UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ALEXANDRA FREALDO DUMONT

**β -glicosidases intestinais da larva de *Diatraea*
saccharalis: clonagem e sequenciamento dos cDNAs,
expressão e algumas propriedades**

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 31/03/2008

ALEXANDRA FREALDO DUMONT

**β -glicosidases intestinais da larva de *Diatraea*
saccharalis: clonagem e sequenciamento dos cDNAs,
expressão e algumas propriedades**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Dr^a Clélia Ferreira

São Paulo
2008

Alexandra Frealdo Dumont

β -glicosidases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*: clonagem e sequenciamento dos cDNAs, expressão e algumas propriedades

.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Dra. Clélia Ferreira pela orientação, dedicação e amizade durante esses anos em que estive no laboratório;

Ao Dr. Walter R. Terra pelo auxílio durante todo o projeto de mestrado e iniciação, e por sua amizade ao longo desses anos;

Ao Prof. José César Rosa, Coordenador do Centro de Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pelas análises realizadas;

À Fernando Ariel Genta (Mig) pela orientação durante a iniciação científica e por todas as discussões durante o mestrado. Com certeza é uma das pessoas que mais contribuiu para o meu crescimento científico;

À Adriana, Alexandre, Plínio, Tamara, Sandro, Guliver, Ivan, Nathi, Érica, Thaís, Dani, Paloma, Ana, Marcelo, André, Augusto, Tiago (Alegria), Pedro, Fábio e a todos os amigos que passaram pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos e me ajudaram durante esses anos;

À Ciça, Lucas e Pererê, pelos inúmeros lanchinhos, cafés e almoços durante esses anos. Com certeza levarei a amizade de vocês para sempre comigo;

Ao Lucas Blanes, Sinistro, Paulinho, Pati, Mineiro e Lili por estarem sempre presentes;

À Maíra, Elisa, Ana Cintra, Colo, Fel, Déa, Mari e Catú, pela amizade incondicional;

Aos meus pais que sem dúvida nenhuma são os maiores responsáveis por eu estar onde estou. Sem a força e o sacrifício deles, não estaria aqui. Amo vocês;

Aos meus irmãos, André e Rodrigo; meus avós, Therezinha, Luís e Cleides, e familiares por todo o amor que me é dado por eles que me faz seguir em frente;

À todos os meus amigos que não coloquei aqui mas que são tão importantes quantos todos os mencionados acima.

Ao CNPq pela bolsa concedida e auxílio dado ao laboratório e à Fapesp pelo auxílio dado ao laboratório.

RESUMO

Dumont, A.F. **β -glicosidases intestinais da larva de *Diatraea saccharalis*: clonagem e sequenciamento dos cDNAs, expressão e alguma propriedades.** 2008. 97p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Utilizando uma biblioteca de expressão feita a partir do epitélio do intestino médio da larva de *Diatraea saccharalis*, nós clonamos e sequenciamos 3 cDNAs completos (Ds β glyA, Ds β glyB e Ds β glyC), além de uma seqüência parcial que teoricamente codificam β -glicosidases.

As seqüências dos peptídeos obtidos após digestão por tripsina das β -glicosidases β gly1 e β gly2 de *D. saccharalis* mostraram que Ds β glyA codifica a β gly1, caracterizada anteriormente. Ds β glyB e Ds β glyC provavelmente codificam duas β -glicosidases solúveis com massas moleculares teóricas de, respectivamente, 57,5 KDa e 56,2 KDa.

Levando em consideração as semelhanças entre β gly1 e β gly3 e entre Ds β glyA e Ds β glyC, é razoável supor que Ds β glyC codifique a β gly3.

Os peptídeos produzidos após a hidrólise de β gly2 por tripsina não são codificados por nenhum dos cDNAs que nós sequenciamos. Bgly2 provavelmente é codificada pelo cDNA cuja seqüência ainda está incompleta.

A inativação da β gly2 por carbodiimida usando o tio-glicosídeo sinigrina e o O-glicosídeo p-nitrofenil β -D-galactopiranosídeo resulta na mesma constante de inativação, indicando que o mesmo sítio ativo é responsável pela hidrólise dos dois substratos. A mesma conclusão é obtida calculando o Km de β gly2 para os dois substratos e o Ki da inibição que cada um deles causa na hidrólise do outro. Os resultados indicam que uma só enzima é responsável pela hidrólise de sinigrina e p-nitrofenil β -D-glicosídeo com atividade semelhante. Essa propriedade nunca foi descrita para outra tio- ou O-glicosidase.

Palavras-chave: enzimas digestivas, insetos, β -glicosidase, Lepidoptera

ABSTRACT

Dumont, A.F. ***Diatraea saccharalis* larvae midgut β -glycosidases: cDNAs cloning and sequencing, expression and some properties.** 2008. 97p Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

We used an expression library made from *Diatraea saccharalis* midgut epithelium and succeeded in cloning and sequencing three complete cDNAs (Ds β GlyA; Ds β GlyB; Ds β GlyC) plus a partial sequence that hypothetically code for β -glycosidases.

The sequence of peptides obtained from the purified *D. saccharalis* β -glycosidases (β Gly1 and β Gly2) after trypsin digestion shows that Ds β GlyA codes for β Gly1, an enzyme that had already been characterized. Ds β GlyB and Ds β GlyC probably code for two soluble β -glycosidases with, respectively, 503 and 493 amino acid residues and theoretical molecular weights of 57.5 kDa and 56.2 kDa.

Taking into account the similarities of β Gly1 and β Gly3 and of Ds β GlyA and Ds β GlyC it is reasonable to suppose that Ds β GlyC codes for β Gly3.

The peptides produced after β Gly2 hydrolysis by trypsin could not be coded by any of the complete sequenced cDNAs, although they might be coded by the still partial sequence we have.

We determined the chemical inactivation of β Gly2 using the thio-glucoside sinigrin and the O-glycoside p-nitrophenyl- β -D-galactoside, and found the same inactivation constant, indicating that the same active site is responsible for the hydrolysis of the two substrates. The same conclusion is reached determining β Gly2 K_m for both substrates and the K_i for inhibition of the hydrolysis of one substrate using the other as inhibitor. These results indicated that only one enzyme is responsible for the hydrolysis of sinigrin and p-nitrophenyl- β -D-galactoside with similar activities, which is not a property reported before for any O- or S- β -glycosidase.

Keywords: midgut enzymes, insects, β -glycosidase, Lepidoptera

ABREVIATURAS

β gly1 - β - glicosidase 1 de *Diatraea saccharalis*

β gly2 - β - glicosidase 2 de *Diatraea saccharalis*

β gly3 - β - glicosidase 3 de *Diatraea saccharalis*

Ds β glyA, Ds β glyB, Ds β glyC – cDNAs clonados a partir do material obtido do intestino médio de *Diatraea saccharalis*

EDC – 1-etil-3-(dimetilamino-propil)carbodiimida

EDTA – etileno diamino tetracetato de sódio

FPLC - Fast Protein Liquid Chromatography

IPTG - Isopropil β -D-1-thiogalactopiranosídeo

K_i – constante de dissociação do complexo enzima-inibidor

K_m – constante de Michaelis-Menten

k_{obs} – constante de pseudo-primeira ordem de inativação da enzima por modificação química

LB – meio de cultura de Luria-Bertani

mU β Glu – metilumbeliferil β -D-glicosídeo

p/v – peso/volume

PCR – reação em cadeia com DNA polimerase

PN β Gal – p-nitrofenil β -D-galactosídeo

PN β Glu – p-nitrofenil β -D-glicosídeo

TAE – Tris Acetato EDTA

Tris – tri-(hidroximetil)-aminometano

V_{máx} – velocidade máxima

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1.Considerações Iniciais	10
1.2. Importância do estudo de insetos	10
1.3. O tubo digestório dos insetos	12
1.4. Tio-glicosidases de insetos	14
1.5. As β -glicosidases de insetos	17
1.6. β -glicosidases e a interação inseto-planta	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Animais	27
3.3. Dissecção das larvas	27
3.3. Homogeneização do epitélio ventricular de <i>Diatraea saccharalis</i>	27
3.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna	
HiTrap Desalting (Pharmacia)	28
3.5. Cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão	
(AKTA Prime – GE Healthcare)	28
3.6. Cromatografia de troca iônica em sistema FPLC	28
3.7. Cromatografia de interação hidrofóbica em sistema FPLC (Pharmacia)	29
3.8. Ensaio enzimáticos	30
3.9. Determinação de K_M e $V_{m\acute{a}x}$ da para sinigrina	30
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	
(SDS-PAGE).	31

3.11. Digestão trípica in situ de proteínas separadas por SDS-PAGE	31
3.13. Espectrometria de Massa	32
3.13. Modificação Química	33
3.14. Competição entre substratos e determinação de K_i	33
3.15. Criação de larvas em dietas contendo mandelonitrila	34
3.16. Reação em cadeia com DNA polimerase (PCR)	34
3.17. Ligação dos fragmentos de DNA em plasmídeo	38
3.18. Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	38
3.19. PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias	39
3.20. Purificação dos plasmídeos a partir das bactérias transformadas	39
3.21. Reação de sequenciamento de DNA	40
3.23. Comparação com banco de dados, alinhamento e cladograma usando as seqüências obtidas	40
3.23. Seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA	41
4. RESULTADOS	45
4.1. Clonagem e sequenciamento das β -glicosidases digestivas de <i>D. saccharalis</i>	45
4.2. Separação das β -glicosidases intestinais de <i>Diatraea saccharalis</i>	62
4.3. Sequenciamento de peptídeos oriundos das β -glicosidases encontradas de <i>D. saccharalis</i>	65
4.4. Hidrólise de O- e S-glicosídeos pela β -glicosidase 2	69
4.5. Criação de <i>D. saccharalis</i> em dietas contendo mandelonitrila	74
4.6. Sequenciamento aleatório de clones da biblioteca de cDNA	77

5. DISCUSSÃO	85
5.1. Sequenciamento das β -glicosidases intestinais de <i>D.saccharalis</i>	85
5.2. Especificidade da β -glicosidase 2 de <i>D.saccharalis</i>	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
SÚMULA CURRICULAR	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

Na língua portuguesa não há, como na língua inglesa, duas palavras distintas que permitam diferenciar enzimas que clivam ligações glicosídicas (glycosidases, em inglês) das que clivam ligações glicosídicas onde está presente uma glicose (glucosidases). Nós iremos nos referir a primeira classe como glicosidases e a segunda como glucosidases.

Também chamaremos de glicosidases as enzimas que clivam O-glicosídeos e de S- glicosidases as que clivam tio-glicosídeos.

1.2. Importância do estudo de insetos

Os insetos são, sem dúvida, o grupo predominante na Terra. Eles representam 75% das espécies animais e 57% das espécies vivas, se considerarmos também as plantas e os protozoários (ver Panda and Kush, 1995).

Esse grande número de insetos é decorrente de sua capacidade de adaptação e diversidade. Os insetos estão presentes em quase todos os ambientes existentes na Terra. Os habitats ocupados por esses organismos são muito variados e eles são encontrados nas florestas tropicais, no ártico, em poços de petróleo, nas geleiras, em minas profundas, cavernas, nas narinas do leão marinho e nos intestinos de cavalos (Resh and Carde, 2003).

Os insetos causam um grande impacto sobre os seres humanos, pois além de transmitirem doenças ao homem, causam grandes danos a lavoura, tanto consumindo os vegetais como transmitindo patógenos para as plantas. Cerca de 1% dos insetos

podem ser considerados de alguma forma danosos ao homem. Mesmo assim, causam prejuízos da ordem de um bilhão de dólares em todo o mundo por ano (Parra *et al.*, 2002).

A grande variação existente entre os hábitos e os habitats dos insetos se deve em parte à capacidade desses organismos de se alimentar de diferentes tipos de compostos. Desse modo, estudos relacionados ao tubo digestivo são fundamentais, se quisermos entender as causas de todo esse sucesso ecológico dos insetos. Outro importante motivo para se estudar o tubo digestivo é o fato desse sistema representar a maior e mais desprotegida região de contato do inseto com o meio ambiente. Sendo assim, estratégias de controle de insetos podem ser planejadas visando atacar alguma das estruturas do tubo digestivo ou desarranjar alguma de suas funções. Embora algumas dessas técnicas já existam (tais como a utilização da toxina de *Bacillus thuringiensis* e de plantas que expressem inibidores de enzimas digestivas não comuns àquelas espécies) a capacidade de criar resistência por parte dos insetos é grande, e sempre novas estratégias são necessárias.

Uma vez que as ordens de insetos são bastante diferentes entre si, generalizações não podem ser feitas estudando-se somente uma delas, pois além da morfologia, há diferenças em aspectos fisiológicos e bioquímicos entre as diversas ordens e até mesmo dentro de uma mesma ordem de insetos. As diferenças encontradas entre as ordens de insetos são maiores do que as observadas, por exemplo, entre os mamíferos.

1.3. O tubo digestório dos insetos

As ordens de insetos apresentam algumas diferenças na morfologia do tubo digestório. O papo e os cecos, por exemplo estão presentes em apenas alguns insetos (Terra e Ferreira, 1994).

Na maioria dos insetos, incluindo os Lepidoptera, o intestino médio ou ventrículo é revestido internamente por uma estrutura quitino-proteica, chamada membrana peritrófica, que cria no lúmen 2 compartimentos. O espaço endoperitrófico (localizado no interior da membrana peritrófica e aonde se encontra o alimento) e o ectoperitrófico (entre a membrana peritrófica e o epitélio do ventrículo) (figura 01). A presença dessa membrana permite a compartimentalização da digestão. Em boa parte dos insetos, incluindo os Lepidoptera, no espaço endoperitrófico acontece a digestão dos polímeros, como amido e proteínas; no espaço ectoperitrófico acontece a digestão intermediária do alimento, na qual os oligossacarídeos tem seu tamanho reduzido e a digestão terminal, aonde são gerados monossacarídeos e aminoácidos ocorre nas membranas microvilares dos enterócitos, seja por enzimas integrantes dessa membrana, seja por enzimas aprisionadas ao glicocalix dessas células (Terra e Ferreira, 1994, 2005).

