valaitis & Bowers, 1993). Terra et al (1978) afirmaram que a trealase de *Rhynchosciara americana* não possuía grupos sulfidríla que afetassem a catálise porque tratamento com iodoacetato não levou à inativação da enzima. Talvez não esteja completamente demonstrado que iodoacetato não inativa a trealase de *Rhynchosciara americana*, porque os ensaios foram realizados em tampão fosfato e Chen et al. (1987) mostraram que íons fosfato protegem a trealase intestinal de rato da inativação por iodoacetato.

Chen et al., 1987, determinaram pKs de 4,8 e 7,2 para os grupos envolvidos em catálise na trealase intestinal de rato. Mostraram que a enzima é inativada por carbodiimida, modificador de grupos carboxila, e que essa modificação podia ser protegida pela presença de trealose, sacarose e Tris (esses últimos inibidores competitivos da enzima). Tris inibe a enzima em pH 6,0 ou maiores enquanto em pH 5,0 ou menores a inibição cai muito ou é ausente, além do que Tris protege a enzima da inativação por modificação de um grupo carboxila. Os dados citados acima levaram os autores a concluir que um grupo carboxila no sítio ativo seria necessário para a ligação do Tris e como um dos grupos envolvidos em catálise tem pK igual a 4,8, eles mencionam a possibilidade deste grupo ser uma carboxila, ao qual o Tris estaria se ligando. Verificaram que a enzima era inativada por iodoacetato, modificador de grupos sulfidríla e que essa inativação também era protegida por trealose e sacarose, mas não por Tris. Devido a esses resultados, mais ao fato do K_m para trealose não variar entre os pHs 6 e 8, eles concluíram que o sítio ativo poderia ser funcionalmente dividido em um sítio de ligação (com pK 4,8) e um sítio de catálise (com pK 7,2). Essa proposição não tem sentido, uma vez que o mecanismo de catálise das trealases, como da maioria das glicosidases deve ser catálise ácido básica, onde os dois grupos são responsáveis pela catálise e estão no sítio ativo. O K_m pode não variar com o pH em toda a região usada para se determinar os pKs (ver Segel, 1975) e os resultados obtidos pelos autores poderiam ser explicados pelo fato do Tris e do iodoacetato serem moléculas menores do que trealose e sacarose (que ocupariam todo o sítio ativo) e cada um deles se ligaria a um dos dois subsítios de ligação de glicose presentes no sítio ativo da trealase.

Mais recentemente, Lee et al. (2001) repetiram os experimentos realizados por Terra et al. utilizando uma trealase purificada de adultos da abelha *Apis mellifera*. Eles

determinaram pKs dos grupos envolvidos em catálise como sendo 5,3 e 8,5 e comentam (embora não mostrem os resultados) que a enzima foi modificada tanto por carbodiimida como por dietilpirocarbonato (modificador de grupos imidazol) e que embora o grupo com pK menor seja uma carboxila dizem que não ficou claro qual era o grupo com pK maior. Eles acabam por concluir que o grupo com pK maior seria uma carboxila, para isso usam os mesmos argumentos iniciais dados por Terra et al. (1978), de que a entalpia de ionização do grupo e seu comportamento frente à alteração na constante dielétrica do meio eram mais condizentes com uma carboxila.

1.6. Localização das trealases intestinais de insetos:

Na maior parte dos insetos a trealase é solúvel, mas em alguns predominam enzimas ligadas à membrana, como nos Diptera *Trichosia pubescens* e *Musca domestica*, onde elas são encontradas como enzimas integrantes das microvilosidades (Espinoza-Fuentes et al., 1984 e 1987). No Lepidoptera *Erinnyis ello*, a trealase é restrita às células e não aparece no lúmen intestinal, mas ela não é uma proteína integrante de membrana, encontrando-se adsorvida ao glicocálix das células intestinais (Santos et al., 1986). Outro Lepidoptera que possui trealase principalmente ligada a membrana é *Bombyx mori*. Nas larvas desse inseto, essa enzima aparece na membrana baso-lateral. (Azuma & Yamashita 1985). Esses autores sugerem que seu papel seria no aproveitamento da glicose da hemolinfa pelo tubo digestivo numa situação de jejum, uma vez que a incubação do tecido com trealose marcada mostrou que glicose radioativa aparecia nas células.

O papel da trealase intestinal solúvel ou presente nas microvilosidades é controverso. Há muito tempo foi proposto que a função dessa enzima seria quebrar em duas moléculas de glicose a trealose que se difundiria da hemolinfa. A glicose assim formada seria novamente levada a hemolinfa a favor de gradiente (Wyatt, 1967) A trealase intestinal de *R. americana* é solúvel e está presente no espaço ectoperitrófico (Terra et al., 1979). Terra & Ferreira (1981), submeteram a jejum e realimentaram larvas de *Rhynchosciara americana*, fazendo medidas da atividade de várias enzimas digestivas, tais como amilase, tripsina, aminopeptidase e trealase. As enzimas digestivas

diminuem ao longo do jejum e sua atividade aumenta novamente quando as larvas são realimentadas. O mesmo comportamento é observado para a trealase, o que não seria de se esperar caso seu papel fosse o de impedir a difusão da trealose da hemolinfa para o lúmen intestinal. Os autores determinaram a quantidade de trealose na hemolinfa, e verificaram que ela era constante, indicando que o nível de difusão seria o mesmo. Esses resultados indicam que a trealase seria uma enzima verdadeiramente digestiva. Entretanto, a hipótese aventada por Wyatt ainda aparece bastante em trabalhos sobre trealases.

1.7. β -glicosídeos tóxicos de origem vegetal:

Para se defender contra a ação de predadores as plantas podem produzir várias substâncias deletérias entre elas os glicosídeos tóxicos. Essas substâncias podem estar presentes em concentrações que variam de 0,5 a 1 % (Spencer, 1998) e, somente os glicosídeos cianogênicos são produzidos por pelo menos 2.500 espécies de plantas (Vetter, 2000). Glicosídeos são moléculas formadas por uma porção denominada glicone que é sempre um monossacarídeo que se encontra ligado a um aglicone que pode ser formado por um ou mais resíduos de monossacarídeo ou por outro tipo de molécula. Os glicosídeos tóxicos de plantas têm a porção do aglicone bastante variável, mas muitas vezes é uma região com estrutura carbônica complexa e hidrofóbica (ver Spencer, 1998).

Sempre imaginou-se que esses glicosídeos tóxicos produzidos pelas plantas agissem nos insetos tendo como alvo as β -glicosidases. Quando essas enzimas clivam os glicosídeos, elas liberam o aglicone que sempre foi descrito como sendo uma substância mais tóxica que o glicosídeo. Os efeitos desses aglicones ainda não foram estabelecidos, mas pelas suas estruturas químicas aparentemente eles poderiam inibir irreversivelmente certas serina-proteinases ou alquilar substâncias tais como ácidos nucléicos. Para sobreviver em dietas contendo essas substâncias algumas adaptações foram verificadas em insetos. Uma delas é desenvolver uma linhagem que tem menor atividade de β -glicosidase como foi visto acontecer em *Collosobruchus maculatus* (Desroches et. al., 1997). Outra adaptação pareceu ser a incapacidade das β -glicosidases

de hidrolisar esses glicosídeos, como foi verificado em *Spodoptera frugiperda* (Marana et. al., 2000 e Marana comunicação pessoal). Em *Diatraea saccharalis* foi demonstrado que quando o inseto é criado em dieta contendo o glicosídeo tóxico, somente a enzima responsável pela produção do aglicone tem sua atividade diminuída (Ferreira et al., 1997).

Nakano e Sacktor (1984), trabalhando com trealase renal de rato observaram que a enzima era inibida por florizina (β -glicosídeo tóxico) e por seu aglicone, a floretina. Caso diferentes tipos de β -glicosídeos tóxicos possam inibir trealases de insetos, seu efeito deveria ser sempre muito danoso a esse animais.

1.8. Objetivos:

Embora trealase seja uma enzima central no metabolismo de insetos, as propriedades das trealases desses animais não são ainda muito bem conhecidas. Na verdade, essas enzimas não são muito bem caracterizadas em nenhum organismo, quando comparadas a caracterização de outras glicosídeo hidrolases ou mesmo enzimas que atacam ligações peptídicas. Além do mais não é conhecido, para nenhuma trealase, os grupos envolvidos em catálise e sua estrutura tridimensional.

A possibilidade dessas enzimas serem inibidas por β -glicosídeos tóxicos vegetais necessita ser investigado, pois caso isso ocorra será interessante conhecer os mecanismos pelos quais alguns insetos contornam esse problema e sobrevivem em dietas contendo essas substâncias.

Os objetivos deste trabalho são iniciar a caracterização física e cinética das trealases de *S. frugiperda* e verificar o efeito de alguns β -glucosídeos tóxicos produzidos por plantas em trealases de insetos. Foi realizada uma caracterização cinética preliminar da trealase intestinal de *S. frugiperda*. Esse inseto foi escolhido devido ao seu tamanho, a facilidade com que é criado e a sua importância como praga agrícola. Já que, *S. frugiperda* é praga de milho e as larvas alimentam-se do cartucho do milho

Além disso, verificamos o efeito de alguns β -glicosídeos em trealases de diversos órgãos de diferentes ordens de insetos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico:

2.1.1. *Spodoptera frugiperda*:

Larvas da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram criadas de acordo com o método de Parra (1986). As larvas eram acondicionadas individualmente em tubos de vidro com uma dieta à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), gérmen de trigo, levedo e ágar e mantidas sob um fotoregime natural (verão 14L:10E; inverno 10L:14E) a 25°C. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel 10%. Para os experimentos foram utilizadas larvas do quinto instar de ambos os sexos com o intestino repleto de alimento.

2.1.2. *Periplaneta americana*:

Uma colônia de barata *Periplaneta americana* (Dictyoptera: Blattidae) foi desenvolvida em laboratório a partir de ninfas e adultos fornecidos pelo Setor de Nutrição da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Os insetos são criados em caixas plásticas de 50x30x80cm fechadas por tampa de tela. As caixas são forradas internamente com papelão e mantidas em local escurecido, à temperatura e umidade ambiente. Chuchu e aveia são fornecidos como fonte de água e alimento para estes insetos. Para este estudo foram utilizados adultos de *Periplaneta americana* de ambos os sexos que apresentassem o intestino médio repleto de alimento.

