Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

Fábio Kendi Tamaki

Tese de Doutorado

"Serina proteinases digestivas de insetos-modelo"

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
Orientador

São Paulo
29 de Março de 2011

Data de depósito na SPG: 09/02/2011

Fábio Kendi Tamaki

Serina proteinases digestivas de insetos-modelo

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra

São Paulo

29 de Março de 2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

40 ANOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

"Serina proteinases digestivas de insetos-modelo"

FÁBIO KENDI TAMAKI

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

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
Orientador e Presidente

Prof. Dr. Pedro Soares do Araujo
IQ - USP

Prof. Dr. Guilherme Menegon Arantes
IQ - USP

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho
ESALQ-USP

Prof. Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes
UFV

SÃO PAULO
29 de março de 2011

Aos meus pais Margaret e Yoski, às minhas irmãs Flávia, Gabriela e Giovana e à minha sobrinha Fernanda, por serem o que existe de mais precioso pra mim.

Agradecimentos

Gostaria imensamente de agradecer a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Certamente seria difícil citar todos, e desde já peço sinceras desculpas pelo lapso.

Nesse sentido, gostaria de agradecer profundamente algumas pessoas especiais e de suma importância na minha formação pessoal e profissional, pelas quais externo um profundo respeito e admiração:

Ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra, pela orientação marcante e decisiva, paciência demasiada, dedicação ao meu projeto, amizade, por todo incentivo, puxões de orelha e pela confiança plena em mim depositada ao longo da minha vida acadêmica.

À Prof. Dr^{a}. Clélia Ferreira pela amizade, discussões e colaboração.

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

A Adriana Rios Lopes, pela valiosa orientação durante a Iniciação Científica.

Aos amigos de laboratório: Fernando Ariel Genta, Alexandre H.P. Ferreira, Augusto Crivellari, Marcelo H.P. Padilha, Alcides Batista, Pedro Tizei, Fábio Mendes, Maria do Carmo (Madu), Walciane Silva, Maria Cícera (Ciça), Thais Bifano, Érica Moreira, Érica Almeida, Daniela Beton, Fabiane Cançado, Bruno Lira, Kátia Rebola, Juliene Jéssica, Plínio, Ticiane, Renata e Sandro Marana pela amizade e discussões.

Às pessoas com quem colaborei: André Coppe Pimentel, Camila Ornelas, Fernanda P. Biagio, Telma Mary Kaneko, Gabriele Wander Ruas, Alexandre Utiyama e Emiliano Monteiro. Muito obrigado pela chance de aprendermos juntos.

Ao Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, por gentilmente ceder o tempo de seus técnicos, o microscópio eletrônico e por sua contribuição nos estudos de microscopia eletrônica.

Aos técnicos Waldir Caldeira e Márcio Valentin Cruz pelo auxílio nos estudos de microscopia e pelas conversas bem humoradas.

À Drª Izaura Yoshico Hirata, da EPM-UNIFESP, pela paciência e pelos microssequenciamentos N-terminais.

À Drª Ana Claudia O. Carreira pelo auxílio nos experimentos com células de insetos, e à Profª Drª Mari Cleide Sogayar pela confiança e pelo espaço em seu laboratório.

Ao biotério e às técnicas Flávia e Fátima.

Aos meus grandes amigos de infância: Guilherme Cayres Mariotti, Pedro Rebello Bortolini, Guilherme Dias Felitti, Patrick Führ Dal'bo.

Aos meus grandes amigos da USP: Lucas Guerra, Alexandra Dumont, Lucas Blanes, Helder Nakaya, Diego Feliu, Flávio Beraldo, Guilherme Louzada, Nathalia Ramalho Moreira, Ivan Bragatto, Viviana Barbosa Paes, Gianlucca Nicastro, Matheus Henrique Dias, Alexandre Bisson, Paulo Paiva, Paulo Zaini, Ivan Bragatto, João Vasconcellos de Almeida, Liliana Massis, Felipe e Ana Beckedorff, Lauren Camargo, Eliezer Steffanello, Ana Laura Boechat, Luciana Mantzouranis, Patrícia Pessoa, Thompson E. Pavan, Joana Paulino, Mari e Bruno, José Roberto Tavares, Vinicius Coutinho, Raphael Teixeira, Daniel Tanigushi, Thiago Venâncio, Yuri Moreira, Valdir Blasios, Diorge Paulo de Souza, Ana Tahira.

Aos meus grandes amigos de república, com que compartilhei boa parte da minha vida: Gustavo de Alencastro, Daniel Lahr, Marcos Sandrini, Gabriel Andreucetti, José Eduardo Martinelli.

Aos amigos de Hepopéias, Pereretas e afins: Priscila, Henrique, Giorgio, Simone, Maria, Cavetas, Dedê, Gabriele, Pepone e Sonho, Tom... foi um prazer e tanto!

Aos amigos do mercado financeiro: Fábio Murad, Denise Alonso, Kleber Zaha, André Kümmel, Lincoln Medeiros.

Ao pessoal da Representação discente: foi um prazer conhecer os bastidores!

Aos meus familiares e àqueles que se enquadram nessa categoria: Tios, Primos, Agregados (Família Marques, Família Real, Pedrinho e Neide, Fagner Perrone, Bruno, etc). Perdoem-me, seriam muitos nomes e certamente esqueceria muitos...

Ao Departamento de Bioquímica, à USP e seus professores, a quem devo tudo o que consegui alcançar até o momento.

Às pessoas da secretaria e da SBBq, pela amizade e ajuda nas horas necessárias.

E Claro, à minha querida Gabi, que compartilhou alegrias e ansiedades durante boa parte desse tempo, sempre me apoiando, trazendo paz de espírito e luz ao meu caminho.

À FAPESP pela bolsa concedida para a realização do projeto.

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

Resumo

Tamaki, F.K. Serina proteinases digestivas de insetos-modelo, 2011, 160 páginas. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil.

Tripsinas e quimotripsinas, enzimas pertencentes à classe das serina proteinases, são as principais enzimas proteolíticas digestivas presentes no intestino médio de insetos de diversas ordens. Entretanto, enzimas de diferentes insetos possuem propriedades cinéticas distintas, sendo os motivos dessas diferenças especulados. Precipitações por sulfato de amônio das tripsinas de *Tenebrio molitor*, *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* mostram que insetos Lepidópteros possuem serina proteinases mais hidrofóbicas, que foi confirmado através de cromatografias de interação hidrofóbica e da análise de acesso do solvente às superfícies protéicas em modelagens tridimensionais de seqüências. Tal fato está relacionado à formação de oligômeros e resistência a defesas de plantas. Inativações por TPCK mostram que quimotripsinas digestivas de *S. frugiperda*, inseto polífago, reagem duas ordens de grandeza mais lentamente e possui um deslocamento do pH ótimo de modificação em mais de uma unidade quando comparada com dos outros dois organismos, fato relacionado à resistência a cetonas presentes em diversas plantas. A tripsina digestiva de *Periplaneta americana* foi purificada e microsseqüenciada, resultando na seqüência VSPAFSYGTG e associada a um alérgeno (denominado PaTry), expresso nos cecos e na região anterior do ventrículo. O anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* reconheceu apenas uma banda no intestino de *P. americana* e foi utilizado para imunocitolocalizar tripsinas nos tecidos epiteliais, demonstrando que esta é secretada por exocitose nos cecos e na região anterior do ventrículo, como esperado. Por último, a atividade majoritária de quimotripsina se localiza surpreendentemente na região posterior do ventrículo de *M. domestica*. Apesar disso, apenas 28% dessa atividade é perdida através das fezes, pois 31% da atividade enzimática se encontra firmemente aderida à membrana, e 41% na fração celular solúvel (associada ao glicocálice), sendo a atividade solúvel luminal correspondente a apenas 12%, indicando

a existência de pelo menos duas espécies moleculares distintas, uma solúvel e uma aderida à membrana, comprovado inativações térmicas das duas atividades (solúvel e aderida à membrana) na presença e na ausência de Triton X-100, sendo que a atividade aderida à membrana apresentou uma maior meia vida com uma cinética de primeira ordem nos dois casos. Ensaio em gel demonstrou que o homogeneizado possui apenas uma banda de atividade quimotríptica de 30 kDa. A atividade solúvel majoritária foi purificada até a homogeneidade, apresentando uma banda de 30 kDa em SDS-PAGE, pH ótimo de 7,4 e é 90% inativada por TPCK 0,1 mM em pH 8,5 em 15 min. Ela prefere substratos contendo Phe em P1, apesar clivar substratos contendo Tyr e Leu. Uma seqüência contígua similar a quimotripsina foi obtida a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de *M. domestica*, formada por 71 ESTs (de 826 seqüências obtidas ao acaso), indicando que esta deve corresponder à atividade majoritária. Essa seqüência, denominada MdChy1, prediz uma proteína madura de 28.639,2 Da e foi clonada e expressa de maneira recombinante em *E. coli* BL21 (DE-3) Star, sendo utilizada para produção de anticorpos policlonais em coelhos, que reconheceram uma banda de 30 kDa no ventrículo anterior e posterior, mas não no médio. Esses anticorpos foram utilizados para imunomarcações e reconheceram proteínas no lúmem, nas microvilosidades e em pequenas vesículas do epitélio, demonstrando que a quimotripsina é secretada ao lúmem por exocitose e indicando que o MdChy1 corresponde à atividade majoritária de quimotripsina. Análises de expressão em *M. domestica* indicam a existência de dois conjuntos de serina proteinases digestivas, um expresso na região anterior e um segundo na região posterior do ventrículo. O MdChy1 é expresso na região posterior, local em que se encontra a atividade majoritária de quimotripsina. Uma reconstrução filogenética dos genes similares a quimotripsinas de *Drosophila melanogaster* e de *M. domestica* demonstram que a MdChy1 se agrupa com genes expressos no intestino médio, portanto, com função digestiva.

Palavras-chave: Insetos, Digestão, Tripsina, Quimotripsina, Digestão de proteínas, Intestino Médio.

Abstract

Tamaki, F.K. Digestive serine proteinases of model insects, 2011, 160 pages. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brazil.

Trypsins and chymotrypsins, serine proteinases enzymes, are the major proteolytic activities present in the midgut of insects. However, enzymes obtained from different insects present different kinetic properties, and the reason for the differences are speculated. Trypsin precipitation of *Tenebrio molitor*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda* with ammonium sulfate showed that Lepidopteran insects possess serine proteinases with a higher superficial hydrophobicity than insects belonging to other orders, which may be associated to oligomerization of enzymes and resistance to inhibitors present in the food. This was confirmed by hydrophobic interaction chromatography and analysis of solvent access to serine proteinases surface. Moreover, inactivations of chymotrypsins by TPCK showed that *S. frugiperda* chymotrypsins react one order slower and has an optimum pH of modification more than 1 unit higher than chymotrypsins of *D. saccharalis* and *T. molitor*, which was related with the resistance of the enzyme to the presence of plant ketones, since *S. frugiperda* is a polyphagous organism. The digestive trypsin from *Periplaneta americana* midgut was purified microssequenced, resulting in the sequence VSPAFSYGTG, coincident to the MPA3 allergen (named PaTry), which is expressed in the caeca and anterior ventriculus. Western blot using *M. domestica* trypsin antisera recognized a single band, and immunohistochemical assays using this antisera showed that the *P. americana* trypsin is secreted by exocitosys in caeca and anterior ventriculus, which is coincident to the expression data. Although the major *M. domestica* chymotrypsin activity is present in the posterior ventriculus, only 28% of the activity is lost in feces, because 31% of activity is membrane-bound, and 41% is in the cellular soluble fraction (glycocalix-associated), and only 12% of total activity is soluble in the lumen, indicating the existence of at least two molecular species of chymotrypsins. Thermal inactivations of both activities (soluble and membrane-bound) showed that they may represent two different molecular enzymes, since the membrane-bound activity has a higher half-life than the soluble both in the

presence and in the absence of Triton X-100. Both activities presented a linear first-order inactivation kinetic. In gel assays showed the presence of only one activity band in the midgut of 30 kDa. The major soluble activity was purified through one affinity-chromatography, and active fractions presented a single 30 kDa band, a optimum pH of 7.4 and was 90% modified by TPCK 0.1 mM at pH 8.5 during 15 min. This enzyme preferentially cleaves substrates containing Phe residues in P1, although it cleaves substrates containing Tyr and Leu. A contig of a chymotrypsin-like sequence was randomly obtained from a cDNA library of *M. domestica* midguts from 71 ESTs (a total of 826 sequences), indicating that this sequence corresponds to the major activity present in the lumen. This sequence, named MdChy1, predicted a protein with 28639.2 Da which was cloned, recombinantly expressed in *E. coli* BL21 (DE-3) Star, this recombinant MdChy1 was used to raise polyclonal antibodies in rabbit. A western blot using this antisera recognised a single band in the anterior and posterior ventriculus, but not in the middle. Imunno-gold labeling of epithelium marked proteins in the lumen, at the microvilli and inside small vesicles, demonstrating that chymotrypsin is secreted through exocytosis in *M. domestica* and reinforcing that MdChy1 corresponds to the major chymotryptic activity found in the midgut. A semi-quantitative RT-PCR of *M. domestica* serine proteinase-like genes demonstrated that there are two set of genes, one expressed in the anterior and another in the posterior ventriculus, as visualized in western blot. MdChy1 is expressed in the posterior ventriculus, where the major chymotryptic activity is found. A phylogenetic reconstruction of *Drosophila melanogaster* chymotrypsin-like sequences and *M. domestica* chymotrypsins showed that MdChy1 branched with sequences expressed in midgut, thus coding proteins involved in digestion.

Keywords: Insect, Digestion, Trypsin, Chymotrypsin, Protein digestion, Midgut.

Abreviaturas

Asp: Ácido Aspártico

B-Y-pNA: Benzoil-Tirosina p-nitroanilida

cDNA : ácido desoxiribonucléico complementar

DMSO: Dimetilsulfóxido, solvente orgânico

DEPC: Dietil pirocarbonato

E.C.: Enzyme Classification

EST: Expressed Sequence Tag, Etiquetas de seqüências expressas

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

G-F-MCA: Glutaril-Fenilalanina 7-amido-4-metil cumarina

His: Histidina

IP: Inibidor protéico

IPTG: Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

kcat: constante de catálise da enzima

Km: Constante de afinidade de Michaelis-Menten

Kobs: Constante de modificação química de uma enzima por um modificador químico

LB: Meio de cultura de Luria-Bertani

mRNA: RNA mensageiro

mU: miliunidades de atividade enzimática (correspondente à formação de 1 nanomol por minuto de produto)

PAGE: polyacrilamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb: pares de base

PBA: Fenil-butilamina

PCR: reação da polimerase em cadeia

PDB: Arquivo em formato Protein Data Bank

pH: cologaritmo da concentração de H^+

pI: Ponto isoelétrico

PITC: Fenilisotiocianato

pKa: Constante de ionização de um ácido

PMSF: Fluoreto de fenilmetanosulfonila

pNA: p-nitroanilina

RNA: Ácido Ribonucléico

RPM: Rotações por minuto

RT-PCR: PCR precedido de reação com transcriptase reversa

S-AAPF-pNA: Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilida

S-AAPF-MCA: Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe 7-amido-4-metil cumarina

S-AAPL-pNA: Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-Nitroanilida

S-F-MCA: Succinil-Phe 7-amido-4-metil cumarina

S-LLVT-MCA: Succinil-Leu-Leu-Val-Tyr 7-amido-4-metil cumarina

SBTI: Soybean trypsin inhibitor (Inibidores de tripsina extraídos da soja)

Ser: Serina

SDS: dodecil sulfato de sódio

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

S-AAPF-pNA: succinil-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilida

TBS: Tampão Tris-NaCl

TBS-T: Tampão Tris-NaCl contendo Tween 20

TLCK: Tosil-Lisina-clorometil cetona

TPCK: Tosil-Fenilalanina-clorometil cetona

Tris: Tris-hidroximetil aminometano

Trp: Triptofano

UFC: Unidade formadora de colônia

V: Volts

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....17
1.1. Considerações iniciais.....17
1.2. Digestão de proteínas em insetos.....19
1.3. Serina proteinases.....20
1.3.1. Tripsinas de insetos.....22
1.3.2. Quimotripsinas de insetos.....25
1.4. Serina proteinases de insetos e resistência a defesas de plantas.....27
1.5. Estudos da tripsina digestiva de *Periplaneta americana*.....33
1.6. A quimotripsina digestiva de *Musca domestica*.....34
2. OBJETIVOS.....39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....40
3.1. Reagentes químicos.....40
3.2. Preparação de material biológico.....40
3.3. Ensaios enzimáticos e determinação de proteínas.....41
3.4. Inativação térmica e por TPCK das atividades de quimotripsinas.....43
3.5. Purificação de serina proteinases.....44
3.6. Microsseqüenciamento N-terminal de enzimas digestivas purificadas.....46
3.7. Precipitação de serina proteinases solúveis por sulfato de amônio.....46
3.8. Cromatografias de interação hidrofóbica de serina proteinases.....47
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições desnaturantes e semi-desnaturantes.....47
3.10. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem de serina proteinases.....48
3.11. Eletroforese em gel de agarose e purificação de fragmentos de DNA.....50
3.12. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T, transformação de células XL1-Blue por choque térmico e plaqueamento de células.....50
3.13. Crescimento de bactérias em meio líquido e preparação de plasmídeos.....51
3.14. Seqüenciamento de DNA.....51
3.15. Extração de RNAm de *M. domestica* e *P. americana* e síntese de cDNA para análise da expressão de genes.....52

3.16. Transformação de células competentes.....53
3.17. Expressão recombinante de serina proteinases.....53
3.18. Lise de bactérias induzidas, análise do sobrenadante e purificação de proteínas recombinantes.....56
3.19. Produção de anticorpo policlonal anti-rMdChy1.....57
3.20. Western Blot 58
3.21. Imunolocalização de quimotripsinogênio no intestino médio de *M. domestica* e de tripsina no intestino médio de *P. americana*.....59
3.22. Análise bioinformática das quimotripsinas de *D. melanogaster*.....60
3.23. Modelagem automática de seqüência de aminoácidos e acesso de solvente à superfície.....61
4. RESULTADOS..... 62
4.1. Purificação de serina proteinases digestivas.....62
4.2. Seqüenciamento, clonagem e tentativas de expressão recombinante de serina proteinases digestivas.....68
4.3. Modificação química de quimotripsinas de insetos por TPCK em função do pH.74
4.4. Estudos de hidrofobicidade de serina proteinases.....76
4.4.1. Precipitações por sulfato de amônio e interações hidrofóbicas de serina proteinases.....76
4.4.2. Modelagem de tripsinas e quimotripsinas de insetos.....77
4.5. Estudos da tripsina digestiva de *P. americana*.....87
4.5.1. Purificação e identificação N-terminal da tripsina digestiva de *P. americana*.....87
4.5.2. Clonagem e expressão recombinante do PaTry.....88
4.5.3. Estudos fisiológicos do PaTry.....98
4.6. Estudos da quimotripsina de *M. domestica*.....100
4.6.1. Distribuição, localização e inativação térmica das atividades de quimotripsinas digestivas de *M. domestica*.....100
4.6.2. Purificação e caracterização da quimotripsina digestiva solúvel de *M. domestica*.....103
4.6.3. Caracterização e produção recombinante do quimotripsinogênio mais expresso.....105

4.6.4. Western Blot e imunocitolocalização do MdChy1.....107
4.6.5. Expressão de serina proteinases ao longo do intestino médio de *M. domestica*.....115
4.6.6. Reconstrução filogenética de genes similares a quimotripsinas de *D. melanogaster* e suas relações com o MdChy1.....118
5. DISCUSSÃO.....122
5.1. Serina proteinases digestivas de insetos.....122
5.2. Mecanismos de resistência de serina proteinases a defesas naturais de plantas.....125
5.2.1. Diminuição da reatividade de quimotripsinas digestivas a cetonas.....125
5.2.2. Diminuição da interação com inibidores protéicos.....127
5.3. Estudos fisiológicos e moleculares da tripsina de *P. americana*.....132
5.4. Propriedades da quimotripsina intestinal majoritária de *M.* domestica.....135
6. CONCLUSÕES.....145
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....147
8. SÚMULA CURRICULAR.....159

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

O táxon Insecta é o mais bem-sucedido do planeta em número, com 950.00 espécies descritas (Baillie *et al.*, 2004), mas com estimativas de até 8 milhões de espécies (Groombridge & Jenkins 2002). Esse grande sucesso evolutivo reflete a grande adaptação dos organismos deste táxon aos mais variados hábitos e hábitats, incluindo adaptações morfofisiológicas do sistema digestivo a diversos tipos de hábitos alimentares que os permitiram ocupar desde os pólos até os trópicos e fazendo-os grandes competidores do homem na Terra. Como conseqüência, eles provocam danos econômicos, como por exemplo: 1) insetos herbívoros que atacam tanto os cultivos quanto as estocagens de alimentos; 2) os vetores de doenças do ser humano e de animais de criação e; 3) pragas sociais e urbanas, como baratas, moscas, cupins e formigas (Gillott, 1995). Assim, uma proporção significativa do suprimento de alimento mundial é perdida devido à atividade de insetos que são pragas agrícolas (Bonning, 2003).

Em vista disso, o esforço para controlar os insetos tem sido uma tarefa secular do homem, tendo sido empregadas várias estratégias de controle. Em cultivos e manejos o controle de insetos-praga tradicionalmente é feito pela aplicação de praguicidas. Entretanto, sabe-se que esse tipo de prática é prejudicial ao meio ambiente, pois atinge inespecificamente todos os insetos presentes no ecossistema, inclusive insetos polinizadores (benéficos às plantações) e não apenas os insetos praga, além de contaminar lençóis freáticos, podendo ser prejudiciais à saúde do ser humano. Assim, em resposta a uma maior consciência ecológica, os processos de controle de insetos atualmente têm sido dirigidos principalmente para o fortalecimento do próprio sistema de defesa das plantas contra os herbívoros, substituindo o uso de praguicidas por meios de controle de pragas mais específicos e menos danosos ao meio ambiente.

Um dos temas de estudo nos últimos anos é o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressem substâncias cujo alvo é o sistema digestivo dos insetos,

isso porque o tubo digestivo dos insetos é uma importante interface entre o organismo e o ambiente (Terra e Ferreira, 1994), sendo, portanto, um potencial alvo de controle biológico.

O trato digestivo dos insetos (Figura 1) pode ser esquematicamente dividido em intestino anterior, médio e posterior. O intestino anterior (dividido em boca, faringe, esôfago, papo e proventrículo) geralmente é esclerotizada e não-secretora, responsável pelo acúmulo de alimento, sendo que muitos organismos possuem enzimas digestivas presentes no papo. O intestino médio pode possuir cecos gástricos e uma região tubular chamada ventrículo, que normalmente possui uma membrana acelular quitino-protéica denominada membrana peritrófica recobrindo o bolo alimentar (ausente em algumas classes de insetos, como os insetos da ordem Hemiptera Heteroptera) e separando o intestino médio em dois compartimentos: o espaço endoperitrófico, interno à membrana, e a região entre a membrana e o epitélio, o espaço ectoperitrófico. O intestino médio é principal o local de secreção de enzimas digestivas, digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, sendo um possível alvo de moléculas de controle dos insetos. Por último, o intestino posterior, subdividido em íleo, cólon, reto e ânus, é responsável pela reabsorção de água e formação das fezes (Terra e Ferreira, 1994).

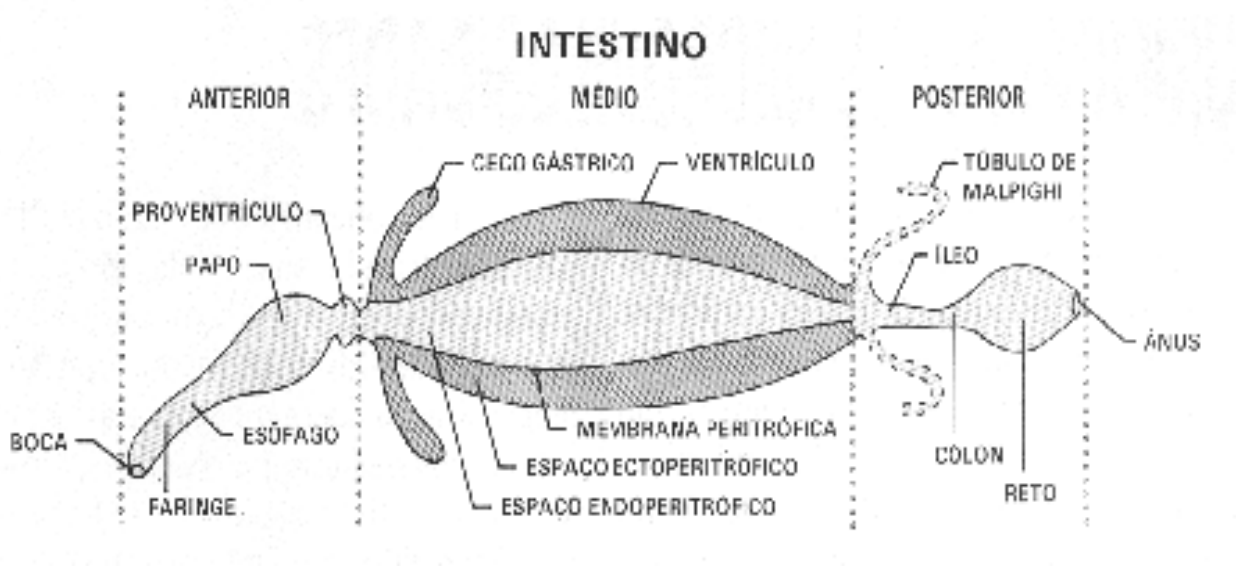


Figura 1. Esquema representativo do sistema digestivo dos insetos.

A descoberta de que plantas podem expressar inibidores protéicos (IPs) que inibem serina proteinases (Ryan, 1978) levou ao estudo das inter-relações entre os IPs e enzimas devido às implicações biotecnológicas. Esses estudos levaram à descoberta de que a presença de IPs na dieta dos insetos induz a expressão de diversas serina proteinases, o que explicaria o desenvolvimento de resistência de insetos a IPs presentes em plantas transgênicas que expressam esses inibidores (Gatehouse *et al*., 1997).

Diversos insetos apresentam diferenças na intensidade e no tipo da resposta a moléculas presentes em suas dietas artificiais ou naturais que sensibilizem suas enzimas. Os mecanismos que evitam a inibição de proteases por IPs são especulados.

Os IPs interagem com as serina proteinases através de seu sítio reativo como substratos lentos das serina proteinases (Lopes *et* al., 2004). Assim, o conhecimento detalhado das especificidades das serina proteinases e de suas estruturas terciárias são necessárias para entender as suas relações com os IPs, os mecanismos de inibição dessas enzimas ou de resistência frente essas moléculas.

1.2. Digestão de proteínas em insetos

O grupo Insecta apresenta organismos adaptados às mais diferentes alimentações, sendo que organismos desse grupo podem aproveitar quase qualquer material orgânico encontrado na natureza como alimento (Wigglesworth, 1972; Hagens, 1984), desde grãos secos estocados até a celulose presente em papel e madeira. Muitos, como a barata americana, conseguem se alimentar até mesmo de exoesqueleto de outros organismos.

Dentre os alimentos ingeridos, as proteínas têm grande importância na disponibilização de aminoácidos essenciais aos organismos. Entretanto, para serem aproveitadas, as proteínas devem ser hidrolisadas até aminoácidos, absorvidos pelo epitélio do intestino médio. Caso a hidrólise das proteínas seja interrompida, os alimentos ingeridos podem se acumular no intestino dos insetos, diminuindo a ingestão de alimentos e a predação de plantios e estoques por pragas. Em última instância, a

não digestão das proteínas alimentares pode levar os organismos à morte devido à baixa disponibilidade de aminoácidos, atingindo níveis letais (Oliveira *et al.*, 2005).

Portanto, a digestão de proteínas é um processo vital aos organismos, sendo que o entendimento de seu mecanismo se faz necessário. A interrupção deste processo fisiológico em insetos criaria novas maneiras de controle de pragas.

A digestão inicial de proteínas ocorre pela ação de proteases, classificadas em endopeptidases (ou proteinases) (E.C. 3.4.21-24), com função de digestão inicial ou despolimerização de proteínas, e exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), cuja função é a digestão final de proteínas (oligômeros ou dímeros) e disponibilização de aminoácidos livres. Entre as exopeptidases estão incluídas as aminopeptidases (E.C. 3.4.11), as carboxipeptidases (E.C. 3.4.16-18) e as dipeptidases (dipeptídeo-hidrolases, E.C. 3.4.13). Já as proteinases estão subdivididas de acordo com seus mecanismos catalíticos em quatro principais subclasses: serina proteinases, cisteína-proteinases, aspártico-proteinases e metalo-proteinases. Esse trabalho tem como objeto de estudo as enzimas da subclasse das serina proteinases de insetos, descritas a seguir.

1.3. Serina proteinases

Serina proteinases (EC 3.4.21) (Barrett *et al.*, 2004) são enzimas que apresentam em seu sítio catalítico a tríade catalítica His57, Asp102 e Ser195 e clivam ligações peptídicas em regiões internas de cadeias polipeptídicas. A numeração dos resíduos nas cadeias polipeptídicas é referida à quimotripsina bovina. Faz parte dessa classe de enzimas a família de enzimas homólogas à família da quimotripsina, que inclui tripsinas e elastases.

As serina proteinases apresentam uma estrutura terciária composta por dois domínios, cada um contendo um beta-barril, sendo que seu sítio ativo e os resíduos catalíticos se encontram entre esses dois domínios. Além disso, as serina proteinases apresentam um sítio de ligação subdividido em subsítios (Schechter & Berger, 1967), cada um ligando um único aminoácido do substrato através de múltiplas interações (Figura 2). Os subsítios são denominados S no sentido do N-terminal do substrato, e S' no sentido C-terminal do substrato; já os resíduos do substrato são denominados P no

sentido N-terminal do substrato e P' no sentido C-terminal. Assim, P1 é a posição do aminoácido a ser clivado no substrato, e este aminoácido se liga ao subsítio S1 da enzima. Como os subsítios da enzima são constituídos por aminoácidos que interagem com o substrato, a composição de aminoácidos de cada subsítio (sequência primária) e as suas posições espaciais (estrutura terciária) determinam a sua especificidade, pois subsítios diferentes apresentarão propriedades diferentes, resultando em enzimas com diferentes especificidades e propriedades cinéticas.

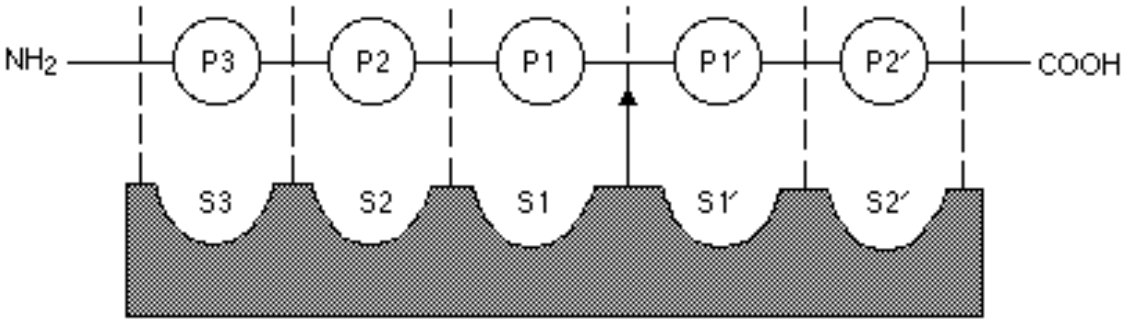


Figura 2. Representação esquemática e nomenclatura dos subsítios de ligação de Schechter & Berger (1967). Abaixo: divisão dos subsítios de ligação das proteinases. Acima: posição e nomenclatura dos aminoácidos do substrato. A seta indica o sítio de clivagem da enzima no substrato.

As serina proteinases possuem mecanismo catalítico semelhante entre si: após a ligação do substrato ao sítio ativo ocorre o ataque nucleofílico da Ser195 sobre a carbonila da ligação peptídica a ser quebrada, formando um intermediário tetraédrico ligado covalentemente à enzima, que recebe um próton do Nitrogênio 3 da His57, sendo degradado em um intermediário acil-enzima e formando a nova região N-terminal do substrato, que é liberada e substituída por uma molécula de água. Essa His57 forma uma ponte de hidrogênio com o Asp102 e tem seu pKa alterado, tornando- se uma potencial base nucleofílica. A água passa a ser o nucleófilo da reação e ataca o carboxilato ainda ligado à Ser195, liberando a nova região C-terminal formada, reconstituindo a enzima (Figura 3) (Voet & Voet, 2004). A quimotripsina digestiva de *S. invicta* (Botos *et al*., 2000), única serina proteinase de inseto com estrutura

tridimensional resolvida, indica que o mecanismo catalítico proposto é válido para serina proteinases de insetos.

A dificuldade em estudar estruturas tridimensionais de serina proteinases de insetos decorre da dificuldade técnica em expressá-las de maneira recombinante: algumas foram expressas de maneira recombinante utilizando como sistema de expressão células de *S. frugiperda*, dentre as quais podemos citar uma quimotripsina de *Spodoptera exigua* relacionada à ecdise (Herrero *et al*, 2005), expressa em células de inseto Sf21 e uma serina proteinase de *Pyrocoelia rufa* (Li *et al*, 2005), expressa em células de inseto Sf9. Além disso, serina proteinases de *M. sexta* envolvidas na ativação da profenoloxidase, um componente do sistema imune de insetos, foram clonadas no vetor pFastBac1 e expressas com atividade em células de inseto Sf21(Ji *et al*, 2003). Outro homólogo de serina proteinase de *Manduca sexta* envolvido na ativação fenoloxidase também foram expresso em células de inseto Sf21 (Lu *et al*, 2008). Dunse *et al*. (2010) expressaram ativamente duas quimotripsinas de *Helicoverpa ssp*, uma sensível a IPs e outra resistente, em células Sf9, além de realizarem mutações sítio-dirigidas nas mesmas. Ainda assim, nenhuma dessas proteínas teve a sua estrutura tridimensional determinada.

1.3.1. Tripsinas de insetos

As tripsinas (EC 3.4.21.4) (Barrett *et al*., 2004) clivam preferencialmente cadeias polipeptídicas no lado carboxila de aminoácidos de cadeia lateral básica, como Arg e Lys, isso porque em seu subsítio P1 (Schechter & Berger, 1967) há um resíduo ácido conservado (Asp189) interagindo com o resíduo S1 carregado positivamente.

A maioria das tripsinas de insetos tem pH ótimo básico, podendo variar de 7,5 a 10,5, e sua massa molecular observada em SDS-PAGE varia de 21 a 35 kDa, com algumas exceções, como a tripsina de *Erinnyis ello* (48 kDa). Além disso, o conteúdo luminal de *H. virescens* apresenta uma atividade de tripsina com massa molecular em torno de 67 kDa. O pI de tripsinas é normalmente ácido, variando de 3,5 a 6,0, tendo como exceções alguns insetos holometábolos das ordens Coleoptera (*T. molitor*, pI 8,0)

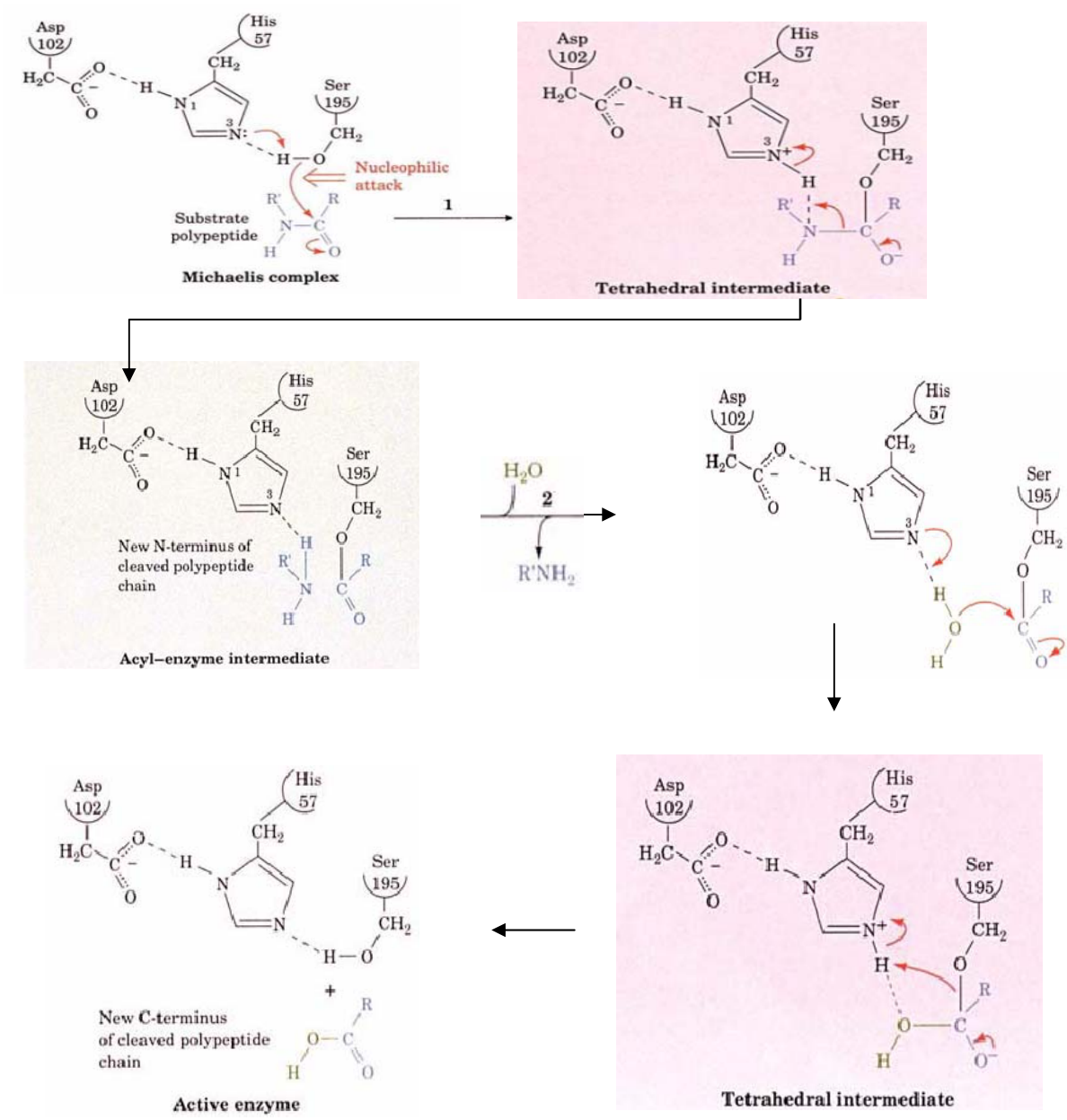


Figura 3: Mecanismo catalítico de serina proteinases. A) ataque nucleofílico da Ser195 sobre a ligação peptídica do substrato; B) Formação de um intermediário tetraédrico; C) quebra da ligação peptídica e formação da extremidade N-terminal; D) saída da nova porção N-terminal formada e entrada de uma molécula de água, que faz um ataque nucleofílico sobre o carbono carbonila; E) formação na nova extremidade C-terminal; F) liberação da nova extremidade C-terminal e regeneração da enzima. (Voet & Voet, 2004).

(Terra e Ferreira, 1994). Essas enzimas ocorrem no intestino da maioria dos insetos, com exceção dos Hemípteros e alguns grupos taxonômicos pertencentes à série Cucujiformia dos Coleoptera como Curculionidae (Terra e Ferreira, 1994, 2005). Contudo, alguns Hemiptera Heteroptera têm tripsinas nas glândulas salivares (Zeng *et al*., 2002).

A distribuição das enzimas ao longo do intestino de insetos é bastante heterogênea: enquanto insetos de ordens basais, como *Periplaneta americana* (Dictyoptera) (Dias, 2004) e *Grylodes sigillatus* (Orthoptera) (Biagio *et al*., 2009), possuem atividade de tripsina majoritariamente localizada no papo (intestino anterior), insetos holometábolos como *Musca domestica* (Diptera), e *S. frugiperda* (Lepidoptera), apresentam atividades de tripsina majoritariamente no intestino médio, podendo ser solúvel, aderida ao glicocálice e à membrana das células do epitélio. Cabe ressaltar que enzimas presentes no papo dos insetos, região esclerotizada e não secretora, devem ser produzidas e secretadas pelas glândulas salivares ou pelo intestino médio.

As seqüências similares a tripsinas conhecidas possuem alta similaridade entre si, com domínios conservados contendo os resíduos catalíticos His57 (TAAHC), Asp102 (DIAL) e Ser195 (GDSGGP), além do Asp189. Ainda assim, as propriedades cinéticas das tripsinas de insetos de quatro ordens distintas de insetos (Dictyoptera: *P. americana*; Coleptera: *Tenebrio molitor*; Diptera: *M. domestica*; Lepidoptera: *Diatraea saccharalis*) (Lopes *et al*., 2006) são bastante diferentes. O estudo envolvendo substratos de fluorescência apagada mostrou diferenças na especificidade primária das tripsinas de insetos Lepidópteros, que preferem Lys a Arg em P1. Ainda, a hidrofobicidade de cada subsítio foi calculada a partir da eficiência de hidrólise de cada peptídeo com uma troca no referido subsítio. Os resultados sugerem que os subsítios das tripsinas digestivas de insetos tornam-se progressivamente mais hidrofóbicos ao longo da evolução. Isso aparentemente é uma adaptação para resistir aos inibidores de plantas, que possuem resíduos polares nos seus sítios reativos.

Fica evidenciado que o sítio de ligação de tripsinas diverge entre insetos, e que, portanto, apesar da alta similaridade das seqüências, deve haver diferenças na estrutura primária refletindo essas diferenças cinéticas.

Além disso, a partir da determinação da energia de ligação e ativação correspondente a cada subsítio e o uso da equação desenvolvida por Marana *et al*. (2002), foi possível inferir a participação de cada subsítio na catálise. Os resultados indicam que, pelo menos nas tripsinas de Lepidoptera, S3, S2, S1' e S2' ligam significativamente o substrato no estado fundamental, enquanto que no estado de transição apenas S1' e S2' o fazem, apoiando o mecanismo de catálise por tripsina atualmente aceito.

Entretanto, apesar das evidências cinéticas, nenhuma estrutura de tripsina de inseto foi resolvida até o momento devido a dificuldade técnica em expressá-las de maneira recombinante e, portanto, não é possível afirmar se seu mecanismo de catálise é idêntico ao proposto. Há apenas um caso descrito de expressão recombinante da tripsina de *Anopheles gambiae* em bactérias (Müller *et al*, 1993). Entretanto, tentativas de reprodução da mesma por nosso grupo não foram bem-sucedidas (Terra, comunicação oral).

Além da estrutura tridimensional, os mecanismos de ativação dessa enzima também são especulados. A ativação de um tripsinogênio de *Bombyx mori* é causada pela presença de um fator desconhecido não protéico presente no intestino médio, e não pela presença de enzimas ativadoras das serina proteases, como verificado em mamíferos (Kaji *et al*., 2009).

Portanto, fica evidente que, apesar da dificuldade técnica, tentativas de expressão dessas proteínas se tornam um objeto de estudo de grande interesse frente, permitindo o entendimento de como as diferentes estruturas tridimensionais influenciam nas diferentes propriedades cinéticas.

1.3.2. Quimotripsinas de insetos

Quimotripsina (EC 3.4.21.1) (Barrett *et al*., 2004) cliva preferencialmente as cadeias polipeptídicas do lado carboxila de aminoácidos aromáticos, como Phe e Tyr. As quimotripsinas de insetos têm usualmente massas moleculares de 20-30 kDa, pH ótimo de 8-11 e diferem das de vertebrados por sua instabilidade em pH ácido, padrões de inibição com inibidores de tripsina de soja (SBTI) (Terra e Ferreira, 1994, 2005) e,

finalmente, reatividade frente ao modificador de imidazol (da His57 catalítica) tosil-fenilalanina clorometil cetona (TPCK). A distribuição da quimotripsina entre os grupos de insetos é similar à descrita acima para tripsina. A dificuldade anterior de detectar atividade de quimotripsina nos intestinos de insetos era uma conseqüência do uso de substratos pequenos (p. ex. benzoil-tirosina p-nitroanilida, B-Y-pNA) nos ensaios, os quais eram antigamente utilizados para quimotripsina de mamíferos. Entretanto, tanto as quimotripsinas de insetos quanto a quimotripsina bovina preferem substratos mais longos (Sato *et al.,* 2008) como succinil-AAPF p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA) (Lee e Anstee, 1995), sendo a detecção da atividade de quimotripsinas de insetos utilizando substratos curtos nem sempre possível.

Os resultados de inativação de quimotripsinas de insetos por TPCK parecem contraditórios. Nenhuma inativação foi observada nas quimotripsinas de insetos Lepidópteros como *Spodoptera littoralis* (Lee e Anstee, 1995), *Helicoverpa zea* e *Agrotis ipsilon* (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001b) enquanto que as quimotripsinas de *Solenopsis invicta* (Whitworth *et al*., 1998) e *Locusta migratoria* (Sakal *et al*., 1988) são inativadas. Nenhuma dessas inativações foi medida quantitativamente, e em alguns casos as condições de reação de TPCK foram inadequadas, como verificado para a quimotripsina de *M. sexta*, que não sofre modificação por TPCK em pH 8,0, mas apenas em pH 9,75 (Peterson *et al*., 1995).

Como a velocidade de reação de TPCK com a His catalítica da quimotripsina pode revelar diferenças no ambiente desse resíduo, um estudo quantitativo foi realizado com quimotripsinas purificadas do intestino de insetos de várias ordens, a saber: *P. americana*, *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda*. (Lopes *et al*., 2009). Os resultados mostraram que a constante de 2ª ordem de inativação das quimotripsinas com TPCK é da mesma ordem de grandeza para as quimotripsinas de *P. americana*, *T. molitor*, *D. saccharalis* e bovina, enquanto que para a quimotripsina de *S. frugiperda* a constante é duas ordens de grandeza menor. Modelagem por homologia de uma seqüência de quimotripsina de *S. frugiperda*, usando a estrutura tridimensional da quimotripsina bovina como modelo, mostrou que um resíduo de Trp substitui o de uma Gly na frente da His catalítica, sugerindo a sua baixa reatividade com TPCK por impedimento estérico. Essa alteração foi interpretada como uma adaptação do inseto para resistir à

presença de cetonas nas suas dietas. Entretanto, a referida seqüência foi obtida ao acaso e pode não corresponder à quimotripsina digestiva estudada e, portanto, não ter as propriedades cinéticas descritas. Além disso, uma seqüência de quimotripsina de *D. saccharalis* também apresentou esse resíduo de Trp, e como essa atividade tríptica é modificada por TPCK com a mesma ordem de grandeza da quimotripsina bovina, deve haver outra explicação para a diminuição da ordem de grandeza na modificação da quimotripsina digestiva de *S. frugiperda*.