Figura 01: Esquema do tubo digestivo de Lepidoptera. Modificado de Resh e Cardé, 2003. E: esôfago; EEn: espaço endoperitrófico; EEc: espaço ectoperitrófico; V: ventrículo; MP: membrana peritrófica; M: túbulos de Malpighi; I: íleo; Co: cólon; R: reto.

Os Lepidoptera apresentam um pH luminal bem básico, em torno de 10. Isso provavelmente ocorre devido a uma adaptação dos seus ancestrais para a extração de hemiceluloses da parede celular das plantas (Terra, 1988). Sendo assim, a maioria das enzimas digestivas desses insetos apresenta pH ótimo em torno de 9 a 10. É interessante observar que as enzimas de digestão final apresentam pH ótimo mais ácidos, semelhantes ao das enzimas de outros insetos.

1.4. Tio-glicosidases de insetos

As tioglicosidases mais conhecidas são de plantas e muitas vezes são chamadas de mirosinases. Elas hidrolisam tio-glicosídeos, que também são chamados de glicosinolatos, gerando glicose e um aglicone instável. Esse se rearranja para produzir sulfato e vários produtos que variam tanto em grupo funcional quanto em substituintes da cadeia lateral. Os produtos incluem tiocianato, isotiocianato (óleo mostarda), nitrilas e outros. Pelo menos 120 glicosinolatos diferentes foram identificados em plantas (Fahey *et al.*, 2001). Nos vegetais, os tio-glicosídeos e as tio- β -glicosidases ficam em compartimentos diferentes e só são misturados quando o tecido é rompido, como após ser ingerido pelos herbívoros.

Há duas hipóteses para a função das tio- β -glicosidases em insetos. Uma é que ela teria papel nutricional e permitiria ao inseto aproveitar energeticamente o glicosídeo e, mais que isso, poderia utilizar o nitrogênio e o enxofre presentes no aglicone. A outra hipótese é que ela serviria como proteção para minimizar os efeitos deletérios dos produtos de degradação liberados pela tio- β -glicosidase das plantas, pois em teoria a enzima do inseto poderia gerar, a partir dos glicosinolatos, produtos menos tóxicos (Pontoppidan *et al.*, 2001).

Não há evidências que apontem para nenhuma das duas hipóteses. Recentemente observou-se dois mecanismos diferentes para evitar a toxidez do glicosinolato em Lepidoptera. Em *Pieris rapae*, que se alimenta de um vegetal que contém 4-hidroxibenzoil glicosinolato, Wittstock *et al.* (2004) mostraram que nas fezes da larva só era encontrada a nitrila correspondente ao glicosinolato. Os autores provaram que isso ocorre porque o tubo digestivo é capaz de secretar uma proteína

que muda o produto da ação da mirosinase vegetal que a larva ingere. Desse modo, em vez de produzir fenil-isotiocianato ela passa a gerar a nitrila. Sequenciamento mostrou que essa proteína não está relacionada a nenhuma outra proteína conhecida. Em *Plutella xylostella*, Ratzka *et al.* (2002) mostraram que o inseto produz uma sulfatase de ampla especificidade que remove o sulfato de vários glicosinolatos. Desse modo eles não são reconhecidos pela mirosinase da planta e não são hidrolisados.

As tio- β -glicosidases de insetos são muito pouco estudadas e até recentemente, só afídeos tinham sido descritos como possuindo uma tio- β -glicosidase. No afídeo *Brevicoryne brassicae* essa enzima foi clonada e seqüenciada. Ela apresenta maior identidade e similaridade de seqüência com as β -glicosidases de insetos do que com as tio- β -glicosidases de plantas (Jones *et al.*, 2002). O anticorpo gerado contra a enzima do inseto não é capaz de reconhecer a enzima da planta (Jones *et al.*, 2001).

As β -glicosidases presentes na família 1 das glicosídeo hidrolases (Coutinho e Henrissat, 1999) tem uma carboxila e um carboxilato responsáveis pela catálise, um funcionando como nucleófilo e o outro como doador de prótons. As tio- β -glicosidases de plantas possuem um resíduo de Glu que funciona como nucleófilo, mas não apresentam o doador de prótons, tendo uma Gln nessa posição (ver Jones *et al.*, 2002). O sequenciamento e a resolução da estrutura tridimensional dessa enzima de *B.brassicae* (Husebye *et al.*, 2005) mostrou que ela possui, como as β -glicosidases, dois grupos carboxilas no sítio ativo, evidenciando que não é essa propriedade que define a clivagem dos glicosinolatos em detrimento dos β -glicosídeos (ver Jones *et al.*, 2002). A maior identidade e similaridade dessa enzima quando foi seqüenciada era com a β -glicosidase digestiva de *Spodoptera frugiperda* (Jones *et al.*, 2002).

Atualmente, essa seqüência apresenta maior similaridade e identidade com a β -glicosidase do Coleoptera *Tenebrio molitor* (número de acesso GenBank: AF312017.1). A estrutura geral da tioglicosidase de *B. brassicae* é semelhante a da mirosinase de *Sinapsis alba* e de β -glicosidases de planta (Husebye *et al.*, 2005). Ela possui um resíduo (Tyr 180) próximo à região de clivagem do substrato que é específico dessas enzimas, e apresenta em sua seqüência apenas um dos dois resíduos de aminoácidos presentes nas mirosinases vegetais que são responsáveis pelo reconhecimento do S presente no substrato (Lys 173) (Husebye *et al.*, 2005).

Poucos outros insetos além de afídeos tiveram a presença de uma tio- β -glicosidase reportada. Há indícios de que *Schistocerca gregaria* é capaz de sintetizar uma tio- β -glicosidase após alimentar-se de dietas contendo glicosinolatos por alguns dias (Mainguet *et al.*, 2000). Em nosso laboratório verificou-se a presença de uma enzima aparentemente capaz de clivar essas substâncias em *Diatraea saccharalis* (Blanes, 2004). É possível que esses poucos relatos sejam resultantes da falta de tentativas de se encontrar tio- β -glicosidases em insetos diferentes de afídeos.

Aparentemente essa enzima presente em *D. saccharalis* é capaz de clivar O- e S-glicosídeos com atividade semelhante. Usualmente o que se observa é alta clivagem de um dos tipos de substrato e atividade residual sobre o outro. As evidências reunidas por Blanes (2004) de que uma só enzima clivava O- e S- glicosídeos foram: a) a separação em colunas cromatográficas seqüenciais, resultando em um pico com forma idêntica quando se ensaia com os dois tipos de substrato e b) a mesma cinética de inativação térmica é observada quando se utiliza O- e S-glicosídeos como substrato.

1.5. As β -glicosidases de insetos

β -glicosidases são enzimas que removem monossacarídeos da porção não redutora do substrato. Elas são capazes de clivar di- e oligossacarídeos, alquilglicosídeos, glicosídeos tóxicos produzidos por plantas e as vezes até polissacarídeos (Ferreira *et al.*, 2001). As β -glicosidases podem hidrolisar substratos contendo diferentes monossacarídeos na posição do aglicone, tais como glicose, galactose, fucose, manose e xilose (Marana *et al.*, 2001). Dependendo de qual substrato é clivado preferencialmente a enzima pode ser chamada de β -glicosidase, β -galactosidase, β -fucosidase, etc.

A especificidade das β -glicosidases pode variar, com algumas enzimas sendo capazes de utilizar uma gama enorme de substratos e outras utilizando poucos tipos de compostos (ver Ferreira *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001, 2003; Azevedo *et al.*, 2003). Baseando-se na atividade catalítica relativa (kcat/Km relativo) sobre vários substratos, Terra e Ferreira (2005) propuseram a divisão das β -glicosidases intestinais de insetos em duas classes. A classe A inclui as enzimas que clivam com eficiência substratos com aglicones hidrofílicos, tais como dissacarídeos e oligossacarídeos. A classe B é formada por enzimas com alta atividade sobre substratos com aglicones hidrofóbicos tais como alquil-, p-nitrofenil- e metil umbeliferil- glicosídeos. Enzimas da classe A são mais abundantes que as da classe B. Enzimas pertencentes às duas classes, mas principalmente as da classe A tiveram várias de suas propriedades determinadas (ver Terra e Ferreira, 2005). Certamente mais dessas enzimas precisam ser estudadas em outras ordens de insetos para compor um quadro mais claro sobre suas características.

O papel das β -glicosidases intestinais de insetos é a digestão intermediária e final de celulosas e hemicelulosas e, segundo Terra e Ferreira (2005) as enzimas muito ativas sobre substratos hidrofóbicos estariam envolvidas no aproveitamento do açúcar presente em glicolipídeos que são os principais componentes das membranas de tilacóides.

A quantidade de β -glicosidases expressas no tubo digestivo pode mudar de um inseto para o outro, independente da ordem à qual este inseto pertence; temos, por exemplo, *Tenebrio molitor*, um Coleoptera, que possui três β -glicosidases, sendo que uma delas apresenta duas isoformas (Ferreira *et al.*, 2001); *Spodoptera frugiperda*, um Lepidoptera com duas β -glicosidases diferentes (Marana *et al.*, 2000) e *Diatraea saccharalis*, outro Lepidoptera, possui três diferentes β -glicosidases no seu tubo digestivo (Azevedo *et al.*, 2003). Entretanto, no geral, insetos que apareceram há mais tempo na evolução normalmente tem um maior número de β -glicosidases em seu intestino e essas enzimas tem especificidades relativamente estritas. Aparentemente há uma tendência evolutiva para que o número dessas moléculas diminua e, concomitantemente, sua especificidade torne-se mais ampla (Ferreira *et al.*, 1998).

A hipótese vigente é que várias β -glicosidases com especificidades diferentes permitiriam que o inseto, ao entrar em contato com uma dieta contendo β -glicosídeos tóxicos, diminuísse de algum modo a atividade da enzima que pode agir sobre aquele glicosídeo sem impedir a digestão de todos os β -glicosídeos (Terra e Ferreira, 1994, 2005). Nas espécies que apareceram mais tardiamente e que tem β -glicosidases com especificidades mais amplas, o problema seria contornado adquirindo mecanismos para desintoxicar o β -glicosídeo danoso.

Várias β -glicosidases intestinais de insetos foram estudadas em nosso laboratório (Marana *et al.*, 1995, 2000, 2001; Ferreira *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001, 2003; Azevedo *et al.*, 2003) e algumas observações interessantes foram feitas.

Realizando experimentos de competição entre substratos, nós obtivemos resultados que indicam que algumas dessas enzimas possuem dois sítios ativos (Marana *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2003). A favor dessa hipótese estão os experimentos de modificação química de resíduos de aminoácidos, que mostraram que a queda de atividade é diferente dependendo do substrato utilizado (Marana *et al.*, 2000) mesmo quando a determinação da seqüência amino-terminal revelou a presença de uma só proteína (Marana *et al.*, 2000).

Aparentemente algumas dessas β -glicosidases possuem 2 sítios ativos (Marana *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2003). A evidência obtida foi, além de cinética, o tempo de inativação diferencial da enzima por modificadores de aminoácidos, dependendo do substrato utilizado. A presença de uma enzima contaminante da preparação foi descartada pela determinação da seqüência amino-terminal, que revelou a presença de 1 só proteína (Marana *et al.*, 2000).

As β -glicosidases de insetos que tiveram sua seqüência de aminoácidos determinada, pertencem à família 1 das glicosídeo hidrolases. As β -glicosidases intestinais de insetos tem uma massa molecular em torno de 60 KDa. Esse valor é semelhante ao encontrado para cada domínio da lactase florissina hidrolase de mamíferos, que possuem um sítio ativo em cada domínio (Van Beers *et al.*, 1995).

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são encontradas nas famílias 1, 3 e 9 das glicosídeo hidrolases enquanto as β -galactosidases (EC 3.2.1.23) aparecem nas

famílias 1, 2, 35 e 42 e as tio-glicosidases (EC 3.2.1.147) só aparecem na família 1 (<http://www.cazy.org/>). As famílias 3 e 42 não possuem enzimas animais.

Todas as β -glicosidases de insetos seqüenciadas até o momento pertencem a família 1, da qual também faz parte a lactase-florizina hidrolase de mamíferos.

Os dados cinéticos obtidos pelo nosso laboratório e que apontam para a existência de dois sítios ativos são conflitantes com o tamanho das enzimas e com o fato das β -glicosidases intestinais de insetos pertencerem a família 1 das glicosídeo hidrolases. Embora nenhuma das enzimas com aparentes dois sítios ativos tenham sido completamente seqüenciadas, a seqüência amino-terminal indica que elas também fazem parte dessa família (Marana *et al.*, 2001).

Seria interessante ter algumas dessas enzimas expressas em bactéria ou levedura para podermos verificar se elas possuem os dois sítios ativos e se isso não for verdade, o que está levando a essa interpretação equivocada.

1.6. β -glicosidases e a interação inseto-planta

Os animais herbívoros compreendem os nematóides, insetos, aves e mamíferos. Visto que 26% do total de espécies vivas são insetos herbívoros e 22% são plantas verdes (Panda and Kush, 1995), há uma espécie de inseto herbívoro para cada vegetal. A maioria dos insetos fitófagos bem sucedidos só apareceram após a evolução das angiospermas. Devido ao fato dos insetos e plantas terem co-evoluído por pelo menos 150 milhões de anos, e pelo fato dos insetos apresentarem alta taxa reprodutiva e curto ciclo de vida, algumas relações bem estreitas entre esses organismos se desenvolveram.