2.1.3. *Tenebrio molitor*:

Uma cultura do besouro da farinha *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) é mantida em laboratório, em farelo de trigo sob condições naturais de luz a uma temperatura média de 25°C e umidade relativa de 70-75 %. Foram utilizadas larvas com desenvolvimento próximo ao último estágio larval e com o intestino médio repleto de alimento.

2.1.4. *Musca domestica*:

Larvas da mosca comum *Musca domestica* (Cyclorrhapha: Muscidae) são criadas à temperatura média de 24°C e luz constante em uma mistura de ração comercial para porcos e palha de arroz (1:2 v/v) umedecidas e fermentadas (Targa & Peres, 1979). Foram utilizadas neste estudo larvas do terceiro instar larval que se alimentavam ativamente.

2.1.5. *Diatraea saccharalis*:

As larvas da broca da cana *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Prof. Dr. J.R.P. Parra do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”.

As larvas de *Diatraea saccharalis* são criadas em dieta artificial à base de gérmen de trigo, farelo de soja, sacarose, sais de Wesson, Nipargin, ácido ascórbico, cloreto de colina, formol 37%, vita gold, antibióticos tetrax ou tetraciclina, solução vitamínica, agar e água destilada (Parra & Mihsfeldt, 1992). Foram utilizados insetos do último estágio larval que apresentava o tubo digestivo repleto de alimento.

2.2. Dissecção dos insetos e preparação das amostras:

2.2.1. *Spodoptera frugiperda*:

2.2.1.1. Preparação das frações solúveis e de membrana do epitélio do ventrículo:

As larvas de *S. frugiperda* foram imobilizadas em gelo, e dissecadas em NaCl 125 mM. O epitélio do ventrículo das larvas de *S. frugiperda*, após remoção da membrana peritrófica com o conteúdo, foi extensivamente lavado com salina e a seguir homogeneizado com água bidestilada em Potter-Elvehjem (10 movimentos por pistilo). O homogeneizado foi então congelado e descongelado três vezes, sendo que, numa destas vezes ele permaneceu congelado por 24 horas. Após tal procedimento, o homogeneizado foi centrifugado a 20.000g durante 30 minutos e numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o estudo da forma solúvel da trealase, enquanto o precipitado foi novamente homogeneizado em água bidestilada e utilizado no estudo da trealase ligada a membrana.

2.2.1.2. Preparação das frações solúveis e de membrana de três regiões distintas do epitélio do ventrículo:

Foram dissecados três lotes de *S. frugiperda*, onde em cada lote havia dez animais. A dissecção foi realizada como no item 2.2.1.1, porém o epitélio do ventrículo foi dividido em três partes iguais em tamanho: epitélio do ventrículo anterior, epitélio do ventrículo médio e epitélio do ventrículo posterior.

Cada amostra foi homogeneizada como descrita no item 2.2.1.1 em 2ml de água bidestilada e a seguir congeladas e descongeladas três vezes, sendo que durante um destes ciclos ela permaneceu congelada durante vinte quatro horas.

Depois, a amostra foi centrifugada durante trinta minutos a 20.000g numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado, enquanto o precipitado foi reomogeneizado em 2ml de água bidestilada. Tanto o sobrenadante quanto o precipitado reomogeneizado foram usados em ensaios enzimáticos.

2.2.1.3. Preparação das frações de diferentes órgãos:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados 3 lotes com 10 animais em cada lote.

Para coletar a hemolinfa procedeu-se da maneira descrita a seguir: foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a seguir a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de suspensão de 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante coletado. Depois, as larvas foram dissecadas em NaCl 125 mM, e foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente, homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000g durante 10 minutos a 4°C; o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.2.2. *Periplaneta americana*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados três lotes de animais com dois animais em cada lote.

Os adultos de *Periplaneta americana* foram coletados das caixas de criação e transferidos para pequenas câmaras com atmosfera de CO₂ para anestesiamento, sendo a seguir transferidos para gelo picado. Para coletar a hemolinfa as baratas tiveram suas patas cortadas e foram então centrifugadas a 52g durante 2 minutos em temperatura ambiente; a hemolinfa foi coletada e adicionou-se um volume de uma suspensão 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 20.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado.

As baratas foram dissecadas em placas de parafina, utilizando solução de NaCl 220 mM gelada, foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi e epitélio do ventrículo foram, separadamente, homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, a seguir foram congelados e descongelados três vezes sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi rehomogeneizado em água bidestilada.

O corpo gorduroso e a carcaça passaram pelo processo descrito acima, contudo o sobrenadante do corpo gorduroso foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura, enquanto a carcaça foi homogeneizada em água bidestilada usando homogenizador Omni-mixer, com 6 pulsos de 30 segundos cada, na velocidade de 5.000 rpm, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos, a amostra foi então sonicada, utilizando 3 pulsos de 1 minuto cada e com intervalos de 1 minuto entre cada pulso. Antes de ser centrifugada, a amostra foi novamente homogeneizada em Omni-mixer como já descrito.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.2.3. *Tenebrio molitor*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados três lotes de animais com 10 animais em cada lote.

Larvas de *Tenebrio molitor* foram imobilizadas em gelo, foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a seguir a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma suspensão 10 mM de PTC, a hemolinfa foi centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado

As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 343 mM gelada, e foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi e epitélio do ventrículo foram separadamente homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes, sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso e a carcaça passaram pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante do corpo gorduroso foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura, enquanto a carcaça foi homogeneizada em água bidestilada com homogenizador Omni-mixer, com 6 pulsos de 30 segundos cada, com 5.000 rpm, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.2.4. *Musca domestica*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados 3 lotes de animais com 10 animais em cada lote.

As larvas de *Musca domestica* são lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e imobilizadas em gelo. A seguir foi realizado um pequeno corte para que a hemolinfa extravasasse, a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma

suspensão de 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 150 mM gelada. Foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente, homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes, sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 25.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.2.5. *Diatraea saccharalis*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados três lotes de animais com 20 animais em cada lote.

As larvas de *Diatraea saccharalis* são lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e imobilizadas em gelo, a seguir foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma suspensão de 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi então coletado.

As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 125 mM gelada. Sendo que, foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado

enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.3. Solubilização com papaína das formas de trealase ligadas à membrana do epitélio ventricular de *S. frugiperda*.

Uma alíquota da fração de membrana preparada como descrito no item 2.2.1.1 foi diluída em HEPES 0,1 M pH 7,4 com papaína numa concentração final de 1mg de papaína para 4 mg de proteína de membrana. Essa papaína havia sido previamente ativada por incubação por 15 minutos a temperatura ambiente na presença de 50 mM de cisteína. As membranas foram incubadas com papaína durante 45 minutos a 30°C, e a seguir centrifugadas a 100.000g durante 1 hora a 4°C (Jordão et al., 1999). O sobrenadante e o precipitado foram coletados e usados em ensaios enzimáticos.

Um controle foi realizado na ausência de papaína.

2.4. Solubilização com fosfolipase D das formas de trealase ligadas à membrana do epitélio ventricular de *S. frugiperda*:

Uma alíquota da fração de membrana preparada como descrito no item 2.2.1.1 foi diluída em HEPES 10mM pH 7,4 com fosfolipase D numa concentração final de 4,87 U de fosfolipase D para 1 mg de proteína de membrana. Depois, a amostra resultante foi incubada durante 60 minutos a 37°C, e a seguir centrifugada a 100.000g por 1 hora a 4°C (Jordão et. al., 1999). O sobrenadante e o precipitado foram coletados e usados em ensaios enzimáticos.

Um controle foi realizado sem a presença de fosfolipase D.

2.5. Solubilização com Triton x-100 das formas de trealase ligadas à membrana do epitélio ventricular de *S. frugiperda*:

Uma alíquota da fração de membrana foi diluída duas vezes em Triton x-100 5%. Depois, a amostra foi incubada durante 24 horas à 4°C, e a seguir centrifugada a 20.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram coletados e usados em ensaios enzimáticos.

O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de Triton x-100.

2.6. Solubilização com CHAPS das formas de trealase ligadas à membrana do epitélio ventricular de *S. frugiperda*:

Uma fração da preparação de membrana foi diluída em HEPES 10mM pH 7,4 com CHAPS numa concentração final de 7 µM. A amostra resultante foi então incubada durante 24 horas a 4°C, e a seguir centrifugada a 25.000g durante 30 minutos a 4°C (Cristofolletti & Terra, 1999). O sobrenadante e o precipitado foram coletados e usados em ensaios enzimáticos.

O mesmo procedimento foi realizado na ausência de CHAPS.

2.7. Cromatografia de troca iônica da fração solúvel do ventrículo de *S. frugiperda*:

A coluna foi equilibrada com tampão trietanolamina 20mM pH 7,5 contendo 11,92 mM de MnCl₂. Foram aplicadas na coluna High-Q (5x1 ml) sistema Econo-system da Bio-Rad, amostras de 1ml da fração solúvel do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*. A coluna foi lavada com tampão trietanolamina 20mM pH 7,5 contendo 11,92 mM de MnCl₂ para retirar as proteínas que não interagiram com a coluna, e as proteínas que permaneceram retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 0,6 M de NaCl preparado no mesmo tampão.

Nesta cromatografia foi utilizado um fluxo de 0,5 ml/min e foram coletadas frações de 500 µl que serviram como material para ensaios enzimáticos.

Os tampões foram preparados com água MilliQ e filtrados em filtro Millipore.

2.8. Cromatografia de interação hidrofóbica:

As frações mais ativas sobre trealose obtidas na cromatografia descrita acima (frações de 70 a 78, Fig.4) foram reunidas e o material foi diluído duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,0 contendo 11,92 mM de MnCl_2 e 3,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A amostra foi então centrifugada a 8.000g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e aplicado em coluna Econo-Pac Methyl HIC (Fig. 5), sistema Econo-system da Bio-Rad. Após cada aplicação, a coluna foi lavada com tampão trietanolamina 20 mM pH 7,5 com 11,92 mM de MnCl_2 e 1,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, para retirar as proteínas que não interagiram com a coluna. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 1,7 M a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ preparado no mesmo tampão.