A resolução da estrutura das quimotripsinas digestivas resistentes à modificação por TPCK permitiria o entendimento do mecanismo de resistência, dado que a quimotripsina de larvas de *S. invicta* é modificada por TPCK (Withworth *et al*., 1998) e possui estrutura tridimensional determinada (Botos *et al*., 2000). A comparação entre uma estrutura sensível à modificação e uma resistente daria evidências dos motivos da diminuição da velocidade de reação.

1.4. Serina Proteinases de insetos e resistência às defesas de plantas

As serina proteinases digestivas de insetos têm sido alvos freqüentes nos estudos de tentativa do controle de insetos-praga. Isso decorre porque essas proteinases são as hidrolases majoritárias em diversos insetos economicamente importantes, sendo responsáveis pela digestão das proteínas ingeridas na dieta e disponibilização de nutrientes. As serina proteinases estão presentes como famílias multigênicas nos insetos, sendo a segunda maior família gênica presente no genoma de *Drosophila melanogaster* (Ross *et al.*, 2003). Tentativas de utilização IPs de serina proteinases como método de controle de insetos-praga foram realizados *in vitro* adicionando-se esses IPs às dietas artificiais dos insetos. Estudos mostram que a presença desses IPs de proteinases na dieta *in vitro* de larvas de *Leptinotarsa decemlineata* tem um efeito negativo sobre o crescimento e desenvolvimento (Wolfson e Murdock, 1987), mostrando-se uma abordagem promissora. IPs vegetais também inibem o desenvolvimento de larvas de *D. saccharalis* (Pompermayer *et al*., 2001).

Entretanto, a utilização de IPs na dieta como modo de controle de pragas, apesar de uma abordagem interessante, mostrou-se algumas vezes inválida em testes *in vitro*

com insetos cultivados em dietas contendo IPs. Há diversos relatos de resistência de insetos aos IPs causado pela remodelação da expressão gênica das serina proteinases, como verificado em *Helicoverpa armigera*, na qual há superexpressão de mRNA de quimotripsinas para compensar a supraexpressão de 3 tripsinas importantes para a digestão (Gatehouse *et al.*, 1997), ou pela expressão de isoformas de enzimas não sensíveis aos IPs (Mazumdar-Leighton e Broadway 2000b; Broadway 1995, 1996; Jongsma *et al.* 1997; Gatehouse *et al.*, 1999). Além disso, Brioschi *et al.* (2007) mostraram que larvas de *S. frugiperda* resistentes a IPs respondem à presença destes disparando a expressão tanto de serina proteinases constitutivamente expressas em larvas quanto de serina proteinases antes ausentes, mostrando que a primeira resposta à presença de IPs na dieta é a superexpressão dos genes (resposta do tipo shotgun), com aumento da expressão de enzimas sensíveis a IPs para suprir a inibição na atividade proteolítica e de enzimas resistentes ou menos sensíveis aos IPs. A presença de IPs na dieta, portanto, regula a resposta da expressão gênica, inclusive alterando outros genes que não relacionados à digestão, como visto em *D. melanogaster* (Li *et al.*, 2007).

Os mecanismos que evitam a inibição de proteinases por IPs são especulados. Dunse *et al*. (2010) identificaram duas quimotripsinas digestivas de *Helicoverpa sp*, sendo uma sensível e a outra resistente a IPs. Essas duas quimotripsinas foram expressas de maneira recombinante, e mutações sítio dirigidas foram realizadas no resíduo 192 (numeração da quimotripsina bovina), mostrando que este não está envolvido na resistência de quimotripsinas a inibidores protéicos. Por outro lado, mudanças na alça 35 demonstraram que esta deve ser a responsável pela resistência de quimotripsinas aos IPs. Modelagens dessa enzima complexada com um inibidor protéico indicam que essa alça da enzima resistente não faz pontes de hidrogênio com os inibidores protéicos, ao contrário da enzima selvagem.

Tripsinas de larvas de *Heliothis virescens* cultivadas em dieta natural de folhas (contendo IPs) sugerem a formação de oligômeros de tripsinas como mecanismo de evitar a inibição, pois ao oligomerizar, os sítios ativos das tripsinas se tornam distorcidos (Brito *et al.*, 2001). A formação de oligômeros deve ocorrer por interações hidrofóbicas intermoleculares, sugerido por cromatografias de interação hidrofóbica.

Lopes *et al.* (2004) demonstraram um claro aumento de hidrofobicidade nos subsítios de tripsinas de diferentes ordens de insetos, sendo que grupos mais derivados de insetos, como Lepidópteros e Dípteros, apresentam tripsinas com subsítios mais hidrofóbicos que tripsinas de insetos das ordens Dictyoptera e Coleoptera, o que diminuiria as interações das tripsinas com IPs de plantas (que possuem resíduos com carga presentes nos sítios de ligação). O aumento de hidrofobicidade nos subsítios também corrobora a idéia de um aumento na hidrofobicidade superficial nas serina proteinases de insetos mais derivados, dado que os subsítios (ou sítios de ligação) encontram-se expostos na superfície das enzimas. Cabe ressaltar também que a estrutura da quimotripsina purificada a partir de larvas de *S. invicta* (Hymenoptera) apresentou uma estrutura de dímero, e a superfície de contato entre os dois monômeros representa menos de 10% da superfície total.

Assim, a interação intermolecular entre tripsinas formando oligômeros pode ocorrer devido à interação entre regiões superficiais hidrofóbicas. Entretanto, não há evidências físico-químicas de que serina proteinases digestivas de diferentes insetos apresentem diferenças de hidrofobicidade superficial que explicariam tais fenômenos. Portanto, alguns simples experimentos poderiam evidenciar esse aumento de hidrofobicidade superficial nas tripsinas de insetos ao longo da evolução.

A presença de sulfato de amônio em uma solução de proteínas diminui a sua solvatação, favorecendo a interação entre as regiões hidrofóbicas na superfície das proteínas com outras regiões hidrofóbicas. Caso haja duas moléculas com superfícies hidrofóbicas, elas tendem a interagir entre si na presença do sulfato de amônio, podendo formar complexos que, quando centrifugados, tendem a precipitar, ou seja, sair de solução.

Além disso, cromatografias de interação hidrofóbica utilizam tampões com alta força iônica, normalmente na presença de sulfato de amônio, diminuindo a solvatação das proteínas e aumentando a exposição de partes hidrofóbicas e favorecendo as interações hidrofóbicas com matriz da coluna. Assim, quanto menor a força iônica necessária para a interação de proteínas com a matriz, maior a área hidrofóbica exposta da proteína. Interações entre proteínas e colunas com diferentes matrizes hidrofóbicas na ausência de sulfato de amônio indicariam uma superfície altamente

hidrofóbica, indicando que essas proteínas poderiam formar interações intramoleculares e, portanto, poderiam formar dímeros ou oligômeros.

Por último, a presença de cetonas na dieta de insetos pode ser um mecanismo de resistência de plantas contra herbivoria por insetos, dado que tripsinas e quimotripsinas são modificadas por cetonas sintéticas, como TLCK e TPCK, respectivamente. Entretanto, as quimotripsinas de *S. littoralis* (Lee e Anstee, 1995), *H. zea* e *A. ipsilon* (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2000b) não são modificadas, enquanto que as quimotripsinas de *S. invicta* (Whitworth *et al*., 1998) e *L. migratoria* (Sakal *et al.*, 1988) são inativadas, como citado anteriormente.

Neste trabalho tentamos entender quais os motivos para uma menor velocidade de modificação da quimotripsina de *S. frugiperda* por TPCK quando comparada com as quimotripsinas bovina, de *P. americana, T. molitor* e *D. saccharalis*.

Schoellmann e Shaw (1963) verificaram que o pH tem efeito sobre a reação de modificação química da quimotripsina bovina com o TPCK, resultando em uma curva em forma de sino (Figura 4), isso porque o TPCK se comporta como um análogo de substrato para a quimotripsina bovina (Kézdy *et al.*, 1967), sendo a reação de modificação química dependente de um grupo básico de p*K*a 6,8 e um grupo ácido de p*K*a 8,9, e benzamida, um inibidor competitivo da quimotripsina bovina, impede a modificação da His57 catalítica de maneira similar a um inibidor competitivo com uma constante de inibição similar a do inibidor diminuindo a hidrólise do substrato por inibição competitiva.

Assim, diferenças em p*K*as dos resíduos catalíticos de quimotripsinas poderiam alterar a reatividade das quimotripsinas frente ao TPCK, visto que uma mudança de 1 unidade no p*K*a de um resíduo catalítico poderia corresponder a uma ordem de grandeza na reação química em determinado pH.

As serina proteinases de insetos formam uma ampla família poligênica, e ocorrem em diversos tecidos dos organismos desempenhando diversas funções fisiológicas. Elas podem estar relacionadas: 1) à ativação da profenoxilase na defesa humoral (Beckage, 2003), sendo, portanto, encontradas na hemolinfa; 2) à ecdise e digestão da cutícula antiga (Riddiford, 2003); 3) à digestão inicial de proteínas

encontradas no lúmem intestinal a subunidades aproveitáveis pelo organismo, desempenhando um papel central no processo digestivo (Terra, 2003).

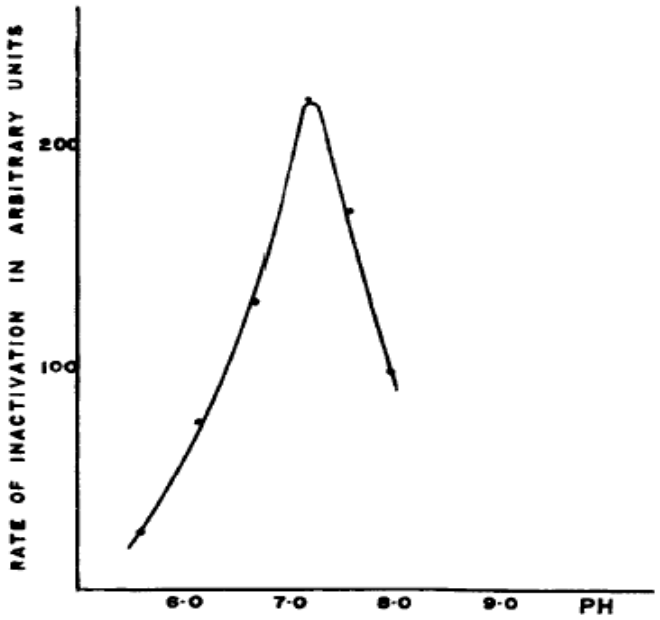


Figura 4. Efeito do pH sobre a modificação da quimotripsina bovina por TPCK (Shaw et al., 1963).

As serina proteinases digestivas dos insetos são de fundamental importância, sendo responsáveis pela digestão inicial de proteínas dos alimentos e pela disponibilização de aminoácidos aos organismos. Em algumas ordens de insetos, como na ordem Lepidoptera, elas representam a maior atividade enzimática no tubo digestivo (Applebaum, 1985). Essas enzimas também desempenham um papel essencial na relação inseto-planta, e sob este aspecto, vale ressaltar que além das isoformas existentes em condições normais, existem algumas que são expressas sob estresse ambiental, chamadas de resistentes. Algumas delas podem clivar inibidores protéicos expressos por plantas, como, por exemplo, a tripsina presente no intestino médio da larva do bruquídeo *Zabrotes subfasciatus*, que cliva IPs da sua α-amilase digestiva presentes em grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Silva *et al*., 2001), desempenhando um papel importante na defesa do inseto frente à resistência desenvolvida pelas

plantas. Assim, o estudo dessas enzimas pode levar ao desenvolvimento da transgenia e a racionalização de esforços destinados à produção desses tipos de cultivos.

Portanto, se faz necessário identificar as serina proteinases (tripsinas e quimotripsinas) digestivas majoritárias previamente caracterizadas de *P. americana* (Dictyoptera), *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *M. domestica* (Diptera: Muscidae), *D. saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e entender as diferenças estruturais entre elas, pois essas diferenças refletem na interação das enzimas com os substratos e inibidores. Pretende-se também encontrar padrões e mecanismos responsáveis pelas diferenças na forma de atuação das serina-endopeptidases digestivas sobre os substratos e pela resistência ou não a inibidores naturais e sintéticos.

Para tal, as serina proteinases devem ser obtidas, purificadas e identificadas diretamente do tubo digestivo dos insetos no intuito de clonar, a partir de bibliotecas de cDNA de intestino de larvas como molde, serina proteinases majoritárias envolvidas em digestão previamente estudadas pelo grupo e com parâmetros cinéticos determinados.

A quimotripsina digestiva majoritária presente no intestino médio de larvas de *T. molitor* foi purificada e microsseqüenciada por Elpidina *et al*. (2005), resultando na seqüência N-terminal IISGSAASKGQFPWQ, que corresponde ao N-terminal de uma seqüência nucleotídica de quimotripsinogênio obtida pelo mesmo grupo. A tripsina digestiva também foi purificada e microsseqüenciada, resultando na seqüência N-terminal IVGGSSISISSVPXQIXLQY. Entretanto, nosso grupo já havia obtido uma seqüência N-terminal da tripsina digestiva majoritária, resultando na seqüência N-terminal IVGGSVINDQLVPQNXS (Cristofoletti, dados não-publicados). Para resolver essa contradição, este estudo tenta desfazer essas contradições, além de microsseqüenciar outras serina proteinases digestivas previamente caracterizadas para, inequivocamente, clonar genes correspondentes a proteínas digestivas e tentar expressões recombinantes das mesmas.

1.5. Estudos da tripsina digestiva de *P. americana*

A barata americana (*P. americana*), é uma das principais pragas urbanas, podendo transmitir doenças a humanos, sendo que vírus, bactérias, protozoários, helmintos e até outras espécies de insetos podem se associar a esses organismos. Além disso, pode causar danos sociais e econômicos, sendo virtualmente impossível contabilizar os prejuízos monetários causados pela deterioração de alimentos e destruição de artigos. São animais de hábito noturno altamente adaptados a todos os nichos ocupados pelo homem.

Seu hábito alimentar polífago decorre de adaptações morfofisiológicas do trato digestivo, permitindo com que se alimente de diversos tipos de materiais, como papel, tecidos, frutas, grãos, castanhas, carnes e até mesmo exoesqueleto de outros insetos (Roth, 1981). Assim, evidencia-se a importância dos estudos do seu sistema digestivo, incluindo as enzimas digestivas responsáveis pela digestão dos alimentos e, conseqüentemente, à sua adaptação aos mais variados nichos ecológicos.

A digestão de proteínas tem um papel fundamental na fisiologia digestiva e no metabolismo, e dentro desse contexto as serina proteinases são de extrema importância, dado que são as proteases mais abundantes do intestino de *P. americana*, apresentando diversas tripsinas e quimotripsinas digestivas. Sabe-se que baratas coletadas em ambiente urbano possuem pelo menos 11 diferentes atividades de serina proteinases presentes em seu intestino, entre tripsinas e quimotripsinas (Hivrale *et al*., 2005), e a atividade tríptica majoritária de machos cultivados em laboratório foi previamente purificada e extensivamente caracterizada bioquimicamente (Lopes *et al*., 2003; Marana *et al*., 2002; Lopes *et al*., 2006).

Frente à grande quantidade de dados bioquímicos e parâmetros físico-químicos desta tripsina, foram levantadas muitas perguntas sobre o mecanismo de catálise e da correlação entre a estrutura e os parâmetros cinéticos. Entretanto, para responder essas perguntas, seria de grande interesse a produção dessa tripsina pela sua expressão recombinante, que possibilitaria mutações sítio-dirigidas de resíduos do sítio catalítico e produção em larga escala da enzima para tentativas de resolução da sua estrutura terciária.

Ainda, apesar de extensivos estudos bioquímicos dessa tripsina digestiva, as suas propriedades fisiológicas, tais como identificação do local de expressão e mecanismo de secreção, não são bem caracterizadas. Distribuições de enzimas mostraram que a atividade majoritária de tripsina se encontra no papo (cerca de 60% da atividade total), sendo que o restante da atividade tríptica se distribui entre os cecos digestivos e a região anterior do ventrículo (Dias, 2004, Figura 5). Não se sabe o local exato de sua expressão, isso porque o papo é uma região esclerotizada e não secretora, especulando-se que possa ser expressa no intestino médio ou nas glândulas salivares. Dados bioquímicos (atividade especifica) apontam que a tripsina deve ser expressa nos cecos digestivos. Além disso, não se sabe o mecanismo de secreção de tripsinas em insetos basais, como em *P. americana.*

Assim, este trabalho também se dedica a estudar a tripsina digestiva majoritária de *P. americana*, melhorando o entendimento de seu papel fisiológico no processo de digestão.

1.6. A quimotripsina digestiva de *M. domestica*

A mosca domestica (*M. domestica*) é uma praga urbana de grande importância por ser vetor de vírus, bactérias, ovos de helmintos e protozoários. Tanto larvas quanto adultos se alimentam de bactérias, sendo que adaptações morfofisiológicas se fazem necessárias para esse hábito de vida.

O trato digestivo da larva de *M. domestica* é dividido em 3 regiões: 1) o intestino anterior; 2) o intestino médio, contendo 4 cecos digestivos na região anterior e a parte tubular (ventrículo); 3) o intestino posterior, contendo íleo, o reto e o ânus.

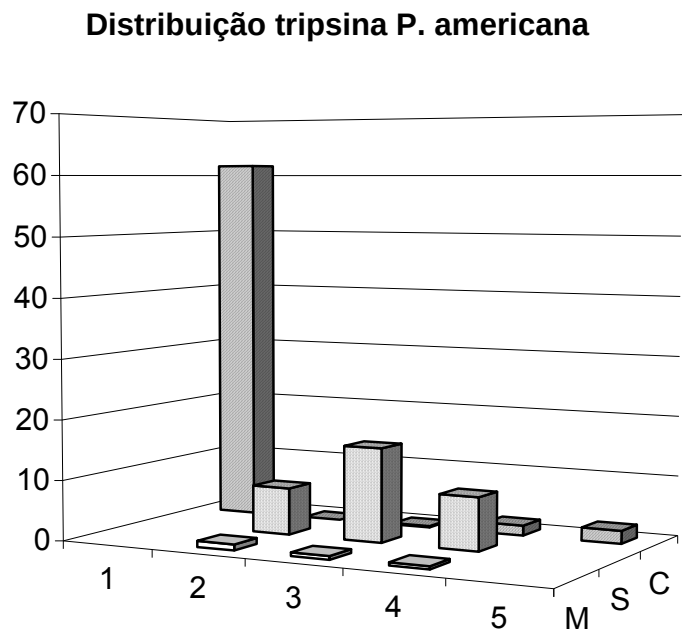


Figura 5. Distribuição da atividade de tripsina ao longo do intestino de P. americana (Dias, 2004).

A parte tubular do intestino médio, o ventrículo, pode ser dividida em 3 partes funcionais: a região anterior do ventrículo, com cerca de um quarto do tamanho total do ventrículo e com pH luminal 6,1; o ventrículo médio, também com cerca de um quarto do tamanho total do ventrículo e com pH luminal em torno de 3,1; e o ventrículo posterior, com cerca da metade do tamanho total do ventrículo e com pH luminal em torno de 6,8 (Figura 6) (Espinoza-Fuentes e Terra, 1987).

No ventrículo médio, região ácida e responsável pela lise bacteriana, encontram-se dois tipos de enzimas digestivas ácidas envolvidas na digestão e lise bacteriana: lisozimas digestivas, envolvidas na quebra da parede bacteriana, e catepsinas D (análogas à pepsina), envolvidas na digestão de proteínas bacterianas (Padilha *et al*., 2009). Além disso, o local de absorção de água é o epitélio dessa região.

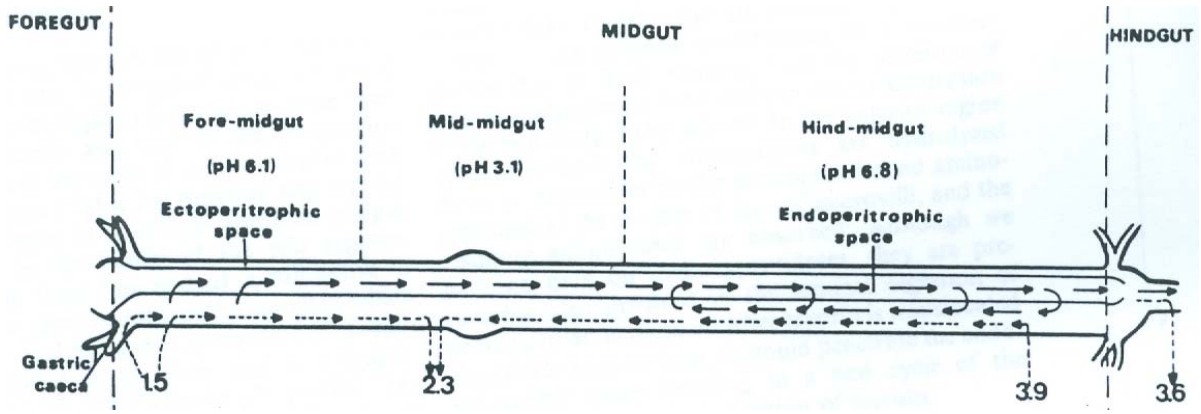


Figura 6. Esquema do intestino de M. domestica (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987). Os valores indicados por setas representam os volumes absorvidos ou secretados.

O ventrículo posterior de *M. domestica* é o lugar responsável pela digestão majoritária das proteínas disponibilizadas após a lise bacteriana e pela absorção dos nutrientes. Além disso, foi demonstrado que é nesse local em que ocorre recirculação endo-ectoperitrófica, pois o fluxo antero-posterior de alimento na região endoperitrófica é contraposto pelo fluxo de água criado na região ectoperitrófica pela sua absorção no ventrículo médio.

Como visto, a digestão de proteínas inicia-se na região ácida do ventrículo médio da larva de *M. domestica*, local de lise bacteriana, pela ação de catepsinas D. Após isso, o alimento passa para o ventrículo posterior, aonde passa a ser digerido por tripsinas solúveis e ligadas à membrana. Assim, essas enzimas têm por função a digestão inicial de proteínas presentes no conteúdo alimentar.

Sabe-se que tripsinas clivam a porção C-terminal de resíduos básicos, e, portanto, as proteínas do bolo alimentar começam a ser digeridas pela ação das tripsinas encontradas no ventrículo posterior. Entretanto, a região central das proteínas do bolo alimentar é rica em resíduos hidrofóbicos e, para que ocorra a disponibilização de aminoácidos, a quebra dessas ligações peptídicas em *M. domestica* deve ser realizada por quimotripsinas, cuja presença já foi descrita em larvas (Blahovec *et al*., 2006), resultando em oligômeros ou dímeros, que serão clivados posteriormente por enzimas de digestão final.

Quimotripsinas de insetos geralmente possuem pH ótimo entre 8-11; entretanto, o valor do pH luminal do ventrículo de *M. domestica* é menor que os valores de pH ótimo de quimotripsinas, indicando que a quimotripsina digestiva de *M. domestica* deve ter diferenças estruturais resultando em diferenças cinéticas e em um deslocamento do pH ótimo, permitindo a enzima ser fisiologicamente funcional. Assim, estudos cinéticos dessa quimotripsina são bastante interessantes, pois evidenciam diferenças no sítio ativo comparado com outras quimotripsinas.

Nenhum estudo fisiológico ou bioquímico foi realizado com a quimotripsina digestiva de *M. domestica*, e não existem dados de distribuição da atividade quimotríptica ao longo do intestino médio. Ademais, não há nenhum estudo demonstrando o mecanismo de secreção de quimotripsinas em insetos.

Jiang et al (1996) descreveram uma quimotripsina de *Aedes aegipty* envolvida com a digestão de proteínas de fêmeas adultas após alimentação. Essa quimotripsina foi expressa de maneira recombinante (sem atividade) e utilizada para produzir anticorpos policlonais em coelhos, os quais foram utilizados para analisar a presença desta proteína antes e após a alimentação. Assim, a produção de quimotripsinas recombinantes em larga escala é importante, pois permite também a produção de anticorpos homólogos que podem ser usados para revelar sua localização e o seu mecanismo de secreção.

Por último, uma consulta ao genoma de *D. melanogaster* (http://flybase.org/), organismo pertencente à mesma classe que a *M. domestica* (Dyptera: Cyclorrapha), encontrou mais de duas centenas de seqüências descritas como homólogas à quimotripsina. Entretanto, não se sabe ao certo se essas seqüências correspondem à quimotripsinas, se são expressas em alguma fase da vida, se possuem alguma função fisiológica e se suas histórias evolutivas têm alguma relação com as quimotripsinas de *M. domestica*, dado que ambos os organismos pertencem à mesma ordem.

Assim, também temos como objetivo estudar a quimotripsina digestiva de *M. domestica* incluindo a sua distribuição da atividade enzimática ao longo do intestino, a purificação da atividade majoritária e sua caracterização bioquímica, além da obtenção de seqüências, a clonagem e a expressão recombinante de genes a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de larvas, melhorando o entendimento do

processo de digestão de proteínas e do padrão de expressão por de diversos genes de serina proteinases ao longo do intestino médio, correlacionando os locais de sua transcrição com de tradução e os mecanismos de secreção dessas enzimas para o lúmem pela produção de anticorpos policlonais. Por último, entender a história evolutiva de genes similares a quimotripsina de *D. melanogaster* e sua relação com os genes de *M. domestica*, comparando com genes de outros insetos.

2. OBJETIVOS

Esse estudo foi dividido em quatro partes, descritas a seguir.

1) Tentativas de estudos estruturais das serina proteinases digestivas de diversos insetos com o intuito de relacionar diferenças estruturais e propriedades das enzimas previamente observadas por nosso grupo, como por exemplo o aumento da hidrofobicidade ao longo da evolução observada em tripsinas digestivas de insetos.
2) Estudos de resistência das serina proteinases digestivas, relacionando dados de hidrofobicidade, inativação por cetonas e modelagens de estrutura tridimensional a partir de seqüências de serina proteinases de insetos a formas de resistências a defesas de plantas.
3) Estudos sobre a tripsina digestiva majoritária de *P. americana*, previamente purificada e caracterizada, mostrando a sua identificação, correlação com uma seqüência nucleotídica e estudos fisiológicos de localização da expressão (transcrição e tradução) e mecanismos de secreção.
4) Estudos bioquímicos e fisiológicos da quimotripsina de *M. domestica*, que não possui nenhum estudo realizado até o presente momento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes químicos

Os tampões, sais e solventes utilizados neste estudo são provenientes da Synth, Sigma-Aldrich (USA) e Merck (Germany).

3.2. Preparação de materiais biológicos

Os materiais utilizados como fonte de enzimas são provenientes de tecidos epiteliais ou conteúdos luminais dos seguintes organismos: *P. americana*, *T. molitor*, *D. saccharalis*, *S. frugiperda* e *M. domestica*. Após dissecção em solução isosmótica, os materiais foram armazenados a -20ºC até sua utilização, quando homogeneizados em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, e submetido a centrifugação a 22.500 x g por 30 minutos a 4ºC em centrífuga (Sorvall RC-5B), sendo separada a fração solúvel da fração de membranas.

Machos adultos de *P. americana* foram adquiridos no setor de Nutrição da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e adaptados por duas semanas a uma dieta de aveia (Quacker) e água, que era fornecida através de algodão umedecido, conforme descrito por Lopes *et al.* (2003). Para dissecção, os animais foram imobilizados em atmosfera de gás carbônico, colocados em gelo e dissecados em solução isosmótica NaCl 225 mM gelada preparada com água bidestilada. Como fonte de proteínas foi utilizada a porção solúvel dos intestinos anterior e médio homogeneizados em água bidestilada.

Larvas de último estágio de *T. molitor* mantidas em cultura sob fotorregime natural em farelo de trigo a 24-26ºC e umidade relativa de 70-75% foram dissecadas em solução NaCl 342 mM gelada, sendo utilizado como fonte de enzimas a porção solúvel do conteúdo posterior do intestino médio.

As larvas de *D. saccharalis* foram criadas em dieta artificial como descrito por Parra e Mihsfeld (1992). Para dissecção, larvas foram imobilizadas em gelo e

dissecadas em solução NaCl 125 mM gelada. Como fonte de enzimas foi utilizada a porção solúvel do conteúdo luminal homogeneizado em água bidestilada.

Larvas de *S. frugiperda* são criadas em laboratório de acordo com Parra (1986) em uma dieta baseada em feijão (*P. vulgaris*), germe de trigo, fermento biológico e ágar sob fotorregime natural a 24-26ºC. Após sua imobilização em gelo, larvas de quinto ínstar são dissecadas em solução NaCl 250 mM gelada, e como fonte de enzimas foi utilizada a porção solúvel do homogeneizado do conteúdo epitelial.

Larvas de *M. domestica* foram criadas em uma mistura de ração comercial para porcos fermentada e palha de arroz (1:2, v/v). As larvas de terceiro ínstar se alimentando ativamente eram dissecadas em solução isosmótica de NaCl 150 mM gelada, sendo utilizado como fonte de enzimas diversas regiões do intestino, descritas posteriormente. Os materiais dissecados foram mantidos a –20°C até uso, sendo então homogeneizados. O intestino de *M. domestica* foi dividido em intestino anterior (IA), ventrículo e intestino posterior (IP). O ventrículo foi dividido em 4 regiões: ventrículo anterior (VA), ventrículo médio (VM), e ventrículo posterior, que foi dividido em região proximal do ventrículo posterior (VPP) e região distal do ventrículo posterior (VPD). A fração solúvel de cada região foi separada da fração de membranas. Esta foi congelada para liberar enzimas aderidas ao glicocálice (Ferreira *et al*, 1989). Após o congelamento, a fração de membranas foi novamente centrifugada, separando a fração de membranas da fração celular solúvel. Todas as regiões e frações foram ensaiadas nas condições descritas. A taxa de excreção (%) de enzimas solúveis foi calculada usando a equação (atividade do intestino posterior/6,1) / (atividade solúvel mais ventricular do ventrículo posterior), dado que o volume do intestino posterior é 6,1 vezes menor que o volume do ventrículo posterior (Espinoza-Fuentes & Terra, 1987).

3.3. Ensaios enzimáticos e determinação de proteínas

Os ensaios enzimáticos tanto de tripsina quanto de quimotripsina foram feitos utilizando diferentes substratos de fluorescência direta, sendo os mais utilizados rotineiramente os substratos de tripsina B-R-MCA (Benzoil-Arg-7-Amida-4-Metil-cumarina; Sigma-Aldrich), Suc-APK-MCA (Succinill-Ala-Pro-Lys-7-Amida-4-Metil-

cumarina; Sigma-Aldrich) e Z-GGR-MCA (Carbobenzoxi-Gly-Gly-Arg-7-Amida-4- Metil-cumarina; Sigma-Aldrich) e de quimotripsina Suc-AAPF-MCA (succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-7-Amida-4-Metil-cumarina; Calbiochem, Chymotrypsin substrate II).

Os substratos foram dissolvidos em DMSO 100% para a concentração final de 1mM e mantidos a 4ºC. Os ensaios a 30º C foram feitos por quatro diferentes intervalos de tempo em tubos de ensaio ou em microplacas brancas contendo tampão em pH adequado (geralmente Tris-HCl 0,1 M pH 8,5) contendo 10 μM de substrato. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). A quantificação da atividade enzimática foi feita pela detecção do produto formado (metilculmarina, MCA) em função do tempo, sendo que para a detecção utilizou-se um espectrofluorímetro (Hitachi, F-2000) com excitação a 380 nm e emissão a 460 nm, ou um leitor de fluorescência em placas Fluorocount (Packard) com filtros de excitação na faixa de 360nm-380nm e de emissão 460 nm - 480 nm.

A determinação de proteínas foi realizada pela utilização do corante Coomassie Blue-G como descrito por Bradford (1976), ou pelo método do ácido bicinchonínico (Smith *et al.*1985), modificado por Morton *et al.* (1992), utilizando ovoalbumina como padrão.

Os parâmetros cinéticos pH ótimo, Km, kcat e eficiência catalítica (kcat/Km) para a atividade de quimotripsina digestiva solúvel de *M. domestica* previamente purificada foram determinados utilizando diversos substratos.

Para verificar o efeito do pH sobre a atividade dessa quimotripsina, ensaios enzimáticos foram realizados com o substrato S-AAPF-MCA em: tampão citrato fosfato 100 mM (pH 6,0-7,0) contendo 200 mM de NaCl; Tris-HCl 100 mM (pH 7,0-9,0) contendo 200 mM de NaCl; Gly-NaOH 100 mM (pH 9,0-10,0) contendo 200 mM de NaCl. Controles de estabilidade da enzima em cada pH foi realizado.

Os parâmetros Km e kcat foram determinados através de ensaios enzimáticos utilizando diferentes concentrações de substrato, a saber: 1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM. Um controle de estabilidade da enzima à presença de DMSO foi realizado com a maior concentração de solvente.

Para modificação da quimotripsina digestiva pura foi utilizado TPCK solubilizado em DMSO 100%, sendo posteriormente diluído para 100 μM em tampão Tris-Hcl 0,1M

pH 8.0. A enzima purificada foi incubada com TPCK por diferentes períodos de tempo a 30°C. Após a incubação, a reação de modificação foi interrompida por diluição com 100 volumes de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo 10 μM de substrato de quimotripsina S-AAPF-MCA. Assim, além de interromper a reação de modificação, o ensaio enzimático para quantificar a modificação era prontamente iniciado.

3.4. Inativação térmica e por TPCK das atividades de quimotripsina

Inativações térmicas a 46°C foram realizadas utilizando-se a fração solúvel e a fração precipitada do homogeneizado do ventrículo posterior de *M. domestica* na presença e na ausência de 10 mM de Triton X-100. Para tal, a enzima foi incubada na temperatura indicada, e alíquotas dessa enzima foram retiradas a determinados períodos de tempo e mantidas em gelo, sendo determinada a atividade enzimática de cada uma delas. O controle utilizado foi enzima não incubada a 46°C (mantida em gelo pelo mesmo período de tempo).

TPCK solubilizado em DMSO 100% foi previamente diluído em tampões de diferentes pHs para a concentração desejada. As modificações químicas de quimotripsina de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram feitas incubando-se o homogeneizado dos respectivos intestinos médios (descritos acima) com TPCK diluído em diferentes tampões (Tris-Hcl 0,1 M pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 e 9,0; Gly-NaOH 0,1 M pH 9,0; 9,5 e 10,0; CAPS-NaOH 0,1 M pH 10,0; 10,5 e 11,0) por determinado período de tempo a 30°C. Após a incubação, a reação de modificação foi interrompida por diluição com 100 volumes de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo 10 μM de substrato de quimotripsina S-AAPF-MCA. Assim, além de interromper a reação de modificação, o ensaio enzimático para quantificar a modificação era prontamente iniciado.

As modificações da quimotripsina de *T. molitor* e *D. saccharalis* foram realizadas com TPCK 10 μM em diferentes períodos de tempo por até 25 minutos. A quimotripsina de *S. frugiperda* foi modificada por TPCK 1 mM em diferentes períodos de tempos até 200 minutos. Controles de homogeneizado em solução de DMSO diluído nos respectivos tampões foram feitos. A reação de modificação em cada pH foi realizada até se atingir de maneira linear um plote do logaritmo da atividade remanescente em

função do tempo de modificação, a partir do qual foram calculados os k_{obs} de primeira e segunda ordem.

Determinações de k_{obs} máximo e p*K*a dos grupos catalíticos a partir das modificações em função do pH foram determinados utilizando o programa EnzFitter 1.05 (R.J. Leatherbarrow, Elsevier-Biosoft, Cambridge, UK)

3.5. Purificação de serina proteinases

Tripsinas e quimotripsinas digestivas majoritárias do intestino médio de larvas *D. saccharalis* foram purificadas até a homogeneidade através de um passo cromatográfico. A tripsina digestiva foi purificada utilizando uma coluna de afinidade benzamidine-sepharose (Lopes *et al*., 2006). Após a aplicação do homogeneizado à coluna, esta foi lavada com Tris-HCl 20 mM pH 8,5 contendo NaCl 200 mM, e a atividade foi eluída com 0.1 M de benzamidina. A quimotripsina digestiva foi purificada utilizando a coluna de afinidade para PBA-agarose (Sato *et al*., 2008). Após a aplicação do homogeneizado à matriz, a coluna foi lavada com 20 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM, e a atividade quimotríptica foi eluída utilizando 0.1 M de PBA no tampão. Frações de 1 mL foram coletadas, sendo ensaiadas com os respectivos substratos para detecção da atividade de tripsina e de quimotripsina. As frações ativas de cada enzima foram reunidas, fervidas e dialisadas, sendo posteriormente analisadas através de SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

A quimotripsina digestiva solúvel majoritária do conteúdo luminal do intestino médio de *S. frugiperda* foi parcialmente purificada através de uma cromatografia de afinidade utilizando uma coluna PBA-agarose. Após a aplicação da fração solúvel do homogeneizado em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 100 mM, a coluna foi lavada com 20 mL desse tampão, e a atividade quimotríptica foi eluída da coluna com 20 mL de tampão Tris 20 mM contendo NaCl 100 mM e PBA 0,1 M.

A atividade solúvel majoritária de tripsina do conteúdo luminal de intestino médio de larvas de *S. frugiperda* foi purificada aplicando-se o homogeneizado em tampão Tris 20 mM pH 8,5 contendo NaCl 100 mM em uma coluna Hitrap Benzamidina (Pharmacia), a qual foi lavada com 10 mL desse tampão. A atividade de quimotripsina foi eluída da

coluna utilizando-se tampão Tris 20 mM pH 8,5 contendo NaCl 100 mM contendo Benzamidina 0,5 M.

A tripsina de *T. molitor* foi purificada como descrito por Cristofoletti *et al*. (2001) através de 2 passos cromatográficos de troca catiônica. A fração solúvel do homogeneizado de 100 animais foi diluída 10 vezes em tampão Tris 20 mM pH 7,0 e aplicada utilizando uma seringa à coluna Hitrap Q, na qual a atividade tríptica não se liga. A coluna foi lavada com 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0, sendo coletadas as frações lavadas (flow-through) contendo a atividade tríptica. A coluna foi regenerada pela aplicação de 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0 contendo 1 M de NaCl. A amostra coletada teve o pH acertado para 9,0 e foi então reaplicada à mesma coluna Hitrap Q conectada a um sistema de baixa pressão AKTA prime e equilibrada em Tris-HCl 20 mM pH 9,0, sendo a coluna lavada com Tris-HCl 20 mM pH 9,0 e um pico de atividade tríptica eluído durante um gradiente de NaCl 0-1 M.

A purificação da tripsina digestiva de *P. americana* foi realizada através de dois passos de cromatografias aniônicas, como descrito por Lopes *et al.* (2003). A fração solúvel do homogeneizado de intestino anterior e médio foi diluída em piperazina 20 mM pH 5,0 e aplicada a uma coluna High Q (Pharmacia), sendo eluído um pico de atividade ao longo de um gradiente de NaCl. As frações ativas foram reunidas e dialisadas contra piperazina 20 mM pH 10,0, sendo posteriormente aplicadas a uma coluna Resource Q (Amershan), sendo um pico de atividade eluído ao longo de gradiente de NaCl. As frações ativas foram reunidas e armazenadas a –20°C até serem utilizadas.

A atividade majoritária de quimotripsina presente no intestino médio de *M. domestica* foi purificada até a homogeneidade através de uma cromatografia de afinidade em coluna PBA-Agarose conectada a uma bomba peristáltica. Para tal, homogeneizado do ventrículo posterior diluído em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM foi aplicado à coluna, a qual foi lavada com 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM. A atividade de quimotripsina foi eluída em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 200 mM e 0,1 M de PBA em 2,5% de etanol. O material resultante desta marcha de purificação foi submetido a um SDS-PAGE para análise de sua pureza, e este revelou apenas a presença de uma

banda única. O material purificado foi mantido a –20°C em tampão contendo PBA para manter a estabilidade da atividade enzimática, sendo antes dos ensaios enzimátios submetido a uma cromatografia Hitrap desalting para a retirada do inibidor PBA.

3.6. Microsseqüenciamento N-terminal de enzimas digestivas purificadas.

As amostras de enzimas digestivas purificadas, a saber: 1) tripsina de *P. americana*; 2) tripsina de *T. molitor*; 3) quimotripsina de *D. saccharalis*; 4) tripsina de *D. saccharalis* foram dialisadas para a retirada do sal e liofilizada por centrifugação a vácuo, sendo que 20 µg de proteína pura foram submetidos a microsseqüenciamento posteriormente no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp). Essas proteínas foram microsseqüenciada por degradação de Edman, pela reação de PITC com o resíduo N-terminal, com posterior clivagem desse resíduo e análise da massa desse resíduo, resultando em um cromatograma com picos contendo os resíduos de aminoácidos prováveis, trabalho realizado pela Drª Izaura Yoshiko Hirata do Depto de Biofísica da Unifesp-EPM.

3.7. Precipitação de serina proteinases solúveis por sulfato de amônio

Sulfato de amônio (0,17; 0,34; 0,51; 0,68; 0,85; 1,02; 1,19; 1,36; 1,53; 1,7; 2,0; 3,0 M) foi adicionado às frações solúveis do homogeneizado de *T. molitor, D. saccharalis* e *S. frugiperda*. Após a adição de sulfato de amônio, a amostra permaneceu a 4°C sob agitação branda por 15 minutos, sendo depois centrifugada 30 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante então foi coletado com seringa e agulha de insulina, sendo o precipitado ressuspendido em água gelada. Tanto as frações solúveis quanto precipitadas eram ensaiadas e a atividade de ambas as frações comparadas à atividade total da fração solúvel do homogeneizado utilizado (controle).

3.8. Cromatografias de interação hidrofóbica de serina proteinases

Cromatografias de interação hidrofóbica foram realizadas em sistema de alta pressão (FPLC) utilizando colunas Resource^{tm} Phe (GE HealthCare). Para tal, o homogeneizado de *T. molitor, D. saccharalis* e *S. frugiperda* diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 foram aplicados na coluna previamente equilibrada com mesmo tampão. As proteínas foram eluídas da coluna com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e com gradiente de SDS 0-2%. Amostras de 0,4 mL foram coletadas, e ensaios enzimáticos de tripsina e quimotripsina foram realizados como descrito.

Além disso, cromatografias de interação hidrofóbica da quimotripsina de *S. frugiperda* foram realizadas da mesma maneira em colunas Resource^{tm} ISO (GE HealthCare) e Resource^{tm} ETH (GE HealthCare).

3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições desnaturantes e semi-desnaturantes

A análise de pureza de proteínas foi realizada por separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12% contendo 0,1% de SDS (Laemmli, 1970), combinando amostras de proteínas com tampão de amostra: Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2,5%, β-mercaptoetanol 0,36 mM, glicerol 10% v/v e azul de bromo fenol 0,005% (p/v). As amostras foram fervidas por 3 minutos a 95ºC com tampão de amostra antes da aplicação, e a corrida foi feita a uma voltagem constante de 200V. Os padrões de massa molecular (Bio-Rad) utilizados foram Lisozima (14400 Da), inibidor de tripsina de soja (21500 Da), anidrase carbônica (31000 Da), ovoalbumina (45000 Da), albumina sérica (66200 Da) e fosforilase b (97400 Da).

Os géis foram corados com prata (Blum *et al.*, 1987) ou com coomassie Blue-R em metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) (Laemmli, 1970).

Ensaio de atividade no conteúdo luminal de *M. domestica* após separação eletroforética semi-desnaturante 4°C e 100V em SDS-PAGE 12% foi realizado aplicando-se a amostra solúvel do intestino médio de *M. domestica* misturada a tampão de amostra sem ß-mercaptoetanol e sem aquecimento.

Após a separação eletroforética, o substrato fluorescente S-AAPF-MCA foi adicionado sobre o gel de poliacrilamida, e a liberação do produto fluorescente foi verificada em transluminador de luz UV. Padrões de massa molecular pré-corados (Bio-Rad) foram utilizados para determinar a massa molecular da enzima nativa.

3.10. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e clonagem de serina proteinases

As reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 0,5 µL de cDNA molde, 0,5 µL de cada um dos iniciadores (direto e reverso) de concentração 10 µM, 1,0 µL de uma mistura de dNTPs 10 mM, 5,0 µL de tampão de PCR (Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM, glicerol 50% e estabilizantes), 1,0 µL de TAQ DNA Polimerase (2,5 Unidades), 1,5 µL de $MgCl_2$ (50 mM) ou 3,0 µL de $MgCl_2$ (25 mM) e água MilliQ estéril para um volume final de 50 µL de reação.

A reação iniciava a 94ºC por 7 minutos, sendo posteriormente feitos ciclos de reação e um período de elongação terminal de 7 minutos a 72ºC, ficando por tempo indeterminado a 4ºC. Os ciclos iniciavam-se pela desnaturação da fita dupla de DNA 1 min a 94°C, sendo seguido do anelamento dos iniciadores à fita de DNA por 1 min a temperatura dependente do Tm dos iniciadores utilizados, e um ciclo de polimerização da DNA polimerase por 1 min a 72°C.