A principal defesa desenvolvida pelos vegetais contra o ataque de herbívoros é a produção de substâncias tóxicas. Há várias classes diferentes desses compostos e inúmeras espécies de plantas que os produzem. Quando um herbívoro se adapta à ingestão desses vegetais que produzem compostos tóxicos ele adquire vantagens tais como: a) supremacia na competição com outros herbívoros, b) maior facilidade em localizar seu alimento, c) caso ele armazene a substância em seus tecidos ele adquire proteção contra predadores e d) proteção contra patógenos (Gillot, 1995).

Entre os compostos tóxicos produzidos pelas plantas estão os O- β -glicosídeos tóxicos (que podem ser fenólicos, cianogênicos ou de outra espécie) e os S- β -glicosídeos tóxicos. Quando nos referirmos aqui aos O-glicosídeos, usaremos apenas o termo glicosídeo. Essas substâncias podem estar presentes em concentrações que variam de 0,5 a 1% (Spencer, 1988) e somente os glicosídeos cianogênicos são produzidos por mais de 2500 espécies de plantas (Zagrobelyny *et al.*, 2004).

Os glicosídeos tóxicos possuem um monossacarídeo (chamado de glicone), geralmente uma glicose, ligado a uma porção que não é um carboidrato ou a outro monossacarídeo mais uma porção que não é carboidrato. Toda a parte da molécula além do monossacarídeo presente na porção não redutora do glicosídeo é chamada de aglicone. O aglicone é bastante variável, mas geralmente é uma região com estrutura carbônica complexa e hidrofóbica (ver Spencer, 1988). Após a ação de uma β -glicosidase, uma glicose é removida e o aglicone é liberado. Inicialmente pensava-se que a toxidez dos glicosídeos cianogênicos devia-se somente a liberação espontânea de cianeto que ocorre após a clivagem pelas β -glicosidases. Entretanto agora se supõe que o aglicone também tem um papel na toxidez, uma vez que ele é bastante variável e complexo. Seus efeitos não estão ainda completamente estabelecidos, mas pelas suas estruturas químicas eles poderiam inibir irreversivelmente serina-proteinases ou alquilar substâncias tais como ácidos nucleicos. Alguns deles são também inibidores da glicose-6-fosfato desidrogenase (Desroches *et al.*, 1977) ou de trealase (Silva *et al.*, 2004, 2006), enzima chave no metabolismo dos insetos.

Uma demonstração inequívoca da participação de glicosídeos cianogênicos na defesa de plantas foi a transferência dos genes da via de síntese de um desses compostos (durrina) de *Sorghum bicolor* para *Arabidopsis thaliana* (Crucifera). As plantas transformadas foram menos atacadas pelo especialista em crucíferas *Phyllotreta memorum* (Tattersall *et al.*, 2001).

Como as β -glicosidases e as tio- β -glicosidases são responsáveis pela liberação dos aglicones tóxicos, a partir dos glicosídeos e tio- β -glicosídeos, elas são importantes na interação inseto-plantas. Embora vários estudos tenham sido feitos sobre os efeitos

dos glicosídeos de plantas nos insetos e sobre o modo pelo qual os insetos reagem a esses compostos, o conhecimento sobre o assunto ainda é limitado e pouquíssimas generalizações podem ser feitas. Isso talvez se deva a grande diversidade de glicosídeos encontrada nos vegetais, assim como a grande diversidade de insetos existentes. Talvez com um número maior desses estudos algumas linhas gerais possam ser traçadas sobre essa interação.

Alguns insetos conseguem ingerir vegetais que apresentam altas concentrações desses compostos e até beneficiar-se desse fato. Muitos podem seqüestrar intactos os metabólitos das plantas para a sua hemolinfa (sangue dos insetos) e outros tecidos e desse modo adquirir imunidade aos seus predadores (para exemplos ver Muller *et al.*, 2001; Nishida, 2002;). Entretanto, muitos insetos são afetados negativamente pela presença desses glicosídeos na dieta.

Alguns evitam a intoxicação que seria causada pela ingestão dos aglicones diminuindo a atividade da β -glicosidase responsável por sua clivagem (Lindroth *et al.*, 1988; Desroches *et al.*, 1977). Entretanto esse não é o único meio pelo qual os insetos contornam esse problema. Larvas de *Anastrepha fraterculus* alimentam-se do fruto da goiabeira enquanto larvas de *Anastrepha pickeli* ingerem sementes do fruto da mandioca, ricos no glicosídeo cianogênico linamarina. Enquanto *A. fraterculus* tem pouca atividade de β -glicosidases, *A. pickeli* possui enzimas bem ativas que podem eficientemente clivar linamarina (Blanes, 2004). Provavelmente *A. pickeli* adaptou-se para aproveitar a glicose proveniente da linamarina e possui algum sistema de desintoxicação do aglicone remanescente.

Em nosso laboratório foi mostrado que as larvas do Lepidoptera *Diatraea saccharalis* possuem três β -glicosidases. Quando a larva é alimentada em dieta contendo amigdalina (glicose- β -1,6-glicose- β -mandelonitrila) por um longo período, a enzima responsável pela clivagem de prunasina (glicose- β -mandelonitrila) e liberação da mandelonitrila cianogênica tem sua atividade diminuída, reduzindo assim a formação do aglicone tóxico (Ferreira *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2003) (figura 02).

Figura 02: Fórmulas estruturais dos glicosídeos cianogênicos e do tio-glicosídeo sinigrina.

2. OBJETIVOS

Diatraea saccharalis mostrou-se um modelo muito interessante para o estudo de vários aspectos relacionados às β -glicosidases.

Ela possui 3 dessas enzimas que já foram purificadas e tiveram suas especificidades determinadas (Azevedo *et al.*, 2003). Uma delas parece ter dois sítios ativos e tem sua atividade diminuída quando a larva é crescida em dieta artificial contendo o glicosídeo cianogênico amigdalina (Ferreira *et al.*, 1997). Essa mesma enzima aparentemente é capaz de clivar O- e S- β -glicosídeos com a mesma eficiência (Blanes, 2004). Em *D. saccharalis* também foi detectada “in vitro” a inibição de trelases presentes em vários tecidos por β -glicosídeos tóxicos naturais e seus aglicones (Silva *et al.*, 2006).

Nosso laboratório pretende aprofundar os estudos relativos ao problema da existência ou não de dois sítios ativos em β -glicosidases; da possibilidade de uma enzima clivar com igual eficiência O- e S-glicosídeos e verificar onde ocorre a regulação da queda de atividade quando da ingestão de amigdalina e qual é o sinal para essa queda.

Para isso é necessária a clonagem do cDNA correspondente as β -glicosidases de *D. saccharalis*, identificar qual seqüência corresponde a qual enzima anteriormente caracterizada e expressar a enzima com aparentes dois sítios ativos e ativa sobre O- e S-glicosídeos.

O objetivo principal desse trabalho foi a clonagem dos cDNAs que codificam as β -glicosidases de *D. saccharalis* e a correlação entre as seqüências e as proteínas caracterizadas anteriormente. Além disso nós obtivemos outras provas sobre a

clivagem de O- e S-glucosídeos por uma mesma enzima e sequenciamos ao acaso algumas EST s presentes na biblioteca de expressão obtida a partir do epitélio do tubo digestivo de *Diatraea saccharalis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

As larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) foram criadas em dieta artificial à base de sacarose, germe de trigo, farelo de soja, sais de Wesson, Nipagin (fungicida), ácido ascórbico, formol, Vita Gold (complexo vitamínico), tetraciclina, solução vitamínica, ágar e água destilada de acordo com Parra e Mihsfeldt (1992).

3.3. Dissecção das larvas

As larvas de *D. saccharalis* foram dispostas no gelo para que ficassem anestesiadas. Foi retirado o intestino do animal na presença de solução salina (NaCl 125 mM) gelada. Os túbulos de Malpighi e o intestino anterior e posterior foram descartados. O epitélio do ventrículo foi separado da membrana peritrófica e do conteúdo luminal.

3.3. Homogeneização do epitélio ventricular de *Diatraea saccharalis*

O material foi colocado em um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e homogeneizado com água bidestilada ou MilliQ gelada. Esse homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes, sendo um dos congelamentos feito de um dia para o outro. Após esse procedimento, o material foi centrifugado à 25.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Recolheu-se então o sobrenadante e o sedimento foi descartado.

3.4. Cromatografia de Filtração em Gel em coluna HiTrap Desalting (Pharmacia)

1,5mL do homogeneizado do epitélio ventricular de *Diatraea saccharalis* foram aplicados com uma seringa em uma coluna HiTrap Desalting equilibrada em tampão etanolamina 20 mM pH 9,5. Após a aplicação, a coluna foi lavada com 10mL do mesmo tampão. Foram coletados os primeiros 2 mL, estando a coluna pronta para nova corrida após o término da lavagem.

3.5. Cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão (AKTA Prime – GE Healthcare)

Foram realizadas cromatografias em duas colunas de troca aniônica nas diferentes etapas do projeto. O método utilizado para ambas foi o mesmo, detalhado a seguir: 2 mL de homogeneizado do material recolhido da HiTrap Desalting foram aplicados em uma coluna (1mL) equilibrada com tampão etanolamina 20mM pH 9,5. Passou-se pela coluna 5 mL do tampão inicial, um gradiente salino (22mL) de 0 a 1M NaCl e uma lavagem final em tampão com 1M NaCl (5mL). Usou-se um fluxo de 2mL/minuto. Para a coluna HiTrap Q (GE Healthcare) coletaram-se frações de 2mL e para a coluna EconoPac Q (BioRad), frações de 1mL como descrito em Azevedo *et al* (2003). As frações com maior atividade sobre NP β glu foram reunidas.

3.6. Cromatografia de troca iônica em sistema FPLC

Foram utilizadas duas colunas durante o projeto: Resource Q para a caracterização cinética da enzima 02 e Mono Q para a purificação das amostras submetidas à espectrometria de massa. O método utilizado foi o mesmo de Azevedo *et al* (2003).

Todo o material reunido após cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão foi diluído 10x e aplicado em uma coluna (1 mL) equilibrada com tampão etanolamina 20 mM pH 9,5 com o auxílio de um superloop de 50 mL. Passou-se pela coluna 10 mL do tampão inicial, um gradiente salino (22 mL) de 0 a 1 M NaCl e foi feita uma lavagem final em tampão com 1 M NaCl (5 mL). Usou-se um fluxo de 0,5 mL/minuto e frações de 0,4 mL foram coletadas. As frações com maior atividade sobre NP β glu foram reunidas.

3.7. Cromatografia de interação hidrofóbica em sistema FPLC (Pharmacia)

Foram realizadas cromatografias em duas colunas de interação hidrofóbica nas diferentes etapas do projeto. Para caracterização cinética da enzima 02 foi utilizada a coluna Resource Phenyl (Pharmacia) e para a espectrometria de massa das enzimas foi utilizada a coluna Phenyl Superose como descrito em Azevedo *et al* (2003).

A cromatografia foi realizada em sistema FPLC (Pharmacia); 500 μ L do material recolhido após a cromatografia descrita no item 3.6 foram aplicados. A coluna foi lavada com 5 mL de tampão citrato-fosfato 100 mM pH6,5 contendo 1,7 M de sulfato de amônio. A seguir aplicou-se um gradiente salino (20 mL) de 41,2 a 0 M de sulfato de amônio e foi feita uma lavagem final em tampão sem sal (5 mL). Usou-se um fluxo de 0,5 mL/min e coletaram-se frações de 0,4 mL. Essa amostra contém três picos de atividade sobre p-nitrofenil β -D- glicosídeo e um pico sobre sinigrina coincidente com um dos picos de atividade sobre NP β glu.

3.8. Ensaaios enzimáticos

Os ensaios foram realizados incubando-se as amostras por diferentes intervalos de tempo em banho a 30 °C. Os substratos foram solubilizados em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,5. Foram utilizados como substrato p-nitrofenil β -D- glicosídeo (10 mM), p-nitrofenil β -D- galactosídeo (10 mM) e sinigrina (20 mM). No caso dos substratos sintéticos foi medida a quantidade de p-nitrofenol formado (ver Terra *et al.*, 1979) e para o substrato natural foi quantificada a glicose liberada (Dahlqvist, 1968).

Nos experimentos de modificação química, foi utilizado, além de sinigrina, metilumbeliferil- β -glicosídeo (10 mM) como substrato. Nesse caso foi medida a liberação de metilumbeliferona (Baker e Woo, 1992), um composto fluorescente.

Branco sem enzima e sem substrato foram feitos. Os ensaios foram realizados em condições em que a atividade era proporcional a quantidade de enzima e ao tempo.

3.9. Determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da para sinigrina

O efeito da variação da concentração de substrato sobre a atividade da S-glicosidase foi determinado utilizando sinigrina em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 6,5 como substrato. Utilizamos 11 concentrações diferentes de substrato (entre 0,075 mM e 10 mM). O programa Enzfitter foi utilizado para a determinação dos parâmetros cinéticos.

3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Amostras a serem aplicadas em SDS-PAGE foram dialisadas contra água milliQ (Millipore), liofilizadas e suspensas em tampão Tris-HCl 60mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); 2-mercaptoetanol 0,36mM; EDTA 0,5mM; glicerol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (p/v). Após serem aquecidas por 4 minutos a 95°C as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v; Laemli, 1970). As placas de eletroforese foram submetidas a uma corrente de 0,2mA/cm² e coradas com Comassie Blue R (Bradford, 1976). Valores de massa molecular relativa (Mr) foram calculados a partir da comparação com proteínas de massa molecular conhecida: fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa).