Utilizou-se um fluxo de 0,5 ml/min, foram coletadas frações de 500 µl que foram posteriormente usadas em ensaios de atividade enzimática.

Os tampões foram preparados com água MilliQ e filtrados com filtro Millipore.

2.9. Cromatografia em coluna FastDesalting usando sistema FPLC:

As frações mais ativas sobre trealose obtidas após a cromatografia hidrofóbica descrita acima foram reunidas (44 a 51). Para retirar o sulfato de amônio da amostra ela foi aplicada numa cromatografia em coluna FastDesalting usando sistema FPLC.

Para realizar a cromatografia em coluna FastDesalting foi utilizado tampão trietanolamina 20 mM pH 7,5 com 11,92 mM de MnCl_2 e fluxo de 3 ml/min. O tampão foi preparado com água MilliQ e desaerado.

2.10. Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ usando sistema de FPLC:

Na cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ foram aplicadas as frações mais ativas sobre trealose obtidas após cromatografia em coluna FastDesalting.

A coluna foi equilibrada com tampão trietanolamina 20 mM pH 7,5 contendo 11,92 mM de MnCl_2 , foram realizadas aplicações de 1 ml e após cada aplicação a coluna foi lavada com tampão trietanolamina 20 mM pH 7,0, 11,92 mM de MnCl_2 para retirar as proteínas que não se ligaram à coluna. Para retirar as proteínas que permaneceram ligadas à coluna, foi realizado um gradiente de 0 M a 0,6 M de NaCl preparado no mesmo tampão.

Foi utilizado um fluxo de 0,5 ml/min e foram coletadas frações de 500 μl que foram usadas para realizar ensaios enzimáticos.

Os tampões foram preparados com água MilliQ e desareados.

2.11. Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isopropyl usando sistema FPLC:

As frações de 44 a 51 que constituíam o pico de atividade sobre trealose eluído da cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Fig. 6) foram reunidas e a seguir diluídas duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,5, 11,92 mM de MnCl_2 e 3,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Depois a amostra foi centrifugada a 8.000g durante 15 minutos a 4°C, o precipitado foi descartado, enquanto o sobrenadante foi aplicado em coluna Resource Isopropyl.

Na coluna Resource Isopropyl foram realizadas aplicações de 1 ml e após cada aplicação a coluna foi lavada com tampão trietanolamina 20 mM pH 7,5 com 11,92 mM de MnCl_2 e 1,7 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; para retirar as proteínas que não interagiram com a coluna. Para retirar as proteínas que se ligaram à coluna foi realizado um gradiente de 1,7 M a 0 M de NH_3SO_4 solubilizado no mesmo tampão.

A cromatografia foi realizada com fluxo de 2ml/min e foram coletadas frações de 400 μl . Os tampões foram preparados com água MilliQ e desareados.

2.12. Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE):

Amostras previamente secas em um concentrador a vácuo foram ressuspensas em tampão de amostra contendo Tris HCl 60 mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); β -mercaptoetanol 0,36 mM; EDTA 0,5 mM; glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,005 % (p/v). Antes da aplicação no gel as amostras eram aquecidas em banho a 95°C por 5 min.

Os géis de poliacrilamida 12 % e SDS 0,1 % foram preparados segundo Laemmli (1970). A separação eletroforética foi feita com uma corrente de 0,2 mA/cm² de gel. As proteínas foram visualizadas por coloração com prata segundo Blum et al. (1987).

2.13. Ensaio enzimáticos:

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando-se a mistura da reação em banho-maria termostatizado (30°C) por diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de substrato) e controles sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais. Exceto aonde indicado, os ensaios foram feitos em tampão citrato fosfato 25 mM pH 6,0.

A atividade enzimática da trealase foi determinada através da reação de TGO (Dahlqvist, 1968), método que permite medir a produção de glicose.

2.14. Determinação de proteína:

A determinação da concentração de proteína presente na amostra foi feita utilizando o método descrito por Krystal et al., 1985, e usando uma curva padrão de albumina de ovo. Todas as amostras obtidas na marcha de purificação (exceto o homogenizado) foram cromatografadas em coluna Hitrap Desalting (Pharmacia-LKB Biotechnology) contra tampão Tris 10 mM contendo Na₂CO₃ 10 mM e Tween 20 0,75% (pH 10-12), a fim de retirar substâncias de baixo peso molecular que poderiam interferir na dosagem de proteína. Este é um procedimento eficiente e rápido por ser realizado

manualmente com o auxílio de seringas. A coluna é equilibrada com 20 ml do tampão de interesse; 1,5 ml da amostra são aplicados a esta coluna e a eluição é realizada com 2,0 ml do tampão utilizado para equilibrar a coluna.

2.15. Experimentos de inibição:

Para determinar o K_i de diferentes substâncias, a trealase pura foi incubada com pelo menos oito concentrações de substrato em cada uma de cinco concentrações diferentes de inibidor. Os valores de K_i foram calculados a partir dos replotes das inclinações dos plotes de Lineweaver-Burk contra a concentração do inibidor (Segel, 1975) usando o programa Enzfitter (Elsevier, Biosoft).

Para utilizar floretina como inibidor ela foi solubilizada em etanol 50%, e o experimento de inibição também foi realizado em etanol 50%. Ainda foi necessário realizar uma curva padrão para cada concentração de floretina, pois tanto a floretina quanto o etanol interferem com o TGO (método de medir glicose).

Para a realização dos experimentos de inibição múltipla foi deduzida a seguinte equação para verificar se um inibidor competitivo (mandelonitrila) estaria se ligando ou não ao mesmo local na enzima que um inibidor não competitivo (floretina):

$$1/V = K_s/V_{\max} K_i [S] (1 + [J]/\beta K_j) [I] + 1/V_{\max} [(1 + J/\alpha K_j) + K_s/[S] (1 + [J]/K_j)]$$

Assim, a enzima foi incubada com pelo menos cinco concentrações de um dos inibidores em cada uma das quatro concentrações diferentes do outro inibidor.

Para verificar se dois inibidores competitivos estariam se ligando ou não, ao mesmo local na enzima foi utilizada a seguinte equação:

$$1/V = K_s/[S] V_{\max} (1 + [J]/\alpha K_j) [I]/K_i + 1/V_{\max} (1 + K_s/[S] + K_s/[S] + K_s[J]/[S]K_j)$$

2.16. Experimentos de modificação química:

A enzima foi dialisada contra tampão Temed 100 mM, pH 6,0 e 11,92 mM de $MnCl_2$ durante três horas. A seguir a amostra foi incubada com EDC 6 mM, Glicina etil éster 40 mM e Temed 100 mM a 30°C. A reação de modificação foi interrompida em diferentes tempos com tampão citrato 1,0 M pH 6,0.

Outra fração da amostra dialisada foi incubada a 30°C com DEPC numa concentração final de 3 mM e a reação de modificação foi interrompida em diferentes tempos com histidina 6 mM. A modificação com DEPC também foi realizada na presença de metil- α -glicosídeo (inibidor competitivo da enzima) numa concentração igual a 2 K_i.

A trealase purificada também foi incubada a 30°C com p-hidroximercuribenzoato 0,75 mM ou iodoacetato 20mM e a reação de modificação foi interrompida em diferentes tempos com 20 mM de Cisteína..

A trealase foi dialisada com Mops 100 mM pH 8,0 durante 3 horas; a seguir a enzima foi incubada a 30°C com fenilglioxal numa concentração de 12,5 mM e a reação foi interrompida em diferentes tempos com tampão citrato 1,0 M pH 6,0.

A trealase foi dialisada com Heppes 50 mM pH 8,5 durante 3 horas e a seguir incubada a 30°C com TNM numa concentração de 5 mM e a reação foi interrompida em diferentes tempos com tampão citrato 1,0 M pH 6,0.

As reações de modificação foram repetidas na presença de trealose na concentração de 10 K_m.

A seguir, as amostras submetidas à modificação por EDC, DEPC, p-hidroximercuribenzoato, iodoacetato, TNM e fenilglioxal (na presença e na ausência de trealose) foram utilizadas para determinar a atividade enzimática remanescente.

2.17. Determinação da ordem de reação em relação ao modificador:

Para determinar a ordem de reação em relação ao fenilglioxal foram realizadas reações de modificação com diferentes concentrações de fenilglioxal e a seguir foi realizado o plote log de k_{obs} (constante de segunda ordem da reação de modificação) versus o log da concentração do modificador. Esse tipo de plote resulta numa reta onde a inclinação é igual a n (número aparente de moléculas de modificador que se ligam ao sítio ativo da enzima). O mesmo foi realizado para verificar a ordem de reação em relação ao EDC.

2.18. Determinação de pK por modificação química:

Para verificar o pK dos grupos modificados por fenilgloxal ou EDC, foram realizadas modificações em diferentes pHs. O pK foi calculado usando a equação abaixo, com k'_{obs} , k''_{obs} e K_a estimados pelo programa Enziffiter.

$$k_{obs} = \frac{k'_{obs}}{1 + K_a/[H^+]}$$

Onde k_{obs} é a constante de inativação observada, k'_{obs} é a constante de inativação independente do pH e K_a é a constante de dissociação do grupo ionizável.

Para determinar a influência do pH na inativação por EDC foi utilizado tampão Temed/HCl 100 mM (pH 5-7). Já para determinar a influência do pH na inativação por fenilgloxal foram utilizados tampão MOPS 400 mM (pH 7-8) e tampão borato 400 mM (pH 8-9). Sendo que, a enzima é estável em todos os pHs.

2.19. Determinação dos pKs dos grupos envolvidos em catálise:

No ensaio da trealase foram usados tampão acetato 50 mM (pH 4-6) e tampão fosfato 50 mM (pH 7-8), os tampões têm força iônica igual a 100 mM e seu pH foi ajustado na temperatura do ensaio. A enzima é estável em todos os pHs. O $V_{máx}$ aparente ($V_{máx\ app}$) e o K_m aparente ($K_{m\ app}$) foram determinados em cada pH (através do plote de Lineaweaver-Burk). O valor do pK dos grupos ionizáveis do sítio ativo foi determinado através da equação abaixo:

$$\frac{K_{m\ app}}{V_{máx\ app}} = \frac{K_m}{V_{máx}} \left[1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right]$$

Onde K_{e1} e K_{e2} correspondem as constantes de dissociação dos grupos prototípicos da enzima livre.