Para a clonagem do tripsinogênio digestivo de *P. americana* (PaTry) sem o peptídeo sinal no plasmídeo pAE (Ramos *et al*., 2004) foram desenhados os 2 oligonucleotídeos iniciadores específicos da tripsina para os plasmídeos pAE (para expressão em *Escherichia coli*): direto 5' CGG GAT CCG CTG TTC CTA AAG CCA AGC G 3', contendo o sítio de restrição para a enzima BamHI, e o iniciador reverso 5' GGA ATT CTT AGT TGA CTC CAG TCT GTT CTG TAA TG 3', contendo o sítio de restrição para a enzima EcoRI, e para tentativas de expressão desse tripsinogênio em células de insetos, foram desenhados os iniciadores específicos para clonagem no plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen) 5' CGG GAT CCA TGC ATC ACC ATC ACC ATC ACC TCC GCT ACC TGG TAC TTG CTT CCC TC 3' e 5' GGA ATT CTT AGT TGA CTC CAG TCT GTT CTG TAA TG 3', os quais adicionam os sítios de restrição das

enzimas Bam H1 e Eco R1, respectivamente, às extremidades do fragmento de DNA obtido. Esse fragmento de DNA amplificado corresponde ao gene que expressa a pré-pró enzima, ou seja, aquela que contém o peptídeo sinal e o pré-peptídeo, para se obter a enzima recombinante em células de insetos sendo produzida e secretada ao meio de cultura.

O quimotripsinogênio digestivo de *T. molitor* foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores específicos direto para clonagem no plasmídeo pAE 5' AAC TGC AGC CTG CCA GCA GAA CTC CCA C 3', contendo o sítio de restrição para a enzima PstI, e reverso 5' GGA ATT CTT AAA CTC CGG CAT TCG AAC 3', contendo o sítio de restrição para a enzima EcoRI. A amplificação do tripsinogênio digestivo de *T. molitor* foi realizada utilizando os iniciadores específicos de tripsina para o plasmídeo pAE: direto 5' AAC TGC AGC GTC CCA CCT TTC CTC CGC 3', contendo o sítio de restrição para a enzima PstI, e reverso 5' GGA ATT CTT ATA TTC CGG CGG TTT GTT G 3', contendo o sítio de restrição para a enzima EcoRI.

O quimotripsinogênio de *M. domestica* (MdChy1) foi amplificado por PCR utilizando iniciadores específicos 5' CG GGA TCC GCC AGC TTA GAC TCC ATT GTC 3' e 5' G GAA TTC TTA TTT GGA ATT GTT TTG AAT TG 3', os quais adicionam os sítios de restrição das enzimas Eco R1 e Bam H1, respectivamente, às extremidades do fragmento de DNA obtido.

Tanto os fragmentos de DNA obtidos quanto os plasmídeos de clonagem foram digeridos com as enzimas de restrição específicas para cada ponta de acordo com o manual do fabricante (New England BioLab). Após a dupla digestão de fragmento e plasmídeo, ambos foram purificados em gel de agarose, sendo que os fragmentos de DNA digeridos foram ligados aos plasmídeos digeridos overnight a 16°C. A reação de ligação (20 µL) utilizou 9 µL de fragmento digerido, 1 µL de plasmídeo digerido, 1 µL de T4 DNA Ligase e 4 µL de tampão que acompanha o kit da enzima ligase, sendo o volume completado com água Milli Q.

3.11. Eletroforese em gel de agarose e purificação dos fragmentos de DNA

Agarose foi solubilizada completamente em tampão TAE (Tris-Acetato 40 mM contendo EDTA 2,0 mM pH 8,5) por aquecimento em microondas para uma concentração final de 1,0% (p/v), e gelificada em cuba horizontal de eletroforese (Life-Technologies). A análise das amostras foi feita pela mistura do produto de PCR com 2,0 µl de tampão de amostra contendo azul de bromo fenol e xilenocianol. A eletroforese foi realizada no mesmo tampão TAE a 100V por 20 minutos. As amostras são visualizadas em transluminador de UV (312 nm) após coração em solução de brometo de etídio (5 µg/mL) por cerca de 5 minutos, após lavagem em água.

Os produtos de PCR foram purificados pela excisão da banda de peso molecular correspondente à esperada em gel de agarose e eluição do DNA do gel após sua dissolução. Para tal, foi utilizado o Kit QIAquick Gel Extration Kit (250), QUIAGEN.

3.12. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T, transformação de células XL1-Blue por choque térmico e plaqueamento de células

Para seqüenciar os produtos de PCR, estes foram ligados ao vetor pGEM-T Easy Vector System I (Promega). A reação de ligação do produto de PCR ao vetor foi feita incubando-se overnight a 4ºC: 0,5 µL do plasmídeo, 1,5 µL do material eluído da purificação do DNA do gel, 2,5 µL de Tampão 2X (Tris-HCl 60 mM pH 7,8 contendo 20 mM de $MgCl_2$, 20 mM de DTT, 2 mM de ATP e 10% PEG) e 0,5 µL de T4 DNA Ligase.

Plasmídeos contendo genes clonados foram misturados a células XL1-Blue competentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Um choque térmico de 90 segundos a 42ºC foi aplicado para a entrada do plasmídeo nas células. Após isso, as células foram resfriadas novamente em gelo por 3 minutos, e 500 µL de meio Líquido LB adicionado às células, com uma incubação posterior a 37ºC para a recuperação e expressão do gene de resistência à ampicilina presente no plasmídeo pGEM-T Easy Vector System I usado na transformação.

A suspensão de células transformadas por choque térmico foram espalhadas com uma alça de Henle em meio sólido LB-Ágar contendo maltose 0,2% (p/v), $MgSO_4$

10 mM, ampicilina (100 µg/mL), 100 µL de IPTG 100 mM (para indução do promotor da β-galactosidase) e 100 µL de X-Gal 50 mg/mL para indicar e selecionar Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) contendo plasmídeos ligados ao fragmento de DNA de interesse (colônias brancas). As placas foram incubadas em estufa a 37ºC por 16 horas para formação de UFCs.

3.13. Crescimento de bactérias em meio líquido e preparação de plasmídeos

UFCs brancas foram selecionadas com palitos de dente esterilizados e colocadas para crescer em 3 mL de meio líquido LB contendo ampicilina (100 µg/mL) durante 16 horas com agitação 250 RPM a 37ºC. Após crescerem, as bactérias foram precipitadas por centrifugação (sendo descartado o meio de cultura) e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e Rnase a 100 µg/mL. As células ressuspendidas foram então lisadas com uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v), sendo posteriormente adicionada a solução de neutralização composta de acetato de potássio 1,32 M pH 4,8. O lisado foi então centrifugado a 10.000 X g por 5 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante aplicado a uma mini-coluna que interage com o plasmídeo de acordo com a carga. A coluna foi lavada com tampão acetato 80 mM contendo EDTA 40 µM e etanol 55% (v/v) para a retirada do material contaminante, sendo que o plasmídeo é eluído em pHs de neutro a levemente alcalino. Para tal, foi utilizado Tris-HCl 10 mM pH 8,0 que além de eluir o plasmídeo favorece a sua estabilidade.

3.14. Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento de DNA foi utilizado o procedimento que se baseia no método de interrupção da reação de polimerização do DNA através da utilização de dideoxiribonucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977). O seqüenciamento foi realizado no aparelho ABI PRISM™ (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se 2 µL da mistura da reação Big Dye terminator V3.0 (Applied Biosystems), 1 µL de DNA, 9,6 pmol de cada

oligonucleotídeo, Tris-HCl 200 mM pH 9,0 e $MgCl_2$ 5 mM em um volume final de 15 µL. A reação foi incubada por 2 minutos a 95ºC, seguida de 35 ciclos de 45 segundos a 96°C, 30 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Terminada a reação, as amostras foram precipitadas com etanol 100% e glicogênio, lavadas com etanol 70%, suspensas em formamida, desnaturadas e aplicadas no seqüenciador automatizado.

3.15. Extração de mRNA de *M. domestica* e *P. americana* e síntese de cDNA para análise da expressão de genes

Todos os reagentes e materiais utilizados para a extração de RNA total foram tratados previamente com água contendo 0,1% de DEPC para a inativação de RNAses ou fornados a 160°C overnight.

Tecidos epiteliais de diferentes partes do intestino médio (ventrículos anterior, médio e posterior) de larvas de *M. domestica* e tecidos epiteliais dos cecos, ventrículo anterior e ventrículo posterior, além de glândulas salivares de *P. americana* foram individualmente macerados na presença de Trizol (Invitrogen), e RNAm de cada região foi extraído. Após isso, clorofórmio foi adicionado, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos, e separação de duas fases: uma orgânica e outra aquosa, que foi coletada, pois é nesta que o RNA total permanece. A esta solução aquosa foi adicionado Isopropanol para concentração final de 33% para a precipitação do RNA total, sendo novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. O pellet formado foi lavado com etanol 75% e centrifugado novamente. A solução etanólica foi descartada e o material foi seco à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspendido em 30 µL de água DEPC.

Para a purificação do RNA total foi utilizado o kit “RNAeasy Mini Kit” (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Esse material foi utilizado na Amplificação de RNAm utilizando-se iniciadores para anelarem na cauda de Poli-A Kit “SuperScrip First strand synthesis system for RT” (Invitrogen). A integridade desse RNA total foi verificada através da integridade do RNA ribossômico visualizada em gel de agarose após separação eletroforética.

Foi utilizado 100 μg do RNA total, e este foi misturado a 10 mM de dNTPs mix e 0,5 μg de oligo (dT). A seguir a amostra foi incubada a 75°C por 10 minutos e foi adicionado a amostra 10X Rt buffer, 25 mM $MgCl_2$, 0,1 M DTT e 1 unidade de RNAseOUT (inibidor recombinante de RNAse). A seguir a amostra foi incubada a 42°C por 2 min, sendo adicionadas 50 unidades de Super Script II RT (transcriptase reversa) e a amostra incubada novamente a 42°C por 90 minutos, para que a enzima transcrevesse o RNA mensageiro a DNA. Para finalizar a reação a amostra foi incubada a 70°C por 15 minutos, e adicionando-se a seguir 1 unidade de RNAseH para despolimerizar o RNA mensageiro, com incubação de 20 minutos a 37°C.

Essas amostra foram utilizadas para a verificação da presença de transcritos primários e análise da expressão de alguns genes em diferentes regiões dos intestinos médios de cada inseto através de RT-PCR, ou seja, PCR realizado utilizando como molde a fita simples sintetizada como descrito acima.

3.16. Transformação de células competentes

Vetores de expressão (0,5 μL) contendo os genes clonados foram misturados a 100 uL de células termocompetentes e incubadas em gelo por 30 minutos. Um choque térmico de 90 segundos a 42ºC foi aplicado para a entrada do plasmídeo nas células. Após isso, as células foram resfriadas novamente em gelo por 3 minutos, e 500 μL de meio Líquido LB adicionado às células, com uma incubação posterior a 37ºC com agitação para a recuperação.

3.17. Expressão recombinante de serina proteinases

Após as clonagens da tripsina de *P. americana* (PaTry) e das tripsina e quimotripsina de *T. molitor* nos vetores de expressão serem inseridas às células competentes, essas foram crescidas em 100 mL de meio líquido LB-Ágar contendo Ampicilina (100 μg/mL) até atingirem uma absorbância a 600 nm de 0,500. Nesse momento, 1 mL de células não induzidas foram aliquotadas como controle, e então IPTG foi adicionado para uma concentração final de 1 mM para a indução do promotor

da β-galactosidase do operon Lac. Após a indução, 1 mL de células foram aliquotadas para análise da expressão das proteínas de interesse.

O vetor de expressão (0,5 µL) pAE clonado com o PaTry foi incubado a 100 uL de células competentes em gelo por 30 minutos, seguido de um choque térmico de 90 segundos a 42ºC. Após isso, as células foram resfriadas novamente em gelo por 3 minutos, e 500 µL de meio Líquido LB adicionado às células, com uma incubação posterior a 37ºC. As linhagens de bactérias utilizadas foram BL21 (DE-3), Origami (DE-3) e BL21 (DE-3) artic cells.

Essas bactérias foram plaqueadas em LB-Agar contendo ampicilina (100 µg/mL) e crescidas overnight a 37ºC. Colônias foram então crescidas em LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e as bactérias foram induzidas por IPTG 1 mM.

O PaTry foi clonado no plasmídeo pFastBac 1, que contém além de uma região para a inserção do gene de interesse e um gene de resistência a ampicilina, um sitio de transposição. O gene da pro-enzima (tripsina com o peptídeo sinal) foi clonado nesse vetor. Após a clonagem do gene ao plasmídeo, este transformou células XL1-Blue para a sua propagação, sendo purificado posteriormente por mini-preparação de plasmídeos.

Esse plasmídeo contendo o PaTry foi utilizado para transformar por choque térmico a linhagem de células *E. coli* DH10Bac (Invitrogen Life Technologies), que contém o genoma do baculovírus contendo um sítio de transposição e uma transposase. Após o choque térmico, 900 mL de meio SOC estéril foi adicionado e as células permaneceram por 4 horas a 37°C com agitação para recuperação.

Após ser transformada pelo plasmídeo pFastBac 1 contendo o gene de interesse, essa linhagem é plaqueada em LB-Agar contendo Kanamicina (50 µg/mL), Gentamicina (7 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), IPTG (40 µg/mL) e X-GAL (100 µg/mL) para a seleção de UFCs contendo os plasmídeos e os bacmídeos recombinantes (seleção de UFCs brancas).

Essas UFCs, após serem crescidas em meio líquido LB contendo os antibióticos previamente citados, tiveram os bacmídeos recombinantes extraídos e purificados. Reações de PCR utilizando iniciadores específicos do PaTry confirmaram a presença do gene clonado nos bacmídeos recombinantes produzidos.

Uma quantificação de DNA foi realizada com esses bacmídeos utilizando um espectrofotômetro do tipo nanodrop, mostrando que havia uma concentração de 2,1 µg/µl de DNA dos bacmídeos.

O bacmídeo recombinante produzido foi utilizado para infectar células Sf9. Para tal, um estoque de células com viabilidade de 98% foi crescido em meio líquido Sf100 sob agitação constante e temperatura de 28°C até atingirem uma quantidade de 10^7. Uma alíquota de 1 mL desse estoque então foi colocado em placa e permaneceu a 28°C em estufa de ambiente saturado de H_2O por 1 hora sem agitação para que ocorresse adesão entre as células.

Após a adesão das células, bacmídeo recombinante combinado com Cellfectina ou combinado com Lipofectamina foi adicionado para ocorrer a infecção das células pelo bacmídeo recombinante.

Após a infecção em placa, essas células infectadas foram lavadas com meio Sf100 e crescidas em suspensão nesse meio por 72 horas a 28°C com agitação constante. A partir desse momento, células em suspensão eram contadas com a utilização de Tripan Blue misturado às culturas celulares infectadas e controle. Fotos de lâminas das culturas celulares foram tiradas para verificar a sua morfologia e indícios de infecção pela presença de restos celulares resultantes de lise e presença de cristais de poliedrina dentro da célula.

As células aderidas, após serem infectadas, foram lavadas com meio de cultura, sendo posteriormente estocadas como fonte viral. Uma alíquota destas células foi crescida em meio liquido a 28°C com agitação constante. Essa cultura celular, após 72 horas, foi centrifugada, sendo o sobrenadante (contendo baculovírus recombinantes propagados) chamados de propagação um (P1). Outros três ciclos de crescimento de células e infecção foram realizados com os sobrenadantes aplicados a uma cultura de células em suspensão contendo 10^6 de células Sf9 das infecções anteriores, sendo denominados P2, P3 e P4, respectivamente. P4, que teoricamente possui uma maior carga viral, foi utilizada para a infecção de células Sf9 e produção de proteínas recombinantes (P5).

Após essa infecção, as células foram centrifugadas e separadas do sobrenadante, sendo a expressão da tripsina analisada no sobrenadante.

O PaTry clonado no vetor de expressão pAE foi utilizado para transformar linhagens de *E. coli* BL21 (DE-3), BL21 (DE-3) Artic Cells e Origami (DE-3). Essas bactérias transformadas foram plaqueadas em LB-Ágar contendo Ampicilina (100 µg/mL), sendo que colônias isoladas foram crescidas em meio líquido LB contendo Ampicilina (100 µg/mL) até uma absorbância a 600 nm de 0,500, quando IPTG 1 mM foi adicionado para a indução da expressão recombinante.

Testes de expressão foram realizados nessas linhagens primeiramente a 37°C para verificar a sua expressão, sendo posteriormente realizados testes em temperaturas menores para tentar a sua expressão de maneira solúvel.

O quimotripsinogênio digestivo de *T. molitor* clonado no vetor de expressão pAE transformou linhagens de *E. coli* BL21 (DE-3) e Origami (DE-3). Colônias isoladas foram crescidas em LB contendo Ampicilina (100 µg/mL) até atingirem absorbância a 600 nm 0,500, sendo adicionado IPTG 1 mM. Testes de expressão primeiramente a 37°C foram realizados para verificar a sua expressão recombinante.

O quimotripsinogênio de *M. domestica* (MdChy1) clonado no vetor de expressão pAE foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* BL21 STAR (DE3). Essas foram crescidas em 100 mL de meio líquido LB-Ágar contendo Ampicilina (100 µg/mL) e Cloranfenicol (70 µg/mL) a 37°C até atingirem uma absorbância a 600 nm de 0,500. Nesse momento IPTG foi adicionado para concentração final de 1 mM e a indução ocorreu por 2 horas a 37°C. Para análise da expressão da proteína de interesse células não induzidas e células induzidas por IPTG 1 mM foram comparadas através de SDS-PAGE.

3.18. Lise de bactérias induzidas, análise do sobrenadante e purificação de proteínas recombinantes

Células induzidas (50 mL) por IPTG foram centrifugadas por 15 minutos a 3000g, sendo o sobrenadante (correspondente ao meio de cultura) descartado e o sedimentado de células congelado a -80ºC, sendo posteriormente ressuspendido em 1 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,0 contendo imidazol 10 mM, NaCl 100 mM e glicerol 10%. Esse material ressuspendido foi sonicado por 3 vezes por 15 segundos

em gelo, com intervalos de 1 minutos entre eles, e após isso, o material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 g. as proteínas solúveis estão presentes na fração solúvel, enquanto que as proteínas insolúveis (corpúsculos de inclusão) se encontram na fração precipitada.

A fração solúvel das proteínas recombinantes expressas foi submetida a purificação em batching com a utilização de resina Ni-NTA Agarose. Para tanto, 200 µL de resina previamente equilibrada com tampão de lise foi adicionada a 1 mL obtido da fração solúvel das proteínas e submetido a incubação por 15 minutos a 4ºC. Após esse período, O material foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 g, e esse primeiro sobrenadante (não ligado) coletado para posterior análise. A matriz foi ressuspendida em 1 mL de tampão de lise, incubada a 15 minutos sob agitação a 4ºC, centrifugada e o sobrenadante (lavado) recolhido para posterior análise. Outros 4 passos de lavagem da resina como este foram realizados. Após isso, a resina foi ressuspendida em 1 mL de tampão de lise contendo 300 mM de imidazol para eluição das proteínas ligadas à matriz, ficando incubada por 15 minutos a 4ºC sob agitação e sendo centrifugado posteriormente. O sobrenadante resultante deste passo (eluído) foi coletado como fonte de enzimas solúveis purificadas, o qual também foi utilizado posteriormente para analisar a expressão das proteínas recombinantes.

3.19. Produção de anticorpo policlonal anti-rMdChy1

Dois coelhos foram imunizados utilizando o quimotripsinogênio recombinante de *M. domestica* purificado. Para tal, 1 mg de rMdChy1 foi aplicada a quatro SDS-PAGE, e as bandas de proteína referentes à proteína recombinante expressa foram recortadas, o gel macerado e misturado com coadjuvante de Freund completo (produto Sigma nº F5881) para uma primeira aplicação no coelho.

Uma segunda aplicação de 500 µg foi realizada 21 dias após essa aplicação, sendo feita da mesma maneira, mas utilizando o coadjuvante de Freund incompleto (produto Sigma nº F5506).

O anti-corpo foi semi-purificado de acordo com o procedimento já estabelecido (Jordão *et al.*, 1996). O sangue coletado (pré-imune e imune) foi incubado por 1 hora a

37 °C, seguindo-se incubação a 4 °C por uma noite. Esse material foi submetido a centrifugação a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante (soro) foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8 numa proporção 1:1. Essa etapa foi seguida de incubação por uma noite à temperatura ambiente, e centrifugado 5000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspendido em solução 50% saturada de sulfato de amônio pH 6,8 e submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores. O precipitado final foi ressuspendido em 2 mL de NaCl 0,1 M e dialisado por 20 horas contra 1000 volumes de 0,1 M de NaCl a 4 °C com uma troca da solução de NaCl. Por fim, o material obtido foi aliquotado e mantido a –20 °C.

3.20. Western blot

Para o reconhecimento de proteínas por anticorpos, amostras resolvidas em SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (western blot). Padrões de massa molecular pré-corado (Low Range, BIO-RAD) foram utilizados para verificação da massa molecular das bandas reconhecidas . a transferência foi realizada através de eletroforese semi-seca para membrana de nitrocelulose em um aparelho de transferência semi-seca (BIO-RAD) conectado a uma fonte. Para transferência, utilizou-se tampão de transferência Tris 48 mM Gly 38 mM contendo metanol 20% e SDS 0,037%

Um pedaço de papel de 9,5 cm x 5,5 cm e 3 mm de altura foi colocado embaixo da membrana de nitrocelulose de 9,0 cm x 5,0 cm previamente banhada em tampão de transferência. Acima da membrana o SDS-PAGE foi colocado e acima deste, outro pedaço de papel de 9,5 cm x 5,5 cm e 3 mm de altura. Os pedaços de papéis foram umedecidos com o tampão de transferência.

A transferência ocorreu por 30 minutos a 15 V, quando é possível visualizar que o padrão de peso molecular pré-corado migrou do SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, indicando que as proteínas de interesse também foram transferidas.

Para evitar a interação inespecífica do anticorpo a regiões da membrana de nitrocelulose sem proteínas, esta foi bloqueada utilizando leite em pó desnatado

MOLICO 5% (p/v) diluído em tampão TBS (Tris 50 mM pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M) com Tween 20 0,05% (TBS-T) por 12 horas a 4°C.

Após isso, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos cada com TBS-T, sendo posteriormente incubada por 4 horas com o anticorpo de interesse na diluição apropriada em TBS-T. As membranas então foram novamente lavadas (3 vezes de 5 minutos com TBS-T), sendo incubadas por mais 1 hora com uma solução de anti-IgG de coelho ou anti-IgG de rato, acoplado a peroxidase, diluído 1:1000 em TBS-T. Após isso, as membranas foram lavadas três vezes por 5 minutos com TBS e então reveladas com uma solução feita com 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvido em 4 mL de metanol, a qual foi adicionada a 20 mL de TBS previamente aquecido a 37°C contendo 15 µL de H_2O_2 até que marcações pudessem ser visualizadas. Ainda, algumas membranas foram reveladas utilizando um substrato de peroxidase quimioluminescente (Immobilon Western, Millipore) e depois sensibilizando filmes fotográficos hipersensíveis (Hyperfil-ECL, GE).

3.21. Imunolocalização de quimotripsinogênio no intestino médio de *M. domestica* e de tripsina no intestino médio de *P. americana*

Larvas de *M. domestica* foram dissecadas na própria hemolinfa, sendo separadas a região anterior, média e posterior. Machos adultos de *P. americana* foram dissecados na própria hemolinfa, sendo separados cecos digestivos, o ventrículo anterior e o ventrículo posterior. Esses tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% contendo glutaraldeído 0,3% em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 por 2 horas a 4°C. Após isso, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol à temperatura ambiente, e embebida em resina de alto grau (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, USA).

Seções ultrafinas foram cortadas com ultramicrótomo e coletado em grades. Às grades foram adicionados gotas de TBS em pH 7,2 contendo BSA 1% por 5 minutos e colocados em NGS (Amersham, UK), diluídos 1:30, por 30 minutos. As seções foram então incubadas overnight em anticorpo primário diluído 1:500 em TBS em pH 7,2

contendo BSA 1% a 4°C. Controles com soros de coelhos não-imunizados foram realizados.

Após 4 lavagens de 5 minutos em TBS pH 7,2 contendo 0,2% BSA, 0,05% NaN_3 and 0,1% Tween 20 as amostras foram colocadas em TBS pH 8,2 contendo 1% BSA e 0,05% NaN_3 por 30 minutos à temperatura ambiente, e incubado com anti-rabbit IgG acoplado a partículas de ouro de 15 nm diluído 1:20 em TBS pH 8,2 contendo 0,2% BSA, 0,05% NaN_3, e 0,1% de Tween 20. As grades foram então lavadas 4 vezes por 5 minutos com TBS pH 8,2 contendo 0,2% BSA, 0,05% NaN_3, e 0,1% de Tween 20, seguido por mais duas lavagens de 5 minutos em mesma solução sem BSA. Após fixação em glutaraldeído 2,5% em cacodilato de sódio 100 mM pH 7,4 à temperatura ambiente as amostras foram finalmente lavadas com água bidestilada, coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo posteriormente analisadas em um microscópio eletrônico Zeiss EM 900.

3.22. Análise bioinformática das quimotripsinas de *D. melanogaster*

Seqüências similares a quimotripsinas depositadas no banco de dados FlyBase (http://flybase.org/) buscando por “chymotrypsin” em “protein domains”, e no NCBI (http://blst.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) usando o quimotripsinogênio de *M. domestica* como alvo (query). As seqüências foram manualmente inspecionadas e aceitas apenas as que condificavam proteínas menores que 440 aminoácidos, possuindo ou não a tríade catalítica, mas não apresentando o Asp189, característico de seqüências similares a tripsinas. Análise de expressão de cada seqüência foi realizada utilizando os dados de microarranjos de expressão presentes no FlyBase.

A identificação de hélices transmembrana e peptídeo sinal foram realizadas usando TMHMM e SignalP3, respectivamente, ambos presentes no ExPASy (http://ca.expasy.org/).

O cladograma das seqüências de quimotripsinas foi inferido usando o algoritmo Neighbor-Joining (Saitou and Nei,1987) e a confidência estimada por bootstrap (10.000 replicatas) (Felsenstein, 1985; Hillis & Bull, 1993). A árvore consenso representa a

história evolutiva das seqüências analisadas. Ramos correspondendo a partições reproduzidas em menos de 70%das replicatas de bootstraps foram colapsadas.

A posição cromossômica dos genes de *D. melanogaster* foi analisada de acordo com Wang *et al.* (2003).

3.23. Modelagens automáticas de seqüências de aminoácidos e acesso de solvente à superfície

Modelagens automatizadas de proteínas (http://swissmodel.expasy.org/) (Arnold *et al.,* 2006; Bordoli *et al.,* 2009) foram realizadas utilizando seqüências de proteínas de *T. molitor, D. saccharalis* e *S. frugiperda* para a análise de resíduos de aminoácidos presentes na superfície dos modelos. Para tal, os PDBs gerados automaticamente a partir das seqüências foi submetido ao programa de análise de acesso do solvente para proteínas NetSurfP–1.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/) (Petersen *et al.,* 2009).

Foram modeladas, de *T. molitor*, a tripsina digestiva (AY845177.1) e a quimotripsina digestiva (DQ356031.1); de *S. frugiperda*, a quimotripsina (AY251276.1) e a tripsina (FJ940726.1); de *D. saccharalis*, a quimotripsina e a tripsina.

4. RESULTADOS

4.1. Purificação de serina proteinases digestivas

A quimotripsina digestiva de *D. saccharalis* foi purificada a partir do intestino médio de larvas até a homogeneidade (Figura 7), apresentando uma banda única de proteínas vizualizada em SDS-PAGE (Figura 8). Dessa amostra de proteína purificada, 20 µg foram submetidas a microsseqüenciamento N-terminal, e não apresentou uma seqüência polipeptídica confiável. Uma segunda tentativa utilizando 40 µg da quimotripsina digestiva foi feita, entretanto sem sucesso.

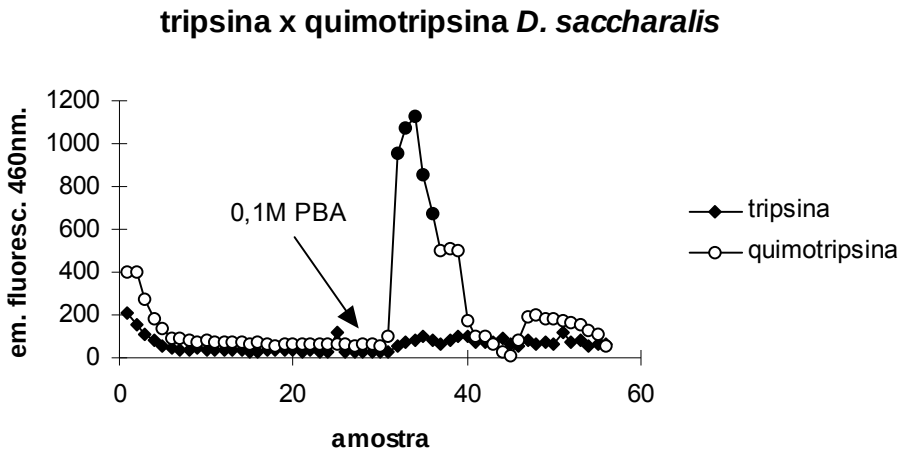


Figura 7. Purificação da quimotripsina de D. saccharalis através de uma cromatografia de afinidade em coluna PBA-Agarose. Frações ativas: quimotripsina 32-36 (ensaio sobre S-AAPF-MCA). Controle de atividade de tripsina: ensaio com S-APK-MCA.

A tripsina digestiva de *D. saccharalis* também foi purificada através de um passo cromatográfico (Figura 9), sendo as frações ativas recolhidas, dialisadas, liofilizadas e submetidas a microsseqüenciamento N-terminal. Entretanto, nenhuma seqüência confiável foi obtida a partir desse experimento.

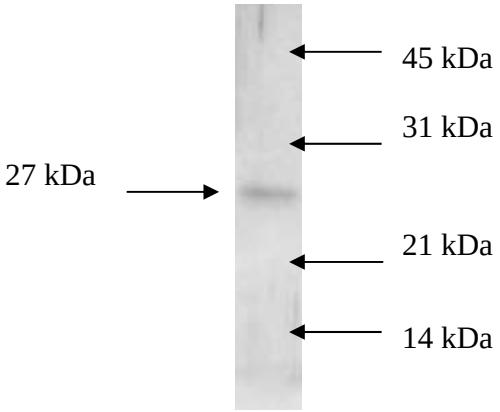


Figura 8. SDS-PAGE das amostras ativas de D. saccharalis coletadas da PBA-Agarose.

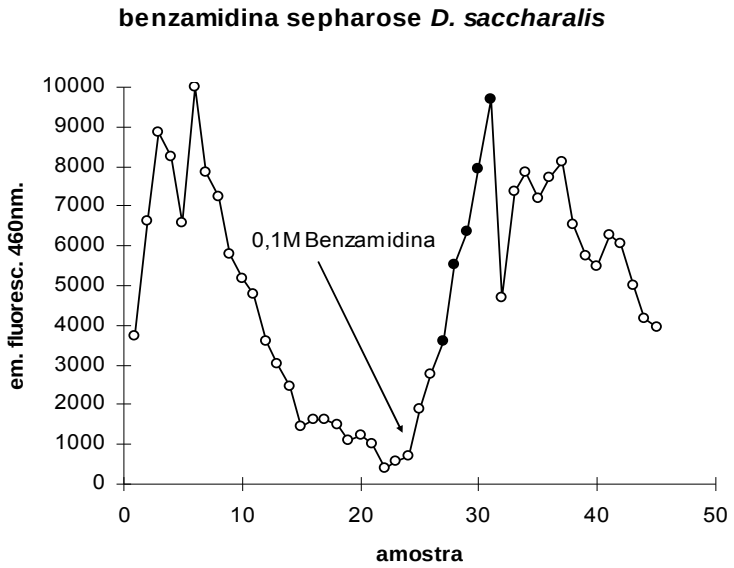


Figura 9. Purificação da tripsina de D. saccharalis em coluna de afinidade de tripsina Benzamidina-Sepharose. Frações coletadas: 27-31. Ensaio sobre Z-GGR-MCA.

Assim, não se pôde estabelecer correlações entre as atividades majoritárias de serina proteinases digestivas e os respectivos genes.

A tripsina de *S. frugiperda* foi purificada até a homogeneidade através de um passo cromatográfico em coluna Hitrap Benzamidine (Figura 10), revelando apenas

uma banda de proteína vista em SDS-PAGE (Figura 11). Entretanto, ensaios enzimáticos dessa amostra revelaram que além da atividade tríptica, existia uma alta atividade quimotríptica, indicando que, apesar de aparecer como uma banda única, a tripsina de *S. frugiperda* apresentava-se contaminada por quimotripsina.

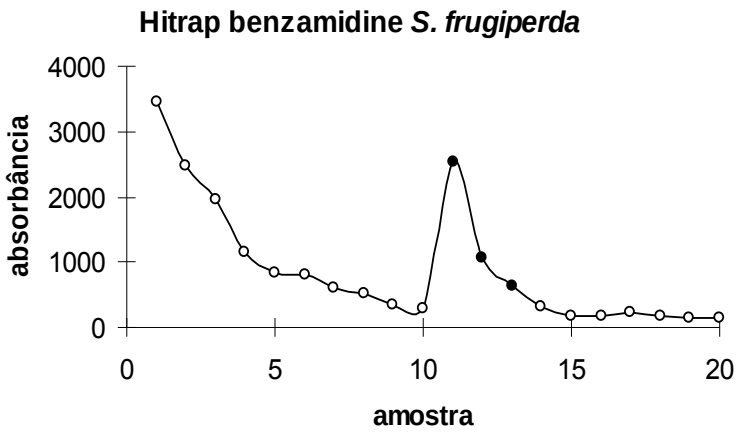


Figura 10. Purificação da tripsina do homogeneizado de S. frugiperda em coluna Hitrap benzamidine. Frações ativas: 11-13 (ensaio sobre S-AFK-MCA).

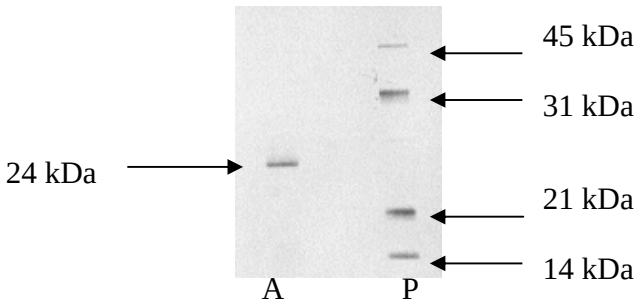


Figura 11. SDS-PAGE 12% do reunido ativo da Hitrap benzamidine de tripsina de S. frugiperda. P: padrão de massa molecular. A: amostra

Assim, foi realizado primeiramente uma cromatografia de afinidade para quimotripsina PBA-Agarose, que além de separar as atividades de tripsina e quimotripsina (Figura 12), permitia a purificação parcial das quimotripsinas de *S.*

frugiperda (Figura 13). As frações ativas de tripsina não ligadas na PBA-Agarose foram reaplicadas na Hitrap Benzamidine (Figura 14), sendo coletado um pico de atividade eluído, o qual resultou em uma banda de proteína pura visualizada em SDS-PAGE (Figura 15) e sem contaminação de atividade quimotríptica.

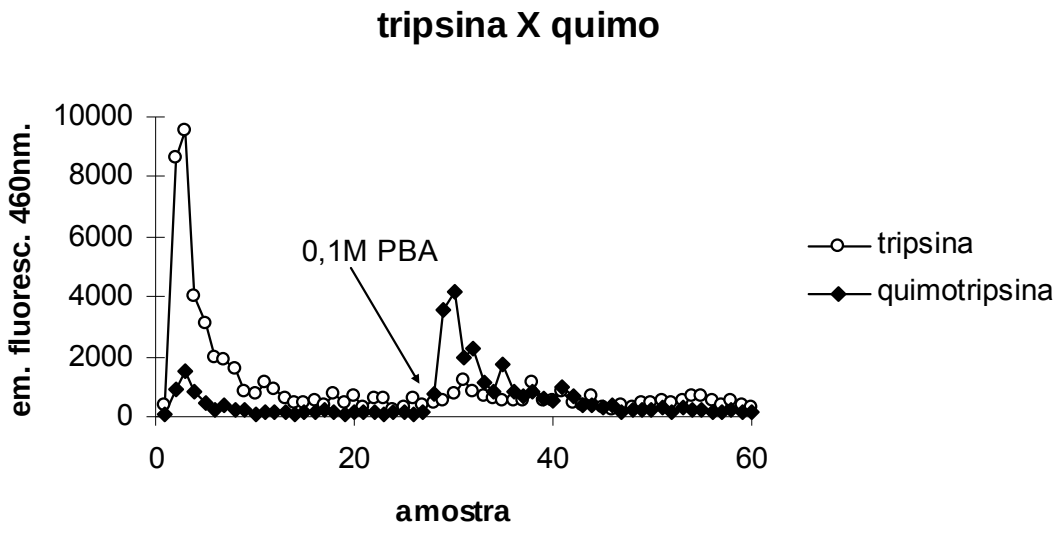


Figura 12. Cromatografia PBA-Agarose para separação das atividade de tripsina e quimotripsina de S. frugiperda. Frações ativas: tripsina (ensaio sobre S-AFK-MCA): 2-8; quimotripsina (ensaio sobre S-AAPF-MCA): 29-32.

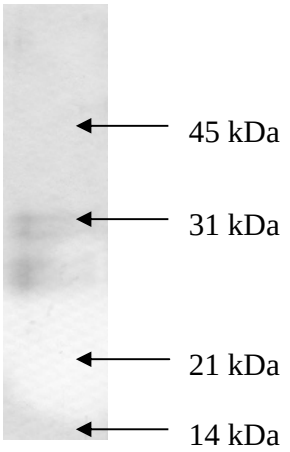


Figura 13. SDS-PAGE das amostras ativas de quimotripsina de S. frugiperda (raias 1 e 2) coletadas da PBA-Agarose.

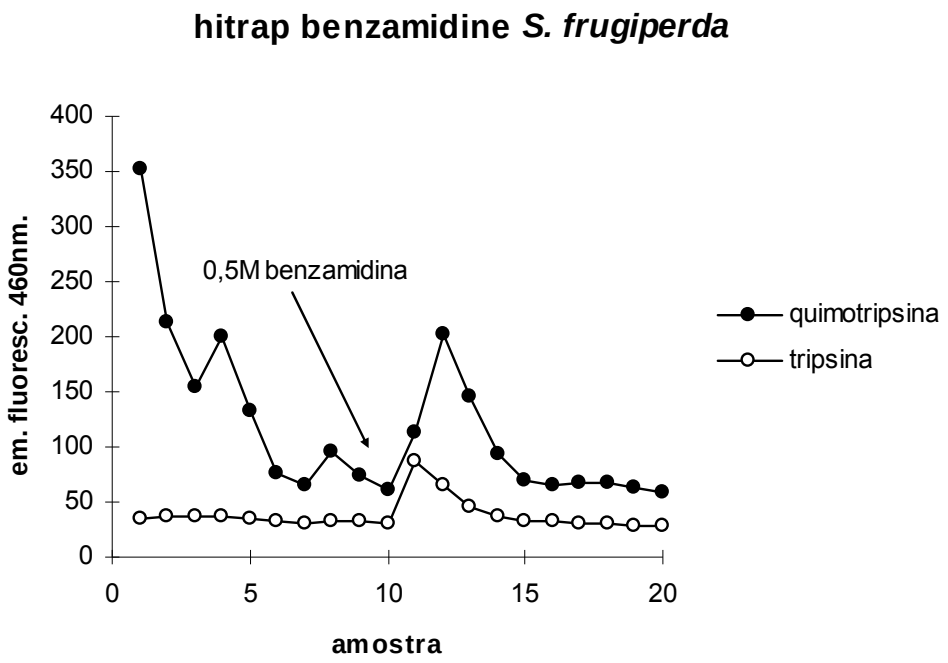


Figura 14. Cromatografia Hitrap benzamidine das amostras coletadas da PBA-Agarose para purificar a tripsina de S. frugiperda. Frações ativas: tripsina (ensaio sobre S-AFK-MCA): 12-13; quimotripsina (S-AAPF-MCA): 12-13.

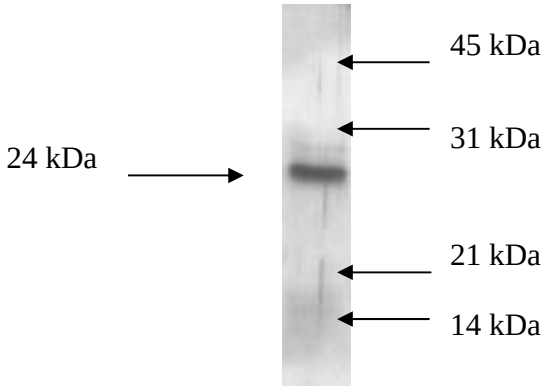


Figura 15: SDS-PAGE do pool ativo de tripsina de S. frugiperda coletadas após Hitrap benzamidine.

A tripsina digestiva majoritária do intestino médio de larvas de *T. molitor* foi purificada até a homogeneidade através de duas cromatografias de troca aniônica em coluna Hitrap Q: a fração solúvel do homogeneizado foi aplicada primeiramente em Tris-HCl pH 7,0 à coluna. O material não ligado teve seu pH ajustado para 9,0 e foi reaplicado à coluna regenerada, sendo eluído durante um gradiente de NaCl (Figura 16). As frações ativas foram recolhidas e aplicadas a um SDS-PAGE, resultando em uma banda única (Figura 17). A tabela 1 resume a marcha de purificação da tripsina de *T. molitor*, com a recuperação e o enriquecimento de cada passo cromatográfico.

Tabela 1. Purificação da tripsina de T. molitor: atividade total, atividade específica, recuperação total e fator de purificação em cada passo cromatográfico.

	Atividade (mU/mL)	**Atividade específica (mU/mg)**	**Recuperação total**	**Fator de purificação**
homogeneizado	145600	13,15	-	1
Hitrap Q pH 7	7112,5	44,47	49%	3,38
Hitrap Q pH 9	10192	315,54	7%	24

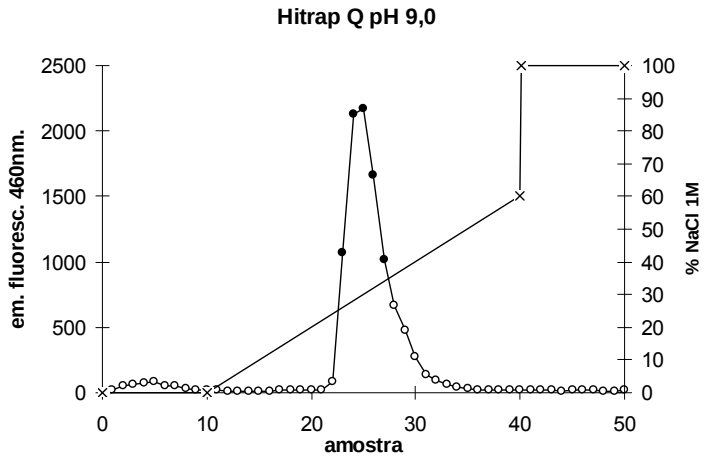


Figura 16. Purificação da tripsina de T. molitor em coluna Hitrap Q, pH 9,0. Frações ativas sobre B-R-MCA: 23-27.

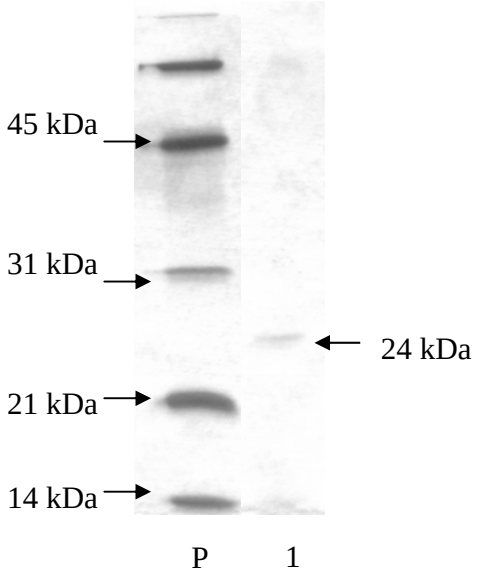


Figura 17. SDS-PAGE 12% das amostras de tripsina de T. molitor purificadas. P: padrão de peso molecular; 1 : amostras do reunido de frações ativas de tripsina.

Foram realizadas duas tentativas de determinação da seqüência N-terminal da tripsina de *T. molitor* por microsseqüenciamento: uma primeira tentativa através da transferência eletroforética semi-seca de 20 µg de amostra de proteína pura após separação por SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose, a qual não resultou em seqüência polipeptídica confiável, e uma segunda tentativa realizada com 20 µg de proteína pura liofilizada, e também não resultou em uma seqüência confiável.

4.2. Seqüenciamento, clonagem e tentativas de expressão recombinante de serina proteinases digestivas

Duas seqüências nucleotídicas parciais, uma similar a tripsina e uma a quimotripsina, foram obtidas ao acaso a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de larvas de *D. saccharalis* (Figura 18). As duas seqüências apresentam a tríade catalítica His-Asp-Ser, sendo que a seqüência similar à tripsina apresenta o motivo N-terminal IVGG conservado e o Asp189 e a seqüência similar a quimotripsina apresenta o motivo N-terminal IVNG e Gly189.

Os genes correspondentes ao tripsinogênio digestivo (Tsybina *et al*., 2005) e ao quimotripsinogênio digestivo (Elpidina *et al*., 2006) de *T. molitor* identificados por microsseqüenciamento N-terminal foram amplificados por PCR (Figuras 19 e 20, respectivamente) e clonados sem o peptídeo sinal no plasmídeo pAE (Ramos *et al*., 2004). Os plasmídeos contendo as serina proteinases digestivas foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli* e testes de expressão, solubilidade e purificação das proteínas recombinantes expressas foram realizados.

A análise da seqüência do tripsinogênio clonado mostra que a proteína ativa (sem o peptídeo sinal nem pró-peptídeo) possui um pI teórico de 6,87, próximo ao pI experimental (8,0), e massa molecular teórica de 22.715,17, condizente com a massa molecular obtida para a proteína purificada a partir do intestino (24 kDa).

Testes de expressão recombinante em *E. coli* mostraram que o quimotripsinogênio digestivo de *T. molitor* não é induzido por IPTG. Já o tripsinogênio digestivo de *T. molitor* clonado no vetor de expressão pAE foi expresso de maneira recombinante tanto nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE-3) (Figura 21) e *E. coli* BL21 (DE-3) Artic Cells, mas não em Origami (DE-3). Testes de solubilidade mostraram que *E. coli* BL-21 (DE-3) expressa o tripsinogênio digestivo apenas em corpúsculos de inclusão (insolúvel), mas não na fração solúvel (Figura 22).