3.11. Digestão trípica in situ de proteínas separadas por SDS-PAGE

Amostras das 3 β -glicosidases encontradas em *D. saccharalis*, após serem purificadas, foram aplicadas em um SDS-PAGE. Após a corrida o gel foi corado com Comassie Blue R e as bandas relativas às 3 β -glicosidases foram recortadas e enviadas para o Prof. José César Rosa, coordenador do Centro de Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A amostra foi submetida a digestão com tripsina. SDS e corante Coomassie blue foram removidos por 3 lavagens com 400 μ L de bicarbonato de amônio 100mM contendo 50% de acetonitrila. Por último a amostra foi desidratada com acetonitrila pura e seca em centrífuga rotatória à vacuo (SpeedVac, Savant). A banda de gel seco foi re-hidratada com uma solução de tripsina (Promega) a 0,5 μ g/20 μ L e após o completo

intumescimento do gel, bicarbonato de amônio foi adicionado para cobrir completamente o gel, sendo incubado a 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5µL de ácido fórmico e o gel foi mantido em temperatura ambiente para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos foram preparados em *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, e equilibrada com ácido fórmico 0,2%. A amostra foi carregada em micro-tip individual e purificada de sais e outros componentes hidrofílicos com 3 x 100µL de ácido fórmico 0,2% sendo eluída da resina em 30µL de uma solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente a amostra foi diretamente infundida no espectrômetro de massas.

3.13. Espectrometria de Massa

Os peptídeos foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo eletrospray triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem eletrospray do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 20µm de diâmetro interno, mantido a 2,8 kVolts, 40 V no cone de entrada e a uma temperatura de 100°C. A amostra foi introduzida através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300nL/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (“peptide mass fingerprint”). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS

(daughter ion scanning) que promove a fragmentação do ion selecionado originando fragmentos de Íons tipo *b* e *y* que foram utilizados para a dedução das respectivas sequências de aminoácidos.

3.13. Modificação Química

Preparações semi-purificadas da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis* foram incubadas com o reagente 1-etil-3-(dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC), que liga-se a carboxilatos, inativando-os (Carraway e Koshland, 1972). A enzima foi previamente submetida a uma filtração em gel em coluna HiTrap Desalting com um tampão fosfato 50 mM pH 5,0. A reação de modificação foi interrompida com a adição de tampão citrato 100 mM pH 6,0 (concentração final de 50mM). Seguiu-se a determinação da atividade remanescente.

3.14. Competição entre substratos e determinação de K_i

Incubou-se a enzima na presença de 8 concentrações de substrato (no intervalo de 0,1 a 2 Km) e 5 concentrações do substrato-inibidor. Foram utilizados NP β gal e sinigrina como substratos e inibidores. Em cada uma dessas situações foram determinadas as velocidades de hidrólise do substrato, que foram tratadas pelo plote de Lineweaver-Burk. Plotando-se as inclinações das retas obtidas neste plote em função das respectivas concentrações de inibidor é possível determinar o K_i , que corresponde a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (Segel, 1993).

Quando NP β gal era utilizado como substrato e sinigrina como inibidor, determinando-se a atividade enzimática medindo-se o p-nitrofenolato liberado, como descrito em Terra *et al.*, 1979. Quando o substrato era sinigrina e o inibidor NP β gal, a

quantidade de glicose foi calculada usando-se o método do Tris-glicose oxidase (Dalqvist, 1988) modificado. Após incubar o meio de reação com TGO, acrescenta-se ácido sulfúrico para transformar todo o p-nitrofenolato em p-nitrofenol que não tem cor.

Para todas as concentrações de substrato e de substrato-inibidor foram feitos brancos de enzima e esses valores foram descontados das absorbâncias para cada um dos pontos.

3.15. Criação de larvas em dietas contendo mandelonitrila

Foram elaborados experimentos para a criação de larvas de *D. saccharalis* em dieta contendo o composto cianogênico mandelonitrila. Para tal, esse composto foi acrescentado à dieta artificial quando esta estava com temperatura inferior a 60 °C e ainda não havia endurecido, para que ele não volatilizasse e para que a dieta ficasse homogênea. Várias concentrações de mandelonitrila foram testadas. Foram pesados e dissecados 10 animais em cada época do desenvolvimento. Também foram medidas e dissecadas larvas em dieta controle para posterior comparação. As medidas que constam nos gráficos são resultantes das médias para os 10 animais.

3.16. Reação em cadeia com DNA polimerase (PCR)

Para que conseguíssemos clones de possíveis β -glicosidases digestivas de *D. saccharalis*, foi feita uma reação em cadeia com DNA polimerase (PCR) em termociclador Robocycler (Stratagene). A reação de PCR foi feita em tampão Tris-HCl 10 mM pH8,4 contendo KCl 50 mM, gelatina 0,01% (p/v), Triton X-100 0,1% (p/v), MgCl₂ 1,5 mM e dNTPs 0,2 mM; utilizando uma biblioteca de cDNA do tubo digestivo de *D. saccharalis* como DNA molde. Os iniciadores utilizados estavam em uma

concentração final de 100 μ M, juntamente com 5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Os iniciadores construídos para esse trabalho foram:

1) Geral para β -glicosidases da família 01 das glicosídeo hidrolases (5' ATG GAE AAE TTE GAA TGG 3'): construído a partir de seqüências de β -glicosidases de insetos já clonadas (*Tenebrio molitor* (Coleoptera), *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Leucophaea maderae* (Dictyoptera), *Neotermes koshunensis* (Isoptera) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera)). Uma região conservada próxima à extremidade 3' das seqüências foi escolhida e o iniciador foi feito com 20 bases em direção à extremidade 3'.

2) Específico para a sequência parcial 01 (5' GTT TAT AAT CCA TCG TCA ATG G 3'): construído na região do códon de terminação da sequência parcial 1 direcionado para a extremidade 5' da sequência molde.

3) Específico para a sequência parcial 02 (5' TCA GTG TAA CAT CGT ATA GAG TAG 3'): construído na região do códon de terminação da sequência parcial 2 direcionado para a extremidade 5' da sequência molde.

4) Específico para a sequência parcial 03 I (5' CAT GCC ATG CTT CAT AGA GGC C 3'): construído na região do códon de terminação da sequência parcial 3 direcionado para a extremidade 5' da sequência molde.

5) Específico para a sequência parcial 04 I (5' CAA ACA ATG GTT TAT TTT AAA C 3'): construído na região do códon de terminação da sequência parcial 4 direcionado para a extremidade 5' da sequência molde.

- 6) Específico para a sequência parcial 02 II (5' CAT ATC CGT CGT CCC ATT CG 3'): localizado na extremidade 5'da sequência parcial 2, direcionado para a extremidade 5' do cDNA.
- 7) Específico para a sequência parcial 03 II (5' GAA ACC TGC ACG CCA TTC GA 3'): localizado na extremidade 5'da sequência parcial 3, direcionado para a extremidade 5' do cDNA.
- 8) Específico para a sequência parcial 04 II (5' TGT AGC CAT TTT TCC ATT CG 3'): localizado na extremidade 5'da sequência parcial 3, direcionado para a extremidade 5' do cDNA.
- 9) Específico para a sequência parcial 02 III (5' CTG AGT ATA GTT TCG CTG AG 3'): localizado na região central da sequência parcial 2, direcionado para a extremidade 5' do cDNA.
- 10) Região N-terminal da sequência parcial 01 (5' GTT CAG CTA CCA AAG CTC CG 3').
- 11) Região C-terminal da sequência parcial 01 (5'AAA TGG AAG CAG ATT GTG GC 3').
- 12) Região N-terminal da sequência parcial 03 (5' GAA GGC TTC ACA TTC GGT GT 3').
- 13) Região C-terminal da sequência parcial 03 (5' GTA ACC ACC TTC CTC GGT GA 3').
- 14) Região N-terminal da sequência parcial 04 (5' CGA CTT AAA AGC CCC TTT CC 3').
- 15) Região C-terminal da sequência parcial 04 (5' TAC TGC GTC CAA CAA AGC AC 3').

16) Geral para β -galactosidase da família 35 das glicosídeo hidrolases (5' CCM CAG GAC ACA CCT TYA TMC A 3'): construído a partir de seqüências de β -galactosidases animais da família 35.

17) Degenerado baseado na seqüência de peptídeos internos da β -glicosidase 02 de *Diatraea saccharalis* I (5' CAY GAT TTA ACW CCW CAY ATG TGT 3').

18) Degenerado baseado na seqüência de peptídeos internos da β -glicosidase 02 de *Diatraea saccharalis* II (5' CAY GAY YGN ACN CCN CAY 3').

19) Degenerado baseado na seqüência de peptídeos internos da β -glicosidase 02 de *Diatraea saccharalis* III (5' TTY GGN YTN TAY GAR GTN GAY TTY 3').

Cada um deles era responsável por gerar fragmentos de diferentes tamanhos: 1 e 16) fragmentos por volta de 400 pb, 2 a 9) fragmentos por volta de 1500 pb, 10 a 15) utilizados para sequenciamento interno da seqüência, 12 e 14) utilizados para estender a seqüência anterior, fragmentos por volta de 750 pb.

O iniciador 17 foi construído utilizando-se as degenerações mais prováveis para os códons de *D. saccharalis*, conforme o banco de dados existente no Expasy (<http://www.expasy.ch/>). Já os iniciadores 18 e 19 foram construídos baseados nas degenerações gerais do código genético.

Cada reação consiste em 1 ciclo inicial de 10 minutos a 94 °C para que ocorra a desnaturação das proteínas da cápsula do fago e a exposição do DNA viral. Em seguida, são realizados mais ciclos (cujo número varia para cada iniciador) que eram constituídos de três fases. A primeira consistia de 1 minuto a 94 °C para desnaturação da dupla-fita do DNA; o segundo consistia de 45 segundos a uma temperatura entre 50

e 60 °C (utilizamos temperaturas diferentes para cada iniciador) para pareamento dos iniciadores; e a terceira de 90 segundos a 72 °C para elongação da nova fita de DNA.

Para análise dos fragmentos gerados foram utilizados géis de agarose 1% (p/v) em tampão TAE, submetidos a uma tensão de 80 -100 V. O material obtido após o final da PCR era misturado a tampão de amostra contendo azul de bromofenol. Após a eletroforese o gel era banhado em solução de brometo de etídeo e as bandas de DNA visualizadas em transiluminador UV. As bandas de interesse foram extraídas do gel utilizando o kit Quiaquick (Quiagen).

3.17. Ligação dos fragmentos de DNA em plasmídeo

Após a extração do gel de agarose, os fragmentos de DNA foram ligados a plasmídeos do kit de ligação pGemT-Easy vector System I (Promega). O produto dessa ligação foi utilizado na transformação de bactérias competentes.

3.18. Transformação de células competentes de *Escherichia coli*

O protocolo de transformação de bactérias competentes (*Escherichia coli*, linhagem XL1-blue MRF') consiste em misturar o volume total do produto de ligação a 100 µL de células competentes. Essa mistura é submetida a ciclos de diferentes temperaturas: 30 minutos no gelo, 2 minutos a 42 °C e 3 minutos no gelo. Adiciona-se então 500 µL de LB líquido e mantém-se as células a 37°C por uma hora, sob agitação. Essa mistura é então plaqueada em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL), 100 µL de IPTG e 100 µL de Xgal 50 mg/mL. A ampicilina impedirá o crescimento de bactérias não transformadas, pois no plasmídeo há um gene que confere resistência a esse antibiótico. Essas placas são mantidas a 37°C por 16 horas. Após esse período,

pode-se observar colônias brancas e azuis; as colônias brancas são aquelas cujo plasmídeo apresenta um inserto, já que não são capazes de clivar as moléculas de X-gal.

3.19. PCR a partir de material obtido de colônias de bactérias

Para que possamos fazer uma triagem mais refinada das colônias com bactérias que apresentam o inserto, é realizado um PCR utilizando DNA das colônias de bactérias como molde. Esse procedimento consiste de uma reação de PCR como a do ítem 3.10. Para tal, com um palito de madeira, retiramos a colônia do meio sólido e esfregamos o palito em um tubo de PCR, de modo que algumas células fiquem presas à parede, e seu DNA possa ser utilizado como molde. Após a reação, um gel de agarose revela quais colônias possuem o inserto.

3.20. Purificação dos plasmídeos a partir das bactérias transformadas

Os plasmídeos foram preparados a partir de 3 mL de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, usando o protocolo “Wisard Miniprep” (Promega). As bactérias são precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase (100 µM/mL). Em seguida realiza-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1% (p/v), que é neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M pH 4,8. Esta mistura é então centrifugada (10.000 g, 15 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante é aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna é lavada com tampão acetato 80 mM, EDTA 40 mM e etanol 55% (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente o plasmídeo é eluído da coluna com água MilliQ autoclavada

(pH 7,0). O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através da determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

3.21. Reação de sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento de DNA foi utilizado o procedimento que se baseia no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxirribonucleotídeos (Sanger et al., 1977). As amostras a serem seqüenciadas foram entregues ao serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A reação de sequenciamento foi realizada usando 500 ng de DNA molde, 1 μ L de iniciador na concentração de 3,3 pmol/ μ L, 2 μ L de “Terminator Ready Reaction Mix” (Perkin Elmer), 6 μ L de tampão Tris-HCl 200 mM pH 9,0 5 mM $MgCl_2$ para um volume final de 20 μ L. As reações foram realizadas num termociclador com 40 ciclos com incubações sequenciais de 10 segundos a 96 °C, 5 segundos a 50 °C, 4 minutos a 50°C. Nessa técnica de sequenciamento automático cada um dos quatro didesoxirribonucleotídeos usados apresentam-se ligados a grupos fluorescentes distintos, o que facilita a detecção dos produtos da reação de sequenciamento no gel de poliacrilamida.