Já, o valor do pK dos grupos ionizáveis do complexo enzima substrato, foi calculado a partir da equação abaixo:

$$V_{máx\ app} = \frac{V_{máx}}{1 + \left[\frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right]}$$

Onde K_{es_1} e K_{es_2} correspondem as constantes de dissociação dos grupos protótipicos do complexo enzima substrato.

3. RESULTADOS

3.1. Distribuição da trealase ao longo tubo digestivo de *S. frugiperda*:

Para verificar como a trealase está distribuída ao longo de tubo digestivo de *S. frugiperda* dissecou-se o intestino médio em três partes de igual comprimento: EVA (epitélio do ventrículo anterior), EVM (epitélio do ventrículo médio) e EVP (epitélio do ventrículo posterior). As amostras foram separadas numa fração solúvel e numa fração particulada. A atividade de trealase foi também determinada na membrana peritrófica com conteúdo, verificou-se que a atividade presente neste compartimento corresponde somente a 3 % do valor encontrado em todo o intestino médio.

A distribuição da atividade de trealase nas frações solúveis e particuladas do epitélio ventricular está apresentada na Tabela I. Pode-se verificar que na fração solúvel do epitélio ventricular está contida cerca de 90 % da atividade total de trealase e somente cerca de 10 % é encontrada ligada a membrana

A distribuição dos dois tipos de atividade enzimática ao longo do ventrículo é muito semelhante (comparar as atividades solúveis e as atividades particuladas de EVA, EVM e EVP na Tabela I).

Tabela I: Distribuição da atividade de trealase no epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*.

	mU/animal	mU/animal (% soma)	mU/mg
EVA solúvel	889	33,3	216
EVM solúvel	872	32,7	214
EVP solúvel	635	24,0	147
EVA particulado	116	4,3	14
EVM particulado	89	3,3	12
EVP particulado	66	2,5	16

3.2. Trealase ligada a membrana:

Para identificar qual a melhor substância para solubilizar a trealase ligada à membrana do epitélio do ventrículo, foram realizados vários experimentos onde a preparação de membrana foi incubada com uma substância que geralmente solubiliza proteínas de membrana. A seguir a amostra foi centrifugada, sendo que para cada substância foi realizado um controle, no qual a proteína passou pelas mesmas condições sem a presença da substância que a solubilizaria.

Para solubilizar as proteínas de membrana foram usados Triton x-100, CHAPS, papaína e fosfolipase D.

Os valores obtidos para a solubilização da trealase tanto nos procedimentos experimentais como no controle estão mostrados na tabela II.

Quando o agente solubilizado foi Triton x-100 verifica-se que a atividade total de trealase é 43 % menor no experimental, indicando que Triton x-100 nas condições usadas no experimento provavelmente está inativando ou inibindo a enzima (resultados não mostrados). Os demais agentes não alteraram a atividade enzimática.

Tabela II: Solubilização da trealase ligada a membrana por diferentes agentes.

Solubilização	% total solubilizada no experimental	% total solubilizada no controle	% solubilizada pelo agente
Papaína	97	76	21
Fosfolipase	95	79	16
Triton x-100	100	69	31
CHAPS	100	71	29

3.3. Purificação da trealase solúvel:

A fim de purificar a trealase solúvel do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda* foi realizada uma cromatografia de troca iônica em coluna HighQ usando sistema Econo-System, na qual o perfil de atividade enzimática (Fig. 4) apresentou um único pico de atividade de trealase. As frações mais ativas (frações de 70-78) foram então reunidas, o material foi diluído duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,0 contendo 11,92 mM de $MnCl_2$ e 3,4 M de NH_3SO_4 e a seguir centrifugado a 8.000g durante 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e aplicado numa cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Econo-Pac Methyl (sistema Econo-System), na qual o perfil de atividade enzimática (Fig. 5) apresentou novamente um único pico de atividade de trealase.

As frações mais ativas eluídas da coluna EconoPac methyl (frações de 44 a 51) foram reunidas e aplicadas numa cromatografia em coluna FastDesalting para que o sal fosse retirado e a amostra pudesse ser aplicada numa cromatografia de troca iônica. Assim, a amostra foi aplicada numa cromatografia em coluna MonoQ (Sistema FPLC), na qual o perfil enzimático (Fig. 6) demonstrou que havia sido eluído apenas um pico de atividade enzimática.

As frações que constituíam o pico de atividade enzimática eluído da coluna MonoQ (Frações de 44 a 51) foram reunidas, o material foi diluído duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,0 contendo 11,92 mM de $MnCl_2$ e 3,4 M de NH_4SO_4 e centrifugado a 8.000g por 15 minutos a 4°C. A seguir a amostra foi aplicada numa cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (Sistema FPLC), na qual observou-se que um único pico de atividade de trealase foi eluído (Fig. 7).

A fim de verificar se a forma solúvel de trealase havia sido purificada foi realizado um SDS-PAGE, aonde foram aplicadas as frações de 30 a 33, as quais foram eluídas da cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (sistema FPLC). No SDS-PAGE (Fig. 8) observou-se apenas uma banda de proteína em todas as frações com massa molecular de 67.000 Da, indicando que a trealase solúvel do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda* foi purificada. A recuperação e o enriquecimento da atividade da trealase durante a purificação são mostrados na tabela III.

Após a purificação de uma forma solúvel de trealase do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*, a marcha de purificação foi refeita para acumular material para sua caracterização cinética.

Figura 4: Cromatografia de troca iônica em coluna HighQ (Sistema Econo-System), da fração solúvel do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão trietanolamina 20 mM pH 7,0; 11,92 mM de $MnCl_2$, e para eluir as proteínas que ficaram retidas na coluna foi realizado um gradiente de NaCl de 0 a 0,6 M no mesmo tampão.

Figura 5: Cromatografia hidrofóbica em coluna Econo-pac Methyl das frações mais ativas reunidas após cromatografia de troca iônica. As frações de 70 a 78 (Fig.4) foram reunidas, diluídas duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,0; 3,4M NH_3SO_4 e 11,92 mM $MnCl_2$ centrifugadas a 8.000g a 4°C durante 15 minutos e o sobrenadante aplicado na coluna Econo-pac Methyl. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão Trietanolamina 20 mM pH 7,0 e 11,92 mM de $MnCl_2$. As proteínas retidas na coluna foram eluídas através de um gradiente de 1,7 a 0 M de NH_3SO_4 no mesmo tampão.

Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Sistema FPLC), na qual foi aplicado as frações de 44 a 51, eluídas da cromatografia de interação hidrofóbica e reunidas (Fig. 5). Na cromatografia foi utilizado Tampão trietanolamina 20 mM pH 7,0 com 11,92 mM de MnCl_2 e as proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 0,6 M de NaCl no mesmo tampão.

Figura 7: Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (Sistema FPLC), na qual foram aplicadas as frações mais ativas sobre trealose reunidas após eluição da cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Fig.6, frações de 44 a 51). Antes da aplicação o material foi diluído duas vezes em tampão trietanolamina 40 mM pH 7,0; 3,4 M NH_3SO_4 e 11,92 mM MnCl_2 . A amostra foi centrifugada a 8.000 g, 4°C durante 15 minutos, e o sobrenadante foi aplicado na coluna. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão trietanolamina 20 mM pH 7,0 e 11,92 mM de MnCl_2 , para eluir as proteínas que ficaram retidas na coluna foi realizado um gradiente de 1,7M a 0M de NH_3SO_4 no mesmo tampão.

Figura 8: SDS-PAGE das frações de 34 a 36 eluídas da cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl realizada como descrito na legenda da figura sete.

Tabela III: Recuperação e enriquecimento da trealase solúvel do intestino médio de *S. frugiperda* durante a sua purificação.

	Atividade específica (mU/ μ g)	Recuperação (%)
Homogeneizado	17,14	100
High-Q	68,12	100
Econo-Pac Methyl	71	100
MonoQ	71	26
Resource Isomethyl	169	18

3.4. Caracterização da trealase solúvel:

Para a enzima purificada foi medido $K_m=0,37$ mM, usando trealose como substrato. Com o intuito de mapear o sítio ativo através de inibidores competitivos, foram realizadas várias inibições com diferentes substâncias (Fig. 9) para determinar quais inibidores seriam competitivos, ou seja, quais se ligariam ao sítio ativo da enzima e poderiam assim ser usados para mapeá-lo em futuros experimentos de inibição múltipla.

Os inibidores usados foram: Metil- α -glicosídeo, Metil- α -manosídeo, Amigdalina, Prunasina, Mandelonitrila, Salicina, florizina, floretina, Tris, gentiobiose e 1,10 fenantrolina.

Methyl- α -glicosídeo Metil- β -glicosídeo Gentiobiose
(glicose- β -1,6-glicose) Amigdalina
(glicose- β -1,6-glicose- β -mandelonitrila) Prunasina
(glicose- β -mandelonitrila)

Mandelonitrila

Salicina

Floretina

Florizina
(glicose- β -floretina)

1,10 Fenantrolina

TRIS

Figura 9: Estruturas das substâncias usadas como inibidores da trealase.

Tabela IV: Padrão de inibição e K_i para vários inibidores da trealase purificada:

Inibidor	Tipo de Inibição	K_i (mM)
Metil- α -glicosídeo	Competitiva	89
Metil- α -manosídeo	Competitiva	6,2
Amigdalina	Competitiva	0,21
Prunasina	Competitiva	0,92
Mandelonitrila	Competitiva	1,14
Gentiobiose	N.I. ¹	-
Florizina	Acompetitiva hiperbólica	0,09
Floretina	Não competitiva	0,03
Tris	Competitiva	0,55
1,10 fenantrolina	N.I. ¹	-
Salicina	Competitiva	19

¹ N.I.: não inibe

Metil- α -glicosídeo, Metil- α -manosídeo e salicina são inibidores competitivos da enzima (Fig. 10), sendo que o manosídeo inibe bem mais que o glicosídeo. (Tab. IV).

Amigdalina, Prunasina e Mandelonitrila também são inibidores competitivos, sendo que a Amigdalina (glicose- β -1,6-glicose- β -mandelonitrila) é um inibidor bem mais eficiente que a Prunasina (glicose- β -mandelonitrila) ou a Mandelonitrila. Por outro lado gentiobiose (glicose- β -1,6-glicose) não inibe a enzima em concentrações de até 2 mM (Tab. IV).