Por outro lado, quando o tripsinogênio digestivo de *T. molitor* foi expresso em *E. coli* BL-21 (DE-3) Artic cells, uma banda de proteína de massa molecular correspondente à esperada foi visualizada na fração solúvel (Figura 23). Essa fração foi submetida a uma purificação utilizando a resina Ni-NTA Agarose, mas nenhuma banda de proteína interagiu com a matriz (Figura 24). Ainda, testes de ativação da fração solúvel do tripsinogênio expresso utilizando tanto enteroquinase quanto tripsina bovina não resultaram em um aumento de atividade da fração solúvel quando comparado com controles.

```
                                        10        20        30        40
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
Tripsina                    1   ---------------------------------------- 1
Quimotripsina               1   VRARSAAESEKRREAEAKLLHQRIVGGLPAGVGQVPYQAG 40
Quimotripsina bovina        1   -CGVPAIQPVLSG-------LSRIVNGEEAVPGSWPWQV- 31

                                        50        60        70        80
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
                                            <---
Tripsina                    1   ------------------------VTAAHCFTGETYSPSN 16
Quimotripsina               41  LLISIVGFEGQGVCGASLVSGNRLVTAAHCWFDGSHQGWK 80
Quimotripsina bovina        31  ---SLQDKTGFHFCGGSLINENWVVTAAHCGVTTSDVVVA 68

                                        90       100       110       120
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
Tripsina                    17  RRIRAGSSYRNTGGIVIGVKRSINHPSYIDYQYNGDISVV 56
Quimotripsina               81  LTVVLGTNYLFHGGTRVETTAVFTHPRWTPLLVRNDIAMI 120
Quimotripsina bovina        69  GEFDQGS--SSEKIQKLKIAKVFKNSKYNSLTINNDITLL 106

                                       130       140       150       160
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
Tripsina                    57  ELETPLVYSSVIQQVSIIAPGAEIR--DNMPAVYAGWG-- 92
Quimotripsina               121 YLPHNVVKPNLIAPVALPRGDELYENFAGSSAIASGFGLT 160
Quimotripsina bovina        107 KLSTAASFSQTVSAVCLPSASDDFA--AGTTCVTTGWGLT 144

                                       170       180       190       200
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
Tripsina                    93  SIEENGPSSRVLQHVNVFTINRNICRQRYSEEAITDNMIC 132
Quimotripsina               161 STSGNILQSQYLSHVKLNVISNSICSYAFP-FILQESNIC 199
Quimotripsina bovina        145 RYT-NANTPDRLQQASLPLLSNTNCKKYWG-TKIKDAMIC 182

                                       210       220       230       240
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|
Tripsina                    133 AGVLDEGGRDPCQGDSG----------------------- 149
Quimotripsina               200 TSG--FGGVGAYRGDSGGPLVVTRGNRPVLVGVTSFGSAL 237
Quimotripsina bovina        183 AG---ASGVSSCMGDSGGPLVCKKNGAWTLVGIVSWGSST 219

                                       250       260
                                ....|....|....|....|....|..
Tripsina                    149 --------------------------- 149
Quimotripsina               238 GCHVNLPSVFARSTSFMDFIVQHL--- 261
Quimotripsina bovina        219 -CSTSTPGVYARVTALVNWVQQTLAAN 245
```

Figura 18. Alinhamento entre a tripsina e a quimotripsina de D. saccharalis com o quimotripsinogênio bovino.

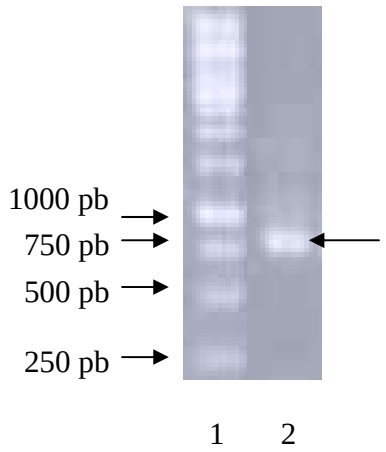


Figura 19. Amplificação da tripsina de T. molitor por PCR a partir da biblioteca de cDNA utilizando-se iniciadores especíicos. Raia 1: padrões de peso molecular; raia 2: tripsina amplificada a partir da biblioteca de cDNA de T. molitor.

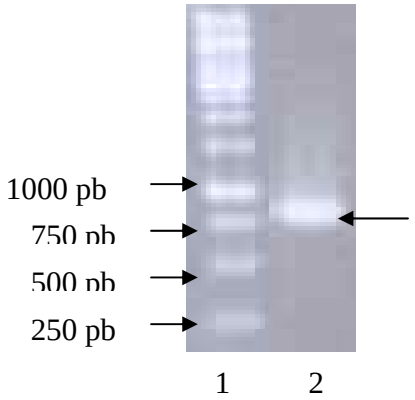


Figura 20. Amplificação da quimotripsina de T. molitor por PCR utilizando biblioteca de cDNA como molde. Raia 1: padrões de peso molecular; raia 2: quimotripsina de T. molitor clonada no vetor de expressão pAE.

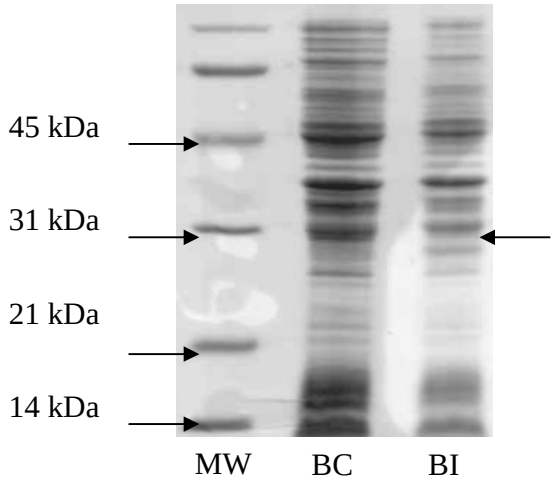


Figura 21. Indução da expressão por IPTG 1 mM do tripsinogênio de T. molitor clonado no vetor pAE em E. coli BL-21 a 37ºC. MW: Padrão de peso molecular; BC: BL-21 (DE-3) controle; BI: BL-21 (DE-3) induzida; A flecha indica a banda correspondente ao tripsinogênio recombinante expresso.

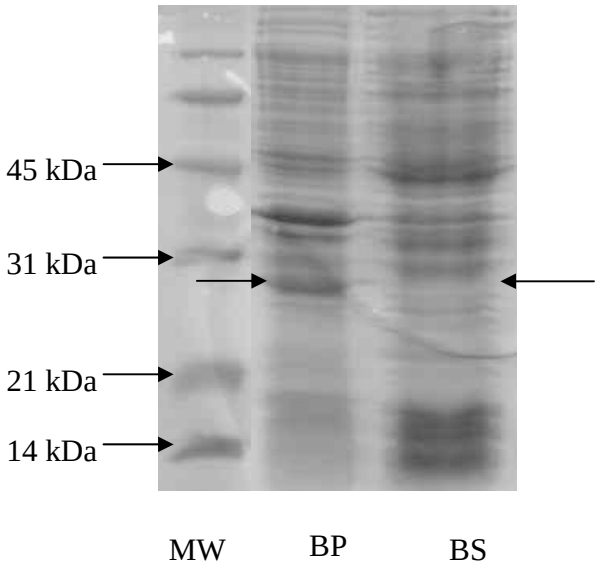


Figura 22. Análise da solubilidade do tripsinogênio de T. molitor expresso a 37ºC em E. coli BL-21 (DE-3) MW: padrão de peso molecular; BP: precipitado da linhagem BL-21 (DE-3) induzida; BS: solúvel da linhagem BL-21(DE-3); As setas indicam a tripsina recombinante expressa aparentemente nas frações precipitadas (corpúsculos de inclusão) e solúvel.

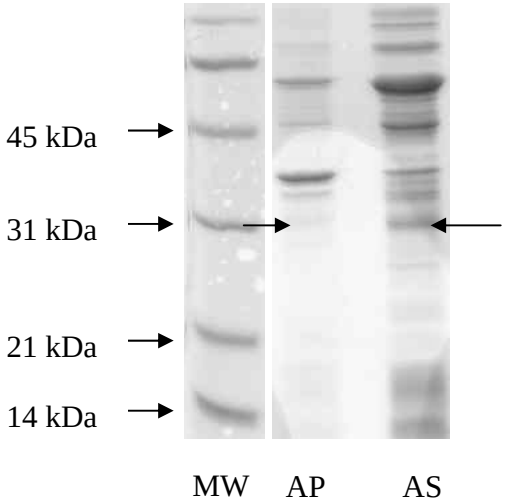


Figura 23. Análise da solubilidade do tripsinogênio de T. molitor expresso a 12ºC em E. coli artic cells (DE-3) MW: padrão de peso molecular; AP: precipitado da artic cells (DE-3) induzida; AS: solúvel da artic cells (DE-3); As setas indicam a tripsina recombinante expressa aparentemente nas frações precipitadas (corpúsculos de inclusão) e solúvel.

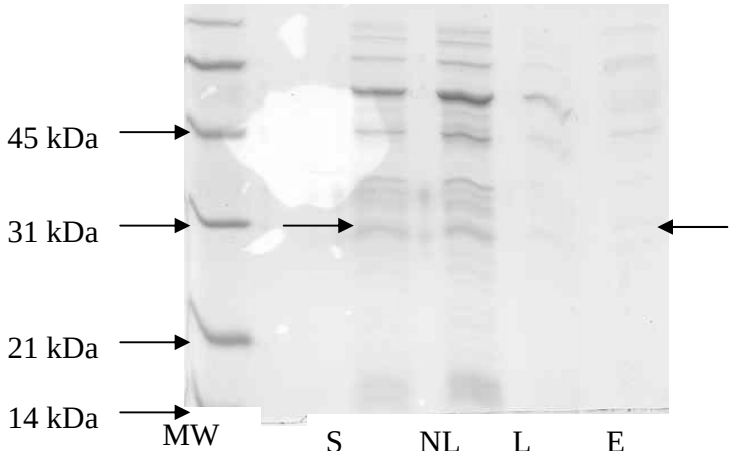


Figura 24. Purificação do tripsinogênio de T. molitor recombinante expresso em E. coli artic cells (DE-3) utilizando Ni-NTA Agarose por batching. MW: padrão de peso molecular; S: solúvel, resultante da análise de solubilidade; NL: Não ligado à coluna; L: lavado da coluna com tampão de lise; E: Eluído da coluna com 300 mM de imidazol.

4.3. Modificação química de quimotripsinas de insetos por TPCK em função do pH

Modificações químicas das quimotripsinas de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda* por TPCK geraram plotes de k_{obs} ($M^{-1}S^{-1}$) versus pH com curvas em forma de sino, como descrito por Schoellmann *et al.* (1963). O ensaio de modificação química da atividade de quimotripsina digestiva de *D. saccharalis* (Figura 25) e de *T. molitor* (Figura 26) mostrou que elas possuem um pH ótimo de modificação em torno de 8,5, sendo que a primeira possui pka1 (His57) de 7,2±0.2 e pKa2 (Ser195) de 9,5±0.2 e a segunda, pKa1 (His57) de 7,2±0,2 e pKa2 (Ser195) de 9,3±0,1, enquanto que a atividade de quimotripsina digestiva presente no lúmem de *S. frugiperda* (Figura 27) possui um pH ótimo de modificação química entre 9,5 e 10, com pKa1 (His57) de 8,3±0,3 e pKa2 (Ser195) de 10,7±0,3. Além disso, verificou-se que o k_{obs} máximo de segunda ordem ($M^{-1}S^{-1}$) das enzimas de *T. molitor* e de *D. saccharalis* são, respectivamente, 17±2 e 20±3, cerca de duas ordens de grandeza maior que de *S. frugiperda*, 0,040±0,007.

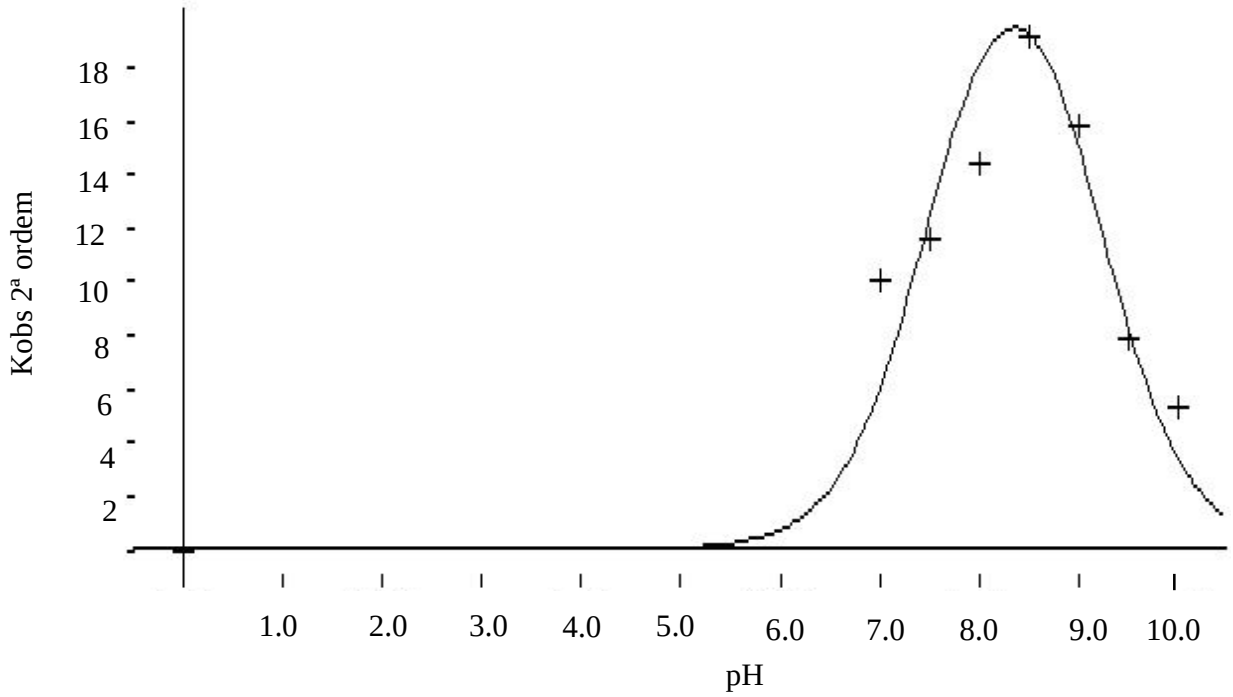


Figura 25. Curva teórica contendo pontos experimentais (+) da modificação química por TPCK em função do pH da quimotripsina de D. saccharalis. A unidade do Kobs de 2ª ordem é $M^{-1}S^{-1}$.

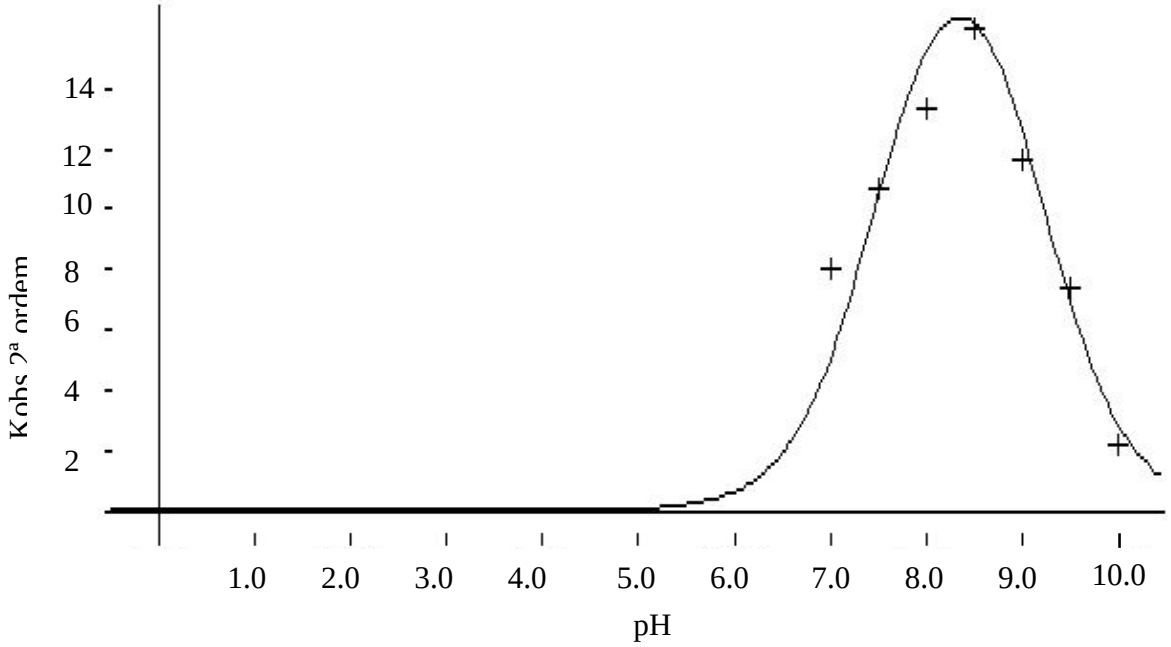


Figura 26. Curva teórica contendo pontos experimentais (+) do efeito do pH na modificação química por TPCK da quimotripsina de T. molitor. A unidade do Kobs de 2ª ordem é $M^{-1}S^{-1}$.

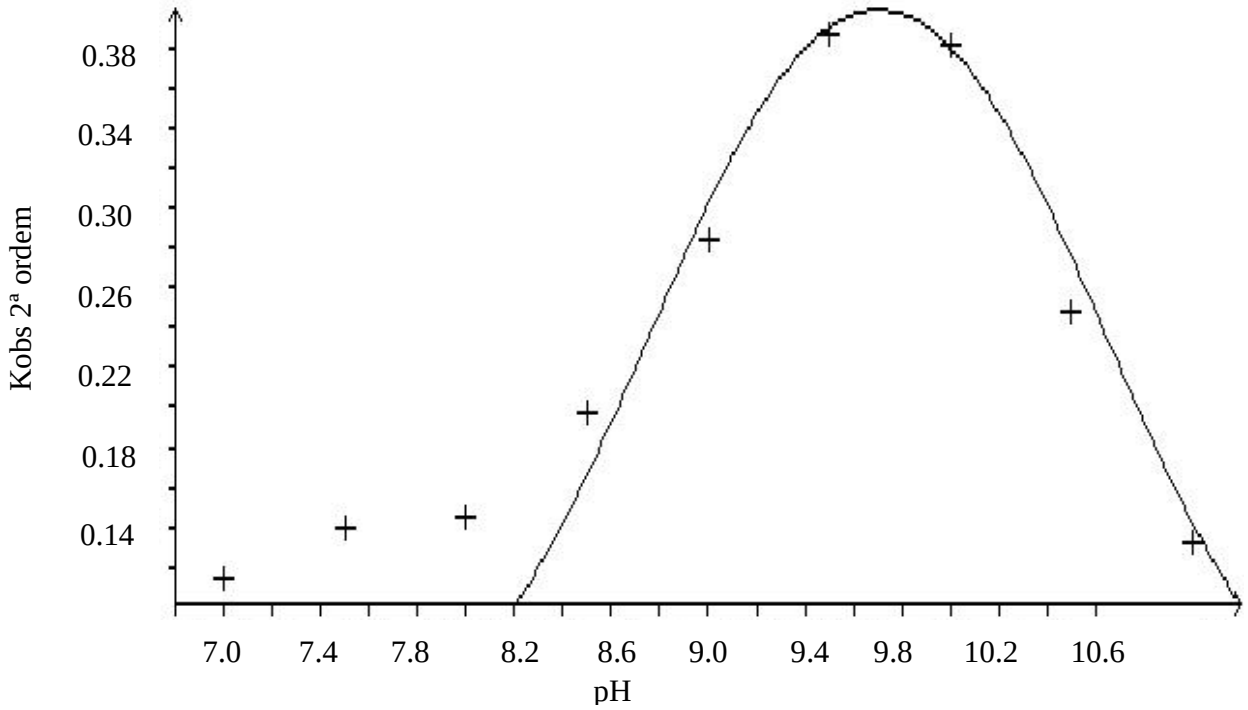


Figura 27: Curva teórica contendo pontos experimentais (+) do efeito do pH na modificação química por TPCK da quimotripsina de S. frugiperda. A unidade do Kobs de 2ª ordem é $M^{-1}S^{-1}$.

4.4. Estudos de hidrofobicidade de serina proteinases

4.4.1. Precipitações por sulfato de amônio e interações hidrofóbicas de serina proteinases

Precipitações das atividades luminais de serina proteinases por sulfato de amônio foram realizadas com a fração solúvel dos homogeneizados intestinais de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda*.

Como mostrado na figura 28, a atividade tríptica solúvel do homogeneizado intestinal de *T. molitor* praticamente não precipita na presença de 2 M de sulfato de amônio e precipita apenas 20% na presença de 3 M de sulfato de amônio. Já a atividade tríptica solúvel de *D. saccharalis* precipita 47% na presença de 0,17 M de sulfato de amônio e 75% com 0,85 M de sulfato de amônio. A atividade tríptica solúvel de *S. frugiperda* precipita 77% com 0,17 M de sulfato de amônio. Ainda, a arividade de tripsina de *Zabrotes subfasciatus* não precipita na presença de até 2 M de sulfato de amônio (dado não mostrado), o que é compatível com os dados de precipitação da atividade luminal de tripsina de *T. molitor*, dado que ambos os organismos pertencem à mesma ordem (Coleoptera), apresentando uma maior proximidade filogenética, sendo esperado que as enzimas de ambos tenham comportamento semelhante.

Cromatografias hidrofóbicas utilizando a coluna Res Phe na ausência de sulfato de amônio foram realizadas para ver se as serina proteinases solúveis digestivas interagiam com a coluna, indicando uma alta hidrofobicidade superficial das serina proteinases. Ainda, caso ocorresse interação entre proteínas e a matriz da coluna, a eluição das proteínas utilizando um gradiente de detergente, como o SDS, poderia indicar qual proteína é mais hidrofóbica.

Desse modo, a atividade tríptica solúvel de *T. molitor* interage fracamente com a coluna de interação hidrofóbica Res Phe na ausência de sulfato de amônio, sendo eluída da coluna em baixas concentrações de SDS (Figura 29 A). Já as atividades trípticas solúveis de *Erynnis ello* (dado não mostrado), *D. saccharalis* (Figura 29 B) e *S. frugiperda* (Figura 29 C), organismos pertencentes à ordem Lepidoptera, interagem

fortemente com a coluna de interação hidrofóbica na ausência de sulfato de amônio, sendo eluídas apenas com 0,7% de SDS.

A quimotripsina de *T. molitor* interage fortemente com a coluna, sendo eluídos dois picos de atividade com mais de 0,9% de SDS (Figura 30 A). Já as quimotripsinas de *Erynnis ello* (dado não mostrado), *D. saccharalis* e *S. frugiperda* eluem na presença da mesma concentração de SDS que as respectivas tripsinas (0,7% de SDS) (Figuras 30 B e 30 C).

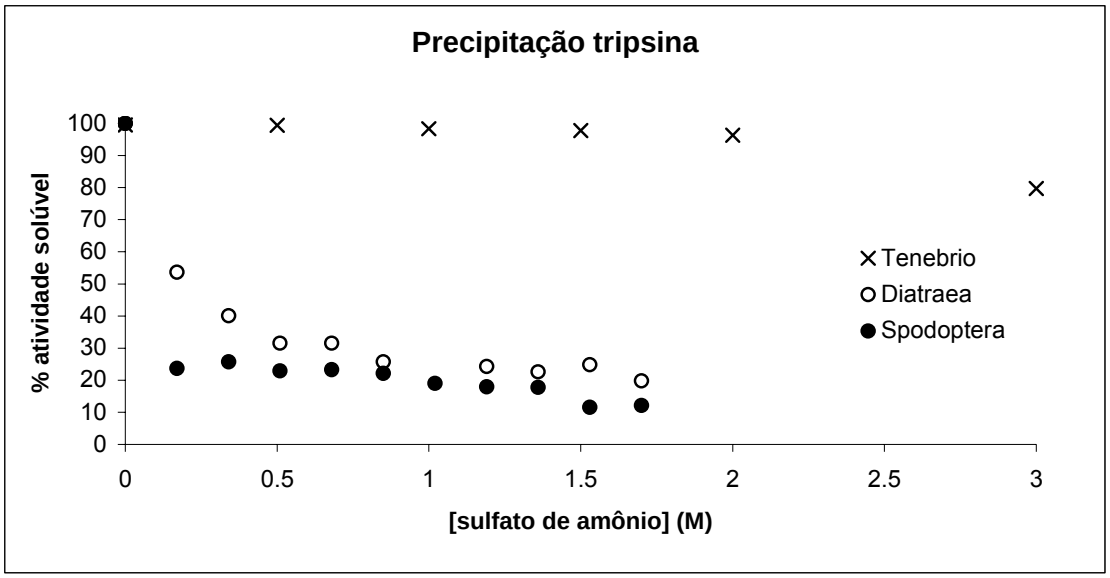


Figura 28. Precipitação da atividade tríptica solúvel de T. molitor (x), D. saccharalis (○) e S. frugiperda (•) em diferentes concentrações de sulfato de amônio.

4.4.2. Modelagem de tripsinas e quimotripsinas de insetos

Modelos gerados automaticamente por similaridade (Swiss-model) a partir de seqüências de serina proteinases de *T. molitor, D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram analisados pelo programa NetSurfP para verificar o acesso superficial de solvente. A partir dessa análise foi possível observar que a superfície das serina proteinases de insetos Lepidópteros tem uma maior quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, sejam

isolados, sejam em conjuntos ("clusters") de 2, 3 e 4 ou 5 resíduos hidrofóbicos na superfície dos modelos analisados.

A quimotripsina de *D. saccharalis* apresenta 2 clusters de 4 aminoácidos hidrofóbicos (IVFW) (LLFI) expostos à superfície e 3 clusters (VV) (IL) (VL) de 2 aminoácidos hidrofóbicos expostos à superfície (Figura 31).

A quimotripsina de *S. frugiperda* contém 1 cluster de 3 aminoácidos hidrofóbicos (FFW) expostos à superfície e próximo ao sítio catalítico e 1 cluster de 2 aminoácidos hidrofóbicos (LI) expostos na superfície (Figura 32).

A quimotripsina de *T. molitor* não apresenta clusters de aminoácidos hidrofóbicos expostos ao solvente. Existem 2 valinas próximas expostas ao solvente, mas não próximas o suficiente para a formação de clusters (Figura 33).

A tripsina de *D. saccharalis* possui 2 clusters de 2 aminoácidos hidrofóbicos (IV) (FI) expostos na superfície (Figura 34).

A tripsina de *S. frugiperda* apresenta clusters de 2 aminoácidos hidrofóbicos (VV) (IF) expostos à superfície, embora exista uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos expostos de maneira isolada, principalmente próximo ao cluster (VV), no qual existe uma região que possui 2 Trp e 1 Leu (WLW) (Figura 35).

A tripsina de *T. molitor* não apresenta a formação de clusters de aminoácidos hidrofóbicos expostos à superfície (Figura 36).

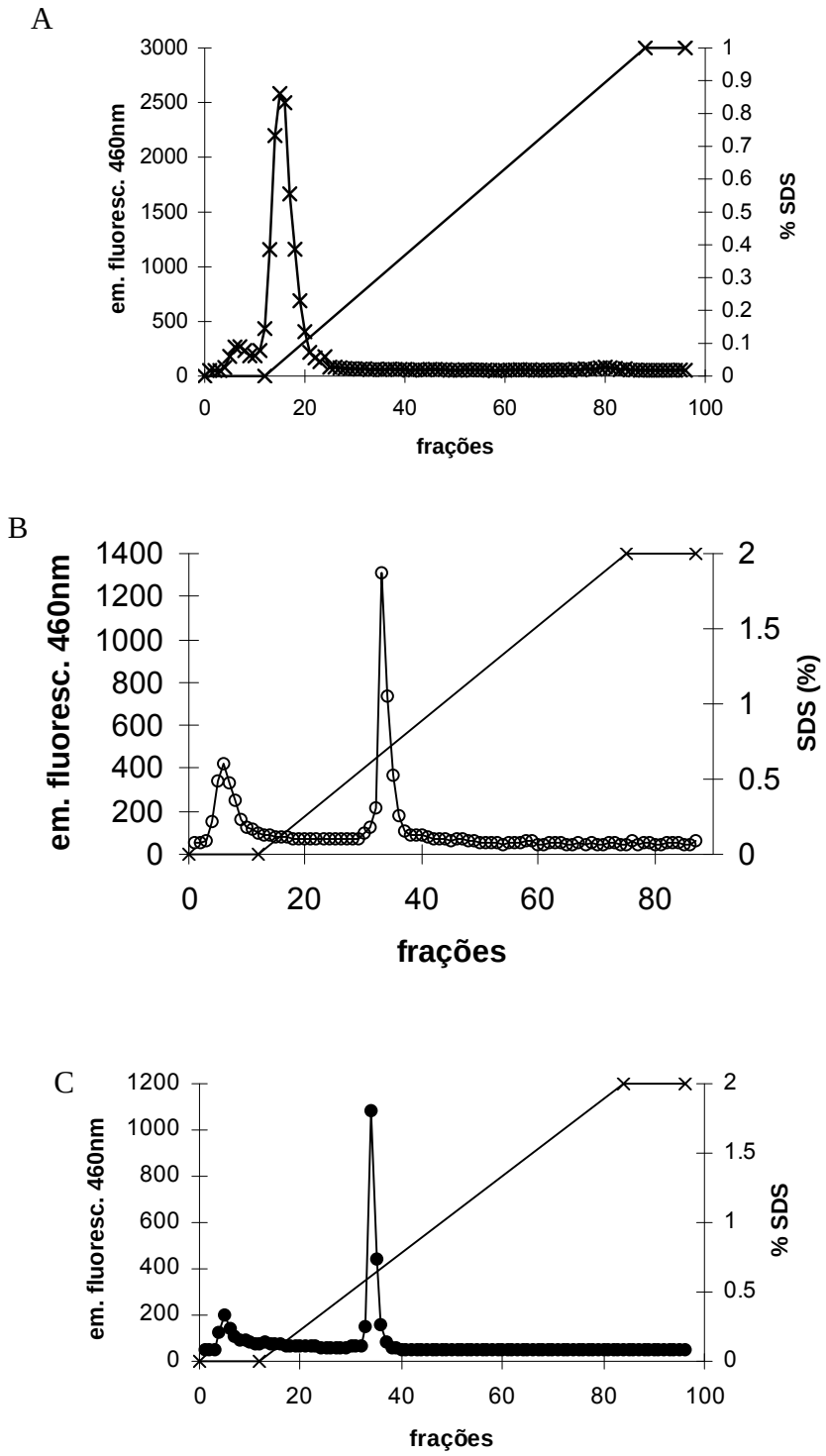


Figura 29. Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Res Phe na ausência de sulfato de amônio. Atividades de tripsinas: A: T. molitor (x), B: D. saccharalis (○); C: S. frugiperda (•) eluídas com gradiente de SDS.

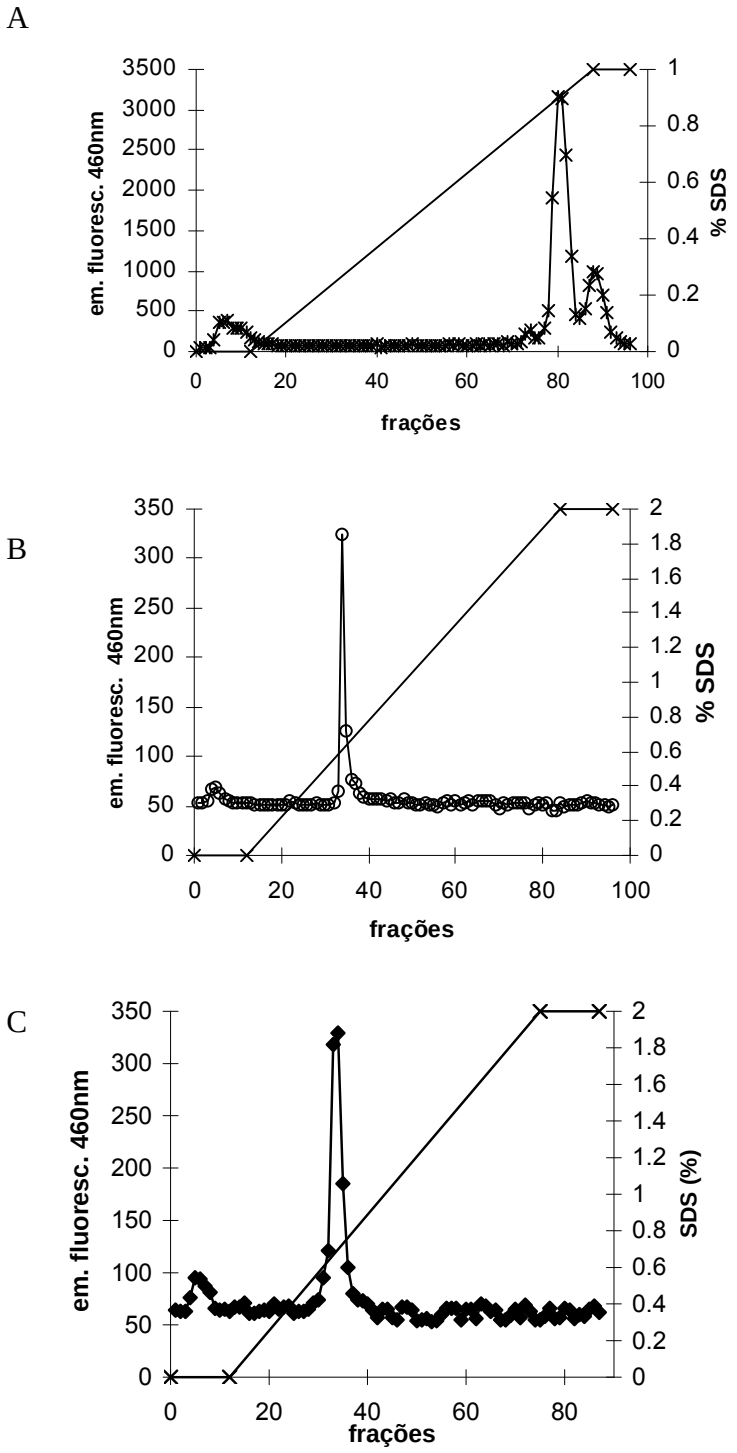


Figura 30. Cromatografias de interação hidrofóbica em coluna Resource^{tm} Phe na ausência de sulfato de amônio. Atividades de quimotripsinas: A: T. molitor (x); B: D. saccharalis (○); C: S. frugiperda (•) eluídas com gradiente de SDS.

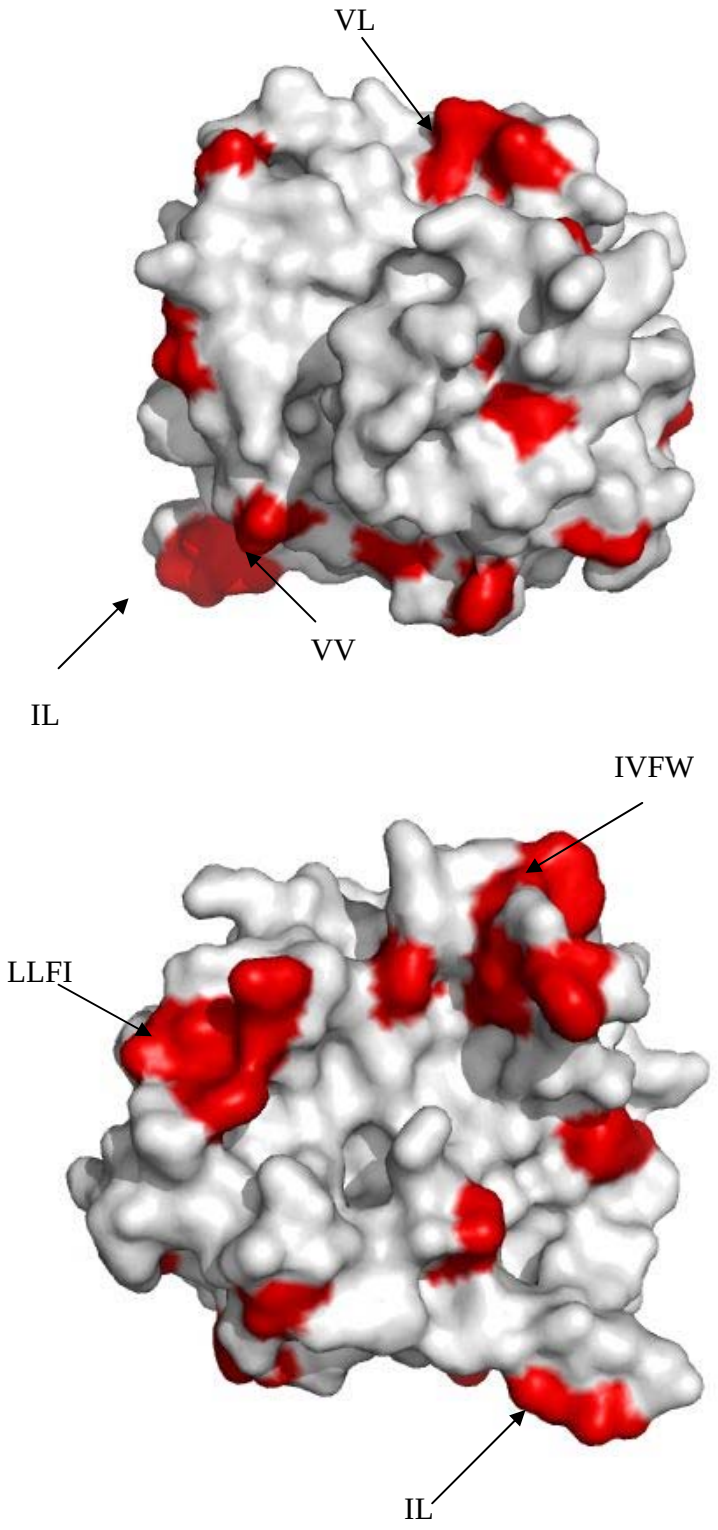


Figura 31. Modelagem de superfície da quimotripsina de D. saccharalis. Em vermelho: resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente. A: Visão frontal. B: Giro de 180°C da visão frontal.

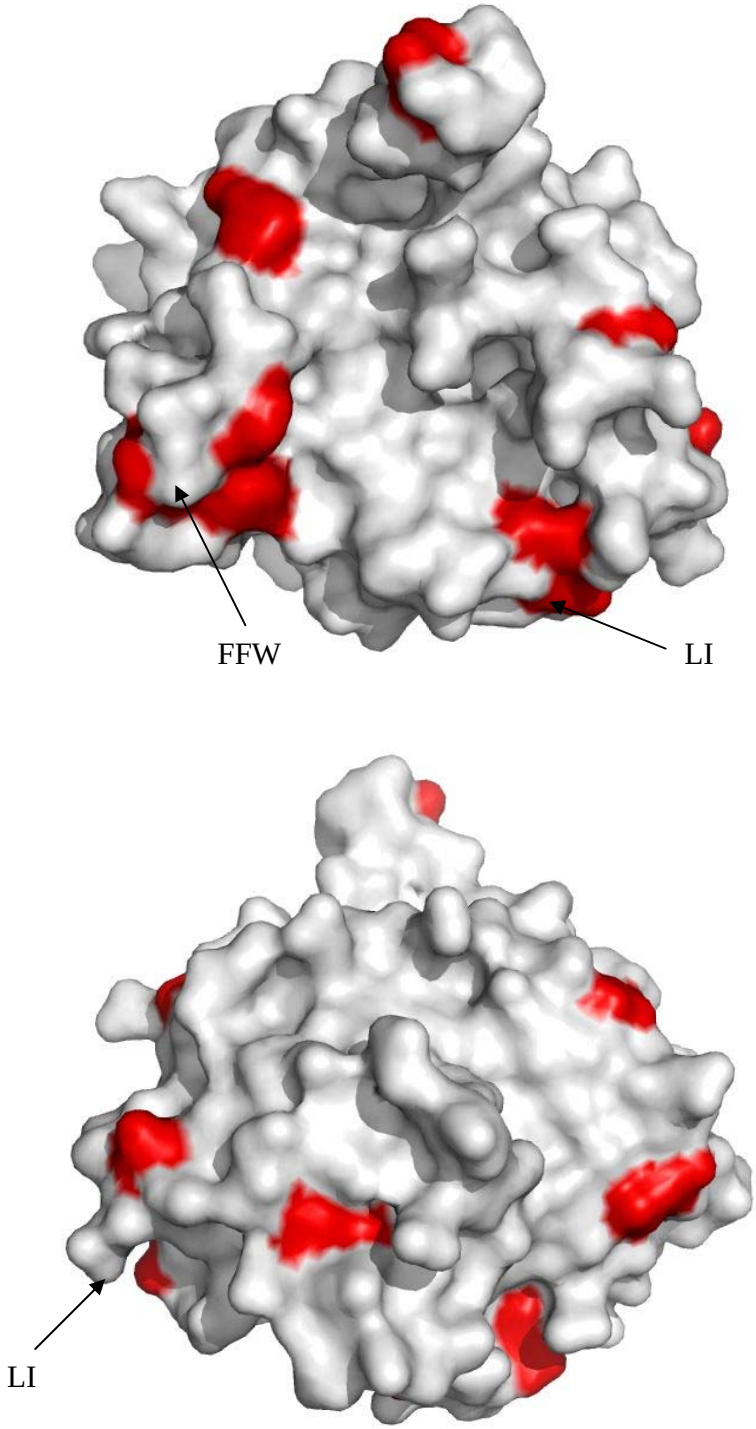


Figura 32. Modelagem de superfície da quimotripsina de S. frugiperda. Os resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente estão marcados em vermelho. A: Visão frontal. B: Giro de 180° da visão frontal.

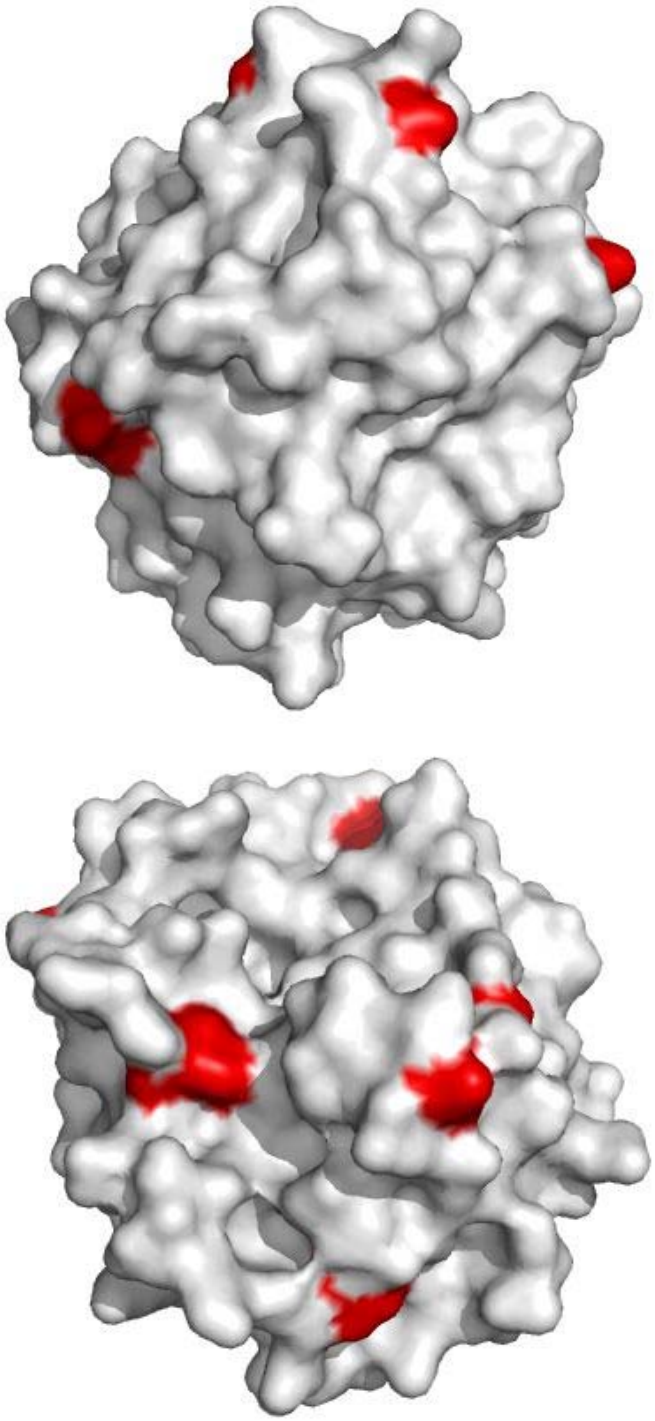


Figura 33. Modelagem de superfície da quimotripsina digestiva de T. molitor. Em vermelho estão marcados os resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente. A: Visão Frontal. B: Giro de 180° da visão frontal.