3.23. Comparação com banco de dados, alinhamento e cladograma usando as seqüências obtidas

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

Os alinhamentos foram feitos utilizando o programa Clustal W e a árvore filogenética foi obtida com o programa MEGA 4 (Tamura *et al*, 2007).

3.23. Seqüenciamento ao acaso da biblioteca de cDNA

3.23.1 - Excisão in vivo do plasmídeo Bluescript

Células XL1-Blue MRF' e SOLR foram crescidas em LB líquido suplementado com maltose 0,2% (p/v) e MgSO_4 10 mM durante 16 h a 30°C sob agitação de 250 rpm. Em seguida as células foram precipitadas por centrifugação (3.000 g por 5 minutos a 8°C) e ressuspensas em uma solução de MgSO_4 10 mM até obter uma A_{600} de 1.0 (8×10^8 células/mL).

Em seguida, foram combinados 10^7 pfu da biblioteca em fago λ Zap II (1 μ L) com 10^8 de XL1-Blue MRF' e 10^9 pfu de fago "helper EX Assist". Nesse passo proteínas codificadas pelo fago "helper" reconhecem especificamente regiões do DNA do fago λ Zap II e promovem a excisão e circularização de uma fita simples de DNA que contém as seqüências do plasmídeo Bluescript e o inserto de cDNA contido no clone de interesse. Essa mistura foi então incubada a 37°C por 15 minutos e logo em seguida foi acrescentado LB líquido para incubação por 3 horas a 37°C com agitação para que o plasmídeo fosse então encapsulado pelas proteínas do fago "helper" e eliminado pelas células XL1-Blue MRF'. Para purificar os fagos, a cultura foi incubada a 70°C por 20 minutos, período suficiente para matar as células XL1-Blue MRF' presentes no meio. Finalmente, esse material foi centrifugado (3.000 g por 10 minutos a 8°C) e o sobrenadante, contendo os fagos carregando o plasmídeo pBluescript e fagos λ Zap II, recuperados.

Para finalizar, as células SOLR foram transformadas com o plasmídeo pBluescript. Para isso 200 μ L de células SOLR foram incubadas com 1 μ L da preparação de fagos obtida no passo anterior. Após 15 minutos de incubação a 37°C essas células foram plaqueadas em meio LB agar contendo carbenicilina (50 μ g/mL), Xgal (50 mg/mL) e IPTG 100 mM. As placas foram incubadas por 16 h a 37°C.

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

3.23.2 - Crescimento de células transformadas em LB líquido e PCR usando material obtido de colônias de bactérias

As colônias isoladas obtidas no meio LB agar contendo carbenicilina, Xgal e IPTG foram crescidas em placas de 96 poços durante 16 h a 37 °C sem agitação em meio LB líquido também contendo carbenicilina (50 μ g/mL).

Posteriormente, com auxílio de um carimbo de replicação, parte das bactérias que cresceram no meio líquido foram transferidas para uma placa de PCR e às restantes foi acrescido glicerol 30% para serem armazenadas a -80 °C. A reação de PCR utilizando a colônia foi realizada em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,4, contendo KCl 50 mM; gelatina 0,01 % (p/v); Triton X-1000, 1 % (p/v); MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; 0,5 mM de cada iniciador utilizado; 5 U de taq DNA Polimerase. A mistura foi incubada a 94°C por

5 minutos, e a seguir realizou-se 30 ciclos como descrito a seguir: 30 segundos a 94°C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 30 segundos a 55°C para o pareamento dos iniciadores e finalmente 3 minutos a 68°C, para o alongamento da fita complementar de DNA.

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose escolhendo aleatoriamente algumas amostras. Os géis foram preparados na concentração final de 1% (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-acetato 8 mM; EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA foram resolvidas com uma diferença de potencial e 80-100V. O tampão de amostra (2:5 volumes de amostra) contendo azul de bromofenol, utilizado na eletroforese, foi usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese.

Após a eletroforese, o DNA foi evidenciado utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm).

3.23.3 - Seqüenciamento dos cDNAs

Os produtos do PCR, após terem sido verificados aleatoriamente através de gel de agarose, foram utilizados na reação de seqüenciamento. Com auxílio do carimbo de replicação, o produto do PCR foi carimbado em uma placa de PCR contendo a mistura para reação de seqüenciamento, usando o iniciador T7. A reação de seqüenciamento foi realizada da mesma forma que descrita no item 3.21.

3.23.4 - Análise e montagem dos ESTs

As seqüências foram processadas em um computador Pentium IV 2,26 GHz utilizando o sistema operacional Linux (Debian Testing com kernel 3.6) com os programas Phred, Phrap e Consed Linux 3.6 (Ewing e Green 1998; Gordon *et al.*, 1998)

compilados, cujas licenças de uso para fins acadêmicos são gratuitas e obtidas diretamente com os autores. Eletroferogramas gerados no seqüenciador foram convertidos em seqüências, as quais foram aparadas, extirpando-se extremidades de baixa qualidade, e as regiões seqüenciadas de vetor foram mascaradas. Em seguida ao processamento, as seqüências foram alinhadas, separando as que se sobrepõe em contíguos e as isoladas (singletos).

Através da ferramenta de biologia molecular Blast Client 3, softwares distribuídos pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi possível comparar as seqüências obtidas com as seqüências do banco de dados internacionais de forma automatizada (Altschul et al., 1990; Wheeler et al., 2000).

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem e sequenciamento das β -glicosidases digestivas de *D. saccharalis*

O principal objetivo do presente trabalho é a clonagem e sequenciamento das 3 β -glicosidases encontradas no intestino médio do lepidóptero *Diatraea saccharalis*. Há uma quarta β -glicosidase que só é detectada em algumas preparações. Ela sempre está presente em quantidades muito pequenas. Foi feita uma PCR com um iniciador baseado em seqüências conservadas de β -glicosidases de insetos e um iniciador para parear com o braço do fago λ (T7) utilizando uma biblioteca de cDNA do tubo digestivo desse inseto como molde. Com temperatura de anelamento de 52°C, 25 ciclos e 0,2mM de MgCl₂, amplificou-se algumas bandas. Uma banda de 350 pb (tamanho esperado para o fragmento devido à região das seqüências usada para construir o iniciador) foi recortada do gel e purificada com o kit Quiaquick (Quiagen) e uma nova PCR foi feita nas mesmas condições utilizando o produto dessa banda como molde (figura 03). Foram seqüenciados plasmídeos provenientes da ligação do produto de PCR no plasmídeo PGEM -T easy e transformação em células de *E. coli* da linhagem XL1-blue. Encontramos então, quatro seqüências parciais com alta similaridade com β -glicosidases de insetos da família 1 que foram denominadas 1, 2, 3 e 4. Todas as seqüências tem o códon de terminação, o que nos mostra que conseguimos a seqüência até a região C-terminal da proteína.

Figura 03: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR realizados utilizando o iniciador geral para β -glicosidases da família 01 em diferentes concentrações de $MgCl_2$. Raias: 1) Padrão de peso molecular, 2) Produto do PCR feito com 1 mM de $MgCl_2$ e 52°C, 3) Produto do PCR feito com 1,5 mM de $MgCl_2$ e 52°C. A seta indica as bandas correspondentes ao fragmento de cDNA de tamanho esperado.

Para estender cada uma dessas seqüências, foram construídos iniciadores específicos para região do códon de terminação de cada uma das seqüências parciais (iniciadores 2, 3, 4 e 5, ver Materiais e métodos). Diferentes estratégias foram adotadas nas PCRs, mas apenas o iniciador da seqüência parcial 1 amplificou o fragmento esperado na temperatura de anelamento de 59°C, 25 ciclos e 0,2 mM $MgCl_2$, seguido de uma PCR utilizando o cDNA extraído da banda do gel como molde, nas mesmas condições de temperatura e de concentração de $MgCl_2$ e com 17 ciclos (figura 04). A partir desse iniciador clonamos um cDNA de aproximadamente 1500 pb. Por uma limitação da reação de sequenciamento, conseguimos sequenciar aproximadamente 1000 pb desse clone com os iniciadores específicos do plasmídeo (PGEM e SP6), 500

pb da região 5' do cDNA e 500 pb da região 3' do cDNA. Para obter o restante da sequência, foram sintetizados 2 iniciadores internos (iniciadores 10 e 11, Materiais e métodos), um em direção à extremidade 3' e outro à extremidade 5' do cDNA molde, para que pudéssemos unir todos os pedaços e obter a sequência completa do cDNA.

Figura 04: Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR realizado com iniciador específico para a sequência parcial 01. 1) padrão de peso molecular 2) Material amplificado após PCR a 56°C, 1,5 mM MgCl₂. A seta indica a banda recortada.

Essa sequência foi chamada DsβglyA, possui 1587 pb que presumivelmente codificam uma proteína de 508 aminoácidos e um peptídeo sinal de 16 aminoácidos. Sua massa molecular foi predita como sendo 58,2 kDa, usando o programa Compute pI/MW, encontrado em www.expasy.ch/tools (figura 05). A proteína teria um único sítio de glicosilação e não possuiria sítio para inserção de âncora de GPI. A tabela 01 mostra as sequências com as quais ela apresenta maiores identidades e similaridades além de compará-las com as outras obtidas nesse estudo.

↓

```

atgaagctagctatcatcgtagggctgtttgtggtgagctgtgctgccaagactgtgcgg
1  M K L A I I V G L F V V S C A A K T V R 20
caggagagaagatttccagatgacttcatgtttggtacagctaccgcctcctaccaaata
21  Q E R R F P D D F M F G T A T A S Y Q I 40
gaaggaggatgggacgcagatggtaaagggaacatttgggattacatgactcacaat
41  E G G W D A D G K G E N I W D Y M T H N 60
aatgcagatgttatcaaagatttgggcaatggagatatcgagccgacacctacaataac
61  N A D V I K D L G N G D I A A D T Y N N 80
tataagagggacgtagagatgatgagagcttggacttgatgcctaccgcttttcgctc
81  Y K R D V E M M R E L G L D A Y R F S L 100
tcatgggcaagaatattgcctgaaggattctcgcacaaagtaaacgaggaaggtgtagc
101  S W A R I L P E G F S H K V N E E G V A 120
ttctacaacaactatattaatgaaatgctgaagtataacataaacctcttattactctt
121  F Y N N Y I N E M L K Y N I Q P L I T L 140
taccattgggatttaccacaaaaactgcaagaactcgggtgggttcgtcaatccactttt
141  Y H W D L P Q K L Q E L G G F V N P L F 160
tctgactggtttgaggattacgctcgggtagcttttgaccgtttcggtgacagagtaaag
161  S D W F E D Y A R V A F D R F G D R V K 180
ttttggatcacctttaacgagccaagagaatctgctatgaaggttatggttcagctacc
181  F W I T F N E P R E I C Y E G Y G S A T 200
aaagctccgatattgaatgctaccgctgggggcacatacctttgtgctaaaaaccttgtt
201  K A P I L N A T A G G T Y L C A K N L V 220
atcgcccatgctaaggcttaccatgctacaataaagactttaaacccactcaaaatgga
221  I G H A K A Y H A Y N K D F K P T Q N G 240
caatgtggcattaccatcagcgtgaattggttggcccgcgaccgattccgaagaggat
241  Q C G I T I S V N W F G P A T D S E E D 260
caaattgcagcggaactaagaagacaagcagaatggggtctttacgccgagcctattttc
261  Q I A A E L R R Q A E W G L Y A E P I F 280
tcccatgaagggtggtttccctaaagaattgtcggaacgtgttgccgccaagagcgctgag
281  S H E G G F P K E L S E R V A A K S A E 300
caaggctacgcctggtcacgaatgccttcattcatggatgaagaacgggacttagtcaag
301  Q G Y A W S R M P S F M D E E R D L V K 320
ggtagttttgatttcttcggtgtgaaccattatacagcagtggttggttcatcagcgaa
321  G S F D F F G V N H Y T A V L V S S A E 340
gaatacaaagtacagtatccggtcccgtcgctttatgatgattccgattcctacacatac
341  E Y K V Q Y P V P S L Y D D S D S Y T Y 360
actccagatgattggccacaatctgcttccatttgggtgaaattagcgccaaacagtatc
361  T P D D W P Q S A S I W L K L A P N S I 380
cacgagcattcacctttttgaaagacaaatacggcgatatacgacttctactgacagaa
381  H D A F T F L K D K Y G D I D F Y V T E 400
aatggctgggtcgacgactccacggctggtttgatagacgatgataggatacactat
401  N G W S T T P T A G L I D D D R I R Y Y 420
agggcagctctgaacagtgcttggatgagagaggccggtgtcaacattagagggtat
421  R A A L N S V L D A R E A G V N I R G Y 440
atggcctggagtctgatggacaacttcgagtggatggaaggctacacagaacggtttcggt
441  M A W S L M D N F E W M E G Y T E R F G 460
ttataccaagttagacttcgaggaccccgctcgtctcgtactcctcgcaaataccgcatc
461  L Y Q V D F E D P A R S R T P R K S A F 480
gtttacaagcatataatcaagaaccgcagcattgatcccgattacgagccagaatccctt
481  V Y K H I I K N R S I D P D Y E P E S L 500
acaatgaccattgacgatggattataaacaatacactagtgaattcgcgccgcctgcagg
501  T M T I D D G L - 508
tcgaccatatgggagagctcccaacgcg

```

Figura 05: Sequência da β -glicosidase A de *Diatraea saccharalis* (Ds β glyA). A seta indica o provável ponto de clivagem do peptídeo sinal. Sublinhado está o códon de parada. Em azul estão os peptídeos encontrados no sequenciamento de aminoácidos após a digestão com tripsina β gly1.