Floretina, o aglicone de florizina, é um inibidor não competitivo linear simples com um K_i de 0,029 mM (Fig. 11), sendo que florizina é um inibidor incompetitivo hiperbólico com $\alpha=\beta=0,35$ e com K_i de 0,087 mM (Fig. 12). Portanto, enquanto o glicosídeo (florizina) se liga somente ao complexo enzima substrato não impedindo completamente a formação de produto, o aglicone (floretina) se liga a uma porção da enzima diferente do sítio ativo e impede a formação de produto.

A **B**

Figura 10:

A: Plotes de Lineweaver-Burk para a inibição da trealase purificada por salicina.

B: Replote da inclinação do plote de Lineweaver-Burk em função da concentração de salicina.

C: Esquema cinético de um inibidor competitivo linear simples.

A **B**

Figura 11:

A: Plotes de Lineweaver-Burk para a inibição da trealase purificada por floretina

B: Replote da inclinação do plote de Lineweaver-Burk em função da concentração de floretina.

C: Esquema cinético de um inibidor não competitivo linear simples.

A **B**

Figura 12:

A: Plote de Lineweaver-Burk para a inibição de trealase purificada por florizina.

B: Replote da inclinação dos plotes de Lineweaver-Burk em função da concentração de florizina.

C: Esquema cinético de inibidor tipo acompetitivo hiperbólico.

Tris em pH 9,0 é um inibidor competitivo linear simples da enzima com um K_i de 0,55 mM, enquanto em pH 6,0 a enzima não foi inibida por Tris (Fig. 13). Ausência de inibição também foi detectada quando 1,10 fenantrolina foi usada como inibidor.

Foram realizados experimentos de inibição múltipla usando como inibidores mandelonitrila (inibidor competitivo da enzima) e floretina (inibidor não competitivo da enzima), e o plote $1/V$ versus $[I]/K_i$ resultou em retas paralelas indicando assim que $\alpha = \infty$ (Fig. 14A). Isto significa que os dois inibidores seriam totalmente excludentes, só podendo um deles ligar-se a enzima de cada vez..

Foi realizado o experimento de inibição múltipla usando Tris e amigdalina que são inibidores competitivos da enzima e o plote $1/V$ versus $[I]/K_i$ resultou em um conjunto de retas paralelas, indicando que $\alpha = \infty$, portanto os inibidores seriam excludentes (Fig. 14B), ligando-se um ou outro a enzima.

Outro experimento de inibição múltipla foi realizado usando Tris e mandelonitrila, ambos também inibidores competitivos da enzima; o plote $1/V$ versus $[I]/K_i$ resultou num conjunto de retas interceptantes, indicando que eles estão se ligando em locais diferentes dentro do sítio ativo (Fig. 14C).

A fim de verificar quais são os grupos presentes no sítio ativo da enzima foram realizados experimentos de modificação química da enzima usando EDC, DEPC, p-hidroximercuriobenzoato, iodoacetato, TNM e fenilglioxal como modificadores.

Na modificação química o modificador se liga covalentemente à enzima inativando-a. EDC modifica grupos sulfidríla, carboxila e fenol; DEPC modifica grupos imidazol; p-hidroximercuriobenzoato e iodoacetato modificam grupos sulfidríla; fenilglioxal modifica grupos guanidino e TNM modifica grupo fenol.

Quando a enzima foi incubada com EDC em pH 6,0; observou-se a modificação da enzima e conseqüente queda da atividade enzimática e quando a reação de modificação se deu na presença de trealose na concentração de $10 K_m$ houve uma proteção parcial da enzima (Fig. 15). Quando realizamos a modificação numa faixa de pH entre 5,0 e 7,0 foi possível estimar um pK de 4,87 (Fig. 16).

Figura 13A: Inibição da trealase purificada por Tris em pH 9,0. O gráfico mostra o plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de Tris, e o incerto mostra o replote da inclinação versus concentração de Tris.

Figura 13B: Trealase purificada na presença de várias concentrações de Tris em pH 6,0. O gráfico mostra o plote de Lineweaver-Burk para diferentes concentrações de Tris.

A

B

C

Figura 14:

A: Inibição Múltipla da trealase purificada, usando como inibidores Mandelonitrila e Floretina.

B: Inibição Múltipla da trealase purificada, usando como inibidores TRIS e Amigdalina.

C: Inibição Múltipla da trealase purificada, usando como inibidores TRIS e Mandelonitrila.

Figura 15: Modificação da trealase por EDC e glicina etil éster a 30°C. O experimento foi realizado na ausência (◆) e presença (■) de trealose numa concentração igual a 10 K_m .

Figura 16: Efeito do pH na inativação da trealase por EDC. As constantes de segunda ordem (k_{obs}) foram calculados a partir das constantes de primeira ordem determinadas através da inclinação de plotes similares aos da figura 15.

A enzima incubada com DEPC numa concentração de 3 a 10 mM não apresentou alteração na sua atividade, mas quando a enzima foi incubada com DEPC na presença de metil- α -glicosídeo numa concentração igual a 2 K_i foi observada modificação da enzima e conseqüente queda de atividade enzimática (Fig. 17). Quando a reação de modificação se deu na presença de trealose na concentração de 10 K_m houve a proteção total da enzima, mesmo na presença de metil- α -glicosídeo. A inativação causada pelo DEPC é parcial, reduzindo cerca de 40 % da atividade enzimática.

Quando a enzima é incubada com p-hidroximercuribenzoato numa concentração de 0,75 mM, ou com iodoacetato numa concentração igual a 20 mM, ou ainda com TNM numa concentração de 5 mM não apresenta nenhuma alteração em sua atividade. Já quando a enzima foi incubada com fenilglioxal 12,5 mM, foi observada e queda da atividade enzimática (Fig. 18), para o resíduo de arginina modificado com fenilglioxal foi determinado um pK de 7,84 (Fig. 19).

A ordem de reação de inativação em relação ao modificador foi determinada para EDC e fenilglioxal, a partir do plote de $\log k_{obs}$ (constante de segunda ordem da reação de modificação) versus o $\log$ da concentração do modificador. Para EDC n (número aparente de moléculas de modificador com o sítio ativo da enzima) foi igual a $0,86 \pm 0,02$, para fenilglioxal n foi igual a $1,6 \pm 0,15$.

O efeito do pH no $V_{m\acute{a}x}$ e K_m da trealase sugere a existência, no sítio ativo, de um grupo desprotonado de pK_{e1} igual a 4,47 e um grupo protonado de pK_{e2} igual a 8,01, enquanto o complexo enzima substrato tem pK_{es1} igual a 4,83 e pK_{es2} igual a 7,59 (Fig. 20) sendo que, a enzima possui um pH ótimo igual a 7,0 (resultados não mostrados).

Figura 17 A: Modificação da trealase por DEPC a 30°C na presença de metil- α -glucosídeo numa concentração igual a 2 K_m. O experimento foi realizado na ausência (♦) e presença (■) de trealose numa concentração igual a 10 K_m.

Figura 17 B: Modificação da trealase por DEPC a 30°C. O experimento foi realizado na ausência (♦) e presença (■) de trealose numa concentração igual a 10 K_m.

Figura 18: Modificação da trealase por fenilgloxal a 30°C. O experimento foi realizado na ausência (◆) e presença (■) de trealose numa concentração igual a 10 K_m .

Figura 19: Efeito do pH (faixa 7-9) na inativação da trealase por fenilgloxal. As constantes de segunda ordem (k_{obs}) foram calculados a partir das constantes de primeira ordem determinadas através da inclinação de plotes similares aos da figura 18.

Figura 20: Efeito do pH no $V_{\max\text{app}}$ a 30°C. Os pontos são experimentais e a curva foi calculada (através do programa enziffiter) depois que os valores de pK_{e1} e pK_{e2} foram computados.

3.5. Inibição das trealases de diferentes insetos por glicosídeos tóxicos produzidos por plantas:

Como trealose é o açúcar circulante em insetos e a trealase já foi descrita em diferentes órgãos como corpo gorduroso, hemolinfa, músculo do voo e intestino, ela é uma enzima essencial ao metabolismo dos insetos (Bounias et al., 1993).

Uma vez que florizina inibe trealose renal de mamífero (Nakano & Sacktor, 1984) decidimos verificar o efeito de vários β -glicosídeos produzidos por plantas nas diferentes trealases de insetos. Para isto foram utilizados os seguintes insetos:

- *Periplaneta americana* (Dictyoptera)
- *Tenebrio molitor* (Coleoptera)
- *Musca domestica* (Diptera)
- *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)
- *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera)

Estes insetos foram criados e dissecados como descrito no material e métodos, e deles foram retirados os seguintes órgãos:

- Carcaça
- Túbulos de Malpighi
- Epitélio do ventrículo
- Corpo gorduroso
- Hemolinfa
- Conteúdo do ventrículo

A carcaça, os túbulos de Malpighi, o epitélio do ventrículo, o corpo gorduroso e conteúdo do ventrículo foram homogeneizados e centrifugados, sendo que tanto o sobrenadante quanto o precipitado rehomogeneizado da carcaça, dos túbulos de Malpighi, do epitélio do ventrículo e do corpo gorduroso foram usados no experimento, enquanto apenas o sobrenadante do conteúdo do ventrículo foi utilizado no experimento. A hemolinfa foi apenas centrifugada e apenas a fração solúvel foi utilizada nos experimentos.

Foram usados como inibidores 0,5 mM de amigdalina, 0,5 mM de prunasina, 0,5 mM de mandelonitrila e 0,05 mM de florizina, sendo que amigdalina e seus derivados

prunasina e mandelonitrila são glicosídeos cianogênicos: a mandelonitrila quando liberada espontaneamente produz cianeto ou ácido prússico, o qual inibe a cadeia respiratória. Florizina é um conhecido inibidor de transportadores de açúcar do epitélio do intestino de mamífero (Vetter J., 2000).