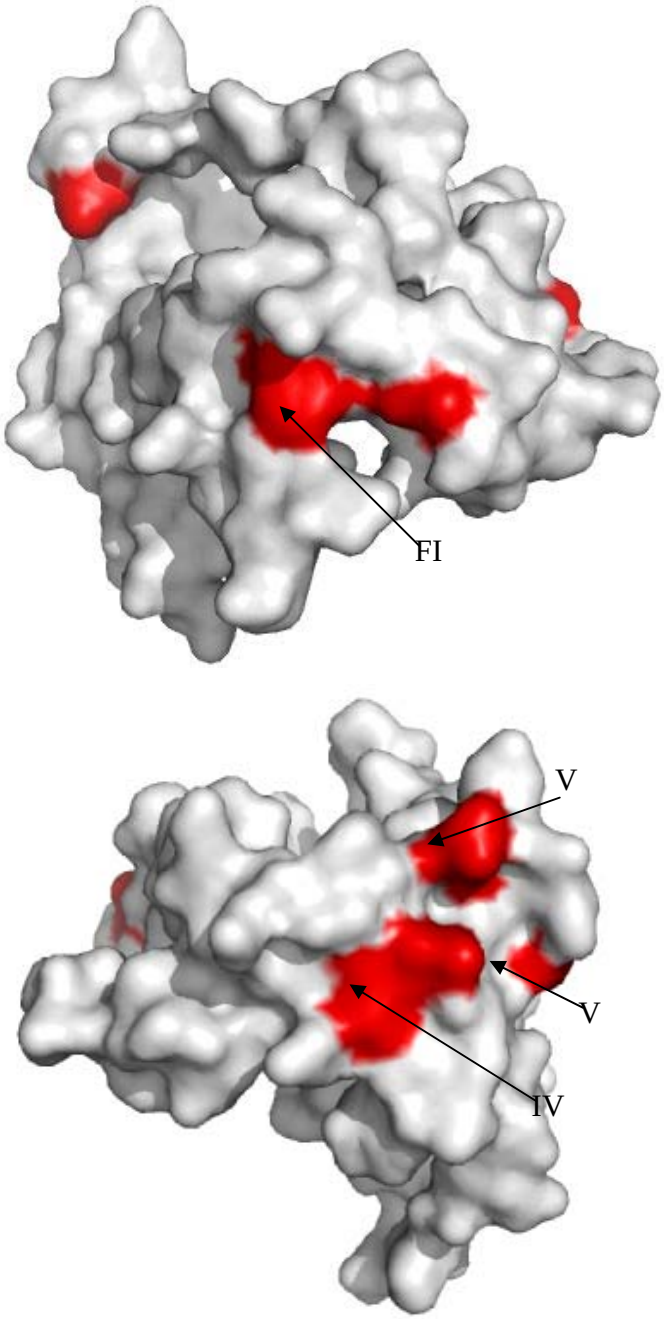


Figura 34. Modelagem de superfície da tripsina parcial de D. saccharalis. Em vermelho, estão mostrados os resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente. A: Visão frontal. B: Giro de 180° da visão frontal.

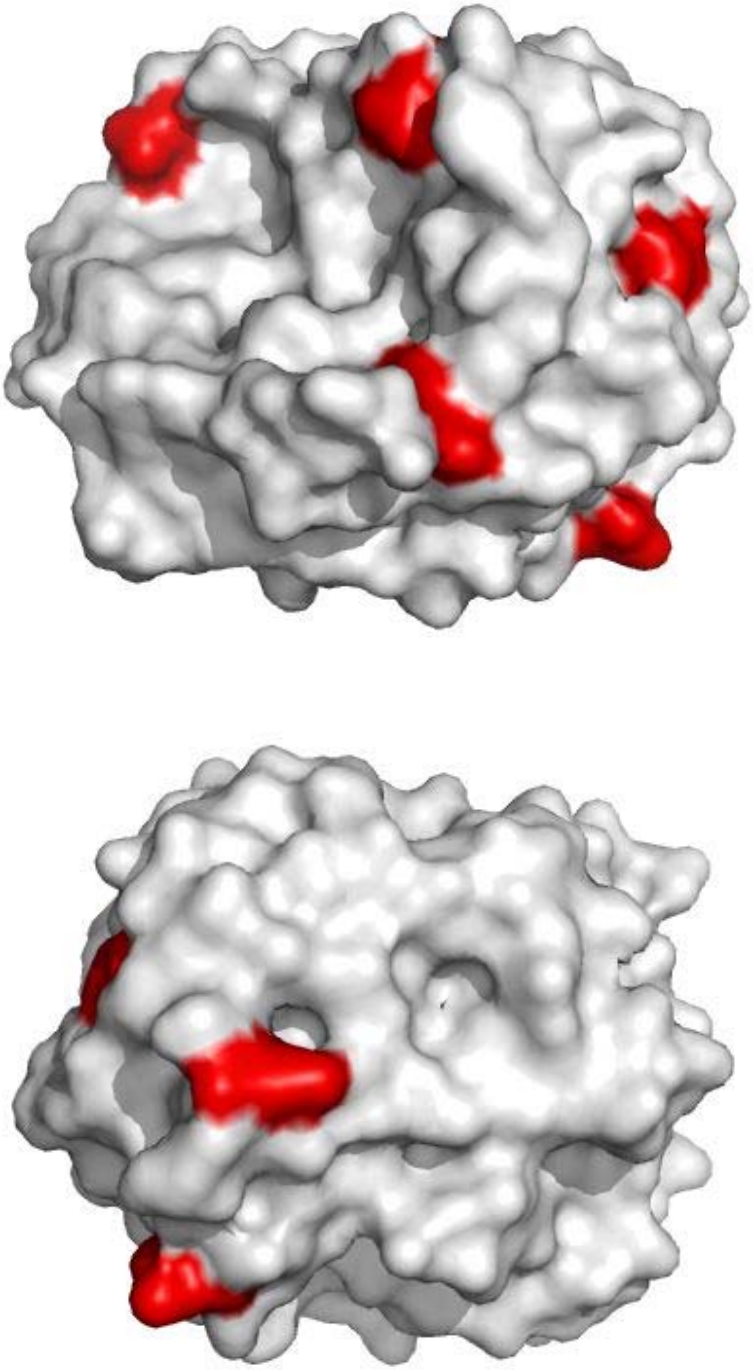
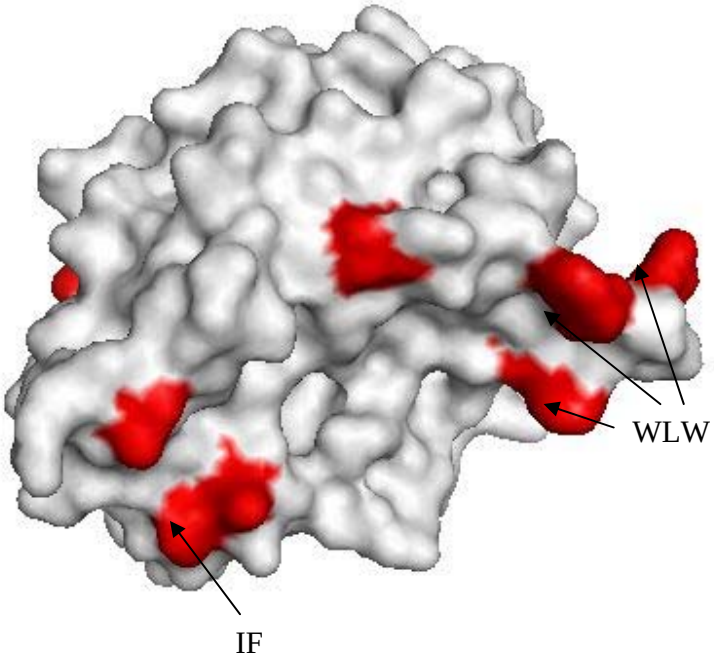


Figura 35. Modelagem de superfície da tripsina digestiva de T. molitor, mostrando os resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente (em vermelho). A: Visão frontal. B: giro de 180° da visão frontal.



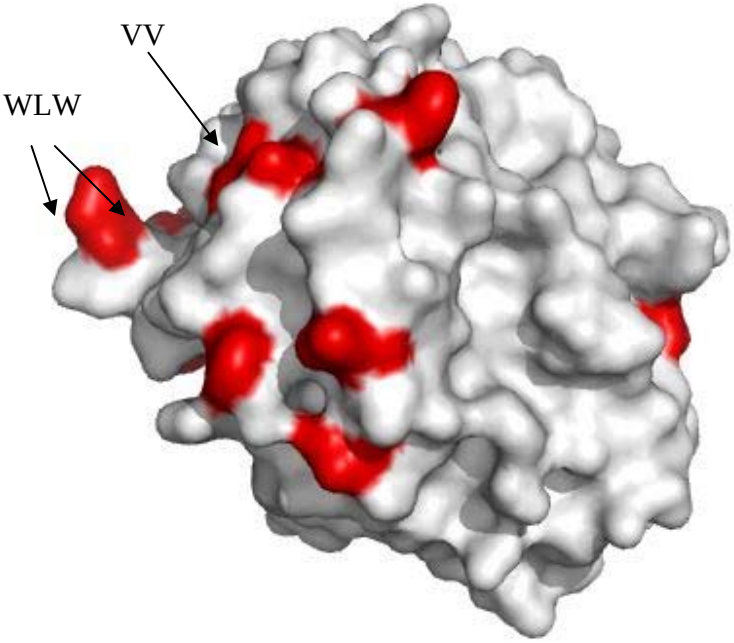


Figura 36. Modelagem da superfície da tripsina de S. frugiperda, mostrando os resíduos hidrofóbicos expostos em vermelho. A: Visão frontal. B: Giro de 180° da visão frontal.

4.5. Estudos da tripsina digestiva de *P. americana*

4.5.1. Purificação e identificação N-terminal da tripsina digestiva de *P. americana*

A tripsina digestiva majoritária de *P. americana* foi purificada de acordo com Lopes *et al.* (2003) através de 2 cromatografias de troca iônica: uma troca iônica High Q em pH 5,0 (Figura 37), com eluição de um pico de atividade, e a aplicação dessas frações ativas coletadas na coluna Res Q em pH 10,0 (Figura 38), sendo eluído um pico de atividade dessa cromatografia, que foi coletado e apresentou uma banda única de proteína visualizada em SDS-PAGE (Figura 39). Essa amostra de proteína pura (20 µg) foi liofilizada e enviada ao Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (EPM-Unifesp) para o microsseqüenciamento do N-terminal. Como resultado, foi obtida uma seqüência de 10 resíduos de aminoácidos: VSPAFSYGTG. Esta seqüência, quando comparada em banco de dados, coincide totalmente com um alérgeno (MPA3 allergen) de *P. americana*, o qual é predito como um homólogo de serina proteinase (Figura 40) e será chamado de PaTry (*P. americana* trypsinogen). Assim, a atividade majoritária de tripsina presente no intestino de *P. americana* corresponde ao gene PaTry.

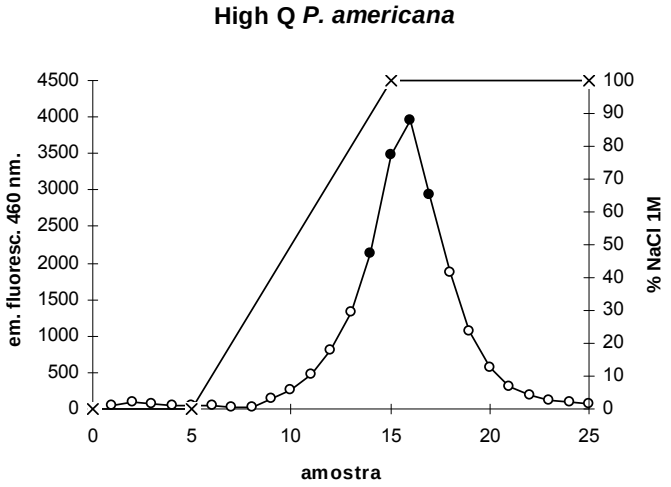


Figura 37. Cromatografia em Coluna High Q do homogeneizado de P. americana. Frações ativas sobre B-R-MCA: 14-17.

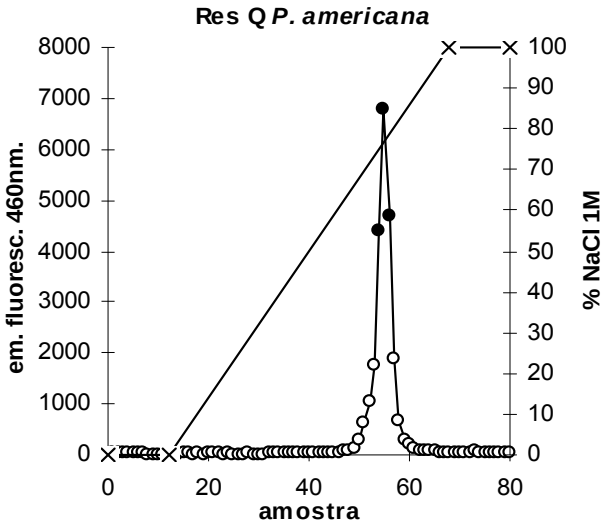


Figura 38. Resource Q da tripsina de P. americana. Frações ativas sobre B-R-MCA: 54-56.

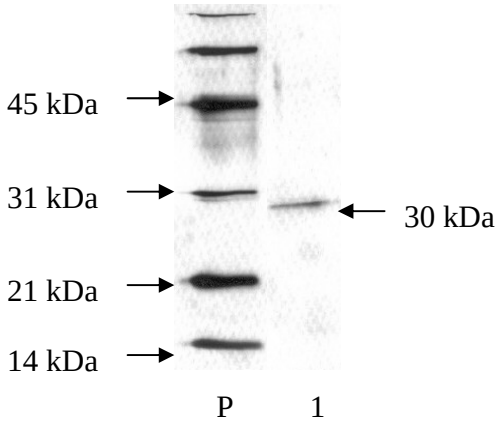


Figura 39. SDS-PAGE 12% das amostras de Tripsina pura de P. americana. P: padrão de peso molecular; 1: amostra das frações ativas coletadas da Resource Q.

4.5.2. Clonagem e expressão recombinante do PaTry

O PaTry identificado por microsseqüenciamento N-terminal foi amplificado por PCR (Figura 41) a partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio e clonado no vetor de expressão em *E. coli* pAE (Figura 42). Ele foi expresso de maneira

recombinante nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE-3) e Origami (DE-3) por 3 horas a 37ºC (Figura 43). As duas linhagens de *E. coli* induziram a expressão da proteína recombinante (rPaTry); entretanto a maior parte da proteína expressa a essa temperatura (se não a totalidade) está presente em corpúsculos de inclusão (não solúvel) (Figura 44). Entretanto, quando induzido a 20ºC, o PaTry parece ser produzido de maneira solúvel (Figura 45). Tentativas de purificação do PaTry a partir da fração solúvel expressa nas duas linhagem em duas temperaturas foram realizadas sem sucesso utilizando-se Ni-NTA Agarose (Figuras 46, 47 e 48).

Além disso, linhagens de *E. coli* artic cells (DE-3) transformadas com o vetor de expressão pAE clonado com o PaTry induziram a sua expressão recombinante, realizada overnight a 12ºC, temperatura na qual a chaperona expressa por essa linhagem de células é ativa. O teste de solubilidade do PaTry aparentemente demonstra que uma parte da proteína expressa está presente na fração solúvel (Figura 49). Entretanto, a purificação das proteínas da fração solúvel utilizando a matriz Ni-NTA Agarose mostrou que não houve ligação de proteína solúvel (Figura 50).

O PaTry também foi amplificado por PCR utilizando iniciadores específicos e clonado no plasmídeo pFastBac 1 (Figuras 51 e 52), o qual possui um sitio de transposição. Após sua clonagem, esse plasmídeo foi usado para transformar a linhagem de *E. coli* DH10Bac, que possui o genoma de um baculovírus e transposases responsáveis pela transposição do PaTry presente no plasmídeo ao genoma do baculovírus, produzindo partículas virais recombinantes, utilizadas para infectar células Sf9 em suspensão, como descrito a seguir.

Teste de expressão recombinante do PaTry foi realizado através da infecção de células em suspensão pelo baculovírus recombinante. A produção de baculovírus foi inferida a partir da viabilidade de células infectadas pelo baculovírus recombinante quando comparada com células controle não infectadas pelo baculovírus.

Após 5 ciclos de infecções virais, a viabilidade da cultura celular infectada após 72 horas de infecção diminuiu a 30%, ou seja, o número de células da cultura infectada (Figuras 53 C) foi reduzido significantemente quando comparado ao controle (figura 53 A). Por último, era possível observar em microscópio que as células infectadas apresentavam em seu interior cápsulas virais de poliedrina, além de características pré-

apoptóticas, como aumento do diâmetro celular (Figura 53 D), ausentes em células de culturas não infectadas pelo baculovírus (Figura 53 B).

A análise da expressão no meio de cultura de células Sf9 infectadas pelo baculovírus recombinante por western blot utilizando o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* não identificou nenhuma proteína expressa no meio de cultura (Figura 54), mostrando que o PaTry não foi expresso nesse sistema heterólogo.

```
atgcttcgctacctggtacttgcttccctcatcgcttgcagcctgagcgctgttcctaaa
 M  L  R  Y  L  V  L  A  S  L  I  A  C  S  L  S  A  V  P  K
gccaagcgtccccgccttgatggccgtattgtaggtggtcgacctgccgacatcgccgat
 A  K  R  P  R  L  D  G  R  I  V  G  G  R  P  A  D  I  A  D
tacccataccagctttcattcgaatactatggcagccacatgtgcggagcttcaatcatc
 Y  P  Y  Q  L  S  F  E  Y  Y  G  S  H  M  C  G  A  S  I  I
agcccgaactgggtggtaacagccgcacattgcgttgatggtgtatcagctagctctgct
 S  P  N  W  V  V  T  A  A  H  C  V  D  G  V  S  A  S  S  A
acattccgagctggaggcagtatcagggagagcggaggctctgtacatcaagccacacaa
 T  F  R  A  G  G  S  I  R  E  S  G  G  S  V  H  Q  A  T  Q
ctgattgcaaaccccaattatgactactacaccattgacttcgatgttgcagtcgcaagg
 L  I  A  N  P  N  Y  D  Y  Y  T  I  D  F  D  V  A  V  A  R
gtctcccctgccttcagctatggaaccggagttcaacctattcctctcgcttcctctgag
 V  S  P  A  F  S  Y  G  T  G  V  Q  P  I  P  L  A  S  S  E
ccttcagctggacaaattgcaacggtcagtggctggggaaccacatcagagggcggatct
 P  S  A  G  Q  I  A  T  V  S  G  W  G  T  T  S  E  G  G  S
acactgccatctcaactgcaggttgtctctgtgcccattgtgtctcgttctgaatgtaat
 T  L  P  S  Q  L  Q  V  V  S  V  P  I  V  S  R  S  E  C  N
caggcttattctgattatggtggcatcacagacgacatgatctgcgctgctgagcaacaa
 Q  A  Y  S  D  Y  G  G  I  T  D  D  M  I  C  A  A  E  Q  Q
ggaggaaaagacgcttgccaaggagattcaggcggtcctctcgttgtcaacggacaactg
 G  G  K  D  A  C  Q  G  D  S  G  G  P  L  V  V  N  G  Q  L
gccggcattgtatcctggggtgtaggatgtgccgagcaaggctaccctggtgtctactct
 A  G  I  V  S  W  G  V  G  C  A  E  Q  G  Y  P  G  V  Y  S
aatgttgcttctctcaagggcttcattacagaacagactggagtcaactaa
 N  V  A  S  L  K  G  F  I  T  E  Q  T  G  V  N  -
```

Figura 40. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos (abaixo da seqüência de nucleotideos) do alérgeno MPA3 de P. americana mostrando a seqüência de aminoácidos obtida no microsseqüenciamento N-terminal da amostra correspondente à tripsina de P. americana (PaTry).

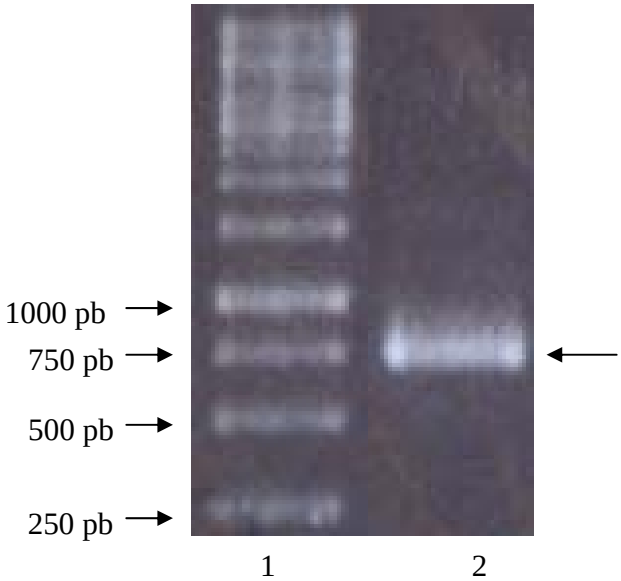


Figura 41. Amplificação de uma banda de tamanho esperado por PCR de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de P. americana. 1: padrões de massa molecular; 2: amostra.

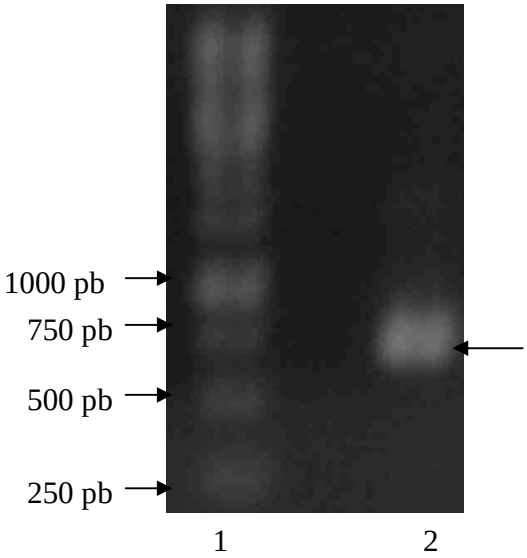


Figura 42. Amplificação do PaTry por PCR utilizando como molde clones ligados aos plasmídeos pAE. Raia 1: padrões de massa molecular; raia 2: amostra.

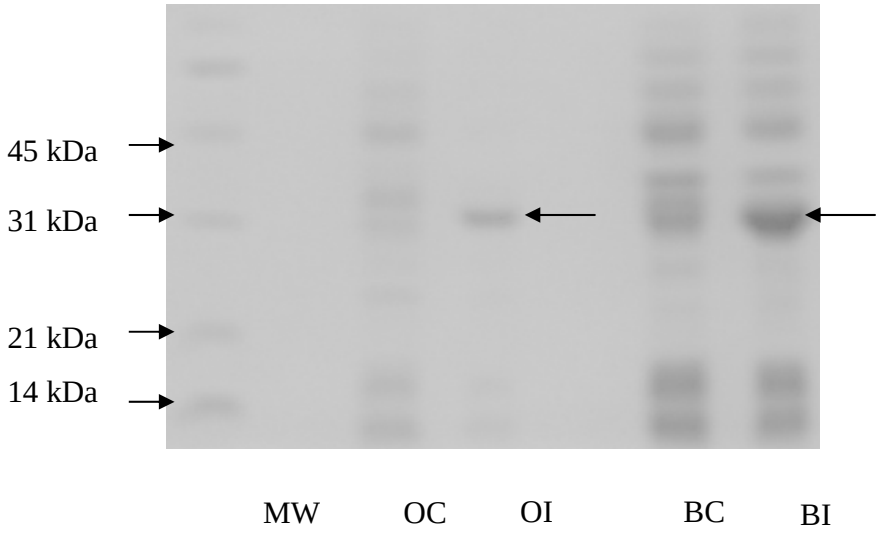


Figura 43. Indução da expressão por IPTG 1 mM a 37ºC do PaTry clonado no vetor pAE em duas linhagens de E. coli. MW: Padrão de peso molecular; OC: Origami (DE-3) controle; OI: OC: Origami (DE-3) induzida; BC: BL-

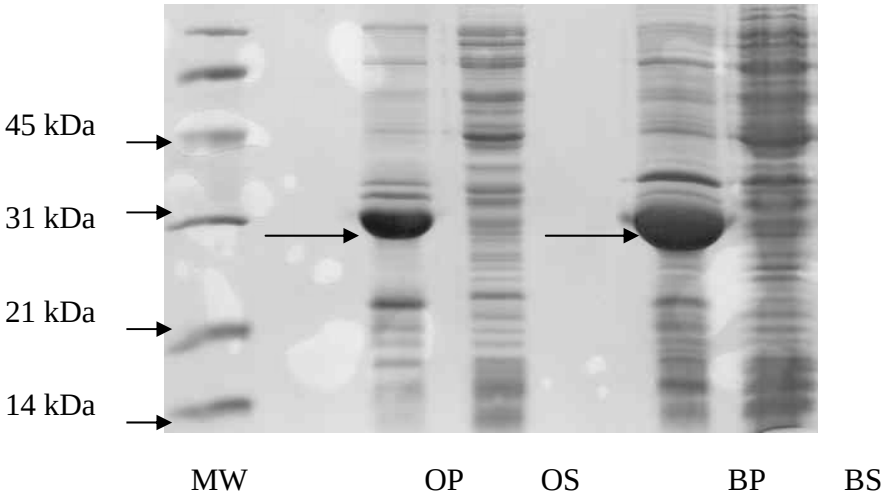


Figura 44. Análise da solubilidade PaTry expresso a 37ºC em duas linhagens de E. coli. BL21 (DE-3) e Origami. MW: padrão de peso molecular; OP: fração precipitada da Origami (DE-3) induzida; OS: fração solúvel da Origami (DE-3); BP: fração precipitada da BL-21 (DE-3) induzida; BS:fração solúvel da BL-21 (DE-3) induzida. As setas indicam o tripsinogênio recombinante expresso presente nas frações precipitadas (corpúsculos de inclusão).

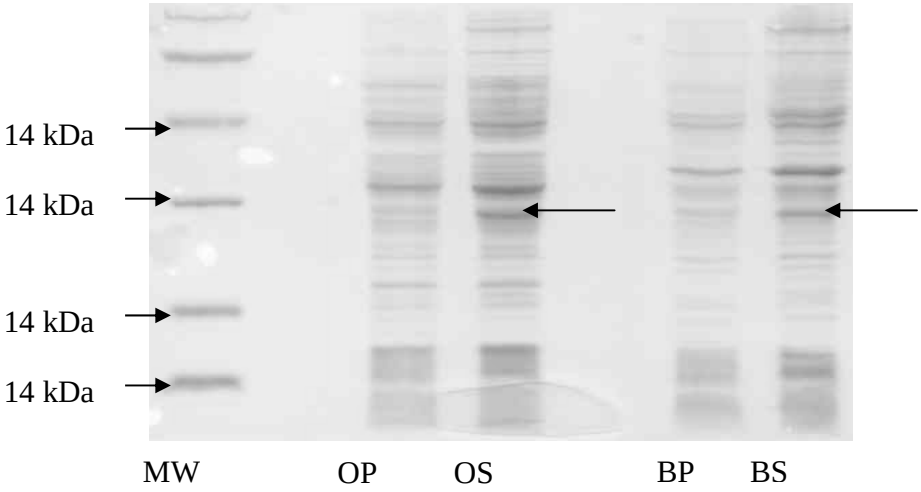


Figura 45. Análise da solubilidade do PaTry expresso a 20ºC em duas linhagens de E. coli. MW: padrão de peso molecular; OP: precipitado da Origami (DE-3) induzida; OS: solúvel da Origami (DE-3); BP: precipitado da BL-21 (DE-3) induzida; BS: solúvel da BL-21 (DE-3) induzida. As setas indicam a banda correspondente à tripsina recombinante.

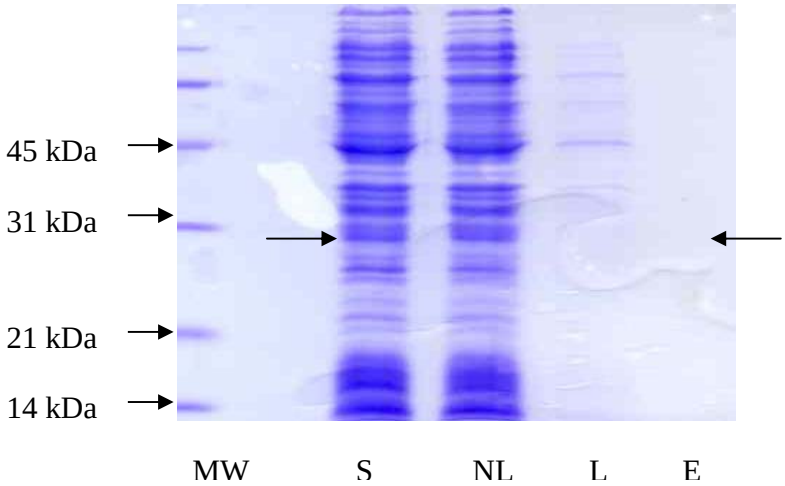


Figura 46. Purificação do PaTry recombinante expresso em E. coli BL-21 (DE-3) a 37ºC utilizando Ni-NTA Agarose por batching. MW: padrão de peso molecular; S: solúvel, resultante da análise de solubilidade; NL: Não ligado à coluna; L: lavado da coluna com tampão de lise; E: Eluído da coluna com 300 mM de imidazol.

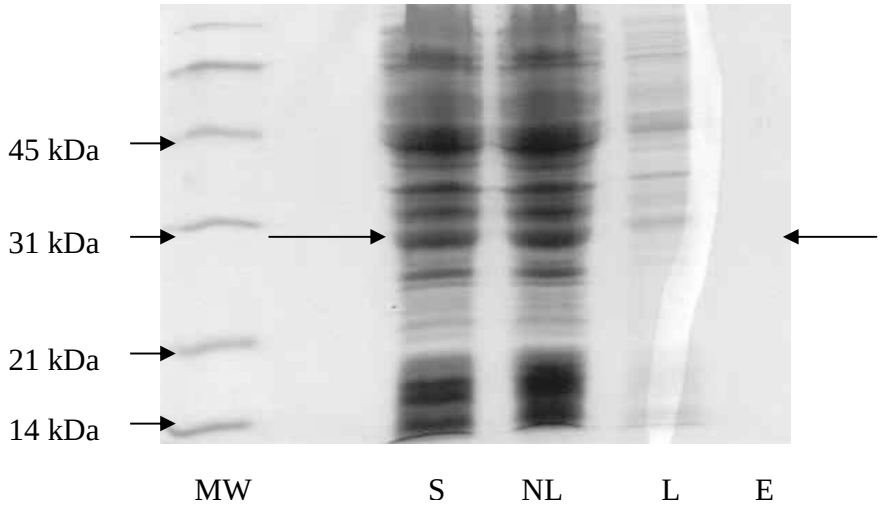


Figura 47. Purificação do PaTry recombinante expresso em E. coli BL-21 (DE-3) a 20ºC utilizando Ni-NTA Agarose por batching. MW: padrão de peso molecular; S: solúvel, resultante da análise de solubilidade; NL: Não ligado à coluna; L: lavado da coluna com tampão de lise; E: Eluído da coluna com 300 mM de imidazol.

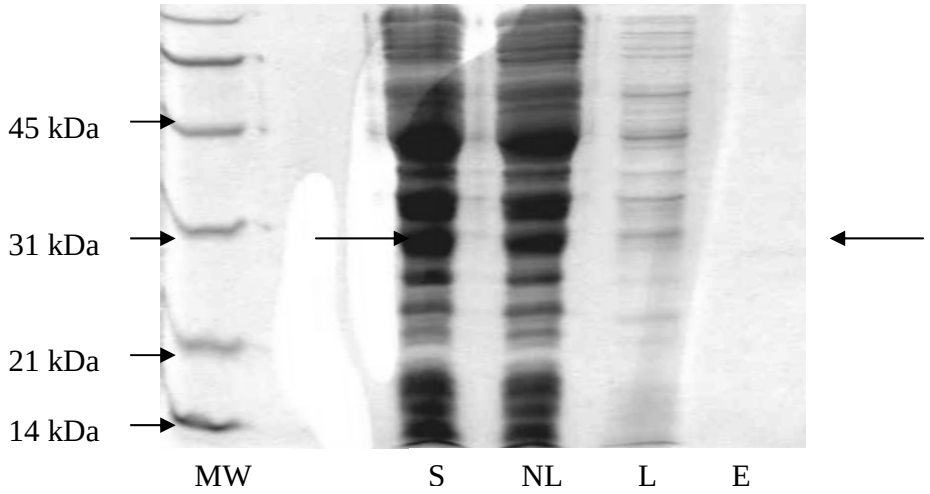


Figura 48. Purificação do PaTry recombinante expresso em E. coli Origami (DE-3) a 20ºC utilizando Ni-NTA Agarose por batching. MW: padrão de peso molecular; S: solúvel, resultante da análise de solubilidade; NL: Não ligado à coluna; L: lavado da coluna com tampão de lise; E: Eluído da coluna com 300 mM de imidazol.

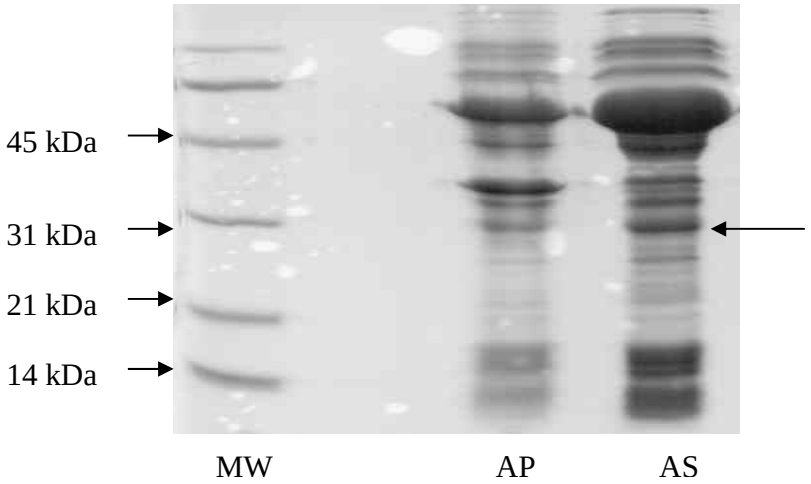


Figura 49. Análise da solubilidade do PaTry expresso a 12ºC em E. coli artic cells (DE-3) MW: padrão de peso molecular; AP: precipitado da artic cells (DE-3) induzida; AS: fração solúvel da artic cell (DE-3); As setas indicam a tripsina recombinante expressa aparentemente nas frações precipitadas (corpúsculos de inclusão) e solúvel.

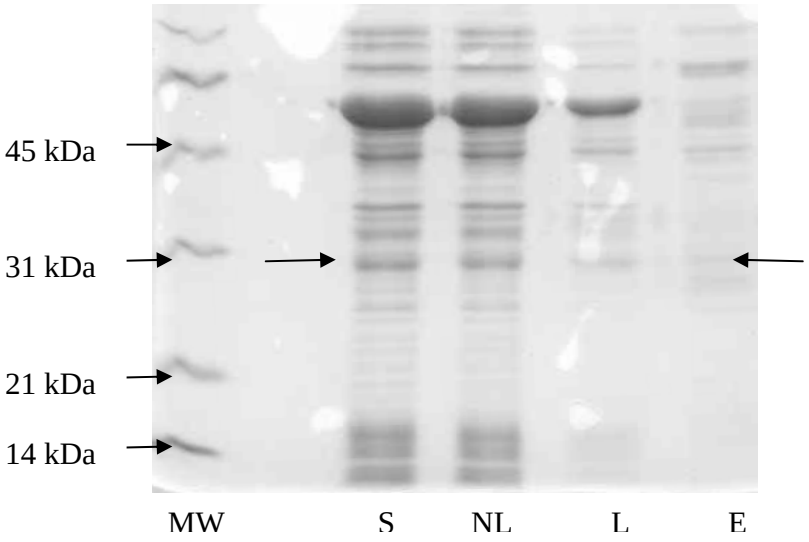


Figura 50. Purificação do PaTry recombinante expresso em E. coli artic cells (DE-3) utilizando Ni-NTA Agarose por batching. MW: padrão de peso molecular; S: solúvel, resultante da análise de solubilidade; NL: Não ligado à coluna; L: lavado da coluna com tampão de lise; E: Eluído da coluna com 300 mM de imidazol.

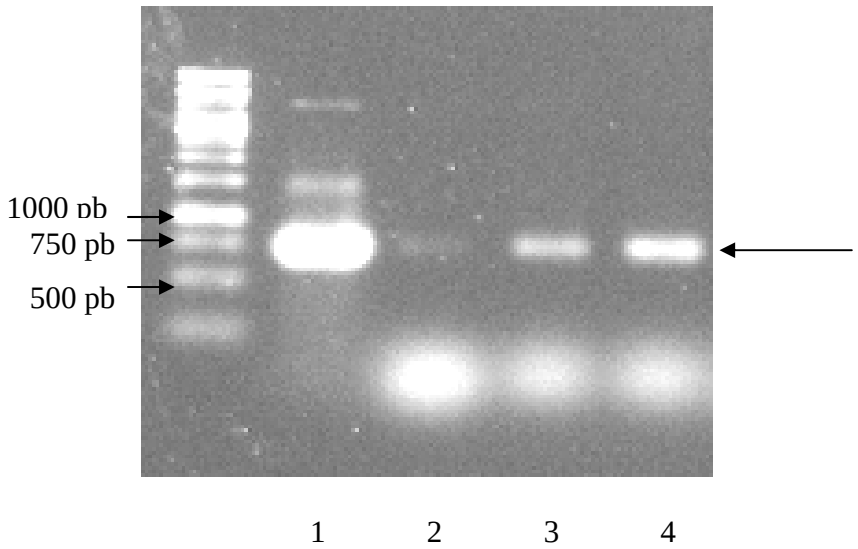


Figura 51. PCR da clonagem do PaTry no plasmídeo pFastbac 1 utilizando iniciadores específicos. Raia 1: controle positivo do PCR utilizando a biblioteca de cDNA como controle. Raias 2 a 4: PCR utilizando os plasmídeos como molde. Sombra abaixo: excesso de primer.

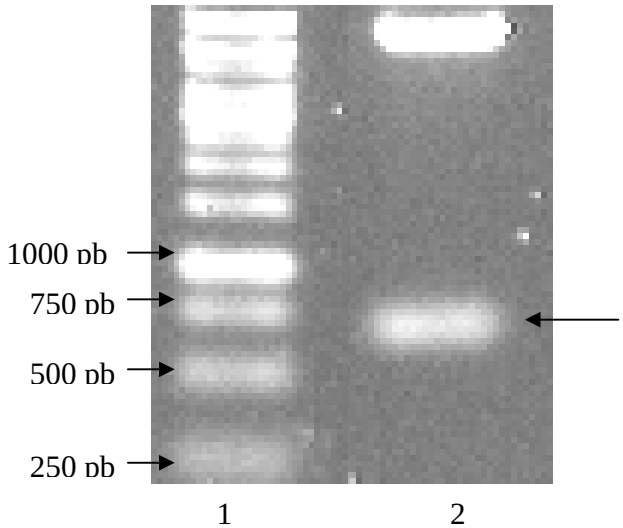


Figura 52. Dupla digestão do plasmídeo pFastBac 1 contendo o gene da pré-pró-enzima do PaTry clonado. A seta indica o fragmento liberado por dupla digestão.

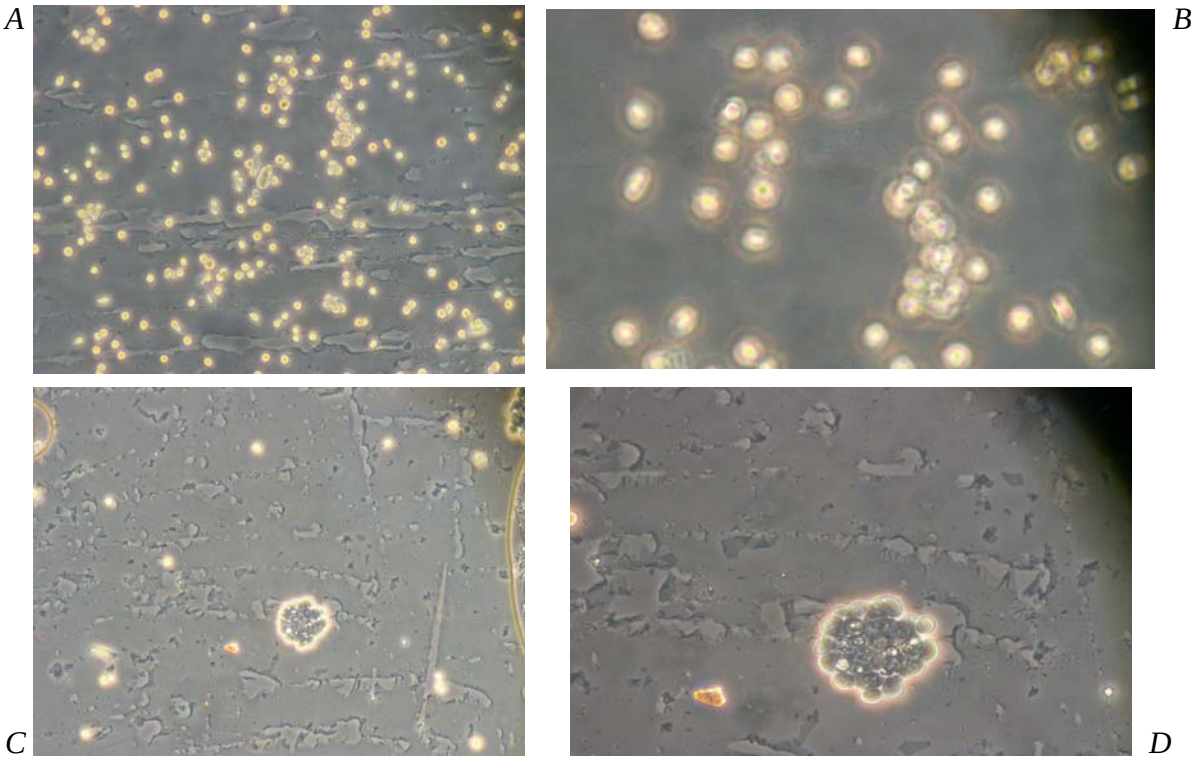


Figura 53 A, B, C e D. Expressão do PaTry em células Sf9 vistas em dois campos visuais com aumentos diferentes. A e B: culturas controle; C e D: infecção por baculovírus recombinantes.

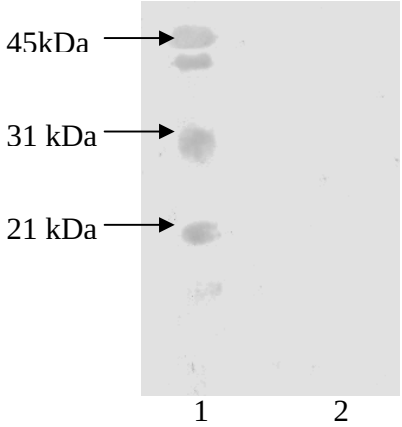


Figura 54. Análise por Western blot da expressão do PaTry utilizando o anticorpo anti-tripsina de M. domestica. 1: Padrões de massa molecular; 2: Amostra.

4.5.3. Estudos fisiológicos do PaTry

A distribuição da atividade de tripsina no tubo digestivo de *P. americana* foi previamente estudada por Dias (2004) (Figura 5), mostrando que a atividade majoritária de tripsina se encontra no papo, sendo também encontrada nos cecos e no ventrículo. Entretanto, quando analisados apenas os tecidos, há atividade apenas nos cecos, indicando que essa seria a região de produção e secreção da enzima.

Para confirmar esses dados bioquímicos, um RT-PCR do gene PaTry foi realizado, demonstrando que este é expresso nos cecos e na região anterior do ventrículo, não sendo expressa em glândulas salivares e nem na região posterior do ventrículo (Figura 55).

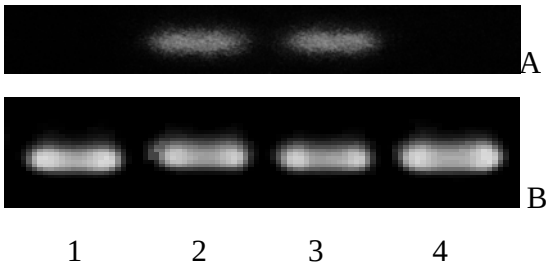


Figura 55. RT-PCR do PaTry (A) e de actina (B), gene constitutivo (controle positivo). 1: glândulas salivares; 2: Cecos; 3: Ventrículo anterior; 4: Ventrículo posterior.

Um Western blot utilizando o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* (Jordão *et al.*, 1996) contra o material total de intestino anterior e médio de *P. americana* mostra que apenas uma banda de proteína de massa molecular correspondente a tripsinas é reconhecida (Figura 56). Imunocitolocalização do epitélio intestinal de *P. americana* utilizando esse anticorpo mostrou que a tripsina é reconhecida em vesículas de secreção nos cecos e nas microvilosidades dos cecos e do ventrículo anterior (Figura 57 A e 57 B). Além disso, há reconhecimento de proteínas no conteúdo luminal (dados não mostrados). Não há reconhecimento de proteínas no ventrículo posterior.

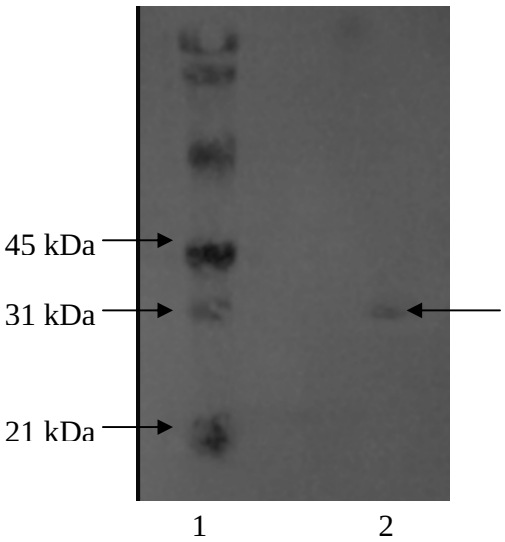


Figura 56. Western Blot do material de tubo digestivo de P. americana utilizando o anticorpo anti-tripsina de M. domestica. 1: Padrão de massa molecular; 2: amostra.