Tabela 01: Comparação entre a sequência de Ds β glyA com as outras seqüências de *Diatraea saccharalis* e de outras β -glicosidases de insetos encontradas no GenBank.

Seqüência similar	Número de acesso	Identidade	Similaridade
β -glicosidase <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera)	AF052729.1	71%	83%
β -glicosidase <i>Neotermes koshunensis</i> (Isoptera)	AB073638.2	47%	64%
β -glicosidase <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera)	AF312017.1	46%	65%
Tioglicosidase <i>Brevicoryne brassicae</i> (Hemiptera)	AF203780.1	45%	64%
Glicosidase <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	AY272037.1	44%	62%
Ds β glyB	-	41%	59%
Ds β glyC	-	50%	67%

Para as outras seqüências parciais, foram construídos novos iniciadores específicos (iniciadores 6, 7 e 8, ver Materiais e métodos), que pareariam na mesma região que o iniciador degenerado. Várias condições de PCR foram testadas, para que pudéssemos trabalhar com a melhor delas. Utilizando os iniciadores para as seqüências parciais 2 e 3 obtivemos bandas com o tamanho esperado (entre 1000 e 1500 pb) no gel de agarose (figuras 06 e 07) nas seguintes condições da PCR: 1mM MgCl₂, 30 ciclos, 56°C (seqüência parcial 02) e 52°C (seqüência parcial 02).

Figura 06: Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR realizado com iniciador específico para a sequência parcial 02. 1) padrão de peso molecular 2) Material amplificado após PCR a 56°C, 1,0 mM MgCl₂. A seta indica a banda recortada.

Figura 07: Eletroforese em gel de agarose dos produtos do PCR realizado com iniciador específico para a sequência parcial 03. 1) padrão de peso molecular 2) Material amplificado após PCR a 52°C, 1,0 mM MgCl₂. A seta indica a banda recortada.

As bandas foram recortadas do gel e o cDNA utilizado para ligação em plasmídeo e transformação das bactérias XL1-blue. Após sequenciamento desses clones, obtivemos grande parte da sequência total a partir dessas duas sequências parciais. Iniciadores internos (iniciadores 12, 13, 14 e 15, ver Materiais e métodos) também foram construídos para o sequenciamento interno do clone, como no caso de Ds β glyA. No entanto, para a sequência parcial 3, o iniciador direcionado à extremidade 5' do cDNA também será utilizado para PCRs tendo como molde a biblioteca de expressão obtida a partir do epitélio do intestino médio de *D. saccharalis* para podermos obter a sequência do cDNA até o códon ATG inicial.

A sequência completa conseguida a partir da sequência parcial 2 foi chamada Ds β glyB. Essa sequência contém 1636 pb que provavelmente codificam uma proteína de 503 aminoácidos, massa molecular predita de 57,5 kDa com peptídeo sinal de 20 aminoácidos (figura 08) e possui 4 possíveis sítios de glicosilação. As similaridades e identidades dessa proteína com β -glicosidases de outros insetos e de *D. saccharalis* estão expostas na tabela 02.

↓

```

1  atgacgcactctatTTTTTatcggtTTTaaactacttTgtaatctgccaaacatctctagct 20
   M T H S I F I G L T L L V I C Q T S L A
21  ggttacaccaaattCCCCgaaggcttcacattcggtgtagcaacagccgcacatcaaatc 40
   G Y T K F P E G F T F G V A T A A H Q I
41  gaaggtgcctggaatgTtagcggcaaataccgaaaatgtctgggatcgccTTTcccacact 60
   E G A W N V S G K S E N V W D R L S H T
61  cggcccgaaatgatcgctgatggcaccaatggTgacatcgcatgtgattcctacaaccgc 80
   R P E M I A D G T N G D I A C D S Y N R
81  tacctagaggacgtcgaggagcttgcgtatTTtaggagtggaacttctaccgTTTTTccttt 100
   Y L E D V E E L A Y L G V D F Y R F S F
101  tcctgggcacgtatcttgcCCcagcggtcgcgTggacttcatcaaccctgatggaattcga 120
   S W A R I L P S G R V D F I N P D G I R
121  tattaccacaatttactaaatgctTTTggctgagaaaaatatcgagtctctggTcacactc 140
   Y Y H N L L N A L A E K N I E S L V T L
141  ttccattgggacttaccgcaaactcttcaagatttaggaggatgggctaaccCcaaatg 160
   F H W D L P Q T L Q D L G G W A N P K M
161  gtggattatTTTccgcgactacgCCgacctTTTgcttcaaagaattcggaggcaaaatcaaa 180
   V D Y F R D Y A D L C F K E F G G K I K
181  tcatggatcacatTTTaaCGaaccatacgaattTgCGaagatgcttatggTgacgagaag 200
   S W I T F N E P Y E I C E D A Y G D E K
201  aaagcaccagccattgacagtcacggcgTtggttaactatTTgtgcagtatacccttcta 220
   K A P A I D S H G V G N Y L C S D T L L
221  aaggcgcatgctgaagcttaccatctTTtataatgaaacctaccgtactatccaaaatgga 240
   K A H A E A Y H L Y N E T Y R T I Q N G
241  aggattatgatttcaattaactccatctggTatgagcccagcgacCCcaataatgccgag 260
   R I M I S I N S I W Y E P S D P N N A E
261  caagtgactTTTggcagaagtagccaatcagttcaagTtcggttggtttgcacacCCcaata 280
   Q V T L A E V A N Q F K F G W F A H P I
281  ttaccgaggaaggtggttaccctaacgtcatgattgagaatgtagcagagcagagtgtct 300
   F T E E G G Y P N V M I E N V A E Q S A
301  gctgagggccttccaaaatcccgattggaacaattcaatcagtactggatccaacggatc 320
   A E G L P K G R L E Q F N Q Y W I Q R I
321  aagggcacgtctgactTTTctgggcatttaaccactacactacgcactcttataactggggcc 340
   K G T S D F L G I N H Y T T H L I T G A
341  ggtgtggatcctacagctaaatcaccatctTggctgaaggacattggagccgctcactact 360
   G V D P T A K S P S W L K D I G A V T T
361  atgaatgttggtggtgattcagcttcggaatggctgagggTggtaccgactgggtttgcc 380
   M N V G G D S A S E W L R V V P T G F A
381  aatttctgcgctggtgtaagagctcatataacgatccacctatTTacattacagagaat 400
   N F L R W C K S S Y N D P P I Y I T E N
401  ggcttctctgatcgTggtactTTtacaagactacggacgtattagttacttcaacgattat 420
   G F S D R G T L Q D Y G R I S Y F N D Y
421  ctaaccgaaattctcaacgtaatatacgaagacaatgtcaaggTattgggctacactgcg 440
   L T E I L N V I Y E D N V K V L G Y T A
441  tggacgctaattggacaacttCGaatggcgTgcaggTttctctgaacgTttcggttctat 460
   W T L M D N F E W R A G F S E R F G F Y
461  tacgtggatattacacaaccagacaggccTaggacaccaaagttatcagctgaatactat 480
   Y V D I T Q P D R P R T P K L S A E Y Y
481  cgccagctgctggccacacgcgagctaccacaagaagaccgTttcaaagatccaagtgtg 500
   R Q L L A T R E L P Q E D R F K D P S V
501  aggcctctatgaagcatggcatgacactagcctTgtatatagTttagctgatatgcaaga 503
   R P L -
   ttaattaaactgtttacactgtttgaaaataaataaaatgttgccctcgTgcc

```

Figura 08: Sequência de DsβgliB de *Diatraea saccharalis*. A seta indica o provável ponto de clivagem do peptídeo sinal. Sublinhado está o códon de parada.

Tabela 02: Comparação entre a sequência de Ds β glyB com as outras sequências de *Diatraea saccharalis* e de outras β -glicosidases de insetos encontradas no GenBank.

Sequência similar	Número de acesso	Identidade	Similaridade
Glicosidase <i>Bombyx mori</i> (Lepidoptera)	AY272037.1	82%	90%
β -glicosidase <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera)	AF312017.1	48%	64%
β -glicosidase <i>Neotermes koshunensis</i> (Isoptera)	AB073638.2	48%	64%
Ds β glyA	-	41%	59%
Ds β glyC	-	45%	64%

A maior sequência que conseguimos obter a partir da sequência parcial 03 foi chamada Ds β glyC. Para Ds β glyC não encontramos um peptídeo sinal, ou seja, não conseguimos amplificar nossa sequência até a metionina inicial, faltando aproximadamente 13 aminoácidos para completar a sequência da proteína completa. Como não conseguimos indentificar a clivagem do peptídeo sinal, acreditamos que não temos a sequência da proteína madura completa. A tabela 03 mostra as identidades e similaridades dessa sequência com outras encontradas para *D. saccharalis* e para outros insetos. Essa sequência de 1524 nucleotídeos provavelmente codifica uma proteína de 495 aminoácidos (figura 09), com massa molecular predita de 56,2kDa.

Tabela 03: Comparação entre a sequência de Ds β glyC com as outras sequências de *Diatraea saccharalis* e de outras β -glicosidases de insetos encontradas no GenBank.

Sequência similar	Número de acesso	Identidade	Similaridade
β -glicosidase <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera)	AF052729.1	54%	69%
β -glicosidase <i>Neotermes koshunensis</i> (Isoptera)	AB073638.2	49%	67%
β -glicosidase <i>Tenebrio molitor</i> (Coleoptera)	AF312017.1	48%	66%
Ds β glyA	-	50%	67%
Ds β glyB	-	45%	64%

```

cgcacgaggaaaggggtcaaacaacccgcagttttcctgaggactttttatattggagcttct
1  H E E R A Q T T R S F P E D F L F G A S 20
tctgccgcataatcaagttgaaggagggtggtgtgaagacggcaaggggttatcaatatgg
21  S A A Y Q V E G G W C E D G K G L S I W 40
gatatagccagccacactgtgccatctcctatagcaaattggcagcaccgggtgacgttgct
41  D I A S H T V P S P I A N G S T G D V A 60
gccgactcattccacctctataaaagagacgtagagattatgaaggaactaggtctagac
61  A D S F H L Y K R D V E I M K E L G L D 80
ttctacaggttctctatatcatggcccaggatcctaccgaatggattcgctaacaagatc
81  F Y R F S I S W P R I L P N G F A N K I 100
aaccatttgggcatcgattactataataaaactgataaacgaaatgcttgccaacaatatc
101  N H L G I D Y Y N K L I N E M L A N N I 120
acaccgttcgtaacaatttatcattgggaccttccttataatctgcagaagttaggaggg
121  T P F V T I Y H W D L P Y N L Q K L G G 140
tgggccaacccctctcatcgctcgattgggttcacagattactcgaagggttttatttgacagt
141  W A N P L I V D W F T D Y S K V L F D S 160
ttcggcgatagagttcgatattggataacaattaatgaacccaatttgatatgccatggt
161  F G D R V R Y W I T I N E P N L I C H G 180
ggttacggcggcgacttaaaaagcccctttccttaatttgactggagtaggggagtagacatt
181  G Y G G D L K A P F L N L T G V G E Y I 200
tgtgcgaagaacgtgttactcgctcacgctaattgtgtaccacttgtagataaggtatat
201  C A K N V L L A H A N V Y H L Y D K V Y 220
aggaaacagcaaaatggtactataggtatatcctttaagctgtacgtggtatgaaccagct
221  R K Q Q N G T I G I S L S C T W Y E P A 240
tcggatagtgaaagatgactatcaggccgctgtgaatgcaagacagtttgaaatgtggccaa
241  S D S E D D Y Q A A V N A R Q F E C G Q 260
tacgcccacatctatatattttctgttcaaggggattttccaatcgagatgaaattgaacata
261  Y A H P I F S V Q G D F P I E M K L N I 280
ggattaaagagcgcagtggaagggttccccagggtcccgtttaccggaactgtcagcagca
281  G L K S A W Q G F P R S R L P E L S A A 300
gaaatcgccatcatcagaggatcctcagatttcttcgggtctcaacgcgtacaccacaagg
301  E I A I I R G S S D F F G L N A Y T T R 320
tttacttacagagatacttctttagaaggaatgtatccagtgccgtcatatattggatgat
321  F T Y R D T S L E G M Y P V P S Y M D D 340
atggggagctggtatgatgacggatctgtcgtggccacagtcgcatgcaacttgggttacag
341  M G A G M M T D L S W P Q S H A T W L Q 360
gaagttccatgggggtttctacgaactgctggttgaaataaagaacttgtagaaaatccg
361  E V P W G F Y E L L V E I K N L Y E N P 380
ccagtgtatatagcggagaacggctggtctactgcaggcgggctagtggacgaagggtcgc
381  P V Y I A E N G W S T A G G L V D E G R 400
attgcttactataggagctacctgagtgctttgttggtggacgcagtagatgagggatgtgac
401  I A Y Y R S Y L S A L L D A V D E G C D 420
gtcagagcgtatgctacctggtcacttatggacaacttcgaatggaaaaatggctacaat
421  V R A Y A T W S L M D N F E W K N G Y N 440
gaaaagtttgggttatatgaagttgatttctccagcccggaaacgcaccagaaggcctaga
441  E K F G L Y E V D F S S P E R T R R P R 460
aagtctgcctacgtctacagagagatcatcagggtcgagacaactcaatctcagttacgaa
461  K S A Y V Y R E I I R S R Q L N L S Y E 480
ccagaagatttctgttgacgataacaacaataagggcggtttaaaaataaaccattgtttgta
481  P E D F V D D N N N K G V - 493
tgaaataaatatccctcgtgcc

```

Figura 09: Sequência da β -glicosidase C de *Diatraea saccharalis* (Ds β glyC). Sublinhado está o códon de parada.