Em alguns ensaios enzimáticos na presença de florizina não foi possível determinar a atividade enzimática, devido a precipitação de compostos no meio de reação, provavelmente porque a florizina foi hidrolisada por β -glicosidases, presentes no tecido, liberando o aglicone floretina o qual é somente solúvel em etanol. Foi calculada a atividade enzimática tanto no controle quanto nos experimentais, sendo estes o resultado da média da atividade dos três lotes de animais usados; a variação obtida em todos os experimentos foi no máximo de 20 %.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 21. Quando o experimento foi realizado com *P. americana* todos os órgãos onde foi detectada atividade enzimática de trealase têm suas formas de trealase inibidas por glicosídeos tóxicos não tendo sido verificada atividade enzimática de trealase na fração particulada do corpo gorduroso e na fração solúvel conteúdo do ventrículo.

Em *T. Molitor* os locais mais atingidos foram a fração particulada e a fração solúvel da carcaça, a fração particulada e a fração solúvel de epitélio do ventrículo, a fração particulada do corpo gorduroso e a fração solúvel do conteúdo do ventrículo e da hemolinfa.

Em *M. domestica* os locais mais atingidos foram: a fração particulada e a fração solúvel dos túbulos de Malpighi; a fração particulada do corpo gorduroso e a fração solúvel da hemolinfa e do conteúdo do ventrículo. Não foi detectada atividade enzimática de trealase na fração solúvel da carcaça, foi verificada a perda total da atividade enzimática de trealase na fração particulada do epitélio do ventrículo (a qual é duas vezes maior que na fração solúvel) e na fração solúvel do conteúdo do ventrículo; além disso, foi observada 20% de perda da atividade enzimática de trealase na fração solúvel do epitélio do ventrículo.

Em *S. frugiperda* o local mais atingido foi à fração solúvel e a fração particulada do epitélio do ventrículo.

Em *D. Saccharalis* não foi detectada a atividade enzimática de trealase no epitélio do ventrículo, no corpo gorduroso e na hemolinfa. Nesse inseto em nenhum local a atividade de trealase foi extremamente afetada pelos inibidores.

Certamente há trealase no epitélio do ventrículo, na hemolinfa e no corpo gorduroso de *D. saccharalis* e o fato de não ter sido detectada atividade se deve ao fato da enzima, na quantidade utilizada ter pouca atividade ou necessitar de alguma substância para a sua ativação ou estabilização.

A) *Periplaneta americana*:

B) *Tenebrio molitor*:

C) *Musca domestica*:

D) *Spodoptera frugiperda*:

E) *Diatraea saccharalis* :

Figura 21: Inibição das trealases presentes em diferentes regiões de insetos de diferentes ordens.

- SC= sobrenadante da carcaça, PC= precipitado da carcaça, SM= sobrenadante dos túbulos de Malpighi, PM= precipitado dos túbulos de Malpighi, SEV= sobrenadante do epitélio do ventrículo, PEV= precipitado do epitélio do ventrículo, SCG= sobrenadante do corpo gorduroso, PCG= precipitado do corpo gorduroso, SH= sobrenadante da hemolinfa, SCV= sobrenadante do conteúdo do ventrículo.

- * = Não foi possível determinar a atividade enzimática devido a precipitação no ensaio.

4. DISCUSSÃO

4.1. Distribuição da atividade trealásica no intestino médio:

Para verificarmos qual a melhor fonte de material para a purificação de trealase, sua atividade foi determinada em diferentes partes do intestino médio. Diferente do que é observado para outras enzimas de *S. frugiperda* (Ferreira et al., 1994) a trealase está presente em quantidades aproximadamente iguais na região anterior, média ou posterior. Isso é verdade tanto para a enzima presente na fração solúvel como aquela ligada a membrana (Tabela I). Desse modo o melhor material a ser usado é o ventrículo como um todo, não sendo necessário isolar-se somente uma das regiões (anterior, média ou posterior).

Quanto a trealase de *S. frugiperda* que exibe maior atividade, os resultados mostram que é a forma solúvel. Ela corresponde à cerca de 90% da atividade presente no ventrículo, estando só cerca de 10% ligada a membrana.

Esse fato, aliado ao passo adicional de solubilização a que tem que ser submetida a enzima de membrana nos levou a optar por dar ênfase inicialmente na caracterização da enzima solúvel.

4.2. Solubilização da trealase ligada à membrana:

Os experimentos de solubilização da trealase ligada à membrana mostraram que para todos os controles, houve uma solubilização da trealase que varia de 69 a 79%. Esse valor é curiosamente próximo, uma vez que as condições de pH, tempo e temperatura de incubação variam (ver materiais e métodos).

Uma hipótese poderia ser que uma parte da enzima está mais frouxamente interagindo com a membrana e qualquer que seja a manipulação a que ela é submetida essa fração é solubilizada. O que vai contra essa hipótese é o fato dessa enzima não ter sido já liberada da membrana quando a fração particulada total foi obtida.

Alternativamente, a atividade que é liberada no controle poderia corresponder a trealase solúvel que não teria sido liberada somente pelo fato do tecido ser congelado e descongelado várias vezes. Essa hipótese também não parece muito viável.

Seria interessante comparar as propriedades das enzimas (solubilizadas em cada tratamento) entre si; com aquela que já é solubilizada na preparação da fração particulada e com a do material particulado para tentar-se ter uma melhor idéia do que está ocorrendo.

Aparentemente a liberação dessa enzima da fração particulada leva a um aumento da sua atividade. Isso parece ser plausível uma vez que nos tratamentos com papaína, fosfolipase e CHAPS a atividade total no material experimental é maior que no controle (resultados não mostrados). Uma vez que o valor do incremento de atividade está em torno de dois, é tentador especular que essa enzima esteja presente em uma membrana que não seja microvilar e que esse acréscimo se deve pelo fato das membranas (exceto a microvilar) selarem com qualquer uma das superfícies voltadas para fora. Desse modo ao formarem-se as vesículas de membrana após a homogeneização do tecido, somente 50% das enzimas estariam acessíveis ao substrato.

O aumento mencionado acima não é visto na preparação com Triton x-100 porque aparentemente este inativa a enzima (resultados não mostrados).

Nos mamíferos a trealase é ligada a membrana por uma âncora de GPI (glicosil fosfatidil inositol), (Van Beers et al., 1995). E nos nemátodes o fato dela não ser solubilizada por proteinase é um indício de que o mesmo pode estar ocorrendo (Behm, 1997). Em *Spodoptera frugiperda* não sabemos ainda como a trealase ligada a membrana está ancorada, pois tanto fosfolipase quanto papaína e detergentes solubilizaram a enzima do mesmo modo.

4.3. Caracterização cinética da trealase solúvel:

Quando usamos como inibidores metil- α -glicosídeo e metil- α -manosídeo (inibidores competitivos lineares simples da trealase) obtivemos um K_i de 89 mM e 6,2 mM, respectivamente. A diferença entre glicose e manose está na posição da hidroxila ligada ao C2, que na manose está na posição axial, enquanto na glicose essa hidroxila

está na posição equatorial. Assim, essa região de ligação do substrato ao sítio ativo deve ser de grande importância, pois a mudança na posição da hidroxila ligada ao C2 do monossacarídeo que se liga ao sítio do glicone causa um aumento de vinte vezes na afinidade da enzima pelo inibidor.

Tanto os glicosídeos cianogênicos amigdalina (glicose- β -1,6-glicose- β -mandelonitrila) e prunasina (glicose- β -mandelonitrila) quanto o aglicone mandelonitrila são inibidores competitivos da trealase purificada. O K_i obtido para eles foi de respectivamente 0,21 mM, 0,92 mM e 1,14 mM, o que indica que todos são bons inibidores, se lembrarmos que o K_m da enzima para trealose é de 0,37 mM. Experimentos utilizando gentiobiose como inibidor (glicose- β -1,6-glicose) não mostraram inibição, embora a concentração usada desse dissacarídeo tenha sido a mesma empregada nos experimentos para determinar o K_i de amigdalina, prunasina e mandelonitrila. Uma vez que trealase apresentou um K_i de 0,21 mM para amigdalina e não foi inibida por gentiobiose (ambas tem uma porção comum só diferenciando na presença de mandelonitrila na amigdalina) parece que um grupo hidrofóbico nas cercanias do sítio ativo favoreceria a ligação.

Além do mais com o experimento de inibição múltipla foi verificado que mandelonitrila (inibidor competitivo simples) e floretina (inibidor não competitivo) se ligam a um mesmo local na enzima. Assim, mandelonitrila isolada talvez esteja se ligando numa região próxima ao sítio ativo, a ponto de impedir a ligação do substrato. A ligação da mandelonitrila nessa região deve causar uma alteração conformacional que permite que a glicose- β -1,6-glicose se ligue também e por isso amigdalina (glicose- β -1,6-glicose- β -mandelonitrila) liga-se bem a trealase (com um K_i de 0,21 mM), enquanto gentiobiose (glicose- β -1,6-glicose) não se liga à enzima. O fato do K_i da amigdalina (0,21 mM) ser maior que o da mandelonitrila (1,14 mM) seria devido à energia de ligação adicional dada pelas duas glicoses presentes na amigdalina.

Diante dos fatos descritos acima nos parece que poderia haver uma bolsa hidrofóbica adjacente ao sítio ativo, ao qual o grupo hidrofóbico da amigdalina (mandelonitrila) estaria se ligando e assim aumentando a afinidade da enzima pelo inibidor, e ao qual estaria se ligando a floretina na inibição múltipla. Assim, a trealase possuiria um sítio para ligação de grupos hidrofóbicos que estaria próximo ao sítio ativo da enzima. Um sítio para a ligação de grupos hidrofóbicos já foi descrito anteriormente

por Alvarado (1967) em transportadores de açúcar do intestino de mamíferos, utilizando florizina e floretina como inibidores e na trealase renal de coelho (Nakano & Sactor, 1984).

Como dito anteriormente, Tris inibe competitivamente a trealase intestinal de rato (Chen et al., 1987) e protege a enzima da inativação por um modificador de grupos carboxila. Os autores mostraram que Tris é um bom inibidor em pH 6,0 ou em pHs maiores enquanto em pH 5,0 ou menores a inibição cai muito ou é ausente. Eles concluem que um carboxilato do sítio ativo seja essencial para a ligação do Tris e como um dos grupos envolvidos em catálise parece ter pK de 4,8 mencionam a possibilidade do Tris estar se ligando a ele. Na trealase de *R. americana* Tris protonado é um inibidor competitivo linear simples que se liga mais que o Tris desprotonado que é um inibidor não competitivo interceptante, e portanto permite que o substrato se ligue embora com mais dificuldade (Terra et al., 1978). Esses resultados levaram ambos os grupos descritos acima proporem a existência de uma carga negativa a qual o Tris estaria se ligando.