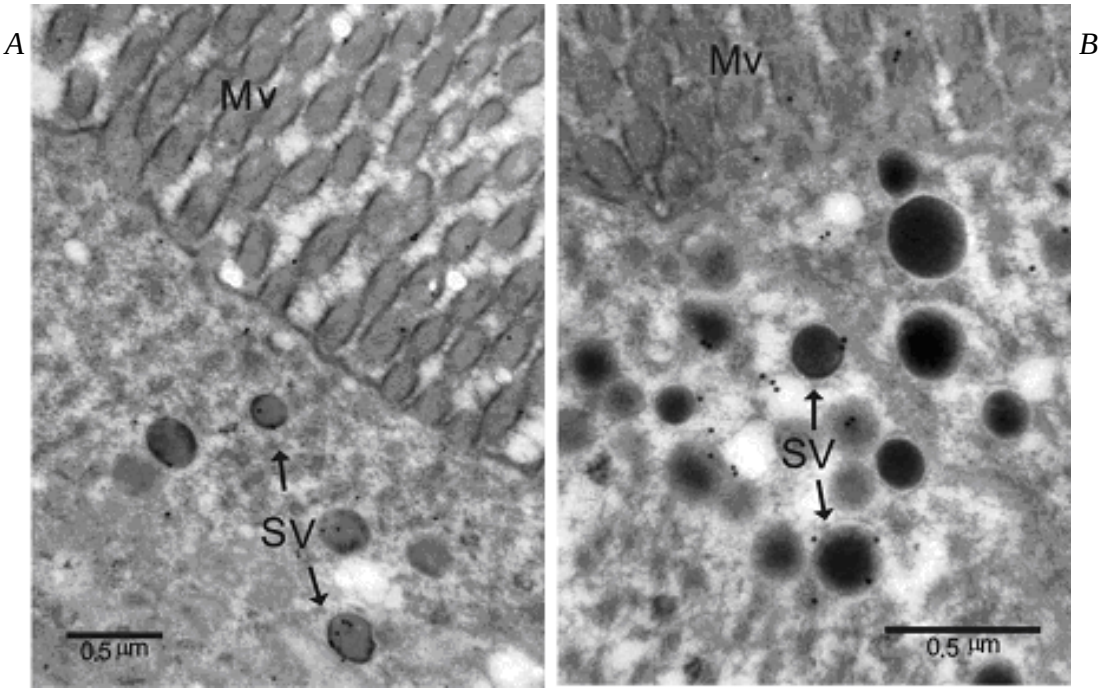


Figura 57 A e 57 B. Imunocitolocalização de tripsina nos cecos de P. americana. SV: vesículas de secreção; Mv: microvilosidades.

4.6. Estudos da quimotripsina de *M. domestica*

4.6.1. Distribuição, localização e inativação térmica das atividades de quimotripsinas digestivas de *M. domestica*

A atividade da quimotripsina digestiva de *M. domestica* está localizada majoritariamente (70%) na porção distal do ventrículo posterior (VP2) de larvas de *M. domestica* (Figura 58), havendo também quantidades menores de atividade na região proximal do ventrículo posterior (VP1, 16%) e no intestino posterior (IP, 9%). Uma parcela majoritária da atividade total (56%) se encontra na fração solúvel, a qual corresponde ao conteúdo luminal mais a fração celular solúvel, e outra parte da atividade total (35%) está presente na fração de membranas. Um ciclo de congelamento e descongelamento por três vezes dessa fração de membranas resultou na liberação de outros 10% da atividade total (Figura 59), indicando que 25% da atividade total estão realmente aderidos à membrana.

Apesar de se localizar majoritariamente na região distal do ventrículo posterior, a taxa de excreção calculada para a atividade solúvel dessa enzima mostra que apenas 28% desta é excretada e perdida nas fezes.

Uma inativação térmica a 46°C das atividades quimotrípticas solúvel e ligada à membrana mostrou que elas possuem diferentes meia-vidas com uma cinética de primeira ordem (Figura 60), sendo que a atividade quimotríptica ligada à membrana possui uma meia vida maior (57 minutos) que a atividade quimotríptica solúvel (36 minutos). Entretanto, essa diferença de meia-vidas entre as atividades poderia ser um artefato devido à inserção da quimotripsina presente na fração de membranas. Assim, para anular uma possível interferência da membrana sobre a atividade, uma inativação na presença de 10 mM de Triton X-100 das frações solúvel e de membranas foi realizada, mostrando que as duas atividades se comportam de maneira semelhante à anteriormente demonstrada: a atividade ligada à membrana possui uma maior meia vida (81 minutos) que a atividade solúvel (45 minutos) (Figura 61). Isso demonstra a existência de pelo menos dois tipos de quimotripsina presentes no intestino médio de M. domestica, sendo uma delas solúvel e outra aderida à fração de membranas.

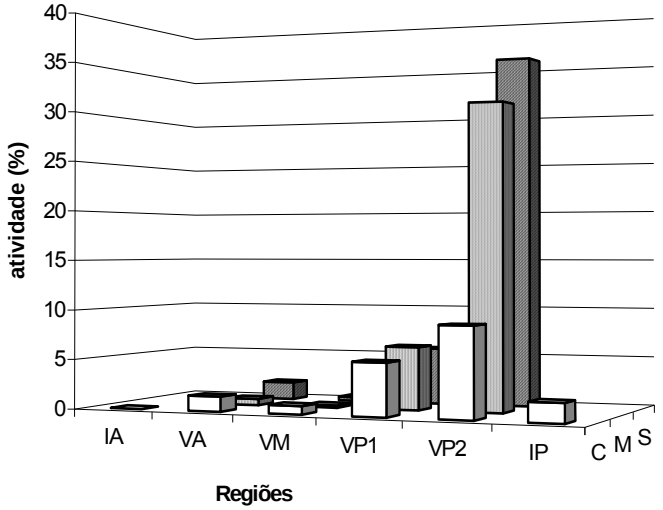


Figura 58. Distribuição da atividade de quimotripsina ao longo do intestino de M. domestica. IA: intestino anterior; VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VP1: região proximal do ventrículo posterior; VP2: região distal do ventrículo posterior; IP; intestino posterior. C: conteúdo luminal; M: fração de membranas; S: fração solúvel do precipitado. Atividade total: 485 um/ animal.

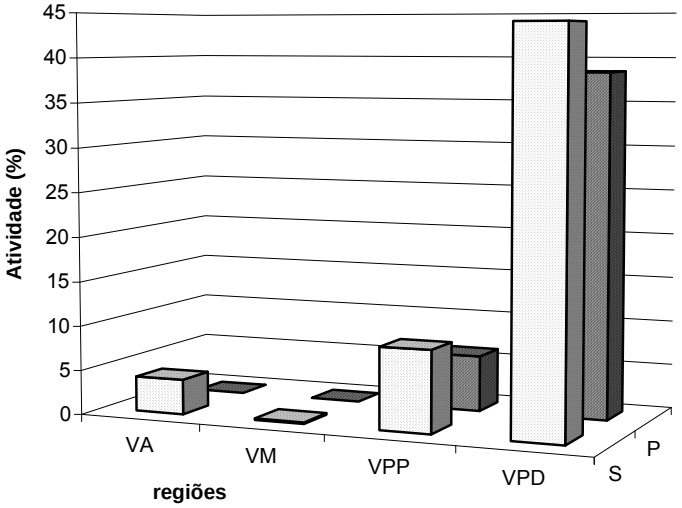


Figura 59. Distribuição da atividade enzimática da fração de membranas após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. VA: ventrículo anterior; VM: ventrículo médio; VPP: região proximal do ventrículo posterior; VPD: região distal do ventrículo posterior. S: solubilizado (liberado) após os ciclos; P: precipitado (aderido à membrana).

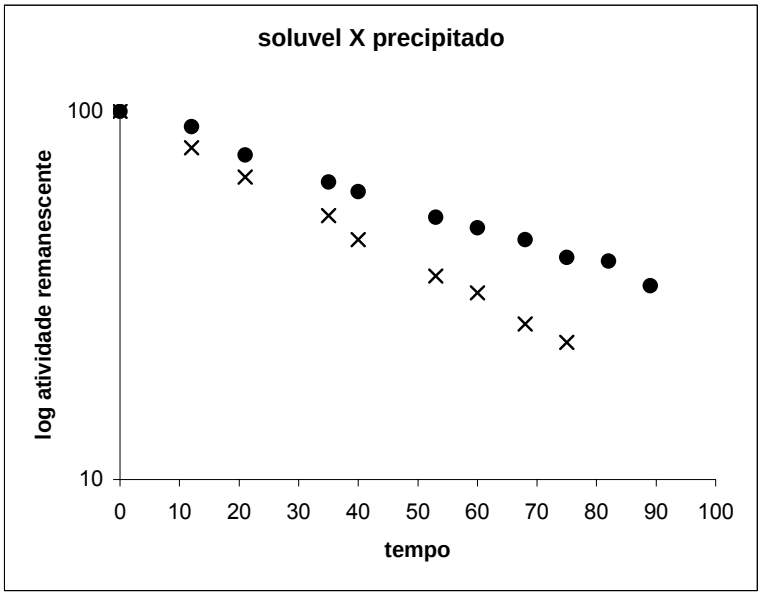


Figura 60. Inativação térmica das atividades de quimotripsinas presentes no intestino médio de M. domestica. (•): atividade de quimotripsina presente na fração de membranas. (x): atividade de quimotripsina presente na fração solúvel.

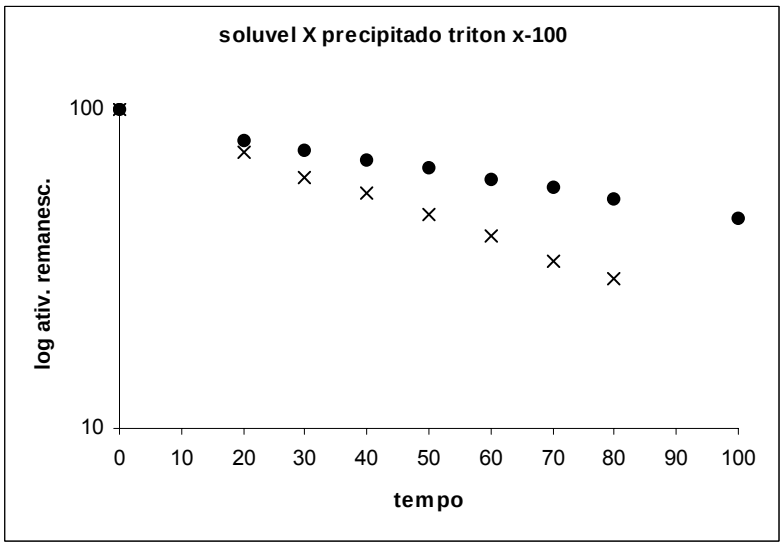


Figura 61. Inativação térmica das atividades de quimotripsinas presentes no intestino médio de M. domestica na presença de 10 mM de triton X-100. (•): atividade de quimotripsina presente na fração de membranas. (x): atividade de quimotripsina solúvel.

4.6.2. Purificação e caracterização da quimotripsina digestiva solúvel de *M. domestica*

A atividade majoritária de quimotripsina solúvel do ventrículo posterior de *M. domestica* foi purificada até a homogeneidade através de uma cromatografia de afinidade em coluna PBA-Agarose (figura 62). As frações ativas eluídas da coluna foram reunidas e submetidas a SDS-PAGE, revelando a presença de uma banda única de 30 kDa, mostrando que a quimotripsina foi purificada até a homogeneidade (Figura 73, raia 1). Não foi detectada a presença de atividade tríptica nas amostras reunidas.

Ensaio enzimático em SDS-PAGE semi-desnaturante da fração solúvel do homogeneizado do ventrículo posterior de *M. domestica* demonstrou a presença de uma banda única de atividade de quimotripsina, a qual possui a mesma massa molecular da quimotripsina purificada (Figura 73, raia 2).

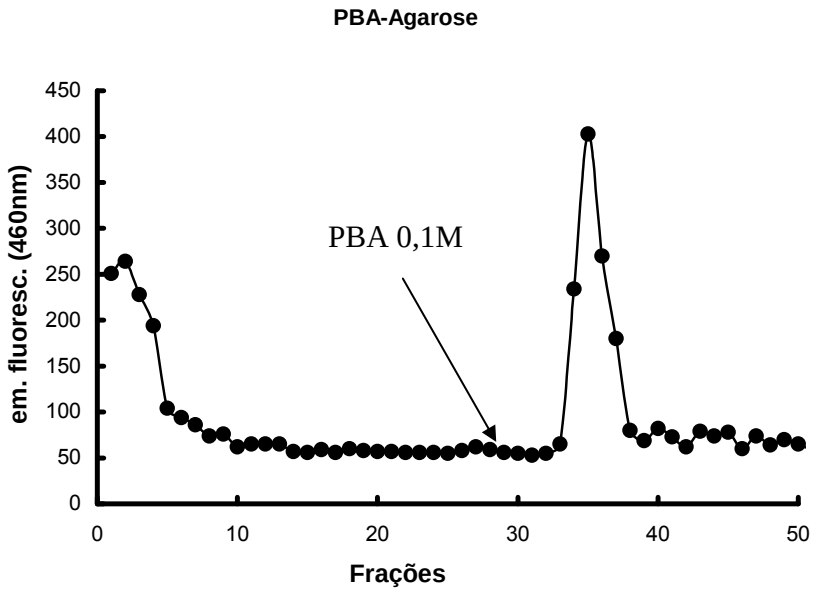


Figura 62. Purificação da quimotripsina digestiva solúvel de M. domestica. Frações ativas: 34-37.

Estudos cinéticos foram realizados com as frações ativas da quimotripsina digestiva solúvel purificada após uma filtração em gel Hitrap desalting para separar a enzima do inibidor PBA presente nas amostras ativas coletadas.

A quimotripsina digestiva solúvel purificada do intestino de larvas de *M. domestica* apresenta um pH ótimo de 7,4 (Figura 63) e é modificada por TPCK 0,1 mM em pH 8,5, perdendo 90% de sua atividade após 15 min de reação.

A quimotripsina digestiva solúvel purificada hidrolisa eficientemente substratos longos, como Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, e se mostra inativa sobre substratos curtos, como o Suc-Phe-MCA. A enzima purificada tem especificidade primária por resíduos volumosos em P1, exemplificado por Phe e Tyr apesar de substratos contendo Leu em P1 também serem hidrolizados (Tabela 2).

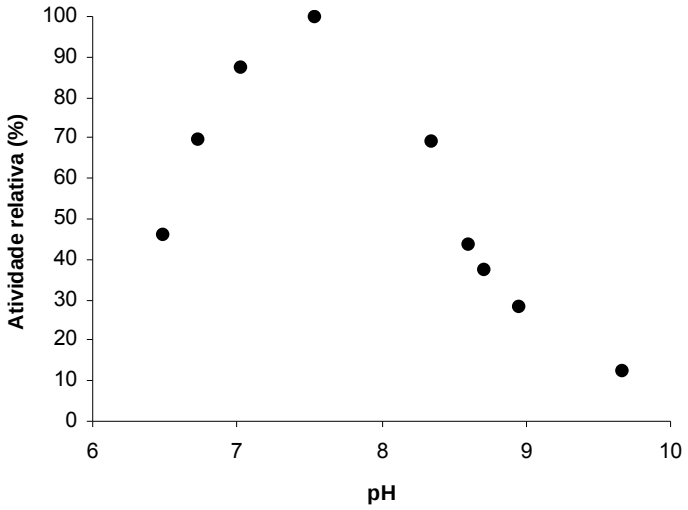


Figura 63. Efeito do pH sobre a atividade da quimotripsina digestiva purificada de M. domestica.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da quimotripsina digestiva solúvel purificada do intestino médio de M. domestica utilizando diversos substratos.

	kcat (S^{-1})	Km (μM)	kcat/Km ($S^{-1}\mu M^{-1}$)
S-Phe-MCA	n.d.	n.d.	n.d.
Glutaryl-Phe-MCA	n.d.	n.d.	n.d.
S-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	3.77	112.1±1.7	0.033
S-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	0.55	8.35±0.07	0.016
S-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	41.89	12.3±1.5	3.40
S-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	23.85	12.3±1.3	1.93

4.6.3. Caracterização e produção recombinante do quimotripsinogênio mais expresso

A partir de uma biblioteca de cDNA de intestino médio de *M. domestica* oito seqüências similares a serina proteinases (homólogos de quimotripsinas e tripsinas) foram obtidas ao acaso, incluindo uma seqüência completa homóloga a quimotripsogênio (Figura 64), denominada MdChy1 (*M. domestica* Chymotrypsinogen 1), a qual contém desde a Met inicial até a região do códon de parada, apresentando um peptídeo sinal de 17 aminoácidos e um pro peptídeo de 15 aminoácidos. Esta seqüência foi formada por 71 seqüências contíguas, o que corresponde a quase 10% das seqüenciais totais obtidas (726) (Padilha, 2009). A análise computacional desta seqüência prediz uma proteína com massa molecular teórica de 28.639,2 Da, condizente com a massa molecular de quimotripsinas de insetos previamente descritas e próxima à da enzima purificada purificada a partir do intestino médio, além de um pI teórico de 5,83. Análises bioinformáticas utilizando diversos programas (www.expasy.ch/) mostram que a proteína predita não deve possuir regiões transmembranas ou âncoras de GPI. Quando alinhada com outras seqüências similares a quimotripsinas (tanto de insetos quanto de outros organismos), a MdChy1 apresentou a tríade catalítica His57-Asp102-Ser195 (numeração da quimotripsina bovina), além de um dos resíduo Ser/Tyr/Gly-189 específico de quimotripsinas (no caso, uma glicina). Também apresenta um resíduo de Ala substituindo a Gly43 conservada nas quimotripsinas analisadas (Figura 65), que se encontra a 2,71 Å de distância da Ser195 (Figura 66), e pode estar implicada na modulação do pKa da Ser195 e, conseqüentemente, na alteração do pH ótimo da quimotripsina.

A MdChy1 foi amplificada por PCR a partir de uma biblioteca de cDNA e clonado em vetor de expressão em *E. coli* pAE.

Células *E. coli* STAR (DE-3) foram transformadas com o plasmídeo contendo o Mdchy1, e a indução da expressão por IPTG produziu uma proteína (MdChy1 recombinante, rMdChy1) recombinante com massa molecular esperada (30 kDa) (Figura 67).

```
ggggacacacagtaaaacgtacaactcaatcgaaatgaagatctttcttgcgttcgctgcc
                                    M  K  I  F  L  A  F  A  A
ttggccattgcgggtgttcatgcggccagcttagactccattgtccaaccaggattccct
 L  A  I  A  G  V  H  A  A  S  L  D  S  I  V  Q  P  G  F  P
gaaggacgcatcatcaacggccaacctgcggccaagggcgaagcaccttacattgtgtca
 E  G  R  I  I  N  G  Q  P  A  A  K  G  E  A  P  Y  I  V  S
ctgaagacctcctcgcacttctgtgctggttccataattgatccacactgggttctgact
 L  K  T  S  S  H  F  C  A  G  S  I  I  D  P  H  W  V  L  T
gcagcccattgtttgatctacaacgacttccaagtggttgctggattgcatttgcgcagc
 A  A  H  C  L  I  Y  N  D  F  Q  V  V  A  G  L  H  L  R  S
gatgagtccgacgcccaagttcgccgcgttaacggaaagcaaaacctgttcgcacatgag
 D  E  S  D  A  Q  V  R  R  V  N  G  K  Q  N  L  F  A  H  E
ctgtatggaggcaatgtgggtcccaatgacatcggtctcatctacatcgccgaggctttt
 L  Y  G  G  N  V  G  P  N  D  I  G  L  I  Y  I  A  E  A  F
gatttgaatgctttgtcccgtgatggatctgctgctgtggccaagattagcttgccctca
 D  L  N  A  L  S  R  D  G  S  A  A  V  A  K  I  S  L  P  S
agcaaatacgaacagaccggcaaaggtaagctcttcggttggggacgtggcaattccggt
 S  K  Y  E  Q  T  G  K  G  K  L  F  G  W  G  R  G  N  S  G
gccttgcccaacaccttgcagactttggatgtgaacatcattggctattccgaatgcaaa
 A  L  P  N  T  L  Q  T  L  D  V  N  I  I  G  Y  S  E  C  K
gctgctttgcccaactctgcccccgtagatcccgtcaatgtttgcacctatactcagggc
 A  A  L  P  N  S  A  P  V  D  P  V  N  V  C  T  Y  T  Q  G
accaccgatggcgcctgcaatggcgactccggcggccccttgattattaacaccgccgaa
 T  T  D  G  A  C  N  G  D  S  G  G  P  L  I  I  N  T  A  E
ggcagcgaaatcgttggtatcgtttcatggggatacactccttgtgccacaacgaaatac
 G  S  E  I  V  G  I  V  S  W  G  Y  T  P  C  A  T  T  K  Y
ccatcggtctacacccaagtatcttcgtacctatcgtggattgcaacaacaattcaaaac
 P  S  V  Y  T  Q  V  S  S  Y  L  S  W  I  A  T  T  I  Q  N
aattccaaataaatgattgttccctgatgcaaaataatcaaaataaagttaaccagcatt
 N  S  K  -
caaaa
```

Figura 64. Seqüência completa do quimotripsinogênio de M. domestica. Sublinhado com linha simples: peptídeo sinal. Sublinhado linha dupla: propeptídeo. Destacado em negrito estão os resíduos catalíticos His57, Asp102 e Ser195, além da Gly189 característica de quimotripsinas.

Análises de indução de expressão do rMdChy1 em diferentes períodos de tempo mostram que ele é expresso em grande quantidade nas 2 primeiras horas de indução por IPTG 1 mM. Após a quarta hora de indução, percebe-se o aparecimento de uma banda de menor peso molecular, provavelmente correspondente ao rMdChy1 clivada por proteases endógenas (Figura 68).

O rMdCy1 expressa em BL21 STAR (DE3) apresentou-se majoritariamente insolúvel (corpúsculos de inclusão), como mostrado por SDS-PAGE (Figura 69), e este

foi purificado até a homogeneidade através de uma cromatografia de afinidade da cauda de Histidina por níquel, apresentando uma banda única visualizada em SDS-PAGE (Figura 70).

4.6.4. Western blot e imunocitolocalização do MdChy1

O rMdChy1 expresso com cauda de histidina foi reconhecido por Western blot pelo anticorpo anti-his tag, o qual reconheceu uma banda de peso molecular correspondente à esperada para a quimotripsina de *M. domestica* recombinante (Figura 71). As amostras resultantes da cinética de indução também foram analisadas por western blot, indicando que o rMdChy1 é melhor induzido nas duas primeiras horas, sendo que uma banda de menor peso molecular é reconhecida após 4 horas de indução por Western blot, corroborando a idéia de que o rMdChy1 é degradado por proteases endógenas da bactéria após esse tempo de indução (Figura 72).

O rMdChy1 foi utilizado para produzir anticorpos policlonais em coelhos. Western Blot utilizando este anticorpo reconheceu uma banda nos materiais do ventrículo anterior e posterior de *M. domestica*, os quais possuem a mesma massa molecular da proteína purificada do intestino de *M. domestica*, da banda de atividade do ventrículo posterior sobre o substrato fluorescente S-AAPF-MCA, da banda reconhecida pelo anticorpo anti-His tag e do rMdChy1 reconhecido tanto pelo anticorpo anti-His tag quanto pelo anticorpo anti-MdChy1, indicando que o anticorpo estaria reconhecendo quimotripsinogênios presentes no epitélio intestinal de *M. domestica* (Figura 73).

```
                        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Manduca_sexta             1       IVGGSSSSVGQFPYQAGLVITLP----RGTAACGGSLLSNRRVLTAAHCWWDGQNQASRFVVVLGSNRLFSGGVRLETRD----IVMHGSWNPNLVRNDI  92
Spodoptera_frugiperda_1   1       IVGGQASSLGQFPYQAGLLADFS----AGQGVCGGSLVRANRVLTAAHCWFDGQNQAWRFTVVLGSIRLFSGGTRVQTSN----VVMHGSWNPSNIRNDV  92
Spodoptera_frugiperda_2   1       IVGGAPAQLGQFPYQAGLIIILP----FWSSACGGSLLNTRKVITAAHCWFDGQSQAISFTVVLGSINLYSGGTRVSSSN----VVMHPNWTPSLVRNDV  92
bovine_chymotrypsin       1       IVNGEEAVPGSWPWQVSLQDKTG------FHFCGGSLINENWVVTAAHCGVTTS-----DVVVAGEFDQGSSSEKIQKLK-IAKVFKNSKYNSLTINNDI  88
Diatraea_saccharalis1     1       IVGGLPAGVGQVPYQAGLLISIVG--FEGQGVCGASLVSGNRLVTAAHCWFDGSHQGWKLTVVLGTNYLFHGGTRVETTA----VFTHPRWTPLLVRNDI  94
Diatraea_saccharalis_2    1       IVGGTVTDISQVPYQDSHXITIL---FIFQSICGGCLISNTRVITAAHCHFDGNFVANSHTVVLGSNTIFSGGVRQSTTN----IAMHPHWTPAIVANDI  93
Tenebrio_molitor          1       IISGSAASKGQFPWQAALYLTVS----GGTSFCGGALISSNWILTAAHCTQGVSGITAYLGVVSLSD---SSRVTAQASR----VVAHPSYSSSTLANDI  89
Spodoptera                1       IVGGQASSLGQFPYQAGLLADFS----AGQGVCGGSLVRANRVLTAAHCWFDGQNQAWRFTVVLGSIRLFSGGTRVQTSN----VVMHGSWNPSNIRNDV  92
Aedes_aegypti             1       IVGGDEAEAHEFPYQISLQWNFNDGQTETMHFCGASVLNENFVLTAAHCKTAYSNTGFIEVVAAEHDVAVAEGSEQRRL--VAEFIVHEDYQGGVSPDDI  98
Solenopsis_invicta        1       IVGGKDAPVGKYPYQVSLRLSGS-------HRCGASILDNNNVLTAAHC-VDGLSNLNRLKVHVGTNYLSESGDVYDVED----AVVNKNYDDFLLRNDV  88
Drosophila_melanogaster   1       IINGYEAAKGEAPYIVSLQTTSNS------HFCAGSLLDEVTIVTAAHCLTYNQ----GQAVAGAHSRTDQENVQIRKFTNAQ-YVIHENYGGGVGPNDI  89
MdChy1                    1       IINGQPAAKGEAPYIVSLKTSS--------HFCAGSIIDPHWVLTAAHCLIYND----FQVVAGLHLRSDESDAQVRRVNGKQNLFAHELYGGNVGPNDI  88
                                                                  *
                                                 110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Manduca_sexta            93       AMIRLPSNVGFNNN---------INVIALPSGSQLNLNFAGERAIASGFGRTRDGAN----IDGSLNHVTLDVIANNVCSRTF--PLLIQSSNICTSGAN 177
Spodoptera_frugiperda_1  93       AMIRLNSNVGLSNT---------IALIALPSGSQLNENFAGENAVASGFGRTSDGAGGGITTNQFLSHVTLPVITNAVCRSSF--PLIVQDSNICTSGAG 181
Spodoptera_frugiperda_2  93       AMITLPNAVSTSNN---------LSPIALPSGNELNNNFAGFTGTASGFGYTRDGGS----VSPTLNHVDLPVITNAVCSNSL--FWYVQDSNVCTSGAG 177
bovine_chymotrypsin      89       TLLKLSTAASFSQT---------VSAVCLPSASDDFAAG--TTCVTTGWG-LTRYTN--ANTPDRLQQASLPLLSNTNCKKYWG--TKIKDAMICAGASG 172
Diatraea_saccharalis1    95       AMIYLPHNVVKPNL---------IAPVALPRGDELYENFAGSSAIASGFGLTSTSGN--ILQSQYLSHVKLNVISNSICSYAF--PFILQESNICTSGFG 181
Diatraea_saccharalis_2   94       AVLRIN-HVGFTNV---------IQPIAMPTGPELNQNFVGLYGLASGFGRTSDSNNN-IPQNQRISSVSLPTIANAQCAAVYG-HNIVISSAICTSGHG 181
Tenebrio_molitor         90       ALIQLSTSVATSTN---------IRTISLSS-STLGT---GASVTVSGWGRTSDSSSS---ISQTLNYVGLSTISNTVCANTY--GSIIQSGIVCCTGST 171
Spodoptera               93       AMIRLNSNVGLSNT---------IALIALPSGSQLNENFAGENAVASGFGRTSDGAGGGITTNQFLSHVTLPVITNAVCRSSF--PLIVQDSNICTSGAG 181
Aedes_aegypti            99       AVIRVDK--PFELN-------DKVKAVKLPKQLEQFDG----DVTLSGWGSVSTTVF--PDYPDKLRKVVLPLVDYEQCDTLWGNDSALAKSNVCAGPID 183
Solenopsis_invicta       89       ALVHLTNPIKFNDL---------VQPIKLSTNDEDLE---SNPCTLTGWGSTRLGGN----TPNALQEIELIVHPQKQCERDQ---WRVIDSHICTLTKR 169
Drosophila_melanogaster  90       GLILLKEEDAFDLNAVARDGSNPVSAVSLPSKTFQGTS----DGYLYGWGRDNSGLL--PLN---LQKLDAIIVDYNECKAALPSNNSLAETNVCTHTPG 180
MdChy1                   89       GLIYIAE--AFDLNALSRDGSAAVAKISLPSSKYEQTG----KGKLFGWGRGNSGAL--PNT---LQTLDVNIIGYSECKAALPNSAPYDPVNVCTYTQG 177

                                                 210       220       230       240       250       260
                                  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Manduca_sexta            178      GR-STCHGDSGGPLAATRNNRP-LLIGVTSFGHRDGCQRGHPAAFARVTSYDAWIRRNL----- 234
Spodoptera_frugiperda_1  182      GR-STCQGDSGGPLVVTRSGRP-LLIGVTSFGSARGCQVGSPAAFARVTSFMSWINGQL----- 238
Spodoptera_frugiperda_2  178      GR-SVCHGDSGGPLVVTSNNRR-ILIGVTSFGHWDGCQSGNPAAFARVT--------------- 224
bovine_chymotrypsin      173      VS--SCMGDSGGPLVCK-KNGAWTLVGIVSWGSSTCSTST-PGVYARVTALVNWVQQTLAAN-- 230
Diatraea_saccharalis1    182      GV-GAYRGDSGGPLVVTRGNRP-VLVGVTSFGSALGCHVNLPSVFARSTSFMDFIVQHL----- 238
Diatraea_saccharalis_2   182      GR-GTCQGDSGGPLVVNQNGRR-ILVGVTSFGARAGCAAGYPAAYARITSFNSWVLSV------ 237
Tenebrio_molitor         172      IQ-STCNGDSGGPLVTGSGTSA-VHVGIVSFGSSAGCAKGYPSAYTRTAAYRSWISSNAGV--- 230
Spodoptera               182      GR-STCQGDSGGPLVVTRSGRP-LLIGVTSFGSARGCQVGSPAAFARVTSFMSWINGQL----- 238
Aedes_aegypti            184      GSKSACSADSGGPLVKQ-SGEEVIQVGVVSWGAVPCGSPRRPTVFAGVSHYVDWIEQQLRA--- 243
Solenopsis_invicta       170      GE-GACHGDSGGPLVANG-----AQIGIVSFGSP--CALGEPDVYTRVSSFVSWINANLKK--- 222
Drosophila_melanogaster  181      KADGSCNGDSGGPLVSQSSSRGAELIGIVSWGYTPCLSTTYPSVYTSVSSFLPWIDENRKAK-- 242
MdChy1                   178      TTDGACNGDSGGPLIIN-TAEGSEIVGIVSWGYTPCATTKYPSVYTQVSSYLSWIATTIQNNSK 240
```

Figura 65. Alinhamento entre quimotripsinogênio bovino A, MdChy1, quimotripsinas de M. sexta, S. frugiperda, D. saccharalis, D. melanogaster e quimotripsinas digestivas de A. aegypti, T. molitor e S. invicta.: Gly43.*

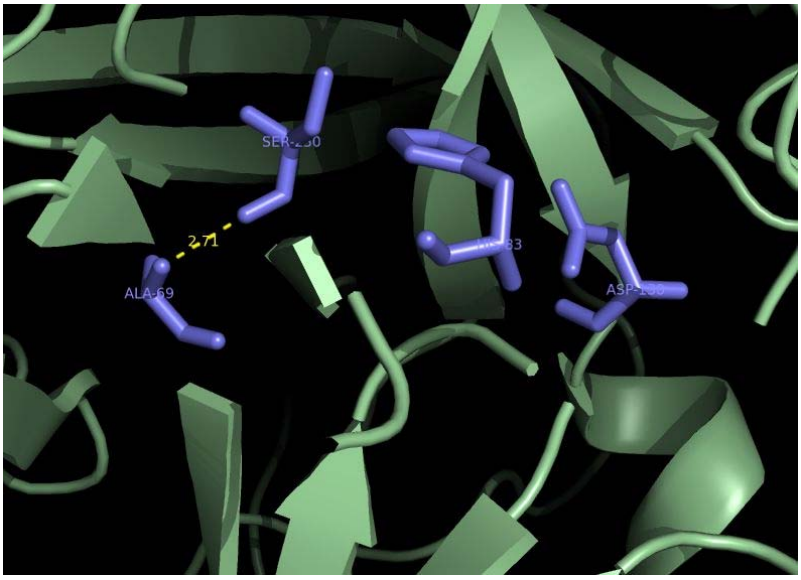


Figura 66. Modelagem da MdChy1, mostrando a tríade catalítica Asp-His-Ser e a Ala próxima à Ser195 (bovine numeração da quimotripsina bovina).

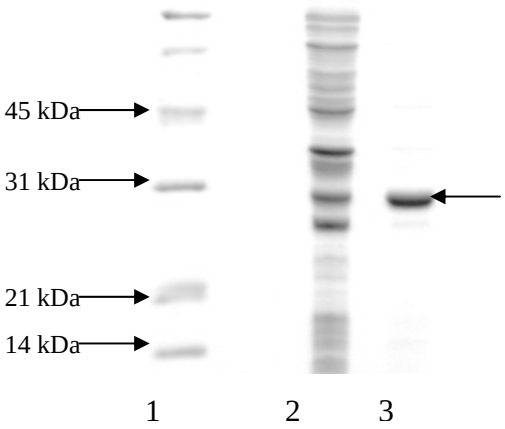


Figura 67. SDS-PAGE da indução da expressão do MdChy1 em BL21 (DE3) STAR. Raia 1: padrão de massa molecular; Raia 2: controle (não induzido); Raia 3: MdChy1 induzido a 37°C por 3 horas.

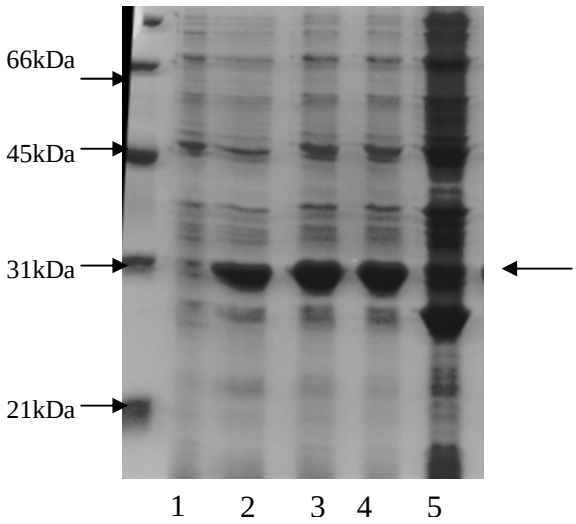


Figura 68. Cinética de indução do MdChy1 por IPTG 1mM por diferentes períodos: raia 1: Zero horas; raia 2: uma hora; raia 3: duas horas; raia 4: 3 horas; raia 5: 4 horas.

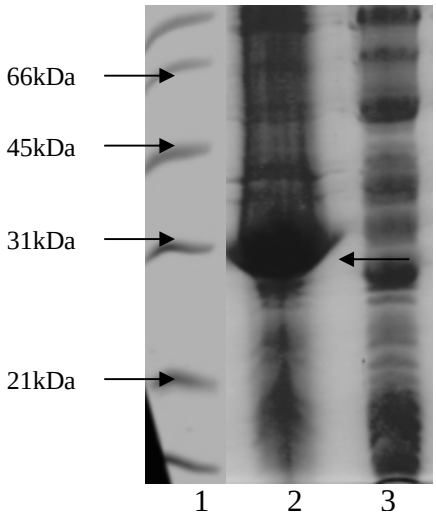


Figura 69. Análise da solubilidade do MdChy1 induzido por 1,5 horas 37°C. Raia 1: pardão de massa molecular; Raia 2: corpúsculos de inclusão; Raia 3: fração solúvel.

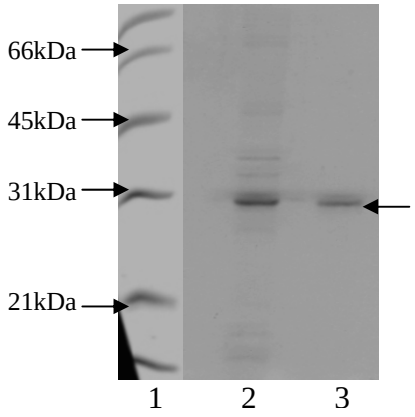


Figura 70: SDS-PAGE do MdChy1 purificado de corpúsculos de inclusão. Raia 1: padrão de massa molecular; Raia 2: lavado (flow-through) da histrap; Raia 3: eluído com 300 mM de imidazol.

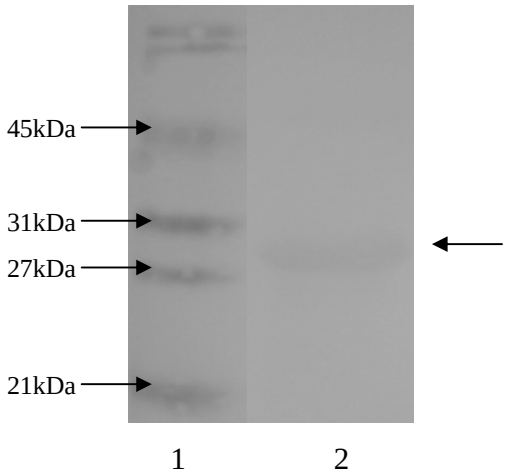


Figura 71. Análise da indução do MdChy1 por Western blot utilizando o anticorpo anti-His tag. Raia 1: padrão de massa molecular; Raia 2: indução por 1,5 horas a 37°C.

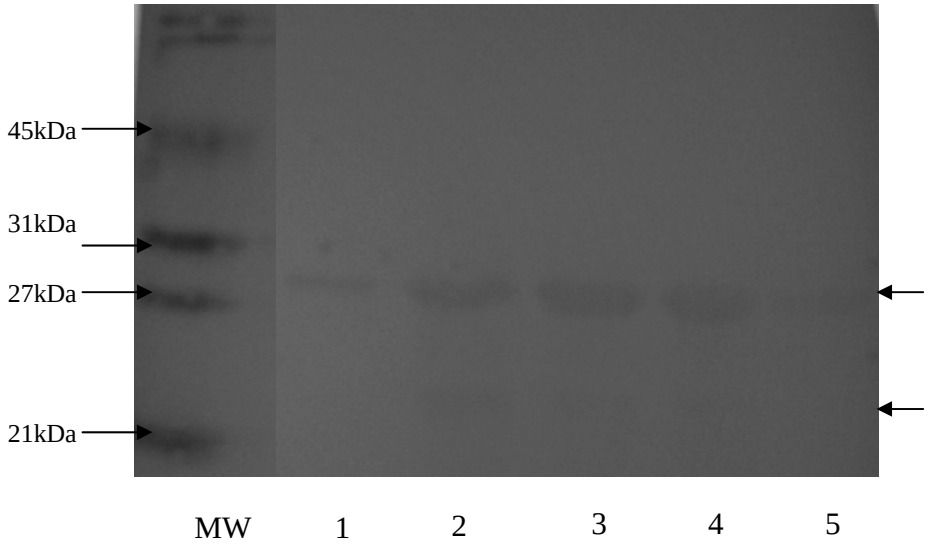


Figura 72. Cinética de indução do MdChy1 através de Western blot utilizando o anticorpo anti-His tag. Mw: Padão de massa molecular; Raia 1: uma hora; Raia 2: duas horas; Raia 3: três horas; Raia 4: quatro horas; Raia 5: controle 4 horas sem IPTG.

Esse anticorpo diluído 500 vezes foi utilizado a realização de imunolocalização de quimotripsinogênio em tecidos epiteliais de intestino de larvas de *M. domestica* (Figuras 74 A e 74 B) e marcou proteínas tanto no epitélio quanto na região do conteúdo (microvilosidades e próximo à membrana peritrófica) no ventrículo anterior e na região proximal do intestino posterior. Não houve reconhecimento ventrículo médio (dados não mostrados).

Na região distal do ventrículo posterior não há reconhecimento em vesículas intracelulares, mas há reconhecimento na região do conteúdo, principalmente próximo às microvilosidades.

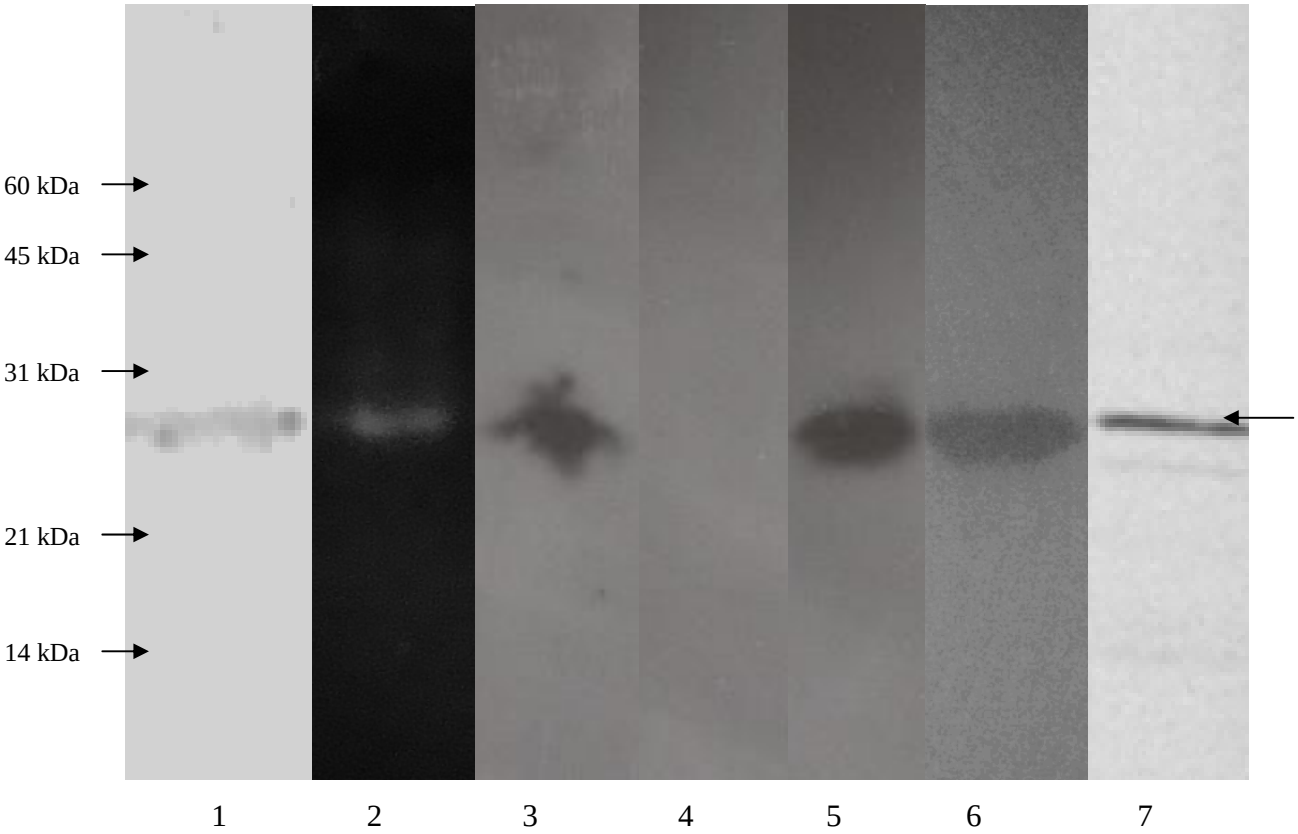


Figura 73. Correlação entre a quimotripsina solúvel purificada (1), a atividade de quimotripsina solúvel após uma separação eletroforética (2), Western blot do intestino de M. domestica utilizando o anticorpo policlonal anti-MdChy1 (3, 4 e 5) e rMdChy1 utilizando os anticorpos anti-His-Tag e anti-MdChy1 (6 e 7).

1: Quimotripsina solúvel purificada do intestino médio;

2: Gel de atividade SDS-PAGE em condições semi-desnaturantes;

3: Western blot do homogeneizado do ventrículo anterior (Diluição 1:500);

4: Western blot do homogeneizado do ventrículo médio (Diluição 1:500);

5: Western blot do homogeneizado do ventrículo posterior (Diluição 1:500).

6 e 7: Western blot do quimotripsinogênio recombinante utilizando o anticorpo monoclonal anti-His-Tag (6) e utilizando o anticorpo anti-quimotripsinogênio.

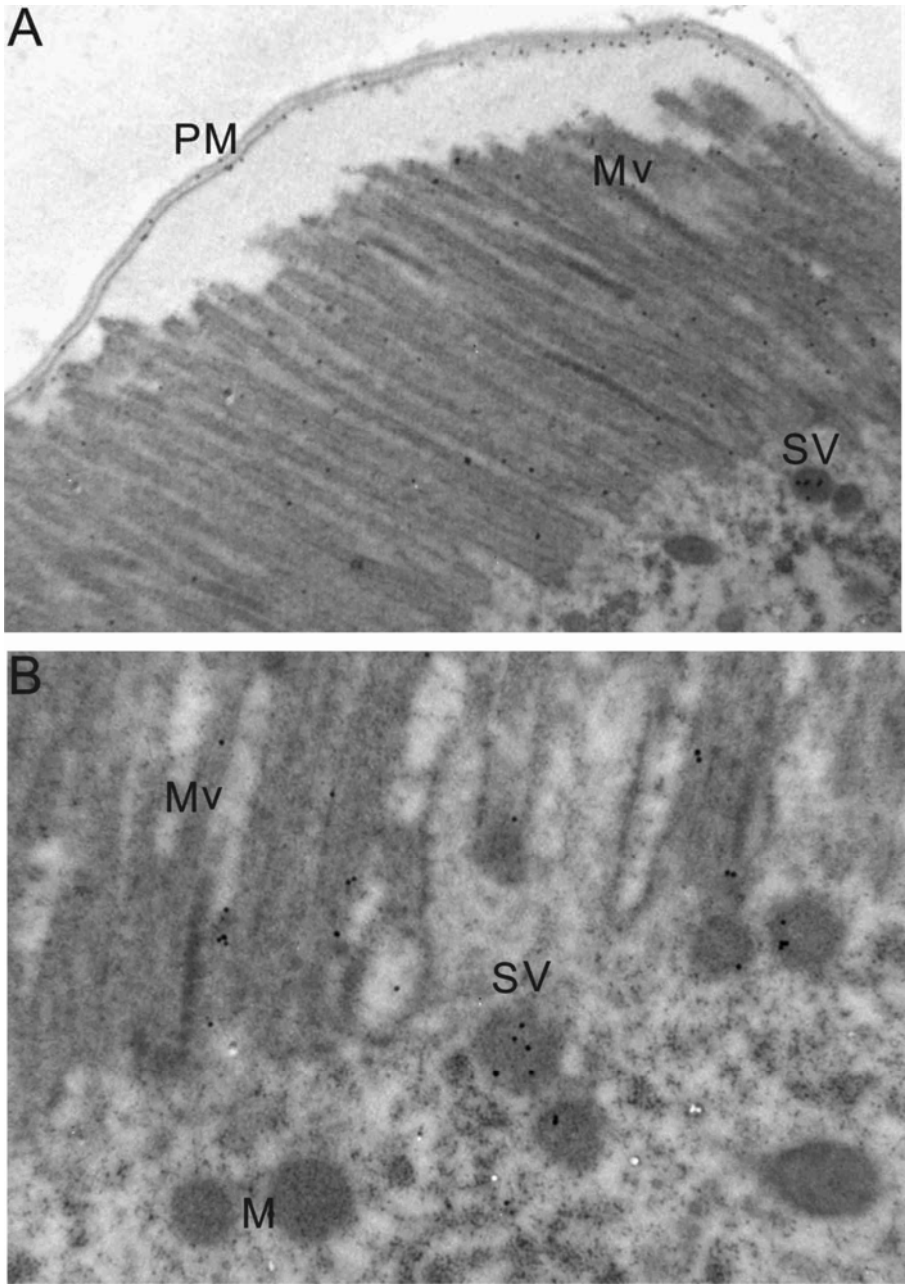


Figura 74. Imunolocalização do MdChy1 em tecidos do ventrículo posterior de M. domestica. A: reconhecimento do MdChy1 em microvilosidades e no lúmem, próximo à membrana peritrófica. B: reconhecimento em vesículas de secreção. Mv: microvilosidades; SV: vesículas de secreção; M: mitocôndrias; PM: membrana peritrófica.