Na tentativa de aumentar a seqüência parcial 4 (Figura 10), construídos 3 iniciadores, um localizado próximo a região do códon de parada da seqüência parcial clonada, outro localizado próximo à região 5' da seqüência parcial e outro localizado mais no meio da seqüência já existente (iniciadores 9, 10 e 11, ver Materiais e métodos). Para todos esses iniciadores diferentes temperaturas (50°C, 54°C, 56°C, 60°C e 62°C) foram testadas além de diferentes concentrações de $MgCl_2$ (1,5mM e 1,0mM), porém nenhuma reação amplificou o cDNA correspondente à seqüência parcial.

Além dessas tentativas, também foram construídos 3 iniciadores a partir das seqüências de peptídeos internos da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis* purificada por Azevedo *et al* (2003) (iniciadores 17, 18 e 19, ver materiais e métodos). Para tal, escolhemos seqüências de peptídeos que não fossem semelhantes as seqüências correspondentes aos cDNAs já encontrados e que não fossem semelhantes às seqüências de peptídeos internos da β -glicosidase 1 de *D. saccharalis*. Todas as reações foram feitas utilizando a biblioteca de cDNA de *D. saccharalis* como molde. Diversas temperaturas e concentrações de $MgCl_2$ foram testadas.

O primeiro iniciador testado (iniciador 17, ver materiais e métodos) foi construído utilizando a seqüência que mais se diferenciava das outras e as degenerações utilizadas foram baseadas naquelas mais comuns para o organismo em estudo. Conseguimos amplificar uma banda do tamanho esperado a partir de uma PCR na temperatura de 52°C e 1,5mM $MgCl_2$ (resultado não mostrado), mas no sequenciamento não obtivemos nenhum clone similar a uma β -glicosidase.

Construímos então novos iniciadores com todas as degenerações possíveis conhecidas para o código genético (iniciadores 18 e 19, ver materiais e métodos).

Utilizamos duas seqüências de peptídeos para tal, um dos iniciadores não amplificou nenhuma banda (iniciador 18) e o outro amplificou uma banda (iniciador 19, resultado não mostrado) a partir de uma PCR na temperatura de 52°C e 1,5mM MgCl₂ que após sequenciamento descobrimos não ser uma β-glicosidase.

Seqüência parcial 04

```
acttcgaatgggacgacggatatgtgtcccgccttcgggtctttatctggttgatttcaatagt
  F E W D D G Y V S R F G L Y L V D F N S
ccgaataagactaggacgccaagtactcagcgaaactatactcaggagtagtagcaaca
  P N K T R T P K Y S A K L Y S G V V A T
cgtcggtttgccagagaactatgatcctcgagacttcactgctttctcatcagcatccga
  R R L P E N Y D P R D F T A F S S A S R
atggccccggcaattctctctccaataactactctatacgatggttacactgacccctcgtgcc
  M A P A I L S P I L L Y T M L H -
```

Figura 10: Seqüência incompleta de β-glicosidase obtida a partir de biblioteca de cDNA do tubo digestivo de *Diatraea saccharalis*. O códon de parada está sublinhado.

Um alinhamento das seqüências obtidas aqui para as β-glicosidases de *D. saccharalis* e de outras β-glicosidases de insetos cujas seqüências estão depositadas no GenBank estão apresentadas na figura 11. As mesmas seqüências, mais uma de *Caenorhabditis elegans* foram usadas para a obtenção de um cladograma (figura 12).

Figura 11

bombyx -----MAWLTTLSILAVCHTGLAAYT-----KFPEGF'TFGVATASHQIEGAWN
 DsBglyB ----MTHSIFIGLTLLVICQ'TSLAGYT-----KFPEGF'TFGVATAAHQIEGAWN
 neotermes ----MWVHTFFFVILLVVVSGARRDVASSDT-----VYTFPDEFKLGAAATASYQIEGAWD
 tenebrio -----ARGAILLVICASTITLADVPD-----YYFPDGFVFGAATAAYQVEGGWD
 Brevicoryne -----MDYKFPKDFMFGTSTASYQIEGGWN
 leucophaea MFWLVSQLLYFPRDAHCLADIPSEAILDNNIPLINNLTFPDGFLFGAATAAYQIEGAWN
 spodoptera ----MKLLVVL'SLVAACNASIVRQQ-----RRFPDDFLFGTATASYQIEGAWD
 DsBglyA ----MKLAIIVGLFVVS'CAAKTVRQE-----RRFPDDFMFGTATASYQIEGGWD
 DsBglyC -----XAHEERAQTT-----RSFPEDFLFGASSAAYQVEGGWC
 *. * : * : : : : * *

bombyx VSGKSENVWDR'LTHTRPEMIADGTNGDVACDSYHRYLEDVEELTYLGVDFYRFSLSWSRI
 DsBglyB VSGKSENVWDR'LSHTRPEMIADGTNGDIACDSYNRYLEDVEELAYLGVDFYRFSFSWARI
 neotermes ENGKGPN'IDWTLTHEHPDYVVDGATGDIADDSYHLYKEDVKILKELGAQVYRFSISWARV
 tenebrio EDGKGESIWDRGTHEHADWVADNSNGDIACDSYHLYKEDVQMLKTLGVNFYRFSIAWSRV
 Brevicoryne EDGKGENIWDR'LVT'SPEVIKDG'TNGDIACDSYHLYKEDVAIIKDLNLKFYRFSISWARI
 leucophaea VDGKGPSIWDEF'THTHPEIITDHSTGDDACKSYKYKEDVQAAKTMGLDSYRFSMSWPRI
 spodoptera EDGKGENIW'DYMVHNTPEVIRDL'SNGDIAADSYHNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARI
 DsBglyA ADGKGENIW'DYMTHNNADV'IKDLGNGDIAADTYNNYKRDVEMMRELGLDAYRFSLSWARI
 DsBglyC EDGKGLSIW'DIASHTVPSP'IANGSTGDVAADSFHLYKRDVEIMKELGLDFYRFSISWPRI
 *. * . : * * * . : : * * * . : : * * * : . . * * * : : * *

bombyx LPTGFS'DHVNPDGIRYYNALLDALAEKNIEPLVTLFHWDL'PQSLQDLGGWTNSKTVDYFR
 DsBglyB LPSGRVDFINPDGIRYYHNLNLAELKNIE'SLVT'LFHWDL'PQTLQDLGGWANPKMVDYFR
 neotermes LPEGHDN'IVNQDGIDYNNLINELLANGIEPMVTMYHWDL'PQALQDLGGWPNLVLAKEYSE
 tenebrio LPTGKADEVNQAGIDYNNLIDELLANDIEPYVTMFWHDL'PQPLQDEGGWPDRLADYFV
 Brevicoryne APSGVMNSLEPKGIAYNNLINELIKNDIIPLV'TMYHWDL'PQYLQDLGGWVNPIMSDYFK
 leucophaea MPTGFPDNI'NQKIDYNNLINELVDNGIMPLVTMYHWDL'PQNLQTYGGWLNESIVPLYV
 spodoptera LPTGMANEVN'PAGIAFYNNYIDEMLKYNITPLITLYHWDL'PQKLQELGGFANPLISDWFE
 DsBglyA LPEGF'SHKVNEEGVAFYNNYINEMLKYNIQPLITLYHWDL'PQKLQELGGFVNPLFSDWFE
 DsBglyC LPNGFANKINHLGIDYNNKLINEMLANNITP'FVTIYHWDL'PYNLQKLGGWANPLIVDWFT
 * * . : : * : : : : . * . : : : * * * * * * * * * : :

bombyx DYS'DVCYREFGDKIKSWITINEPYEV'CEDAYGDIKKAPALDSHGIGNYLCSDNLLKAHAE
 DsBglyB DYADLCFKEFGGKIKSWITINEPYE'ICEDAYGDEKKAPAI'DSHGVGNLYCSDTLLKAHAE
 neotermes NYARVLF'KNFGDRVKLWLTINEP'LT'FMDGYASEIGMAPSINTPGIGDYLAHTVIAHAR
 tenebrio DYARVLF'ENFGDRIKYWMTINEPIMQ'ICEAGYSGGSFAPYISNPGVGGYECHTHTVLLAHGR
 Brevicoryne EYARVLF'TYFGDRVKWWITINEP'IAVCKG-YSIKAYAPN'LNKTTGHYLAGHTQLIAHGK
 leucophaea SYARVLF'ENFGDRVKWWLTINEPQ'FVSLG-YEFRVMAPGIFTNGTGPYIASTNVLKAHAR
 spodoptera DYARVVF'ENFGDRVKMFITINEPRE'ICFEGYGSATKAPILNATAMGAYLCAKNLVTAHAK
 DsBglyA DYARVAF'DRFGDRVKFWITINEPRE'ICYEGYGSATKAPILNATAGGTYLCAKNLVIGHAK
 DsBglyC DYSKVLFD'SFGDRVRYWITINEPNL'ICHGGYGGDLKAPFLNLTGVGEYICAKNVLLAHAN
 . * : : : * * . : : : : * * . * * : * * . : : * *

Continuação Figura 11

bombyx	SYHLYNEKYRPTQNGTVMISINSIWIYEPSPDENAEQVALAETANQFKFGWFAHPIFTNEG
DsBglyB	AYHLYNETYRTIQNGRIMISINSIWIYEPSPDNNAEQVTLAEVANQFKFGWFAHPIFTEEG
neotermes	IYHLYDQEFRAEQGGKVGISLNNINWCEP-ATNSAEDRASCENYQQFNLGLYAHPIFTEEG
tenebrio	TYRLYDSDFRAEQNGQIGIAIDSYWHEPNYADRETDQEASEVDMQLNYGWFVNPFIN--G
Brevicoryne	AYRLYEEMFKPTQNGKISISISISGVFFMPKNAESDDDIETAERANQFERGWFGHPVY--KG
leucophaea	AYHMYDEEFRESQKGKISIAPNIMWGLPVNVTSLDDWEATARYLLFYAGWFTDPIYGKDG
spodoptera	AYLYDREFRPVQGGQCGITISVNWFGP-ATPTPEDEMAAELRRQGEWGIYAHPIFSAEG
DsBglyA	AYHAYNKDFKPTQNGQCGITISVNWFGP-ATDSEEDQIAAELRRQAEWGLYAEPIFSHEG
DsBglyC	VYHLYDKVYRKQQNGTIGISLSCTWYEP-ASDSEDDYQAAVNARQFECGQYAHPIFSVQG
	* *: : * * *: . : * : * : . * *
bombyx	GYPEVMIENVAKQSAAEGFSKPRLEQFDDYWIQRIKGTSDFLGINHYATHLITGPGIDPI
DsBglyB	GYPNVMIEENVAEQSAAEGLPKSRLEQFNQYWIQRIKGTSDFLGINHYTTHLITGAGVDPT
neotermes	DYPAVLKDRVSRNSADEGYTDSRLPQFTAEEVEYIRGTHDFLGINFYTA--LLGKSGVEG
tenebrio	NYPEVMIERVKANSLAEGYPQSRLEPFTADEQEMMGTFDFLGLNHYSSDKVYFAEDGAG
Brevicoryne	DYPPIMKKWVDQKSKEEGLPWSKLPKFTKDEIKLLKGTADFYALNHYSS-RLVTFGSDPN
leucophaea	DYPKVMRESIAENSKRQGFPSKRLPTFTTEEEKNYIKGTADYAFNAYTA-FLVNKSNNTEN
spodoptera	GFPKELSDKIAEKSAQQGYPWSRLPEFTTEEEKAFVRGTSDLIGVNHYTAFLVS-ATERKG
DsBglyA	GFPKELSERVAAKSAEQGYAWSRMPFSFMDDEERDLVKGSFDFFGVNHYTAVLVSSAEYK
DsBglyC	DFPIEMKLNIGLKSAAWQGFPRSRLELSAAEIAIIRGSSDFFGLNAYTTRFTYRDTSLG
	. : * : : : * : * . . : : : : : * : . * * : :
bombyx	AK-SPSWLKDTGSITSLEVGGDS--ASEWLRVVPTGFANLLRWCKSSYNBP-PIYITENG
DsBglyB	AK-SPSWLKDIGAVTTMNVGGDS--ASEWLRVVPTGFANFLRWCKSSYNBP-PIYITENG
neotermes	Y--EPSRYRDSGVILTQDAAWPIS-ASSWLKVVPWGFRKELNWKIKNYNNP-PVFIITENG
tenebrio	D--HPSHWADTGVIGYQDASWPGS-ASSWLKVVPWGLNKLVLWIKDHYDNP-PVLIITENG
Brevicoryne	----PNFNPDASYVTSVDEAWLKPNETPYIIPVPEGLRKLLIWLKNEYGNP-QLLIITENG
leucophaea	L--TPSWAHDLAISAYEGSNWLISNTSSWESVAPISLRSIMNWITGRYGNKYELFIITENG
spodoptera	PYPVPSLLDDVDTGSWADDSWLKS-ASAWLTLAPNSIHTALTHLNNLYNKP-VFYIITENG
DsBglyA	QYPVPSLYDDSDSYTYTPDDWPQS-ASIWLKLAPNSIHDAFTFLKDKYGDI-DFYVITENG
DsBglyC	MYPVPSYMDDMGAMMTDLSWPQS-HATWLQEVWPWGFYELLVEIKNLYENP-PVYIAENG
	* . * : : . * : : : . . * . . : : *
bombyx	FSDRG---TLQDYGRIQYYNDYLSAILDVIYDDGVRVLGYTAWTLMDNFEWRAGFTEPF
DsBglyB	FSDRG---TLQDYGRISYFNDYLTEILNVIYEDNVKVLGYTAWTLMDNFEWRAGFSERF
neotermes	FSDYG---GLNDTGRVHYYTEHLKEMLKAIHEDGVNVIGYTAWSLMDNFEWLRGYSEKF
tenebrio	FSDTG---ELDDYDRANYKQYLYEILKAINEEECNVIGYTAWSLMDNFEWMAGYTQRF
Brevicoryne	YGDDG---QLDDFEKISYLKNYLNATLQAMYEDKCNVIGYTVWSLLDNFEWFYGYSIHF
leucophaea	FADKG---QLNDTKRITYLATYLTEVLKAIFIDEIKMKALTVWSLIDNFEWADGYTSKW
spodoptera	WSTDESRENSLIDDDRIQYYRASMESLLNCL-DDGINLKGYMAWSLMDNFEWMEGYIERF
DsBglyA	WSTTPTAG--LIDDDRIRYRAALNSVLDAR-EAGVNIRGYMAWSLMDNFEWMEGYTERF
DsBglyC	WSTAG-G--LVDEGRIAYRSYLSALLDAV-DEGCDVRAYATWSLMDNFEWKNGYNEKF
	: . * * : * : * . : . . * : : * : :

```

bombyx      GFYHVDITDPDLPRTPKLSAD----IIAAR-----RHRDC-----PGRAV--
DsBglyB     GFYYVDITQPDRPRTPKLSAEYYRQLLATRELPQEDRFKDP-----SVRPL--
neotermes   GIYAVDFEDPARPRIPKESAKVLAIEIMNTRKIP--ERFRD-----
tenebrio    GMHYVDFDDPERPRTKRLSSYVYNNIITTRHVD--WDYYPD-----WPPTQENKN-
Brevicoryne GLVKIDFNDPQRTTRTKRESYTYFKNVVSTGKP-----
leucophaea  GLYHVDFNDPERKRTPKASSHFMENTVSTRKVP--KKFLPLDVTIDLLTLWPRSEDGLKR
spodoptera  GLYEVD FSDPARTRTPRKA AFVYKHIIKHRVVD--YEYEPE-----TMVMTIDEGH--
DsBglyA     GLYQVDFEDPARSRTPRKSAFVYKHIIKNRSID--PDYEPE-----SLTMTIDDGL-T
DsBglyC     GLYEVD FSSPERTRRPRKSAYVYREIIRSRLN--LSYEPE-----DFVDDNNNKGV-
          *:  **: .*  *  :  :  :

bombyx      -----
DsBglyB     -----
neotermes   -----
tenebrio    -----
Brevicoryne -----
leucophaea  VSFV-----
spodoptera  -----
DsBglyA     ITSEFAAACRSTIWESSQR
DsBglyC     -----