Esse parece não ser o caso na trealase de *S. frugiperda* onde não há inibição do Tris a pH 6,0. Além disso, o K_i obtido para a enzima de *S. frugiperda* (0,55 mM) é bem menor que o encontrado na trealase renal de rato em pH 6,0 (4 mM) e na trealase intestinal de *R. americana* em pH 6,0 (74 mM) e em pH 9,0 (182 mM). O Tris neste caso deve estar interagindo com a enzima não através de um grupo carregado, mas possivelmente fazendo pontes de hidrogênio com suas hidroxilas. Como Tris protonado não interage com a enzima, ele possivelmente está ligando-se a uma região do sítio ativo que poderia apresentar um grupo protonado em pHs em torno de 6,0, talvez o resíduo de arginina.

A ausência da inibição da trealase de *S. frugiperda* por Tris em pH 6,0 foi para nós surpreendente. Esse fato levou-nos a pensar se o Mg^{2+} que sempre está presente poderia falsear alguns dos nossos resultados. A trealase de *S. frugiperda* perde a atividade quando Mg^{2+} não está presente nos passos de purificação ou se ele é removido por diálise. Pretendemos verificar se a enzima após ser dialisada recupera sua atividade após uma aplicação de Mg^{2+} e também se uma diálise na presença de substrato (adicionado também ao tampão de diálise) estabiliza a enzima. Caso esse último evento ocorra poderíamos verificar se o Mg^{2+} está interferindo na inibição por Tris a pH 6,0,

embora provavelmente não fosse possível determinar o K_i , pois não saberíamos as concentrações exatas de substrato.

Foi também surpreendente o fato de florizina ser um inibidor incompetitivo hiperbólico. Como os outros glicosídeos são inibidores competitivos da trealase, imaginávamos que este também seria o caso para florizina. A inibição incompetitiva hiperbólica significa que o sítio para ligar florizina só é exposto após a ligação do substrato, e embora a florizina dificulte, não impede a formação de produto. Floretina, que é igual a florizina exceto pela ausência da glicose, é um inibidor não competitivo linear simples. As hipóteses que conseguimos aventar são de que a floretina se ligue na região hidrofóbica próxima ao sítio ativo onde ligaria também a mandelonitrila. Devido a isso mandelonitrila e floretina são inibidores excludentes. Essa região não tem espaço suficiente para acomodar a florizina; espaço esse que aparece quando a enzima sofre alguma mudança conformacional, mesmo que pequena, ao se ligar ao substrato. Alternativamente, a florizina (do mesmo modo que a floretina) poderia ser um inibidor não competitivo, embora não do tipo simples. Quando há inibição não competitiva hiperbólica e α e β são menores que 1, o cruzamento das retas no plote de Lineweaver-Burk ocorre no quadrante III. Quanto mais distante do eixo essas retas se cruzarem mais aparentariam ser paralelas no primeiro quadrante. Desse modo, as duas substâncias (florizina e floretina) poderiam estar ligando na mesma região, só que a presença da glicose ligada à floretina deve fazer com que a ligação desta seja um pouco diferente, permitindo a atividade parcial da enzima.

A ligação de substâncias na região do sítio ativo parece realmente levar a alguma alteração conformacional que expõe uma outra região da enzima. Isso é confirmado pela observação de que DEPC não afeta a atividade da enzima livre, mas passa a inativá-la quando metil- α -glicosídeo está presente, (Fig. 16). Como o metil- α -glicosídeo é um inibidor competitivo da trealase e a trealose protege a enzima da inativação por DEPC podemos dizer que embora haja dois subsítios de ligação para glicose, o metil- α -glicosídeo liga-se sempre ao mesmo sub-sítio. Além disso, a histidina deve estar no outro subsítio. Se essa suposição e aquela sobre a ligação do Tris forem corretas, inativação por DEPC na presença de metil- α -glucosídeo e Tris poderia indicar se a Histidina encontra-se próxima da arginina.

Como o DEPC diminui a atividade da enzima em somente 40 %, essa histidina que está sendo modificada não é essencial para a catálise.

4.4. Resíduos de aminoácidos presentes na região do sítio ativo:

Várias glicosidases possuem duas carboxilas envolvidas em catálise e a presença destes mesmos grupos no sítio ativo da trealase foi sugerido por Terra et al. em 1978, estudando a trealase do intestino de *Rhynchosciara americana*. Essa proposição foi baseada na determinação cinética dos pK desses grupos e na verificação de que a entalpia de ionização do grupo e seu comportamento frente à alteração na constante dielétrica do meio era mais condizente com uma carboxila. Esses mesmos experimentos e argumentos foram repetidos por Lee et al. em 2001 usando uma trealase purificada de adultos de *Apis mellifera*.

A modificação da trealase de *R. americana* por carbodiimida (modificador de grupo carboxila nas condições usadas no experimento) era protegida parcialmente por 100 K_i de sacarose (inibidor competitivo) em pHs mais baixos, mas nenhuma proteção foi observada em pH 6,9 (Terra et al., 1979a). Isso levou os autores a proporem que a carboxila protonada estaria nas cercanias do sítio ativo e talvez funcionasse no passo de protonação através de outro resíduo de aminoácido, de modo semelhante ao que ocorre com a catálise das serina-proteinases. Entretanto essa possibilidade não foi pesquisada por esses autores.

Um candidato a ser o grupo doador de prótons na trealase é a histidina, uma vez que seu pK está próximo do encontrado para o doador de prótons das trealases (pK entre 7,2 e 8,6). Além disso, resíduos de histidina são responsáveis pela catálise em algumas glicosídeo hidrolases e a trealase de *Lymantria dispar* é inativada por DEPC (Valaitis & Bowers, 1993). Lee et al. (2001) dizem que a trealase de *Apis mellifera* foi modificada EDC e DEPC, embora não mostrem os resultados.

A trealase solúvel de *S. frugiperda* tem como pK dos grupos protótipicos da enzima livre (pK_e) 4,83 e 7,59 e da enzima ligada ao substrato (pK_s) 4,47 e 8,01. A diferença no pK₁ (0,3 unidades) pode ser devido a uma variação experimental, mas a diferença no pK₂ (0,6 unidades) talvez reflita uma alteração real. Essa alteração pode ser

devido à mudança conformacional que a enzima sofre ao ligar-se ao substrato, a qual faz com que a florizina se ligue e que leva a alteração na posição relativa nos resíduos de aminoácidos quando metil- α -glicosídeo se liga a enzima.

Nós verificamos há presença de um resíduo de arginina, um resíduo modificado por EDC e um resíduo de histidina.

EDC modifica grupo sulfidríla, resíduos de tirosina e resíduos de carboxilas. Como agentes que modificam grupos sulfidríla (iodoacetato e p-hidroximercuriobenzoato) não modificam a enzima e agentes que modificam resíduos de tirosina (TNM) também não modificam a enzima, EDC só pode estar modificando carboxilas. Além do mais, como é observada uma proteção parcial da enzima, quando a reação de modificação se dá na presença de trealose, a carboxila pode estar próxima ou no sítio ativo.

O pK estimado por modificação da enzima com EDC é de 4,87, o que é muito próximo do valor obtido cineticamente ($pK_{e1}=4,83$), portanto o grupo com pKa em torno de 4,8 deve ser uma carboxila.

Quando o efeito do pH na modificação por fenilglioxal é determinado, obtém-se um pK de 7,84. O fato do pK_{e2} determinado cineticamente ser de 8,1, indica que o doador de prótons pode ser uma arginina, o que nunca foi proposto para trealases.

Através do experimento da ordem de reação em relação a EDC verificamos que n é igual a 0,86, assim apenas uma molécula de EDC ligando-se à enzima é capaz de inativá-la.

A ordem de reação em relação a fenilglioxal é 1,6. Não temos explicação para a obtenção de 1,6 como ordem de reação. Entretanto números diferentes têm sido obtidos quando fenilglioxal é usado como modificador. Konishi e Fujioba (1987) trabalhando com glicina metil transferase de rato obtiveram uma ordem de reação de 1,05 com fenilglioxal. Sandro Marana, em comunicação pessoal relatou que modificando a β -glicosidase de Mr 50.000 de *Spodoptera frugiperda* (Marana et al., 2001). com fenilglioxal ele encontrou uma ordem de reação igual a 1,8. Entretanto, realizando mutações sítio dirigidas dessa enzima ele removeu um determinado resíduo de arginina e não havia mais modificação por fenilglioxal, demonstrado que a alteração na atividade enzimática era devido a um só resíduo de arginina.

Sabe-se que uma molécula de fenilglioxal reage com arginina (Konishi e Fujioba, 1978) e que o complexo tem uma estabilidade que depende muito do pH como mostrado por Takahashi (1968). Esse autor mediu uma meia vida de 24h a pH 5,5; 45 minutos a pH 7,0 e menos de 15 minutos a pH 8,0 e 9,0; todas as medidas feitas a 25°C. Como os pHs de ensaio podem ser diferentes, isso talvez possa estar causando reversibilidades diferentes e os dados estarem sendo falseados, indicando uma maior quantidade de fenilglioxal do que é realmente necessário para a modificação.

4.5. Inibição das trealases por glicosídeos tóxicos produzidos por plantas:

O fato de amigdalina (e seus derivados prunasina e mandelonitrila) e florizina inibirem a trealase pode ser um indício de que os glicosídeos cianogênicos liberados pelas plantas para proteção contra os insetos podem estar atuando de forma mais drástica do que o imaginado. Uma vez que trealase é uma enzima essencial ao metabolismo dos insetos e como esses glicosídeos podem não estar atuando apenas na trealase intestinal como também nas demais trealases dos insetos, todas as funções metabólicas estariam sendo prejudicadas. É interessante enfatizar que sempre foi dito na literatura que os aglicones são bem mais tóxicos que os glicosídeos. No que se refere especificamente às trealases nem sempre essa é a situação. Algumas das trealases são inibidas mais pelo glicosídeo (amigdalina ou prunasina) do que pelo seu aglicone (mandelonitrila). Isso é observado principalmente nas trealases de *P. americana* e em várias de *M. domestica* (Figura 21). Talvez isso ocorra porque *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, só alimentam-se de vegetais e talvez por isso estejam melhores adaptados à ingestão de glicosídeos tóxicos.