4.6.5. Expressão de serina proteinases ao longo do intestino médio de *M. domestica*

Sete outras seqüências similares a serina proteinases, sendo 5 seqüências similares a tripsinas e 2 similares a quimotripsinas, foram obtidas por seqüenciamento ao acaso dos transcritos do intestino médio (ventrículo) (Padilha, 2009). A seqüência da MdChy2 (Figura 75) e da MdChy3 (Figura 76) são mostradas em alinhamentos com o quimotripsinogênio bovino. Já as seqüências de tripsinas (MdTry1-5) são mostradas alinhadas entre si e com o quimotripsinogênio bovino (Figura 77).

Análise da expressão dessas seqüências foram estudadas por RT-PCR, com o intuito de mostrar o local de expressão de cada serina proteinase. Os resultados mostram que MdTry1, MdTry3 e MdTry4, além das MdChy1 e MdChy3 são expressas no ventrículo posterior. Entretanto, a MdTry2 e MdTry5, além da MdChy2, são expressas no ventrículo anterior (Figura 78).

```
                     10        20        30        40        50        60
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  1   CGVPAIQPVLSGLSRIVNGEEAVPGSWPWQVSLQDKTGFHFCGGSLINENWVVTAAHCGV 60
MdChy2  1   ----------FGRGSFLEG-SALSSAW--------------CGGSLIGNRWVLTAAHCTD 35

                     70        80        90       100       110       120
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  61  TTSDVVVAGEFDQGSSSEKIQKLKIAKVFKNSKYNSLTINNDITLLKLSTAASFSQTVSA 120
MdChy2  36  GIQSVTVYLGATVRTSAEVTHTVAKSDIIIHSGWNSKTLKNDISLIKIP-SVSYTSRIQA 94

                    130       140       150       160       170       180
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  121 VCLPSASDDFA--AGTTCVTTGWGLTRYTNANTPDRLQQASLPLLSNTNCKKYWGTKIKD 178
MdChy2  95  VKLPAIASSYSTYAGDYAIASGWGKISDSASGVTNNLQWARMQIITNTVCAATYGTSIVT 154

                    190       200       210       220       230       240
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  178 -AMICAGASG-VSSCMGDSGGPLVCKKNGAWTLVGIVSWGSST-CSTSTPGVYARVTALV 235
MdChy2  155 SSNICVSTPGGVSTCNGDSGGPLVLE--SSKVQVGLTSFGSSAGCAKGYPAAFTRVTSYL 212

                    250
            ....|....|.
Bovine  236 NWVQQTLAAN- 245
MdChy2  213 DWIKSNTGIAY 223
```

Figura 75. Alinhamento de aminoácidos da seqüência parcial do MdChy2 e o quimotripsinogênio bovino.

```
                    10        20        30        40        50        60
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  1   CGVPAIQPVLSGLSRIVN-GEEAVPG-SWPWQVSLQDKTGFHFCGGSLINENWVVTAAHC 58
MdChy3  1   -KIFKNNCLGGGPRRKKKQGQTLFPKXEAPYIVSLKTSS--HFCAGSIIDPHWVLTAAHC 57

                    70        80        90       100       110       120
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  59  GVTTSDVVVAGEFDQGSSSEKIQKLKIAKVFKNSKYNSLTINNDITLLKLSTAASFSQTV 118
MdChy3  57  -LINNDFKVAAEMHLPSHESDAQVRRVN--LKEKPVRT--------------------- 92

                   130       140       150       160       170       180
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  119 SAVCLPSASDDFAAGTTCVTTGWGLTRYTNANTPDRLQQASLPLLSNTNCKKYWGTKIKD 178
MdChy3  92  ------------------------------------------------------------ 92

                   190       200       210       220       230       240
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Bovine  179 AMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKNGAWTLVGIVSWGSSTCSTSTPGVYARVTALVNWV 238
MdChy3  92  ------------------------------------------------------------ 92


            ....|..
Bovine  239 QQTLAAN 245
MdChy3  92  ------- 92
```

Figura 76. Alinhamento de aminoácidos da seqüência parcial do MdChy3 e quimotripsinogênio bovino.

Como visto, o anticorpo anti-rMdChy1 reconhece proteínas no ventrículo anterior e no posterior de *M. domestica*. Entretanto, tanto a atividade quimotríptica quanto seus transcritos estão majoritariamente presente no ventrículo posterior. Por outro lado, vemos a presença de transcritos e de uma atividade minoritária no ventrículo anterior, indicando que o anticorpo policlonal anti-rMdChy1 pode estar reconhecendo de maneira cruzada outra quimotripsina expressa neste local.

```
                                                 10        20        30        40        50
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bovine chymotrypsinogen A   1   ----------------------------CGVPAIQPVLSGLS-RIVNGE 20
MdTry1                      1   ------------------WPPTYSRRYPCWMAVLLVAPMPTSNNIPIKF 31
MdTry2                      1   -KDLTMKAFVALSLFVAVASAGVMPPIQPRLPLVPVMPLEELEGRITNGE 49
MdTry3                      1   GVQLYSNLGPRITMGHQKLWINSLAIG--LLVTLASAAHLPLDGRIVGGY 48
MdTry4                      1   ----FKEFSFEYNMFRCTFVLLALMADSAMGSVIMPRLIPDLEGRVVGGE 46
MdTry5                      1   -------------------------------------------------- 1

                                            60        70        80        90       100
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bovine chymotrypsinogen A   21  EAVPGSWPWQVSLQDKTGF--HFCGGSLINENWVVTAAHCG-VTTS-DVV 66
MdTry1                      32  QCVIAADIVAVAVS--------TAATSLFRLPIVLVG-------ELDLSL 66
MdTry2                      50  LAKPGQFPYQVGLSLVFGDKGAWCGGTLISDRWILTAAHCTDGADGVTAY 99
MdTry3                      49  EVDIRDVPFQVSLQSYN----HFCGGSLIVKRFVLTAAHCTDGNSPTAPL 94
MdTry4                      47  DTTIDQYPYQVSVR-LLGS--HVCGGSIYNSRVVVTAAHCI-YSFLGASS 92
MdTry5                      1   -------------------------------------------------- 1

                                        110       120       130       140       150
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bovine chymotrypsinogen A   67  VAGEFDQGSSSEKIQKLKIAK--VFKNSKYNSLTINNDITLLKLS--TAA 112
MdTry1                      67  LTVVAGSTYLDDVTWELPVSK--IIVHEKYT-SANDYDVAILVLR--GNF 111
MdTry2                      100 LGAIDIKDDHEKGQQRIYTSKSNIAIHEHWDPSTLSNDISLIKLP--VVI 147
MdTry3                      95  FSVRIGSTYSEKGGLLLRVLR--IHQHEKYNFSFIDYDFSILELEDYDEN 142
MdTry4                      93  YSIQYGVTKVGGSNNVIGAQR--IVKNEKYDSSSINNDVALIFLS--LDI 138
MdTry5                      1   --------------------------GQDYSSSTKVNDIAVIRLS--SSL 22

                                        160       170       180       190       200
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bovine chymotrypsinogen A   113 SFSQTVSAVCLPSASDDFAAGTTCVTTGWG-LTRYTNANTPDRLQQASLP 161
MdTry1                      112 SFNNRIQPISLDKARP--EAGAESIVTGCG--TLVEGGDIPINCDKSLST 157
MdTry2                      148 EFNERIQPASLPKMDGHYSTYEGDMVWASGWSKTAIRLHCFALLRTLRSR 197
MdTry3                      143 ALPFKLTYAKLPRANEDLPDGTLATISGWGGTKNPLDRCMLRPLSSTVIV 192
MdTry4                      139 PFSATAQPIPLASAEP--EPTTVAVVTGWG-TTEEDGASA-SILQKTEVL 184
MdTry5                      23  TMSSTIKAIALVSTAP--ANGAAASVSGWG-TTSFGSSSAPSQLRYVNVK 69

                                        210       220       230       240       250
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
bovine chymotrypsinogen A   162 LLSNTNCK--KY-WGTKIKDAMICAGAS--GVSSCMGDSGGPLVCKKNGA 206
MdTry1                  158 MLS---------------------------------------------- 160
MdTry2                  198 LEAT--------------------------------------------- 201
MdTry3                  193 CLAKSPSG-----------RAIVAAYRG-----ERSGSDRWPWSD----- 221
MdTry4                  185 IVARDVCN-SQYAGINEIANVMLCAAVENGGKDACQGDSGGPLVA--NG- 230
MdTry5                  70  IVGRTQCASSTYGYGSKIKASMICAYTV--GKDSCQGDSGGPLVS--GG- 114

                                        260       270       280
                                        ....|....|....|....|....|....|....|....
bovine chymotrypsinogen A   207 WTLVGIVSWGSSTCSTSTPGVYARVTALVNWVQQTLAAN 245
MdTry1                      160 ---------------------------------------- 160
MdTry2                      201 -PVDFYCGWTEKNLYTARWKLPQ---------------- 223
MdTry3                      221 -ILTGLQGWVP-TIRRIPPALPEQNVEYRAHI------- 251
MdTry4                      230 -ELVGIVSWGVGCARADFSGVYSNVAELRDWIEANLA-- 266
MdTry5                      114 -VLAGVVSWGQGRAQTNYPGVYADVAALRSWVVSAASSV 152
```

Figura 77. Alinhamento de aminoácidos entre o quimotripsinogênio bovino e seqüências de tripsinas de M. domestica.

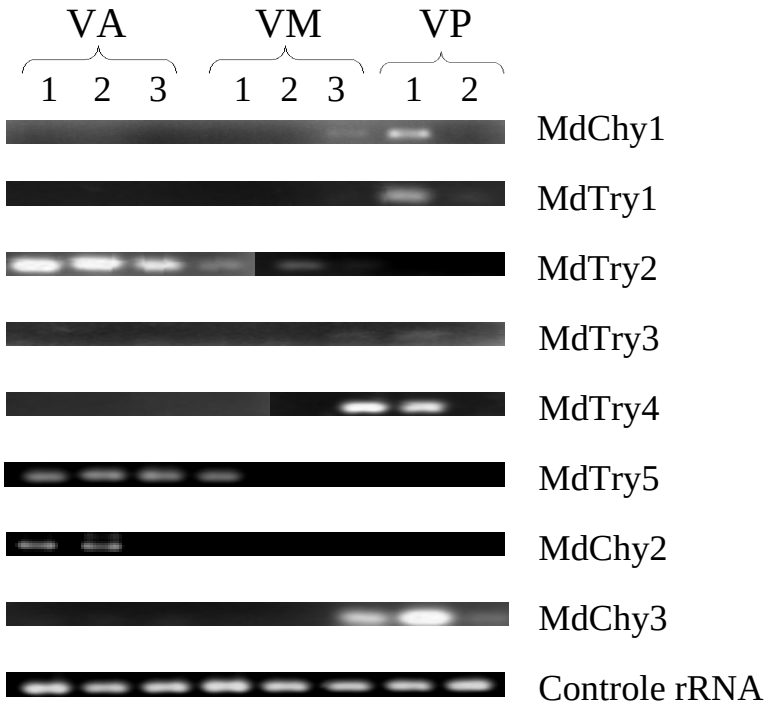


Figura 78. RT-PCR de genes de serina-proteinases presentes no intestino médio de M. domestica. VA: Ventrículo anterior 1) proximal, 2) médio e 3) distal; VM: Ventrículo médio 1) proximal, 2) média e 3) distal; VP: Ventrículo posterior 1) proximal e 2) distal.

4.6.6. Reconstrução filogenética de genes similares a quimotripsinas de *D. melanogaster* e suas relações com o MdChy1

Uma reconstrução filogenética foi feita utilizando genes (seqüências) similares a quimotripsinas de *D. melanogaster* menores de 440 aminoácidos e que não apresentaram Asp189 (característico de tripsinas) encontradas no banco de dados FlyBase, além de seqüências similares a quimotripsina de *M. domestica* (MdChy1 e MdChy2), o quimotripsinogênio bovino e algumas seqüências similares a quimotripsina de diversos insetos previamente estudadas, resultando em uma árvore que contém nove ramos (A-I) apresentando bootstrap maior que 70% (Figura 79).

A análise de expressão de cada gene de *D. melanogaster* mostrou que os genes de *D. melanogaster* agrupados nos ramos principais são expressos na mesma fase de vida, suas localizações nos cromossomos são fisicamente próximas e, portanto, cada ramo possui o mesmo padrão de expressão. Isso deve ocorrer devido à origem comum

de genes clusterizados: um gene ancestral deve sofrer duplicação e suas cópias permanecer no mesmo cromossomo, com função e padrão de expressão semelhantes.

O ramo A é constituído por genes conhecidos com *Jonah*, pois são expressos especificamente no intestino médio de larvas, como mostrado por hibridização *in situ* (Akan & Carlson, 1985). Análise da expressão confirma esse padrão, mostrando que, além de larvas, é expresso também no intestino médio de adultos, inferindo que estão envolvidos em digestão, desde que larvas e adultos se alimentam de bactérias. O ramo A apresenta seqüências presentes nos cromossomos 3R, 3L, 2R e 2L. Apenas duas seqüências (CG3088 e CG8329) não são expressas no intestino médio, mas na cabeça de adultos.

Vale ressaltar que as duas seqüências se encontram próximas no cromossomo 3L, e que, portanto, a análise filogenética reflete a localização cromossômica e o padrão de expressão dos genes.

O ramo B é constituído por genes presentes no cromossomo 3L expressos no intestino médio, sendo que a maior parte deles é altamente expresso em larvas e em adultos. Além disso, o gene MdChy2, presente na região anterior do intestino médio de *M. domestica*, também está presente neste ramo, indicando que esses genes devem ser expressos no intestino e com função digestiva. O gene CG1989 é o único que se encontra no cromossomo X e é expresso em baixas porções no corpo inteiro em embriões e na pulpa, e portanto, não deve ter função de digestão de alimentos ingeridos. Este gene possui todos os resíduos catalíticos e, portanto, também deve estar envolvido na digestão de proteínas de outros processos fisiológicos.

O ramo C é composto por seqüências presentes no cromossomo X, e está dividido em 2 ramos menores: C1, que apesar de ser expresso no intestino médio, é composto apenas por seqüências que não apresentam todos resíduos catalíticos, e C2, contendo seqüências catalíticas: CG2071, expressa no intestino médio, e Cg4653, no intestino médio e posterior; já CG32523 é expressa na cabeça, e CG1304, no corpo inteiro.

O ramo D apresenta genes presentes no cromossomo X, indicando que essas seqüências podem codificar proteínas envolvidas no desenvolvimento. De fato, todos os genes são expressos nas espermatecas de fêmeas adultas, e a maior parte dos genes

codifica proteínas não-catalíticas. Além disso, (CG17012) um gene catalítico possui um domínio transmembrana. Portanto, esses genes codificam proteínas não envolvidas em digestão, mas em alguma outra função fisiológica.

O ramo E também é constituído por genes não catalíticos expressos em testículos de machos, principalmente em adultos, e que portanto devem estar envolvidos em alguma função relacionada ao desenvolvimento ou reprodução. As seqüências estão distribuídas nos cromossomos 2R, 3L e 2R.

O ramo F, tal como o ramo A, possui genes expressos no intestino médio de larvas e adultos, sendo que o ramo F' possui genes presentes no cromossomo 2L, além dos genes MdChy1 e MdChy3, presentes na região posterior do intestino médio de *M. domestica* e provavelmente envolvidos em digestão, indicando que os genes presentes neste ramo também estão envolvidos em digestão de proteínas, apesar da existência de um gene não catalítico. Há uma seqüência (CG32808) presente no cromossomo X e expressa em todo o corpo de embriões e da pulpa. Os outros genes estão localizados no cromossomo 3R e expressos no intestino médio somente durante a metamorfose, indicando que as enzimas codificadas por eles devem estar envolvidas na degradação de proteínas envolvida na remodelação tecidual desta fase. Vale ressaltar que o quimotripsinogênio bovino, comprovadamente digestivo, está presente neste ramo, corroborando a idéia de esse ramo conter genes envolvidos em digestão.

O ramo G é composto por seqüências catalíticas presentes no cromossomo 3R expressos em todo o corpo de pulpas, sendo que o gene CG12256 é expresso somente no cérebro e no gânglio toráxico-abdominal. Assim, esses genes devem estar envolvidos na degradação de compostos neurotransmissores ou proteínas do sistema nervoso.

O ramo H é composto por genes presentes no cromossomo 3R expressos no intestino médio principalmente de larvas. Dois genes (CG31266 e CG31267) não possuem os resíduos catalíticos. Neste ramo está presente um quimotripsinogênio de *A. aegypti*, indicando que esses genes também devem produzir proteínas digestivas.

O ramo I é composto de seqüências de *D. melanogaster* presentes em sua maioria no cromossomo 2R, em geral expressos na fase pré-pupa, havendo genes expressos no corpo inteiro (CG18420 e CG18636), no corpo gorduroso (CG3505, CG30289 e

CG33459), na glândula salivar (CG30287), na cabeça e no coração (CG33458) e no testículo (CG31220). Apesar disso, esses genes formam um ramo com alta consistência, contendo genes codificando proteínas 1) não catalíticas e ancoradas à membrana; 2) catalíticas e ancoradas à membrana e 3) catalíticas secretadas.

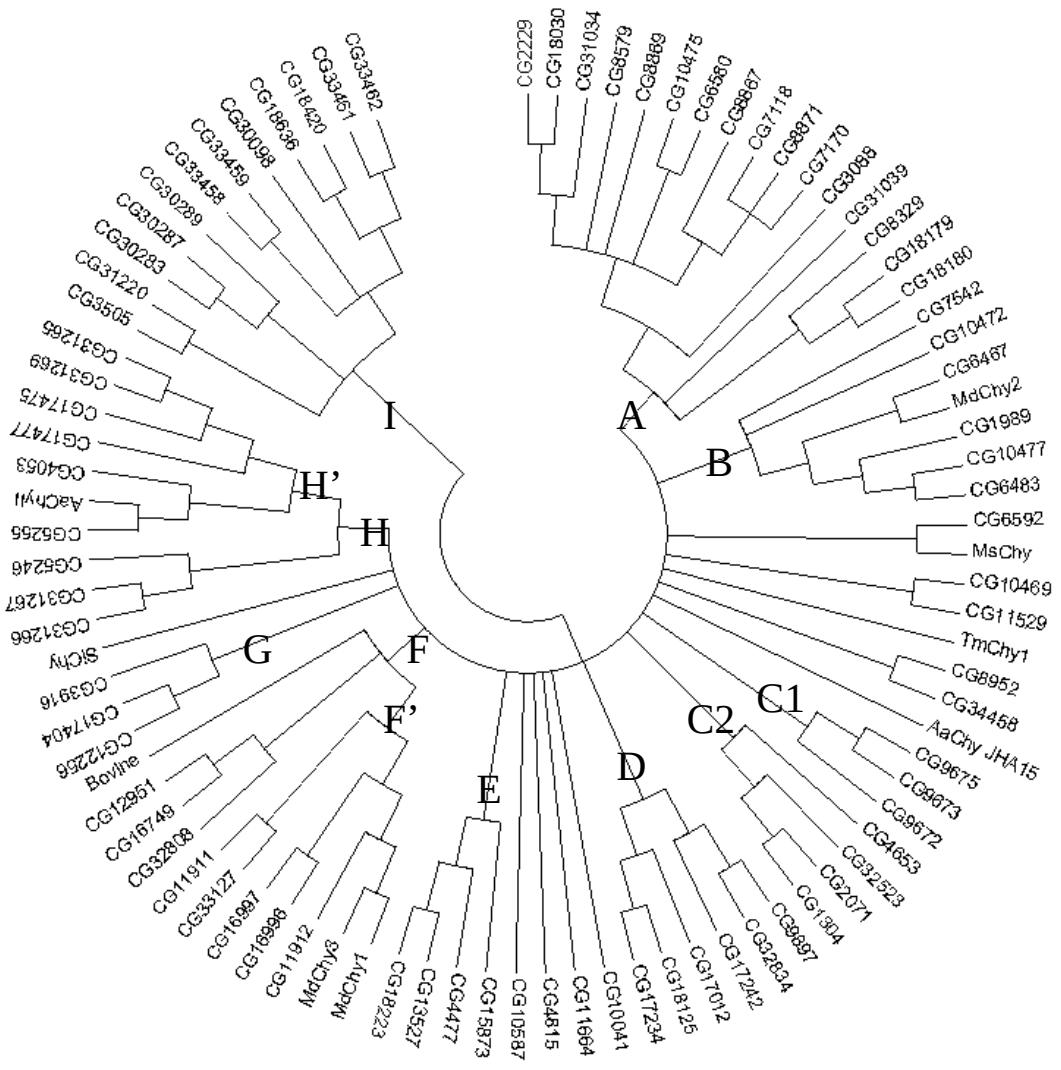


Figura 79: Reconstrução filogenética dos genes similares a quimotripsinas de D. melanogaster e M. domestica. MdChy1, MdChy2 e MdChy3: M. domestica chymotrypsinogen 1, 2 e 3; SiChy: S. invicta chymotrypsin (Structure); AaChy_JHA15: A. aegypti chymotrypsinogen JHA15; AaChyII: A. aegypti chymotrypsinogen II; TmChy1: T. molitor chymotrypsin 1; MsChy: M. Sexta Chymotrypsinogen.

5. DISCUSSÃO

5.1. Serina proteinases digestivas de insetos

A tripsina majoritária digestiva pura de *T. molitor* já havia tido sua seqüência N-terminal determinada pelo nosso grupo (IVGGSVINDQLVPQNXS). Entretanto, essa seqüência é diferente da obtida da tripsina purificada e seqüenciada por Tsybina *et al*., (2005) (IVGGSSISISSVPXQIXLQY), a qual coincidiu com uma seqüência nucleotídica obtida por análise de transcritos do intestino médio (Tsybina *et al*., 2005). Nenhuma seqüência nucleotídica prediz uma proteína contendo a seqüência N-terminal obtida por nosso grupo.

Assim, a identificação de uma outra tripsina majoritária seria de grande interesse, dado que as larvas cultivadas pelo nosso grupo crescem em uma dieta diferente das larvas cultivadas por Tsybina e colaboradores, e que mostraria que o tipo de dieta poderia influenciar na expressão gênica das enzimas digestivas em larvas. Portanto, tentamos novamente microssequenciar esta tripsina majoritária purificada a partir do intestino médio, não obtendo sucesso.

O gene correspondente à tripsina microsseqüenciada por Tsybina *et al*. (2005) foi clonado sem o peptídeo sinal a partir de uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA extraído do intestino médio de larvas de *T. molitor*, suportando a idéia de esta tripsina deve se referir à atividade majoritária digestiva.

A análise do pI teórico e de massa molecular tripsinogênio clonado estão em concordância com dados de purificação da tripsina digestiva majoritária presente no intestino médio de larvas de *T. molitor*, assim como a massa molecular da proteína recombinante induzida. Assim, a cromatografia em coluna aniônica realizada em pH 7,0 não liga essa tripsina à matriz, pois a enzima deveria estar positivamente carregada (de acordo com a determinação experimental do pI) ou praticamente sem carga (de acordo com o pI teórico), sendo eluído no “flow-through”; entretanto, quando a mesma enzima é aplicada na mesma coluna em pH 9,0 interage com a matriz, pois nesse pH ela se encontra negativamente carregada e interage com a matriz, sendo eluída durante

gradiente de NaCl, suportando que o gene clonado deve corresponder à tripsina majoritária.

Testes de expressão recombinante em BL-21 (DE-3) produz a totalidade da proteína recombinante expressa em corpos de inclusão, e em *E. coli* BL21 (DE-3) Artic cells uma parte da proteína se encontra na fração solúvel. Testes de ativação desse tripsinogênio foram realizados utilizando tanto enteroquinase quanto tripsina pancreática bovina comercial, e nenhuma das duas enzimas foi capaz de ativar o tripsinogênio recombinante de *T. molitor*, indicando que este provavelmente é ativado por alguma outra enzima ou fator presente no intestino médio, ou ainda que a proteína foi expressa em conformação inativa. Dado que esse tripsinogênio também não é ativado por pHs ácidos e que um fator termorresistente não protéico desconhecido está presente no intestino médio e envolvido na ativação de uma atividade de tripsina *B. mori* (Kaji *et al*., 2009), a ativação de tripsinogênios de insetos poderia estar condicionada à presença desse fator presente no intestino médio, e não à presença de enzimas ativadoras das serina proteases, como visto em mamíferos.

O quimotripsinogênio digestivo puro de *T. molitor* identificado por microsseqüenciamento N-terminal (Elpidina *et al*., 2006) foi clonado no vetor de expressão pAE, e testes de expressão recombinante em bactérias *E. coli* não induziram a expressão de proteínas recombinantes.

A purificação das serina proteinases de insetos da ordem Lepidoptera é usualmente realizada através da utilização de colunas de afinidade (Peterson *et al*., 1994; Peterson *et al*., 1995; Lopes *et al*, 2006; Valaitis, 1993). Entretanto, as atividades de serina proteinases de insetos da ordem Lepidoptera são difíceis de serem isoladas, pois geralmente há atividade contaminante de tripsina nas purificações de quimotripsinas, sendo o contrário verificado também (Peterson *et al*, 1994, Peterson *et al*., 1995).

Nesse trabalho conseguimos isolar a atividade de tripsina de *S. frugiperda* sem atividade residual de quimotripsina, apresentando uma banda única de proteína. Entretanto a purificação da quimotripsina de *S. frugiperda* através de apenas um passo cromatográfico por afinidade não pareceu ser eficiente. Apesar de esse passo cromatográfico permitir a separação das atividades tríptica e quimotríptica, as frações

ativas de quimotripsina submetidas a SDS-PAGE demonstraram algumas bandas de proteínas, indicando que devem existir algumas espécies moleculares de quimotripsina presentes no intestino médio de larvas de *S. frugiperda*, com variados pesos moleculares. Isso tornou inviável a tentativa de identificação do N-terminal a partir do material liofilizado (único método que gerou resultado positivo nos microsseqüenciamento), pois o material liofilizado conteria diversas espécies moleculares e não permitiria a identificação de uma seqüência confiável.

Resultados semelhantes em relação à purificação da quimotripsina de *S. frugiperda* foram obtidos por Lopes *et al*. (2009), que também demonstraram que, apesar de representarem diversas formas moleculares, a atividade quimotríptica se apresenta como se fosse apenas uma forma catalítica, visto que dados cinéticos obtidos com essa preparação de quimotripsinas purificadas apresentam cinéticas de primeira ordem para experimentos de modificação química.

Os estudos de Brioschi *et al*. (2007) demonstrando a existência de diversos genes de tripsinas e quimotripsinas expressos constitutivamente no intestino médio de larvas de *S. frugiperda* corroboram esses dados, reforçando a existência de diversas quimotripsinas presentes no intestino médio de larvas de *S. frugiperda*. Além disso, dados presentes no banco de dados SPODOBASE (http://bioweb.ensam.inra.fr/spodobase/) mostram a presença de diversas seqüências similares a quimotripsina obtidas a partir de bibliotecas de intestino médio.

Além disso, diversos insetos da ordem Lepidoptera são resistentes a inibidores de serina proteinases presentes na dieta, e tal fato também é devido à expressão de isoformas de enzimas não sensíveis aos inibidores de proteinase presentes na dieta (Mazumdar-Leighton e Broadway 2000b; Broadway 1995, 1996; Jongsma *et al* 1995; Jongsma & Bolter 1997; Gatehouse *et al*., 1999; Brito *et al.*, 2001).

Assim, devido à presença de mais de uma espécie molecular de quimotripsina presente no intestino médio das larvas de *S. frugiperda*, não é surpreendente a presença de diversas bandas de proteína nas frações ativas purificadas através de um passo de afinidade de quimotripsina.

Portanto, no caso de *S. frugiperda* fica evidente a existência de diversas quimotripsinas envolvidas em digestão, não havendo um gene majoritário expresso. A

atividade de quimotripsina presente no intestino médio corresponde a um conjunto de espécies moleculares de enzimas expressas e ativas similares, e, portanto, qualquer um desses genes seria interessante de ser estudado, pois todos devem estar envolvidos na digestão de proteínas.

As serina proteinases digestivas majoritárias de *D. saccharalis*, por outro lado, foram purificadas até a homogeneidade através de apenas um passo cromatográfico de afinidade. Tanto a tripsina quanto a quimotripsina purificadas foram submetidas a microsseqüenciamento N-terminal, não resultando em nenhuma seqüência e não permitindo estabelecer correlações entre as enzimas purificadas, previamente caracterizadas, e seus correspondentes genes.

5.2. Mecanismos de resistência de serina proteinases a defesas naturais de plantas

5.2.1. Diminuição da reatividade de quimotripsinas digestivas às cetonas

Lopes *et al.* (2009) mostraram que quimotripsinas de insetos são modificadas diferencialmente por TPCK, sendo que a quimotripsina de *D. saccharalis* e de *T. molitor* são rapidamente modificadas, enquanto que a quimotripsina de *S. frugiperda* é modificada com uma velocidade duas ordens de grandeza menor. Foi proposto que a quimotripsina de *S. frugiperda* poderia ser mais lentamente modificada devido a: 1) um impedimento estérico devido à substituição de uma Gly por um Trp no sitio catalítico que evitaria a entrada do modificador ao sítio ativo, impedindo a sua reação com a His57; 2) uma mudança de reatividade da His57 (Lopes *et al*., 2009).

Por outro lado sabe-se que o TPCK reage com a quimotripsina como um análogo de substrato, sendo que quimotripsinas inativas não reagem com ele. Foi visto que quimotripsinas modificadas por DFP (diisopropil fluorofosfato), que modifica a Ser195 da tríade catalítica, tira a capacidade da quimotripsina bovina de reagir com o TPCK (Glick, 1968); além disso, Kézdy *et al.* (1967) mostraram o comportamento do TPCK como um análogo de substrato para a quimotripsina bovina, sendo a reação de modificação química dependente de um grupo básico de p*K*a 6,8 e um grupo ácido de

p*K*a 8,9, e benzamida, um inibidor competitivo da quimotripsina bovina, bloqueou a ação do TPCK competitivamente com uma constante de inibição igual àquela observada quando diminuindo a hidrólise do substrato.

Assim, se o impedimento estérico causado pelo Trp ocorresse, deveria ser observada uma menor atividade da quimotripsina de *S. frugiperda* quando comparada com a quimotripsina de *D. saccharalis* ou de *T. molitor* frente substratos como o S-AAPF-MCA, que possui o resíduo de Phe em P1, sendo estruturalmente semelhante ao TPCK, e outros resíduos em P2-P4, portanto, maior e mais facilmente impedido fisicamente. Como não se observa uma diminuição na atividade enzimática devido a impedimento estérico, é possível que a explicação alternativa de uma reatividade menor da His57 dessa quimotripsina frente a cetonas, como o TPCK, seja correta, e que exista uma mudança no p*K*a da His57 por efeitos de interação com resíduos vizinhos da His57, o que poderia levar a uma diminuição da reatividade da quimotripsina de *S. frugiperda* ao TPCK.

A reação de modificação da His57 pelo TPCK deve ser depende de seu p*K*a e do pH do meio, o que indicaria mudanças em sua reatividade. Para tal, reações de modificação química de quimotripsinas de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda* foram realizadas em diferentes pHs de tal maneira a se verificar como a reação ocorria em diferentes pHs. Através desse experimento, observou-se que as quimotripsinas de *T. molitor* e de *D. saccharalis* possuem aproximadamente o mesmo pH ótimo de modificação química (8,5), com valores de p*K*as da His57 muito próximos, em torno de 7,2, condizentes com os valores de pKa da His57 de quimotripsinas de mamíferos (em torno de 6,8), além de valores de k_{obs} máximo da mesma ordem de grandeza. Já a quimotripsina de *S. frugiperda* possui um deslocamento no pH ótimo de modificação química por TPCK em mais de uma unidade (entre 9,5 e 10,0), com o pKa da His57 bastante deslocado (8,3), além de um k_{obs} de segunda ordem duas ordens de grandeza menor, mostrando que esta reage muito mais lentamente com o TPCK que as duas outras quimotripsinas citadas. Peterson *et al.* (1995) obteve resultados semelhantes com a quimotripsina de *M. sexta*, a qual não foi modificada em pH 8,0, sendo que a reação de modificação química foi observada apenas em pH 9,75. Ainda assim, houve uma redução de apenas 57% de atividade, dados condizentes com os nossos dados

obtidos. Outros insetos lepidópteros da família Noctuidae (*S. littoralis, H. armigera* e *A. ipsilon*) parecem apresentar o mesmo fenômeno, corroborando a idéia de haver mudanças na reatividade da His57 de quimotripsinas dos insetos apenas dessa família, pois insetos da mesma ordem, como *D. saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), ou de ordens próximas, como *S. invicta* (Hymenoptera) reagem rapidamente com o TPCK.

Portanto, o TPCK reage com a His57 catalítica apenas quando esta se apresenta em sua forma desprotonada, exatamente como um análogo de substrato. No caso da quimotripsina de *S. frugiperda*, quando a His57 está protonada (pH abaixo do pKa), a reação de modificação não acontece efetivamente, como também observado para a quimotripsina de *M. sexta* modificada em pH 8,0. Entretanto, quando aumentamos o pH do meio de reação e a His57 se torna desprotonada, o TPCK age como um análogo de substrato e acontece a reação de modificação, mesmo que em velocidades menores.

Além disso, o deslocamento do pKa da His57 (8,3) da quimotripsina de *S. frugiperda* em mais de uma unidade quando comparada com a quimotripsina de mamíferos (6,8) pode ser o motivo da menor reatividade da primeira frente ao TPCK.

Como resultado final, essa diferente velocidade de reação entre as quimotripsinas resistentes e sensíveis pode ser interpretada como um mecanismo de defesa de quimotripsinas de insetos polífagos à presença de cetonas de plantas.

Na verdade a presença de uma quimotripsina resistente a modificação por cetonas pode ter sido um caracter sinapomórfico de grande importância para o aparecimento da polifagia dentro da ordem Lepidoptera, sendo, portanto, um caráter basal dentro da ordem. Esse caráter pode ter sido perdido em alguns organismos, como *D. saccharalis*, que não apresenta hábito polífago e que, portanto, não sofre essa pressão evolutiva e não necessita dessa defesa.

5.2.2. Diminuição da interação com inibidores proteícos

As serina proteinases de insetos parecem ter sido selecionadas através da evolução tendendo a um aumento da sua hidrofobicidade superficial. Lopes *et al.* (2004) demonstrou que os subsítios de tripsinas de insetos tendem a ficar mais hidrofóbicos

em insetos mais derivados, como os da ordem Lepidoptera e Diptera, o que levaria a uma diminuição da interação entre serina proteinases digestivas e inibidores protéicos de serina proteinases, que apresentam resíduos polares no sítio de ligação à enzima (alça hidrofílica). Portanto, o aumento na hidrofobicidade dos subsítios de tripsinas de insetos lepidópteros parece ser uma resposta à presença de inibidores protéicos na dieta, que interagiria pior com enzimas contendo regiões hidrofóbicas do que com aquelas com regiões hidrofílicas. Assim, um aumento da hidrofobicidade na superfície de serina proteinases parece estar relacionado à proteção dessas enzimas contra a inibição dessas enzimas por IPs expressos por plantas.

Brito *et al.* (2001) demonstrou que as serina proteinases de *H. virescens* formam dímeros ou oligômeros, e que essas formas oligoméricas são mais freqüentes em animais alimentados com folhas de plantas (ou seja, na presença de inibidores protéicos de serina proteinases presentes na dieta) do que em animais alimentados em dieta artificial. Ainda, foi visto que a formação desses oligômeros aumenta os Kis dessa enzima relativo a inibidores protéicos de serina proteinases expressos em plantas, como SBTI, o que indicaria que os oligômeros de enzimas possuem uma menor região exposta ao inibidor, dificultando a sua ligação ao sítio catalítico. Por último, imagina-se que a interação entre as serina proteinases formando oligômeros ocorra por interações entre regiões hidrofóbicas da superfície das enzimas.

Dada a importância de verificar a hidrofobicidade superficial das serina proteinases de insetos, alguns experimentos foram realizados para verificar se há diferenças em parâmetros físico-químicos relativos a hidrofobicidade superficial das serina proteinases ou se esse fenômeno acima citado deve ser explicado de alguma outra maneira.

Primeiramente, foram realizados experimentos de precipitação de enzimas com sulfato de amônio, isso porque a presença do sal diminui a solvatação das proteínas, favorecendo a interação de regiões hidrofóbicas. Assim, ao adicionar sulfato de amônio, as interações entre regiões hidrofóbicas de proteínas são favorecidas, facilitando também a formação de oligômeros e complexos protéicos que tendem a se precipitar. Quanto menor a concentração de sulfato de amônio utilizada para precipitar a proteína, mais hidrofóbica esta é.

Esses experimentos de precipitação na presença de sulfato de amônio demonstraram que as tripsinas de insetos da ordem Coleoptera (*T. molitor* e *Z. subfasciatus*) são pouco hidrofóbicas, pois não precipitam na presença de altas concentrações (2 M) de sulfato de amônio. Por outro lado, precipitações de tripsinas de insetos da ordem Lepidoptera (*D. saccharalis* e *S. frugiperda*) demonstraram que essas enzimas precipitam muito mais facilmente, sendo que as tripsinas de *D. saccharalis* precipitam cerca de 47% na presença de apenas 0,17M de sulfato de amônio, e as tripsinas de *S. frugiperda*, cerca de 77% na presença de apenas 0,17M de sulfato de amônio, um indício de que tripsinas de insetos da ordem Lepidoptera realmente são mais hidrofóbicas.

Para confirmar essa hipótese, cromatografias de interação hidrofóbica foram realizadas na ausência de sulfato de amônio. Assim, a interação entre serina proteinases e a coluna indicaria a presença de regiões hidrofóbicas expostas na superfície, sendo a enzima mais hidrofóbica eluída com maior concentração de SDS, pois quanto mais detergente necessário à eluição da enzima, mais forte são as suas interações hidrofóbicas na superfície.

A tripsina de *T. molitor* interage fracamente com a coluna de interação hidrofóbica Res Phe, sendo eluídas com menos de 0,1% de SDS. Já as tripsinas de *D. saccharalis* e de *S. frugiperda* necessitam de altas concentrações de SDS para serem eluídas da coluna (cerca de 0,7%), corroborando os dados de precipitação por sulfato de amônio e confirmando que as tripsinas de insetos da ordem Lepidoptera são mais hidrofóbicas que de insetos de outros grupos.

Cromatografias hidrofóbicas em coluna Res Phe das quimotripsinas de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda* também foram realizadas, mostrando que nos 3 casos as quimotripsinas interagem fortemente com a matriz, sendo que as quimotripsinas de *T. molitor* surpreendentemente interagem muito bem com a coluna, sendo eluídas com cerca e 0,9% de SDS, ao contrário das tripsinas de *T. molitor*, que interagem fracamente com a coluna e são eluídas com baixas concentrações de SDS (menos de 0,1%). Esse fato foi interpretado como sendo uma ligação das quimotripsinas de *T. molitor* à matriz por afinidade, dado que se ligam bem a substratos

contendo resíduos aromáticos, como o grupo fenil, em P1, o qual está presente como grupo ligante na matriz da Res Phe.

As quimotripsinas digestivas de insetos preferem Tyr a Phe em P1; entretanto, a especificidade é trocada em substratos menores, apresentando atividade sobre Suc-Phe-pNA, mas não sobre B-Y-pNa (Sato *et al*., 2008).

Por outro lado, as quimotripsinas tanto de *D. saccharalis* quanto de *S. frugiperda* interagem exatamente da mesma maneira que as respectivas tripsinas, sendo eluídas nas mesmas frações (0,7% de SDS), indicando que essas são tão hidrofóbicas quanto as respectivas tripsinas.

Nem sempre é possível separar a atividade de tripsina e quimotripsina de insetos lepidópteros (Peterson *et al.*, 1995), mesmo utilizando cromatografias de afinidade. Esse fato de atividades de tripsina e quimotripsina de insetos lepidópteros serem eluídas conjuntamente talvez se deva à interação entre essas enzimas através de suas regiões hidrofóbicas e formação de oligômeros entre essas enzimas.

Assim, fica evidente também que as quimotripsinas de insetos lepidópteros são bastante hidrofóbicas. Entretanto, pelos perfis cromatográficos das quimotripsinas tanto de *D. saccharalis* quanto de *S.frugiperda* fica a dúvida se suas quimotripsinas e tripsinas isoladamente estão interagindo com a matriz, ou se são oligômeros formados entre tripsinas e quimotripsinas que estão interagindo, sendo assim, as duas acabam sendo eluídas exatamente nas mesmas frações.

É possível imaginar que tanto *S. frugiperda* quanto *D. saccharalis* possuem tripsinas menos hidrofóbicas em quantidades minoritárias, pois nos experimentos de precipitação com sulfato de amônio de ambas permanece uma atividade residual não precipitada (cerca de 20%). Além disso, é possível ver durante as cromatografias de interação hidrofóbica que ambas possuem uma pequena fração não ligada à coluna, sugerindo que essas podem ser um tipo de serina proteinases menos hidrofóbicas que a maioria presente no intestino médio de *S frugiperda*.

Dentro da ordem Lepidoptera, parece haver grandes diferenças de hidrofobicidades entre tripsinas de diferentes insetos, visto que dados de precipitação mostraram que as tripsinas de *S. frugiperda* parecem ser mais hidrofóbicas que as de *D. saccharalis*. Esse fato ajuda a explicar as diferenças nos hábitos de vida das duas

espécies: enquanto *D. saccharalis* é um inseto que se alimenta apenas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), *S. frugiperda* é um inseto polífago que pode se alimentar de diversas culturas e plantas encontradas na natureza. Essa diferença de hábitos pode ter sido resultado evolutivo da diferença entre enzimas desses insetos. Assim, insetos que possuíam enzimas mais hidrofóbicas e que formam oligômeros em maior quantidade ou mais estáveis poderiam se alimentar de vários tipos de plantas, pois seriam mais resistentes a diferentes tipos de inibidores protéicos expressos por plantas do que insetos que possuíam enzimas menos hidrofóbicas, sendo que esses que possuem tripsinas menos hidrofóbicas poderiam se alimentar de apenas alguns tipos de plantas, ou seja, na presença de uma variedade muito menor de inibidores de proteases expressos por plantas, portanto, evoluindo com hábitos mais especialistas.

Dados de interação de quimotripsinas desses organismos com a matriz hidrofóbica Res Phe sugerem que a quimotripsina luminal de *T. molitor* é mais hidrofóbica que as duas outras citadas, pois ela é eluída com maiores concentrações de SDS. Entretanto, esse dado pode refletir apenas a ligação da enzima pela matriz contendo um grupo fenil e que ligaria no bolsão do subsítio P1 ou P1'. Assim, essa aparente interação seria apenas um artifício da afinidade da enzima por resíduos de Phe, e não um reflexo da hidrofobicidade superficial da enzima de *T. molitor*.

Modelagens automatizadas por homologia de seqüências de serina proteinases de *T. molitor*, *D. saccharalis* e *S. frugiperda* (tripsinas e quimotripsinas) seguidas de análise de acesso de solvente à superfície protéica indica a existência de uma maior proporção de resíduos hidrofóbicos expostos na superfície das tripsinas dos insetos lepidópteros, e que as serina proteinases de insetos lepidópteros possuem clusters de pelo menos 2 resíduos hidrofóbicos expostos na superfície, podendo esses clusters chegar a ter 5 aminoácidos hidrofóbicos, ao contrário das serina proteinases digestivas majoritárias *T. molitor*, que não possuem clusters de aminoácidos hidrofóbicos expostos na superfície. Os clusters hidrofóbicos devem favorecer interações hidrofóbicas intermoleculares, explicando os dados obtidos por Brito *et al.* (2001) e nesse trabalho, além de explicar um possível mecanismo de oligomerização das serina proteinases digestivas de insetos.

Assim, a presença de serina proteinases mais resistentes tanto à presença de inibidores protéicos expressos em plantas quanto à presença de cetonas reativas podem ser uma condição *sine qua non* para o surgimento da polifagia entre insetos herbívoros. Como discutido, os mecanismos para que essas resistências ocorram começam a ficar mais esclarecidos.

Dunse *et al*. (2010) demonstraram que em *Helicoverpa ssp* a resistência das quimotripsinas a um inibidor tipo II de batata se deve a uma modificação na alça 35 das enzimas, a qual interage com o inibidor nas enzimas sensíveis, mas não interage nas enzimas resistentes. Assim, fica descrito um segundo mecanismo que envolve uma menor interação entre enzima e inibidor.

5.3. Estudos fisiológicos e moleculares da tripsina de *P. americana*

Estudos de distribuição de enzimas em *P. americana* foram previamente realizados por Dias (2004), demonstrando que atividade de tripsina se encontra majoritariamente (cerca de 60%) no papo, havendo também uma menor atividade de tripsina nos cecos e no ventrículo. Entretanto, como o papo é uma região esclerotizada, ela não deve ser a região que expressa e secreta a tripsina digestiva em *P. americana*. Assim, a enzima presente nessa região deveria originar-se ou no intestino médio ou nas glândulas salivares.

Hivrale *et al.* (2005) demonstraram que há pelo menos 11 atividades de serina proteinases presentes no intestino de *P. americana*, sendo que 7 dessas atividades são similares a tripsina, enquanto Lopes *et al*. (2003) purificou e caracterizou a atividade tríptica majoritária presente no intestino de *P. americana*.

Essa atividade tríptica majoritária presente no intestino anterior (papo) e na região anterior do intestino médio (cecos e ventrículo anterior) de *P. americana* foi purificada até a homogeneidade, e seu microsseqüenciamento N-terminal resultou em uma seqüência de aminoácidos que possibilitou correlacionar a atividade tríptica majoritária a um gene previamente conhecido como um alérgeno de barata (MPA3 allergen), cuja seqüência nucleotídica prediz uma proteína homóloga a um tripsinogênio, denominado PaTry, corroborando os dados obtidos.

O mesmo PaTry foi identificado por microsseqüenciamento do extrato total de *P. americana* e demonstrada como um alérgeno (Per a 10) (Sudha *et al*., 2008). Entretanto, como a proteína foi purificada de um extrato total, nenhum papel fisiológico pôde ser relacionado a essa proteína. Assim, fica demonstrado também que esse alérgeno é proveniente do intestino de *P. americana*, e corresponde à atividade majoritária de tripsina presente em seu intestino.

A análise da expressão do PaTry demonstrou que ele é expresso apenas nos cecos e no ventrículo anterior, não sendo expresso nem em glândulas salivares nem na região posterior do ventrículo, como esperado pela distribuição de atividade enzimática ao longo do tubo digestivo. Assim, o PaTry é produzido pelos cecos e pelo ventrículo anterior, secretado ao lúmem e ativado por algum fator. Após ser ativado, a tripsina deve ser levada ao papo, local de maior concentração de atividade enzimática.

Um Western Blot do material de tubo digestivo de *P. americana* utilizando o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* mostrou que esse anticorpo reconhece apenas uma proteína. Assim, experimentos de imunocitolocalização foram realizados utilizando esse anticorpo. Esses experimentos mostraram que a tripsina de *P. americana* é reconhecida em vesículas de secreção e no complexo de Golgi dos cecos e do ventrículo anterior, como previsto pelos dados de expressão obtidos através de RT-PCR, além de ser visualizada nas microvilosidades e nas proximidade da membrana peritrófica dessas regiões.

Pela distribuição de enzimas verifica-se que há maior quantidade de atividade de tripsina no papo do que no resto do ventrículo. Caso o tubo se portasse apenas como um vaso conectado, seria esperado que a enzima produzida nos cecos e no ventrículo anterior seguisse o fluxo antero-posterior junto com o bolo alimentar, o que parece não ocorrer. Ao contrário, a tripsina digestiva é produzida nos cecos e ventrículo anterior, como demonstrado por RT-PCR e nas imunolocalizações, mas se dirige ao papo, provavelmente através de retro-peristaltismo.

Os dados de distribuição de outras enzimas solúveis (dados não mostrados) (Dias, 2004) mostram uma manutenção da proporcionalidade entre enzimas do papo e o intestino, como acontece com maltase, que também está presente em maior quantidade no papo e com mesma proporção da tripsina (cerca de 60% da atividade).

Portanto, em *P. americana* as enzimas produzidas na região anterior do intestino médio devem ser lançadas para o papo por retro-peristaltismo, ou seja, todo o conteúdo de enzimas secretadas presente nessa região, incluindo a tripsina digestiva, é lançada para o papo.

Assim, em insetos pertencentes a ordens basais parece haver um refluxo de enzimas, incluindo tripsinas, do intestino médio para o intestino posterior, como visto em insetos da ordem Dictyoptera (*P. americana*) e Orthoptera (*Abracris flavolineata*, *Grilodes sigillatus*) (Biagio *et al*., 2009), dado que a tripsina não é produzida em glândulas salivares. Ainda, demonstramos que nessas ordens a tripsina é secretada por exocitose, similar ao visto em *M. domestica* (inclusive com marcação nas membranas da vesícula de secreção), mas diferente do que é visto com tripsina em insetos de outras ordens, como verificado em *T. molitor* (Coleoptera), com secreção apócrina, e *S. frugiperda* (Lepidoptera), com secreção microapócrina.

A clonagem do PaTry foi bem sucedida nos vetores pAE e pFastBac; entretanto, tentativas de clonagens no vetor de expressão em *Picchia pastoris* pPIC9 não deram certo. Assim, as primeiras tentativas de expressão do PaTry foram realizadas em diferentes linhagens de *E. coli*, em diferentes temperaturas; entretanto, se as expressões produziram proteínas solúveis, estas não foram passíveis de serem purificadas, o que tornou a continuação do projeto tecnicamente inviável. Este foi um resultado esperado, já que há apenas um relato de expressão de tripsina de inseto (*A. gambiae*) bem sucedida em *E. coli* M15 (QiaGen), não havendo outros relatos de expressão de serina proteinases de insetos em bactérias (Müller *et al*., 1993).

Serina proteinases humanas (tripsina e trombina) são expressas em *P. pastoris* em quantidade suficiente para estudos de mutação sítio-dirigida e estrutural (Bobofchak *et al*, 2005). Entretanto, pelo fato de não conseguirmos clonar o PaTry no plasmídeo pPIC9, essas tentativas não foram realizadas.

O sistema de expressão mais promissor utilizado ultimamente é aquele que utiliza cultura de células de insetos (*S. frugiperda*) Sf9 ou Sf21 infectadas por baculovírus para a expressão de proteínas recombinantes. Alguns relatos de serina proteinases expressas ativamente com sucesso nesses sistemas foram descritos nos últimos anos; além disso, outras enzimas de insetos não expressas em sistemas

heterólogos foram expressas nesse sistema, como por exemplo a amilase de *Anopheles merus* (Chimoy Effio *et al*, 2003).

Assim, partimos para essa outra abordagem, tentando a expressão do recombinante do PaTry utilizando células de inseto Sf9. Para tal, a pré-pró-enzima (ou seja, o gene da enzima contendo o peptídeo sinal e o pró-peptídeo) foi clonada no plasmídeo pFastBac 1 para a produção de um bacmídeo recombinante contendo o gene da tripsina de interesse. O bacmídeo, após ser produzido, foi utilizado para infectar células Sf9, gerando baculovírus recombinantes. As células infectadas tiveram sua viabilidade celular diminuída em 70% quando comparadas a células controle, apresentando restos de lise celular presente no meio de cultura, demonstrando que a produção viral ocorreu com sucesso. Após 5 ciclos de propagação viral, foi verificado na fração solúvel a expressão PaTry recombinante por Western blot, utilizando o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica*, não sendo identificada nenhuma proteína recombinante. SDS-PAGE dessa fração solúvel não indicou a existência de bandas de peso molecular esperado (dado não mostrado). Isso pode ter ocorrido por três diferentes motivos: 1) a tripsina recombinante não foi expressa; 2) a enzima está sendo produzida e é degradada, seja por outras proteases, seja por auto-ativação, ou seja, a enzima produzida é ativada e ocorre a autólise, não sendo detectada a sua presença.

Testes de ativação do PaTry recombinante expresso em bactérias foram realizados utilizando a enzima enteroquinase com as frações solúveis, tanto dos expressos em bactérias como em células de inseto. Assim, possíveis traços de enzima recombinante solúvel poderiam ser detectados pelos ensaios enzimáticos utilizando substratos fluorescentes. Entretanto, os testes de ativação não resultaram em observação de atividade contra substrato específico para tripsina B-R-MCA, indicando que provavelmente essas enzimas estariam sendo produzidas apenas na forma inativa, o que as torna inadequadas para testes de cristalização, sendo também inviável considerar a realização de mutações sitio-dirigidas.

5.4. Propriedades da quimotripsina intestinal majoritária de *M. domestica*

O estudo da quimotripsina de *M. domestica* teve início no intuito de entender a sua função fisiológica na digestão e tentar verificar se há diferenças entre esta enzima e outras previamente estudadas, dado que ela se encontra em uma região do intestino médio (ventrículo posterior) de larvas de *M. domestica* de pH ligeiramente ácido, que poderia levar a mudanças no sítio catalítico modulando o pKa dos resíduos catalíticos. Uma substituição importante vista por alinhamentos parece ser a troca de uma Gly-43 (numeração da quimotripsina bovina) de quimotripsinas por uma Ala presente na quimotripsina de *M. domestica*, a qual está a 2,71 A de distância da Ser195 catalítica. Essa Ala, por ser mais hidrofóbica que a Gly presente em outras quimotripsinas, deve criar um ambiente mais hidrofóbico, podendo diminuir o pKa da Ser195. Assim, uma diminuição no pKa da Ser195 catalítica levaria à diminuição do pH ótimo da quimotripsina de *M. domestica*. A mesma mudança é vista em uma quimotripsina de *D. melanogaster* (CG11912), similar à quimotripsina de *M. domestica* e filogeneticamente próxima. Como os dois organismos também são filogeneticamente próximos e fisiologicamente muito parecidos, esta troca nas quimotripsinas sugere que a Ala pode modular o pKa da serina catalítica nas quimotripsinas.

Uma distribuição de enzimas mostrou que a atividade de quimotripsina de *M. domestica* se localiza majoritariamente em tecidos da região distal do ventrículo posterior de larvas, sendo que cerca de 30% da atividade enzimática total está na fração solúvel dos tecidos, e outros 25% da atividade enzimática total estão na fração de membranas precipitada. Entretanto, quando essa fração de membranas é congelada e descongelada, cerca de 60% da atividade presente nesta região é liberada para a fração solúvel, indicando que uma parte da atividade enzimática não é firmemente aderida à membrana, fato que pode estar ocorrendo pela adesão da enzima ao glicocálice (Ferreira e Terra, 1989). Entretanto, quando a fração de membranas é congelada e descongelada pela segunda vez, nenhuma atividade quimotríptica foi liberada (dados não mostrados), indicando a existência de um segundo tipo de quimotripsina, inserida na membrana.

Essa adesão da enzima aos tecidos deve ser um mecanismo que evita a perda da enzima por excreção: as enzimas aderidas não entram na corrente antero-posterior luminal, evitando a sua perda nas fezes. A taxa de excreção da atividade de

quimotripsina solúvel indica que 28% desta atividade é excretada. Isso provavelmente se deve à localização posterior da atividade enzimática, o que impede que haja tempo hábil para que a totalidade da atividade enzimática seja recuperada por recirculação endo-ectoperitrófica.

Um SDS-PAGE nativo da fração solúvel revelou a presença de uma banda única de atividade sobre o substrato sintético S-AAPF-MCA. Esta atividade quimotríptica solúvel majoritária do ventrículo posterior foi purificada pela utilização de uma cromatografia de afinidade de quimotripsina pelo inibidor PBA utilizando a resina PBA-agarose, mostrando uma banda única visualisada em SDS-PAGE com a mesma massa molecular da banda de atividade.

A quimotripsina purificada do ventrículo posterior apresentou um pH ótimo de 7,4, mais ácido que quimotripsinas de outros insetos (Sato *et al.*, 2008), evidenciando que esta quimotripsina deve ter mudanças na vizinhança de seu sítio catalítico que modulam esse pH ótimo abaixo do normal. Essas mudanças podem ter evoluído devido à presença do ventrículo médio ácido que acidifica o bolo alimentar, que é alcalinizado no ventrículo posterior, porém atingindo apenas pH 6,8. Assim, as enzimas presentes neste compartimento devem possuir um pH ótimo em torno de neutro para serem ativas sobre o alimento.

A atividade da quimotripsina pura é reduzida em 90% após 15 min de modificação com TPCK 0,1 mM em pH 8,5, mostrando que as quimotripsinas de insetos do clado Cyclorrapha devem ser sensíveis a cetonas. Isso demonstra que, até o presente momento, apenas as quimotripsinas de alguns insetos da ordem Lepidoptera, como as de *S. frugiperda* (Lopes et al., 2009), *S. litorallis* (Lee and Anstee, 1995), *H. zea* e *Agrothis ipsilon* (Mazumdar-Leighton and Broadway, 2000a) são modificadas lentamente por TPCK.

A quimotripsina purificada hidrolisa eficientemente substratos longos, como o S-AAPF-MCA, mas não substratos curtos, como o S-F-MCA, que está em concordância com dados da quimotripsina de *S. littoralis* (Lee & Anstee, 1995), apesar de outras quimotripsinas de insetos hidrolizarem substratos curtos (Sato *et al.*, 2008). Isso demostra que a presença de aminoácidos no substrato ocupando os subsítios S1, S2 e S3 (Schechter & Berger, 1963) da enzima são fundamentais para aumentar a eficiência

catalítica da enzima (Sato *et al.*, 2008, Whitworth *et al.*, 1998), claramente preferindo resíduos de Phe em P1 a Leu, com uma eficiência catalítica (kcat/Km) duas vezes maior para o substrato S-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA frente ao S-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA, visto que os dois substratos possuem os mesmos aminoácidos, exceto o resíduo a ser clivado em P1. Entretanto, tal fato ainda se mostra surpreendente, pois como descrito por Sato *et al.* (2008), as quimotripsinas de *P. americana* e *D. saccharalis* não clivam ligações quando há um resíduo de Leu em P1. Além disso, a enzima também parece preferir resíduos de Phe em P1 a Tyr, pois a enzima cliva o substrato S-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA quase duas vezes mais eficientemente (kcat/Km) que o substrato S-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA. Entretanto, essa diferença pode também ser reflexo de interferência dos subsítios S2, S3 e S4 sobre o subsítio S1, dado que os aminoácidos presentes nas posições P2, P3 e P4 diferem entre os dois substratos.

Assim, esses indícios evidenciam a preferência da quimotripsina digestiva de *M. domestica* por resíduos aromáticos, como Phe e Tyr, em relação a resíduos alifáticos, como Leu.

O seqüenciamento ao acaso dos transcritos do epitélio de intestino médio de *M. domestica* a partir de uma biblioteca de cDNA não normalizada revelou a presença de apenas uma seqüência contígua de quimotripsinogênio (precursor de quimotripsina) em larvas de *M. domestica* formada pelo seqüenciamento de 71 ESTs dos 826 totais (9.4% dos transcritos), indicando que este gene altamente expresso deve corresponder à atividade de quimotripsina majoritária presente no ventrículo de *M. domestica*.

Esse quimotripsinogênio, denominado MdChy1, foi totalmente seqüenciado desde a Met inicial até o códon de parada, mostrando a presença da tríade catalítica (Asp57-His102-Ser195) e do resíduo de especificidade de quimotripsinas (Gly189), e a presença de um peptídeo sinal na região N-terminal, indicando que a proteína codificada por essa seqüência deve ser secretada pelas células epiteliais, corroborando os dados obtidos de existência de uma atividade de quimotripsina solúvel. Esse quimotripsinogênio não possui regiões transmembranas nem âncoras de GPI (análise da seqüência com os programas big-PI Predictor e GPI-SOM), levando a acreditar na existência de uma segunda enzima ancorada à membrana. Lemos e Terra (1991) descreveram a presença de duas formas de tripsina em larvas de *M. domestica*,

sendo uma solúvel e uma segunda ligada à membrana. Assim, a existência de duas formas moleculares de quimotripsinas, sendo uma solúvel e uma segunda ligada à membrana, parece condizente; entretanto, nenhuma seqüência que poderia representar a atividade aderida à membrana foi descrita até o momento. A massa molecular predita da proteína MdChy1 é de 28.639,2 Da, muito próxima à massa molecular encontrada para a quimotripsina digestiva purificada do intestino médio de *M. domestica*, de 29 kDa, indicando que o MdChy1 pode corresponder à enzima purificada e estudada. O pI teórico da proteína predita pelo MdChy1 é 5,83.

A análise da expressão do MdChy1 mostrou que este é expresso na região proximal do ventrículo posterior de M. domestica, ou seja, o MdChy1 é transcrito na região proximal do ventrículo posterior. Entretanto, a atividade enzimática se concentra na região distal do ventrículo posterior, mostrando que esse gene deve ser expresso na forma de zimogênio na região proximal do ventrículo posterior e secretado ao lúmen, onde deve ocorrer o processamento por clivagem do pró-peptídeo por uma tripsina presente nessa região (visto que há um sítio de clivagem de tripsina entre o pró-peptídeo e a enzima madura do MdChy1). Assim, após ser expressa e secretada ao lúmen, a proteína é clivada e se torna ativa, sendo sua atividade encontrada na região distal do ventrículo posterior. Ainda, o fato de ocorrer uma co-localização entre o local de expressão do MdChy1 e o local aonde há atividade de quimotripsina sugere que o gene previamente clonado se refere à atividade de quimotripsina digestiva.

Testes de expressão recombinante revelaram que apenas a linhagem de *E. coli* BL21 STAR (DE3) induziu a expressão desta enzima em até 2 horas de indução por IPTG 1 mM a 37°C. Com 4 horas de indução nestas condições, observa-se a diminuição de intensidade da banda induzida e o aparecimento de uma banda de menor peso molecular, indicando que o MdChy1 recombinante deve estar sendo degradado por proteases endógenas da bactéria.

Análises de solubilidade de proteínas expressas nestas condições mostram que o MdChy1 recombinante é expresso insolúvel, ou seja, em corpúsculos de inclusão. Western blot dessas amostras mostrou que a proteína foi expressa com a cauda de seis histidinas na região N-terminal, a qual foi reconhecida pelo anticorpo anti-His tag. A purificação desta enzima recombinante através de uma cromatografia de afinidade

desta cauda de histidina por níquel confirmou a presença desta cauda de histidina e se mostrou eficiente para a purificação desta proteína recombinante.

A proteína recombinante foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em coelhos. Western blots utilizando o anticorpo policlonal contra o MdChy1 expresso de maneira recombinante se mostrou específico para a quimotripsina digestiva, reconhecendo apenas uma banda de proteína no ventrículo posterior, que coincide com a banda de proteína purificada (visualizada por SDS-PAGE) e com a banda de atividade de quimotripsina (visualizada após o ensaio de uma separação eletroforética do ventrículo posterior em SDS-PAGE sob condições semi-desnaturantes), corroborando a idéia de que esse gene corresponde à quimotripsina digestiva majoritária.

Entretanto, esse mesmo anticorpo reconhece uma banda de proteína no ventrículo anterior, local em que não há atividade significante de quimotripsina. Esse dado poderia ser explicado pela reação cruzada do anticorpo na presença de outras serina proteinases expressas nessa região do intestino médio de *M. domestica*. Como visto, o gene MdChy2 é expresso no ventrículo anterior, e por apresentar os resíduos catalíticos, deve ser o responsável pela atividade quimotríptica nesta região.

Akan & Carlson (1985) demonstraram por hibridizações *in situ* que genes chamados de *Jonah* são especificamente expressos no ventrículo anterior e na região proximal do ventrículo posterior de larvas de *D. melanogaster*, exatamente como visto por western blot utilizando o anticorpo anti-MdChy1. Os autores citam esse fato como sendo uma “reação cruzada”, dado que a distribuição da atividade de quimotripsina em *D. melanogaster* é similar à descrita para *M. domestica*. Foi verificado posteriormente que esse gene *Jonah* é homólogo à quimotripsina, corroborando os nossos dados de western blot e suportando a produção de um anticorpo para a quimotripsina digestiva de *M. domestica*. Portanto, o anticorpo anti-MdChy1 deve reconhecer o produto do gene MdChy2 no ventrículo anterior e o produto do gene MdChy1 no ventrículo posterior. Além disso, Jordão *et al*. (1996) também comentam um reconhecimento de uma banda no intestino anterior de *M. domestica* utilizando o anticorpo anti-tripsina, corroborando a nossa idéia de reconhecimento cruzado entre os anticorpos de serina

proteinases específicos para enzimas do ventrículo posterior e enzimas presentes no ventrículo anterior.

Assim, o anticorpo anti-MdChy1 foi utilizado para a realização de imunocitolocalizações de quimotripsinogênio em tecidos de *M. domestica*.

Dados de distribuição da atividade de quimotripsina mostra que uma grande parcela da atividade se encontra na fração solúvel, sendo em menor quantidade encontrada no conteúdo e uma maior parte aderida ao glicocálice (fração solúvel celular). Assim, através de experimentos de imunocitolocalizações dessa enzima, seria esperado observar marcações dessa enzima na região proximal (em vesículas de secreção), mas não em vesículas de secreção da região distal do ventrículo posterior. Além disso, deveríamos ver a presença da enzima em grande quantidade no lúmen tanto na região proximal quanto na região distal, sendo que uma grande parte dessa enzima deveria estar ancorada ao glicocálice, como mostrado nos dados de distribuição de atividade.

De fato, as imunocitolocalizações reconheceram proteínas nas vesículas e no lúmen nas microvilosidades e no glicocálice do ventrículo anterior e da região proximal do ventrículo posterior, não havendo reconhecimento no ventrículo médio. Na região distal do ventrículo posterior não há reconhecimento em vesículas de secreção, apenas nas microvilosidades e na região do glicocálice, até próximo à membrana peritrófica, como previsto anteriormente. Esse dado corrobora nossa hipótese da localização da expressão da enzima, como previsto anteriormente pelos dados de distribuição de atividade enzimática e de RT-PCR.

Para verificar se há expressão de outras serina proteinases nessa região do ventrículo anterior de *M. domestica*, iniciadores específicos foram desenhados a partir de seqüências previamente obtidas em nosso laboratório pelo seqüenciamento ao acaso de uma biblioteca de cDNA de intestino inteiro de larvas de *M. domestica*. A análise da expressão de 7 genes de serina proteinases, além do MdChy1, foram analisados através de RT-PCR, demonstrando que parece existir dois grupos de serina proteinases expressas no intestino médio de *M. domestica*: um grupo de serina proteinases (sendo 3 tripsinas e 1 quimotripsina) expresso na região anterior do intestino médio, e um segundo grupo (2 tripsinas e 1 quimotripsina, além do MdChy1)

expresso na região posterior. Assim, realmente deve estar acontecendo um reconhecimento cruzado do anticorpo com uma das serina proteinases expressas no ventrículo anterior de *M. domestica*, que não corresponderia ao gene de interesse, tal como deve ter ocorrido em hibridizações *in situ* (Akan & Carlson, 1985) e com o anticorpo anti-tripsina de *M. domestica* (Jordão *et al*., 1996).

Assim, parecem existir dois conjuntos de serina proteinases expressos no intestino de larvas de *M. domestica*: um conjunto expresso no ventrículo anterior, representando apenas uma atividade residual tanto de tripsina quanto de quimotripsina, e outro expresso no ventrículo posterior, onde se localiza as atividades majoritárias de tripsina e quimotripsina presentes no intestino de larvas. Esses dois conjuntos poderiam ter funções diferentes, sendo que o conjunto expresso anteriormente não deve ter função digestiva, mas a proteção do inseto contra invasões e infecções, dado que há muitas serina proteinases envolvidas no sistema imune, como visto em *B. mori* (Dohke, 1973; Ashida & Dohke, 1980) e em *D. melanogaster* (Chosa *et al.,* 1997), além de *M. domestica* se alimentar de bactérias. Ainda, foi demonstrada em *M. sexta* a indução da expressão de serina proteinases pela presença de bactérias (Jiang *et al.,* 1998). Já o conjunto de genes expressos posteriormente deve ter função digestiva, clivando proteínas liberadas após a lise bacteriana na região ácida mediana do intestino médio.

Sabe-se que as quimotripsinas formam uma vasta família multigênica em insetos. Assim, o reconhecimento cruzado entre o anticorpo policlonal anti-MdChy1 e diversas proteínas similares a quimotripsinas seria possível. No genoma de *D. melanogaster* foram identificados mais de 1 centena de genes contendo um domínio de serina proteinases, sendo que a história evolutiva de 87 desses genes contendo menos de 440 aminoácidos e não apresentando Asp189 (tripsinas) foi reconstruída filogeneticamente, resultando em uma árvore contendo 9 grandes ramos agrupados por bootstraps acima de 70%, sendo que os genes agrupados parecem ter funções fisiológicas semelhantes, como descrito a seguir. Além disso, os ramos possuem genes que estão fisicamente próximos, geralmente localizados nos mesmos cromossomos.

Três grandes ramos, A, B e F, possuem genes de proteínas catalíticas e que são expressos especificamente no intestino médio de larvas e adultos, sendo portanto os genes envolvidos na digestão de proteínas do bolo alimentar; além disso, já foi

verificado que o MdChy1 estudado agrupa-se no ramo F, enquanto que o MdChy2 se encontra no ramo B, genes de *M. domestica* expressos no intestino médio, o que suporta a idéia de as seqüências desses ramos serem envolvidas em digestão no intestino médio. Ainda, o ramo H, apesar de possuir seqüências não catalíticas, são expressas especificamente no intestino médio, podendo estar envolvidos em alguma outra função durante a digestão, como por exemplo a ligação de inibidores de serina proteinases presentes na dieta. Ainda, como o intestino médio é uma grande área de interface com o meio ambiente, deve haver mecanismos de ativação do sistema imune, sendo que alguns deles passam pela ativação da cascata da profenoloxidase, que necessitam de SPHs (homólogos de serina proteinases não-catalíticas) para a sua ativação (Ross *et al*., 2003).

Surpreendentemente, dois grandes ramos de genes similares a quimotripsinas se encontram no cromossomo X: o ramo D, constituído por genes expressos somente em espermatecas de fêmeas, e o ramo E, contendo genes expressos apenas em testículos de machos. Tal fato reinforça a importância das serina proteinases em outras funções fisiológicas que não a digestão. De fato, Kelleher & Pennington (2009) descreveram a atividade de serina proteinases (tripsina e elastase) presentes no tecido reprodutivo de *Drosophila arizonae*, inclusive relacionando alguns genes de *D. melanogaster* aqui descritos, como os genes CG17012 e Cg17234, que são descritos como genes não conhecidos (nem tripsina ou elastase). Além disso, citam que o trato reprodutivo feminino de *D. arizonae* é significantemente enriquecido por serina proteinases recentemente duplicadas, o que está de acordo com os dados obtidos. Entretanto, o trato reprodutivo de *D. melanogaster* não possui nenhuma atividade de tripsina ou elastase, o que está de acordo com a presença de genes não-catalíticos expressos nas espermatecas e nos testículos. Assim, esses genes devem desenvolver alguma função fisiológica que não necessite da clivagem de proteína, podendo estar envolvido na sinalização ou ligação a substratos sinalizadores, similar aos SPHs.

Há ramos contendo seqüências sem funções claras, como os ramos C1 e C2, constituídos por genes que não têm um padrão específico de expressão, indicando que estes podem desempenhar funções “constitutivas”, como por exemplo genes relacionados ao sistema imune e às cascatas de ativação da profenoloxidase (Ross *et*

al., 2003). Por último, os ramos G e I possuem genes expressos em diversas fases do ciclo de vida, em diferentes tecidos e que, portanto, podem estar relacionados com alguma outra função, como a fixação de músculos somáticos em embriões de *D. melanogaster* (Murugasu-Oei *et al*., 1995), ou a remodelação dos tecidos que acontece ao longo do desenvolvimento e que requerem a degradação de proteínas dos tecidos antigos para a formação dos novos tecidos.

Assim, essa reconstrução filogenética fornece informações úteis sobre possíveis informações sobre localização cromossômica, local e fase da vida de expressão dos genes e correlação com a sua função fisiológica. O MdChy1 estudado provavelmente é o gene relacionado à expressão da principal atividade de quimotripsina digestiva encontrada na região posterior do intestino médio, relacionados com a digestão de proteínas provenientes da alimentação (bactérias) e disponibilização de nutrientes, demonstrado pelos dados de expressão (RT-PCR e a quantidade de ESTs sequenciados a partir da biblioteca), a sua imunocitolocalização em tecidos e o seu agrupamento juntamente de genes de *D. melanogaster* expressos no intestino médio de larvas e adultos. O gene MdChy2 deve codificar a atividade de quimotripsina minoritária presente na região anterior do intestino médio (demonstrado por RT-PCR e pela biblioteca de células oxínticas presentes na porção anterior do intestino médio, local onde a seqüência foi obtida ao acaso), e que deve sofrer reconhecimento cruzado pelo anticorpo anti-rMdChy1.

6. *CONCLUSÕES*

A partir deste trabalho conclui-se que:

- As serina proteinases digestivas de insetos não são eficientemente expressas de maneira recombinante em bactérias. Mesmo quando expressas solúveis, elas não são eficientemente purificadas e mostraram-se inativas.
- As serina proteinases digestivas de insetos mais derivados apresentam maior hidrofobicidade superficial, que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa dos organismos à presença de inibidores protéicos na dieta com a oligomerização das enzimas, o que dificultaria a ligação dos inibidores ao sítio de ligação das enzimas;
- Insetos polífagos da ordem Lepidoptera possuem quimotripsinas que reagem lentamente com cetonas, como o TPCK, quando comparados com quimotripsinas de insetos de outras ordens ou de mamíferos, fato relacionado à presença de cetonas como defesa de plantas à herbivoria;
- A tripsina de *P. americana* foi identificada e seu gene, denominado PaTry, inteiramentente clonado, sendo também demonstrado que ele é expresso nos cecos e na região anterior do ventrículo, e que a sua secreção se dá por exocitose nos epitélios dos cecos e da região anterior do ventrículo;
- Tentativas de expressão recombinante do gene PaTry em bactérias e em células de inseto Sf9 não resultaram em proteínas ativas;
- As enzimas digestivas de *P. americana* presentes no papo são produzidas ou nas glândulas salivares ou nos cecos e região anterior do ventrículo. Quando produzidas nos cecos e no ventrículo anterior, as enzimas parecem ser levadas ao papo por retro-peristaltismo, dado que a proporção de diferentes enzimas se mantém constante e que, portanto, as diversas regiões do intestino se portam como vasos comunicantes;

- A quimotripsina digestiva de *M. domestica* foi purificada até a homogeneidade, e seus parâmetros cinéticos foram determinados, demonstrando que esta possui especificidade similar a quimotripsinas de insetos e de mamíferos;
- O gene MdChy1, inteiramente clonado, deve corresponder à atividade quimotríptica majoritária presente no ventrículo posterior e caracterizada cineticamente, pois suas características moleculares, o local de sua expressão o número de ESTs obtidos a partir do seqüenciamento ao acaso e a imunocitolocalização de tecidos utilizando o anticorpo anti-MdChy1 corroboram essa idéia;
- Pela primeira vez foi realizada uma imunocitolozalização de quimotripsinas em tecidos epiteliais de insetos, demonstrando que em *M. domestica* elas são secretadas em pequenas vesículas por exocitose;
- A reconstrução filogenética das seqüências similares a quimotripsinas de *D. melanogaster* e *M. domestica* mostra que elas se agrupam de acordo com o seu padrão de expressão ao longo do ciclo de vida e posição física nos cromossomos, mostrando que esta família multigênica apresenta genes similares provavelmente com a mesma função fisiológica.

7. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Akam M.E., Carlson J.R., 1985. The detection of Jonah gene transcripts in Drosophila by in situ hybridization. EMBO J. 4 (1) 155-61.

Applebaum, S.W., 1985. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.L. (Ed). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 4. Pergamont Press, New York, pp. 279-311.

Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 22,195-201.

Ashida, M., Dohke, K, 1980. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzime of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 10, 33-47.

Barrett A.J., Rawlings N.D. and Woessner J.F. (2004) Handbook of Proteolytic Enzymes. Elsevier, San Diego.

Baillie, J.E.M., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N., 2004. IUCN Red list of threatened species. A global species assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

Beckage, N.A., 2003. Immunology. In: Encyclopedia of Insects, 555-559. Resh V. H. & Cardé R. T. Academic Press, 2003.

Biagio F.P., Tamaki F.K., Terra W.R., Ribeiro A.F., 2009. Digestive morphophysiology of Gryllodes sigillatus (Orthoptera: Gryllidae). J Insect Physiol. 55 (12), 1125-33.

Blahovec, J., Kostecka,.Z., Kociova, A., 2006. Peptidolytic enzymes in different larval stadium of housefly *Musca domestica*. Veterinarni Medicina 51 (4), 139-144.

Blum H., Beier H., Gross H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis 8, 93-99.

Bobofchak KM, Pineda AO, Mathews FS, Di Cera E., 2005. Energetic and structural consequences of perturbing Gly-193 in the oxyanion hole of serine proteases. J. Biol. Chem. 280 (27), 25644-25650.

Bonning B.C., 2003. Biotechnology and Insects. In: Encyclopedia of Insects, 120-123. Resh V. H. & Cardé R. T. Academic Press, 2003.

Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., Schwede, T., 2009. Protein structure homology modelling using SWISS-MODEL Workspace. Nature Protocols 4, 1.

Botos I, Meyer E, Nguyen M, Swanson SM, Koomen JM, Russell DH, Meyer EF., 2000. The structure of an insect chymotrypsin. J. Mol. Biol. 298(5), 895-901.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254.

Brioschi, D., Nadalini, L.D., Bengtson, M.H., Sogayar, M.C., Moura, D.S., Silva-Filho, M.C., 2007. General usp regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 1283-1290.

Brito, L.O., Lopes, A.R., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitor may be mediated by the syntesis of new proteinases. Comp. Biochem. Physiol. 128B, 365-375.

Broadway R. M, 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Insect Physiol.* 41, 107-116.

Broadway R. M, 1996. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteinases. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 32, 39-53.

Chimoy Effio P, Folgueras-Flatschart AV, Montor WR, Pernasetti FM, Pueyo MT, Sogayar MC., 2003. Expression of functional Anopheles merus alpha-amylase in the baculovirus/Spodoptera frugiperda system. Insect Mol. Biol. 12(5), 415-425.

Chosa, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K., Ohnishi, E., 1997. Activation of prophnoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem. Mol. Biol. 27 (1), 61-68.

Cristofoletti P. T., Ribeiro A. F., Terra W. R., 2001. Apocrine secretion of amylase and endocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. J. Insect Physiol. 47, 143-155.

Dias, A. B. Jr., 2004. Evolução do sistema digestivo em insetos. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade de São Paulo. *Orientador:* Walter Ribeiro Terra.

Dohke, K. 1973. Studies on prophenoloxidase-activating enzyme from cuticule of the silkworm *Bombyx mori*: purification and characterization of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 157 (1), 210-221.

Dunse, K.M., Kaas, Q., Guarino, R.F., Barton, P.A., Craik, D.J., Anderson, M.A., 2010. Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. Proc. Natl Acad. Sci. 107 (34), 15016-21.

Elpidina, E.N., Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B.., 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. Biochimie 87(8), 771-779.

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 (6), 809-817.

Ferreira, C., Terra, W.R., 1989. Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). Insect Biochem. 19 (4), 383-391.

Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P.J., Christeller, J.T., 1997. Characterization of major midgut proteinases cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. Insect Biochem. Molec. Biol. 27, 929-944.

Gatehouse A., Norton E., Davidson G., Babbe S., Newell C., Gatehouse J., 1999. Digestive proteolitic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects of plant protease inhibitors in vivo and in vitro. *J. Insect Physiol.* 45, 545-558.

Gillott, C., 1995. Entomology 2nd ed. Plenum Press, New York, 798pp.

Glick D. M., 1968. Ligant-induced pK changes in chymotrypsin. Biochemistry 7, 3391.

Groombridge, B., Jenkins, M.D., 2002. World *Atlas of biodiversity*. Prepared by the UNEP World Conservation Monitoring Center. University of California Press, Berkeley, USA.

Hagens, K.S., Dadd, R.H., Reese, J., 1984. The food of insects. In: Huffaker, C.B., Rabb, R.L. Entomological entomology. New York: Wiley, 80-107.

Herrero, S., Combes, E., Oers, M.M. V., Vlak, J.M., Maagd, R.A., Beekwilder, J., 2005. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. Insect Biochem. Molec. Biol. 35, 1073-1082.

Hivrale VK, Chougule NP, Chhabda PJ, Giri AP, Kachole MS., 2005. Unraveling biochemical properties of cockroach (*Periplaneta americana*) proteinases with a gel X-ray film contact print method. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 141(3), 261-266.

Ji C, Wang Y, Ross J, Jiang H., 2003. Expression and in vitro activation of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor (proPAP-2) from baculovirus-infected insect cells. Protein Expr. Purif. 29(2), 235-243.

Jiang, H., Wang Y., Kanost M.R., 1998. Pro-phenoloxidase activating proteinase from an insect, *Manduc Sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(21), 12.220-12.225.

Jiang, Q., Hall, M., Noriega, F.G., Wells, M., 1996. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. Insect Biochem. Mol. Biol, 27 (4), 283-289.

Jongsma M. A., Bakker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity intensitive to inhibition. Proc. Nat. Acad. Sci. 92, 8041-8045.

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

Jordão, B.P., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Lehane, M.J., Ferreira, C., 1996. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. Insect Biochem. Mol. Biol. 26 (4), 337-346.

Kaji, K., Tomino, S., Asano, T., 2009. A serine protease in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*: protein sequencing, identification of cDNA, demonstration of its synthesis as zymogen form and activation during midgut remodeling. Insect Biochem Mol Biol. 39 (3), 207-17.

Kelleher, E.S., Pennington, J.E., 2009. Protease gene duplication and proteolytic activity in *Drosophila* female reproductive tract. Mol. Biol. Evol. 26 (9), 2125-2134.

Kézdy, F.J., Thomson, A., Bender, M.L, 1967. Studies on the reaction of chymotrypsin and L-1-chloro-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanone. J Am Chem Soc. 89 (4), 1004-9.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature 227, 680-685.

Lee, M.J., Anstee, J.H., 1995. Endoproteases from the midgut of *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 49-61.

Lemos F.J., Terra W.R., 1991. Digestion of bacteria and the role of midgut lysozyme in some insect larvae. Comp Biochem Physiol B 100 (2), 265-8

Li J, Choo YM, Lee KS, Je YH, Woo SD, Kim I, Sohn HD, Jin BR., 2005. A serine protease gene from the firefly, *Pyrocoelia rufa*: gene structure, expression, and enzyme activity. Biotechnol. Lett. 27(15), 1051-1057.

Li, H.M., Margam, V., Muir, W.M., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R., 2007. Changes in *Drosophila melanogaster* midgut proteins in response to dietary Bowman-Birk inhibitor. Insect Mol. Biol. 16(5), 539-49.

Lopes A.R., Terra W.R., 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 407-415.

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

Lopes, A.R., Juliano, M.A., Marana, S.R., Juliano, L., Terra, W.R., 2006. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 130-140.

Lopes, A.R., Sato, P.M., Terra, W.R., 2009. Insect chymotrypsins: Chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolution coevolutional adaptation of insects and plants. Achives Insect. Biochem. Physiol. 70 (3), 188-203.

Lu Z, Jiang H., 2008. Expression of *Manduca sexta* serine proteinase homolog precursors in insect cells and their proteolytic activation. Insect Biochem. Mol. Biol. 38(1), 89-98.

Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C., Terra, W.R., 2002. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. Biochem Biophys Res Commun. 290(1), 494-497.

Mazumdar-Leighton S., Broadway R.M., 2000a. Transcriptional induction of diverse midgut trypsin in larval *Agrotis ipisilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. Insect Biochem. Molec. Biol. 31, 645-657.

Mazumdar-Leighton S., Broadway R.M., 2000b. Identification of six chymotrypsins cDNAs from larval midguts from *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipisilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. Insect Biochem. Molec. Biol. 31, 633-644.

Morton R.E., Evans T.A., 1992. Modifications of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. Anal. Biochem. 204, 332-334.

Müller, H.M., Crampton, J.M., della Torre, A., Sinden, R., Crisanti, A., 1993. Members of a trypsyn gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. EMBO J. 12 (7), 2891-2900.

Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X., Chia, W., 1995. Masquerade, a novel secreted serine proteinase-like molecule is required fo somatic muscle attachment in Drosophila embryo. Gene Dev. 9, 139–154.

Oliveira M.G.A., De Simone S.G., Xavier L.P., Guedes R.N.C., 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Comp. Biochem. Physiol, Part B 140, 369-380.

Padilha, M.H., Pimentel, A.C., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2009. Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. Insect Biochem. Mol. Biol. 39 (11), 782-791.

Padilha, M.H., 2009. Fisiologia molecular em *Musca domestica* (Diptera). Tese de Doutorado (Bioquímica). Universidade de São Paulo. *Orientador:* Walter R. Terra.

Parra, J.R.P., 1986. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves, S.B. (Ed.), Controle Microbiano de Insetos. Editora Manole, São Paulo, pp. 348-373.

Parra, J.P.R., 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.

Petersen, B., Petersen, T.N., Andersen, P., Nielsen M., Lundegaard' C., 2009. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. BMC Structural Biology 2009, 9:51 doi:10.1186/1472-6807-9-51.

Peterson, A.M., Barillas-Mury, C.V., Wells, M.A., 1994. Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 24(5), 463-471.

Peterson, A.M., Fernando, G.J., Wells, M.A., 1995. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 25(7), 765-774.

Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Effects of the soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Ent. Exp.Apll. 99, 79-85.

Ramos, C.R., Abreu, P.A., Nascimento, A.L., Ho, P.L., 2004. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. Braz. J. Med. Biol. Res. 37(8), 1103-1109.

Riddiford, L.M., 2003. Molting. In: Encyclopedia of Insects, 733-738. Resh V. H. & Cardé R. T. Academic Press, 2003.

Ryan, C., 1978. Proteinase Inhibitor in plant leaves: a biochemical mode for pest induced natural plant protection. TIBS, 148-151.

Ross, J., Jiang, H., Kanost, M.R., Wang, Y., 2003. Serine proteases and their homologs in the Drosophila melanogaster genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. Gene 304, 117-131.

Roth, L.M., 1981. Introduction. In: Well, W.J., Adiyodi, K.G. The american cochroach. London: Chapman and Hall, 1-13.

Sakal, E., Applebaum, S.W., Byrk, Y., 1988. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. Int. J. Pept. Protein Res. 32, 590-598

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Sato, P.M., Lopes, A.R., Juliano, J., Juliano, M.A., Terra, W.R., 2008. Subsite Substrate specificity of insect chymotrypsin. Insect Biochem. Mol. Biol. 38 (6), 628-633

Schechter, I., Berger, A., 1967. On the size of active site in proteases I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Commum. 27, 157-162.

Schoellmann, G., Shaw, E., 1963. Direct evidence for the presence ofHistidine in the active center of chymotrypsin. Biochemistry 2 (2), 252-255.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurements of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

Silva, C.P., Terra, W.R, Lima, R. M. 2001. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the Bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 18-28.

Sudha V.T., Arora N., Gaur S.N., Pasha S., Singh B.P., 2008. Identification of a serine protease as a major allergen (Per a 10) of *Periplaneta americana*. Allergy 63 (6), 768-76.

Terra W. R., Ferreira C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109B, 1-62.

Terra W. R., 2003. Digestion. In: Encyclopedia of Insects, 310-313. Resh V. H., Cardé R. T. Academic Press, 2003.

Terra, W.R., Ferreira, C., 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrov, K., Gill, S. (Org.). Comprehensive Molecular Insect Science. Oxford, 2005, v. 4, p. 171-224.

Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B., Elpidina, E.N., 2005. Digestive Proteinases of Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Larvae: Purification and Characterization of a Trypsin-Like Proteinase. Biochemistry (Moscow) 70 (3) 300-305.

Valaitis, A.P, 1993. Gypsy Moth Midgut Proteinases: Purification and Characterization of Luminal Trypsin, Elastase and the Brush Border Membrane Leucine Aminopeptidase. Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 139-149.

Voet, D., Voet, J.G.J., 2004. Biochemistry, 3. ed. John Wiley, New York.

Whitworth, S.T., Blum, M.S., Travis, J., 1998. Proteolytic enzymes from larvae of the fire ant, *Solenopsis invicta*: isolation and characterization of four serine endopeptidases. J. Biol. Chem. 273, 14430-14434.

Wigglessworth, V.B., 1972. The principles of insect physiology. 7. ed. London: Chapman and Hall, 476-552.

Wolfson, J.L., Murdock, L.L., 1987. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomol. Exp. Appl. 44, 235-240.

Zeng, F., Zhu, Y.C., Cohen, A.J., 2002. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). Insect Biochem Mol Biol. 32, 455-464.

Sites consultados

- http://bioweb.ensam.inra.fr/spodobase/
- http://flybase.org/
- http://ca.expasy.org/

8. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Fábio Kendi Tamaki
Local e data de nascimento: Jundiaí - SP, 26/06/1983
E-mail: fktamaki@gmail.com

Formação

Bacharel em Ciências Biológicas – IB-USP, 2002-2005.

Licenciatura em Ciências Biológicas – IB-USP, 2004-2007.

DOUTORADO EM CIÊNCIAS (BIOUQUÍMICA)
Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP
Instituto de Química, Departamento de Bioquímica
Orientador: Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra
Período: 2006-2011

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 2006-2010

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE COMGRESSOS

Tamaki, F.K., Padilha, M.H.P., Terra, W.R., 2009. Distribution, Purification, Partial Characterization, Sequencing, Cloning and Expression of *Musca domestica* Chymotrypsin. XXXVIII Reunião anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP

PUBLICAÇÕES

Biagio F.P., Tamaki F.K., Terra W.R., Ribeiro A.F., 2009. Digestive morphophysiology of Gryllodes sigillatus (Orthoptera: Gryllidae). J Insect Physiol. 55 (12), 1125-33.

Monitorias

Participação do Estágio supervisionado em docência do Programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE) junto à disciplina de Bioquímica Experimental (QBQ-316), ministrado aos alunos da Farmácia (Integral) no 2° semestre de 2007.

Participação do Estágio supervisionado em docência do Programa de aperfeiçoamento de ensino (PAE) junto à disciplina de Biologia Molecular (QBQ-317), ministrado aos alunos da Farmácia (Noturno) no 1° semestre de 2008.