Uma vez que a produção do aglicone pode não ocorrer ou ocorrer só parcialmente, ter enzimas susceptíveis somente a ele seria mais vantajoso para o inseto do que ter suas enzimas afetadas também pelo glicosídeo.

Apesar de ter sido verificada a inibição das formas de trealase dos órgãos de diferentes ordens de insetos, não se sabe se estes glicosídeos tóxicos estariam sendo absorvidos pelas células do intestino dos insetos e a partir daí alcançariam os demais órgãos. Em mamíferos foi verificado que amigdalina, prunasina e vicina são

transportadas intactas através do intestino evertido de porco (Gopalan, 1992). Entretanto, em insetos nenhum estudo desse tipo foi feito. O conhecimento de que órgãos são atingidos pelo glicosídeo e/ou aglicone é fundamental para que saibamos se esse efeito que nós verificamos nas trealases ocorre “in vivo”.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Alvarado F. (1967). **Hypothesis for the interaction of phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars.** Biochem. Biophys. Acta 135, 483-495.
- Asano N., Kato A. & Matsui K. (1996a). **Two subsites on the active center of pig kidney trehalase.** Eur. J. Biochem. 240, 692-698.
- Asano N., Kato A., Kizu H., Matsui K., Watson A.A & Nash R.J. (1996b) **Calystegine B4, a novel trehalase inhibitor from *Scopolia japonica*.** Carb. Res. 293, 195-204.
- Azuma M. & Yamashita O. (1985). **Cellular localization and proposed function of midgut trehalase in the silkworm larva, *Bombyx mori*.** Tissue and cell 17, 539-551.
- Bauer L.S. (1995). **Florida Entomol.** 78, 414-443.
- Bhem C. A. (1997). **The role of trehalose in the physiology of nematodes.** Int. J. Parasitol. 27, 215-229.
- Bounias M., Bahjou A., Gordoux L. & Moreau R. (1993). **Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide.** Biochem. Molec. Biol. Int. 31, 249-266.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987). **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.** Electrophoresis 8, 93-99.
- Castro A. G., Tunnacliffe A. (2000). **Intracellular trehalose improves osmotolerance but not desiccation tolerance in mammalian cells.** Febs letters 487, 119-202.

- Chen C.C., Guo W.J.Y., Isselbacher K. J. (1987). **Rat intestinal trehalase**. *Biochem. J.* 274, 415-424.
- Cristofolletti P. T., Terra W. R. (1999). **Specificity, anchoring, and subsites in the active center of a microvillar aminopeptidase purified from *Tenebrio molitor* (Coleoptera) midgut cells**. *Ins. Biochem. and Mol. Biolo.* 29, 807-819.
- Dahlqvist A. (1968). **Assay of intestinal dissaccharidases**. *Analyt. Biochem.* 22, 99-107.
- Desroches, P., Mandon, N., Beaeher, J.C., Huignard, J., (1997). **Mediation of host-plant use by a glucoside in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera; bruchidae)**. *J. Insect. Physiol.* 43, 439-446.
- Espinoza-Fuentes F.P., Ferreira C. & Terra W.R. (1984). **Spatial organization of digestion in the larval and imaginal stages of the sciarid fly *Trichosia pubescens***. *Insect Biochem.* 14, 631-638.
- Espinoza-Fuentes F.P & Terra W.R. (1987). **Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut**. *Insect Biochem.* 17, 809-817.
- Ferreira C., Parra J.R.P. & Terra W.R. (1997). **The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidase from *Spodoptera frugiperda* and *Diatrea saccharalis***. *Inset. Biochem. Physiol.* 119B, 219-225.
- Ferreira C., Capella A.N., Sitnik R. & Terra W.R. (1994). **Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae**. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 26 229-331.

- Gopalan V., Pastuszyn A., Galey W. R. Jr., and Glew R. H. (1992). **Exolytic hydrolysis of toxic plant glycosides by guinea pig liver cytosolic β -glucosidase**. J. Biol. Chem. 267, 14027-14032.
- Harvey W. R., Cioffi M. & Wolfersbeger M. G. (1983). **Chemiosstatic potassium ion pump of insect epithelia**. Am. J. Physiol. 224, 163-175.
- Henrissat B. (1991). **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities**. Biochem. J. 280, 309-316.
- Henrissat B. & Bairoch A. (1993). **New families on the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities**. Biochem. J. 293, 781-788.
- Henrissat B. & Romeu A. (1995). **Families, superfamilies and subfamilies of glucosyl hydrolases**. Biochem J. 311, 309-316.
- Hiraoka T., Hayakawa Y. & Downer R.G.H. (1995). **Immunocytochemical localization of trehalase inhibitor in some insect species**. Cell Tissue Res. 279, 465-468.
- Ishihara R., Taketani S.; Sasai-Takedatsu M.; Kino M.; Tokunaga R. & Kobayshi Y. (1997). **Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase**. Gene 202, 69-74.
- Jordão B. P., Capella A., Terra W. R. & 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.
- Kadowaki M.K., Polizeli M.L.T.M., Terenzi H.F. & Jorge J.A. (1996). **Characterization of trehalase activities from the termophilic fungus *Scytalidium thermophilum***. Biochim. Biophys Acta 129, 199-205.

- Kato A., Adachi I., Miyauchi M., Ikeda K., Komae T., Kizu H., Kameda Y., Watson A.A., Nash R.J., Wornald M.R., Fleet G.W.J. & Asano N. (1999). **Polyhydrolylated pyrrolidine and pyrrolizine alkaloids from *Hyacinthoides non-scripta* and *Scilla campanulata***. Carb. Res. 316, 95-103.
- Knuesel I., Murao S., Shin T., Amachi T. & Kayser H. (1998). **Comparative studies of suidatrestin, a specific inhibitor of trehalase**. Comp. Biochem. Physiol. 120B, 639-646.
- Konishi K., Fujioka M. (1987). **Chemical modification of a functional arginine residue of rat liver glycine methyltransferase**. Biochemistry 26, 8496-8502.
- Krystal G., Macdonald C., Munt B. Ashwell S., (1985). **A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding**. Analytical Biochemistry 148, 451-460.
- Laemmli, U.K., (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄**. Nature 227, 680-685.
- Lee J., Tsuji M., Nakamura M., Nishimoto M., Okuyama M., Mori H., Kimura A., Matsui H., and Chiba S. (2001). **Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase**. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65 (12), 2657-2665.
- 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.
- McGaughy W.H. & Whalon M.E. (1992). **Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. Science 258, 1451-1455.

- Nakano M. & Sacktor B. (1984). **Renal Trehalase: two subsites at the substrate-binding site.** Biochim. Biophys. Acta. 791, 45-49.
- Pan Y.T., Ghidoni J. & Elbein A.D. (1993). **The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase.** Arch. Biochem. Biophys. 303, 134-144.
- Parra J.R.P. (1986). **Criação de insetos para estudos com patógenos.** In Alvez SB (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Editora Monole. 348-373.
- Parra J.R.P. & Mihsfeldt L.J. (1992). **Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer.** In: Anderson T.E.; Leppla N.C. (Eds). Advances in insect rearing for research and pest management. Boulder, Co: Westview Press
- Parra, J.R.P., Paterniani E., Marcos Filho J. & Machado Neto R. (2002). **Ária of Agrarian sciences.** In Science in Brazil, organized by Carvalho A.C.C., Campos D.A. & Bevilacqua L. Academia Brasileira de ciências, Rio de Janeiro.
- Ribeiro A.F., Ferreira C. & Terra W.R. (1990). **Morphological basis of insect digestion.** In Mellinger, J.(Ed). Animal nutrition and tranport processes. Vol. I. Karger, Basel 96-105.
- Ross H.H., Ross C.A.& Ross J.R.P (1982). **A textbook of entomology.** 4th Edition. John Wiley and sons, New York
- Santos C. D. & Terra W.R., (1986). **Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from Erinnyes ello larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane.** Insect Biochem. 16, N^o4, 691-700.
- Segel, I.H. (1975). **Enzyme kinetics.** Wiley, New York.

- Spencer, K.C. (1988). **Chemical mediation of coevolution in the *Passilora-Heliconius* interaction.** In: Spencer, K.C. (Ed.) Chemical mediation of coevolution. Academic Press, Inc. pp 167-240.
- Takahashi K. (1968). **The reaction of phenilglyoxal with arginine residues in proteins.** J. Biol. Chem. 23, 6171-6179.
- Targa H. J. and Peres C. A. (1979). **Radiation-induced dominant lethal mutations in oocytes of *Musca domestica*.** Mutation Res. 63, 153-160.
- Terra W. R., Ferreira C. & Bianchi A. G. (1978). **Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site.** Biochem. Biophys. Act. 524, 131 - 141.
- Terra W. R., Ferreira C. & Bianchi A. G. (1979a). **Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and Midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance.** J. Insect Physiol. 25, 487-494.
- Terra W. R., Terra I. C. M., Ferreira C. & Bianchi A. G. (1979b). **Carbodiimide-reactive carboxyl groups at the active site of an insect midgut trehalase.** Biochem. Biophys. Acta. 571, 79-85.
- Terra W. R. & Ferreira C. (1981). **The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: Digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara americana*.** J. Insect Physiol. 27, 325-331.
- Terra W.R. & Ferreira C. (1994). **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** Comp. Biochem. Physiol. 109B, 1-62.

- Van Beers E.H., Bler 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, 197-162.
- Valaitis A.P. & Bowers D.F. (1993). **Purification and properties of the soluble midgut trehalase from the gypsy moth, *Lymantria dispar*.** Insect Biochem. Molec. Biol. 23,599-606.
- Vetter J. (2000). **Plant cyanogenic glycosides.** Toxicon 38, 11-36.
- Vonk J.H. & Western J.R.H. (1984). **Comparative Biochemistry and Physiology of Enzymatic Digestion.** Academic Press, New York.
- Wigglesworth V.B. (1972). **The principles of Insect Physiology.** 7th Edition. Methuen, London.
- Wyatt G.R. (1964). **The biochemistry of sugars and polysaccharides in *Musca domstica* L. and *Calliphora erythrocephala* Meig.** J.Insect Physiol. 10, 273-278.