```

Figura 11: Alinhamento de sequências de β -glicosidases de insetos. As seqüências com os respectivos códigos do GenBank são: Leucophaea: β -glicosidase de *Leucophaea maderae* (AY064214.1); Brevicoryne: S-glicosidase de *Brevicoryne brassicae* (AF203780.1); Neotermes: β -glicosidase de *Neotermes koshunensis* (AB073638.2); Tenebrio: β -glicosidase de *Tenebrio molitor* (AF312017.1); Bombyx: β -glicosidase de *Bombyx mori* (AY272037.1); Ds β glyA, Ds β glyB, Ds β glyC: seqüências obtidas nesse trabalho; Spodoptera: β -glicosidase de *Spodoptera frugiperda* (AF052729.1). *,:e. indicam resíduos idênticos, altamente conservados e pouco conservados, respectivamente. As caixas mostram as regiões conservadas que contém os resíduos de glutamato catalíticos. Em vermelho estão indicados os resíduos envolvidos na ligação com o substrato. Em verde, Tyr 180 e Lys 173 de *B.brassicae*. Em rosa estão os resíduos encontrados por espectrometria de massa referentes à enzima 01 em Ds β glyA. Em azul temos as seqüências encontradas por espectrometria de massa na enzima 02 em Ds β glyC.

Figura 12: Cladograma das seqüências de β -glicosidases de insetos depositadas no GenBank e das enzimas de *Diatraea saccharalis*. Os números correspondem ao código do depósito no GenBank.

4.2. Separação das β -glicosidases intestinais de *Diatraea saccharalis*

Sabe-se que existem 3 β -glicosidases digestivas em *D. saccharalis*. Elas já haviam sido purificadas em nosso laboratório anteriormente e sua especificidade determinada (Azevedo *et al.*, 2003). No entanto a marcha de purificação utilizada não pôde ser repetida devido à descontinuidade por parte dos fornecedores de algumas colunas utilizadas nessa purificação. Para nosso estudo cinético, o importante é que uma β -glicosidase não contamine a outra e assim utilizamos um novo método para a separação dessas enzimas, baseado no desenvolvido por Blanes (2004), com algumas modificações que permitiram uma melhor resolução das proteínas. Esse método consiste em passar, inicialmente, a amostra obtida como descrito no item 2.3 por uma coluna HiTrap Desalting para que o homogeneizado possa estar em tampão etanolamina 20 mM pH 9,5. Após eluição das proteínas da coluna, há só um pico com atividade sobre NP β glu (figura 13). As frações mais ativas foram reunidas e submetidas a uma cromatografia de troca iônica em mono Q, de onde novamente só um pico com atividade β -glicosidásica é obtida (Figura 14). As frações mais ativas são reunidas e aplicadas em uma cromatografia de interação hidrofóbica, onde se observam agora 3 picos com atividade sobre NP β glu (Figura 15).

Figura 13: Atividade sobre NPβglu nas frações obtidas após cromatografia de troca iônica (HitrapQ) do material obtido como descrito no item 3.2 em sistema de baixa pressão. Foram reunidas as frações de 14 a 19.

Figura 14: Atividade sobre NP β glu nas frações obtidas após cromatografia de troca iônica (MonoQ) em sistema FPLC. Foram reunidas as frações 41 e 42.

Figura 15: Determinação de atividades sobre NPβglu (azul) a sinigrina (rosa) nas frações obtidas após cromatografia de interação hidrofóbica (Resource Phenyl) em sistema FPLC. Foram reunidas as frações de 43 a 47.

Esse conjunto de cromatografias faz com que cada β-glicosidase não fique pura como proteína (uma segunda banda é detectada), mas apenas uma β-glicosidase está presente em cada preparação (resultados não mostrados).

As frações mais ativas de cada um dos picos mostrados na figura 15 foram reunidas e utilizadas no tratamento com tripsina e sequenciamento.

4.3. Sequenciamento de peptídeos oriundos das β-glicosidases encontradas de *D. saccharalis*

As frações mais ativas das três β-glicosidases resolvidas como descrito no item anterior foram reunidas e submetidas a uma eletroforese contendo SDS. Após

coloração com Comassie Blue-R, as bandas relativas as proteínas foram enviadas ao Prof. José César Rosa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A análise por espectrometria de massa da β -glicosidase que é eluída primeiro na cromatografia apresentada na figura 15, gerou a sequência de 2 peptídeos internos, além de seu padrão de clivagem por digestão trípica (figura 16).

Os seguintes peptídeos foram encontrados, sendo que nenhum dos 2 está localizado em regiões conservadas para as β -glicosidases, podendo então ser utilizados para relacionar a proteína com uma das seqüências de nucleotídeos encontradas:

- Met – Pro – Ser – Phe – Met – Asp – Glu – Glu – Arg
- Phe – Trp – Ile – Thr – Phe – Asn – Glu – Pro – Arg

Uma amostra referente à β -glicosidase que apresenta atividade sobre NP β glu e sinigrina (figura 15) também foi enviada ao Prof. José César nos fornecendo 4 seqüências de peptídeos internos para essa proteína, além do padrão de digestão com tripsina (figura 17).

Os peptídeos encontrados para a enzima 2 foram os seguintes, sendo que para os aminoácidos entre colchetes, a ordem em que aparecem não pôde ser deduzida:

- Phe – Ser – Leu – Ser – Trp – Pro – Arg
- Glu – Leu – Gly – Val – Asp – Phe – Tyr – Arg
- [Ala – Tyr] – His – Asp – Leu – Thr – Pro – His – Met – Cys – Arg
- [Phe – Gly] – Leu – Tyr – Glu – Val – Asp – Phe – Ser – Thr – Leu – Leu – Arg

Não conseguimos obter quantidade suficiente de proteínas para fazer a mesma análise com a β -glicosidase que é eluída por ultimo da cromatografia de interação hidrofóbica (figura 15).

Protein 58K beta-glicosidase *Diatraea saccharalis* , in situ tryp.dig. 30ul 60%MeOH, 5%Formic ac. nanoflw

2006-ALEXANDRA-IQ-003 1 (1.035) Mk [Ev-135601,lt10,En1] (0.300,3,Cmp); Sb (15,10.00)

Scan ES+
2.61e7

Figura 16: Espectro de massa após digestão da β -glicosidase 01 de *Diatraea saccharalis* com tripsina .

Amostra 2 2a.prep. in situ tryp. poros, 30ul 60%MeOH/5%formic.ac. nflw

2007-ALEXANDRA-IQ3-02 1 (1.033) Sm (SG, 3x0.30)

Scan ES+
1.63e7

Figura 17: Espectro de massa após digestão da β -glicosidase 02 de *Diatraea saccharalis* com tripsina .

4.4. Hidrólise de O- e S-glicosídeos pela β -glicosidase 2

A β -glicosidase aparentemente capaz de clivar O- e S- glicosídeos foi denominada β -glucosidase 2 por Azevedo e colaboradores (2003).

Uma inativação térmica realizada com material semi-purificado foi realizada por Blanes (2004) e mostrou a mesma cinética de uma inativação à 52°C quando usada NP β glu ou sinigrina como substrato.

Nós reunimos as frações mais ativas capazes de clivar 2 substratos após a cromatografia hidrofóbica apresentada na figura 15 e determinamos a inativação causada por EDC na enzima que cliva cada um dos substratos. Os resultados estão apresentados na figura 18, e com qualquer substrato nós obtivemos um k_{obs} de $0,006^{-1}$.

Figura 18: Modificação química da β -glicosidase 2 de *Diatraea saccharalis* por EDC.

Para comparar os sítios ativos em que NP β glu e sinigrina são hidrolisados, foram feitos experimentos de competição entre os dois. Quando sinigrina é usada para inibir a hidrólise de NP β gal, o K_i obtido é de $1,1 \pm 0,2$ mM (figura 19). Esse valor é semelhante ao valor obtido para o K_m de sinigrina ($1,4 \pm 0,2$ mM) quando se usa a mesma fonte de enzima (figura 20).

NP β gal como inibidor da hidrólise de sinigrina, tem um K_i de $0,47 \pm 0,1$ mM (figura 21) enquanto seu K_m é de $0,55 \pm 0,05$ mM (Azevedo *et al.*, 2003).

Figura 19: A) Plote de Lineweaver-Burk para ensaio em diferentes concentrações de PN β gal na presença de diferentes concentrações de sinigrina. B) Plote das inclinações das retas para as diferentes concentrações de sinigrina.

Figura 20: Plote de Lineweaver-Burk para ensaio sobre sinigrina com a β -glicosidase 02 de *Diatraea saccharalis*.

Figura 21: A) Plote de Lineweaver-Burk para ensaio em diferentes concentrações de sinigrina na presença de diferentes concentrações de PNβgal. B) Plote das inclinações das retas para as diferentes concentrações de PNβgal.

4.5. Criação de *D. saccharalis* em dietas contendo mandelonitrila

Como a relação entre a atividade das β -glicosíadas é alterada quando a dieta contém amigdalina (glicose- β -1,6 glicose- β -mandelonitrila) (Ferreira *et al.*, 1997), mandelonitrila poderia ser o sinal para essa alteração. Por isso, decidimos crescer as larvas na presença dessa substância para verificar se o mesmo efeito era observado.

Inicialmente criamos as larvas em duas concentrações de mandelonitrila: 0,02% e 0,05%. As larvas criadas nas duas concentrações foram pesadas (figura 22) e a taxa de mortalidade também foi calculada (figura 23). Pudemos observar que as larvas criadas na dieta contendo 0,02% de mandelonitrila não tiveram modificação nem em seu peso, nem na taxa de mortalidade das larvas. Já os animais criados em dieta contendo 0,05% de mandelonitrila apresentaram uma grande redução no tamanho e a grande maioria morreu quando entrou em contato com o alimento.

Figura 22: Comparação dos pesos das larvas de *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo ou não diferentes concentrações de mandelonitrila ao longo de seu desenvolvimento (mg/larva).

Figura 23: Comparação da mortalidade encontrada entre as larvas de *Diatraea saccharalis* criadas em dieta artificial contendo diferentes concentrações de mandelonitrila ao decorrer de seu desenvolvimento. É considerado 100% o total de larvas esperadas nos experimentos (30 larvas).

Para podermos ter animais suficientes para a purificação e detecção das β -glucosidases, optamos por criar os animais em uma concentração de mandelonitrila intermediária, 0,035%. Os animais criados nessas condições não apresentaram diferenças quando comparados com as larvas controle na taxa de mortalidade nem no tamanho. Nada foi alterado também na relação entre as atividades das várias β -glicosidases. (figura 23).

Pelos resultados obtidos, em experimentos futuros usando dietas com mandelonitrila teremos que utilizar um grande número de animais para que seja possível obtermos enzima em quantidade suficiente após a mortalidade e a diminuição de tamanho dos animais.

Será necessário também verificar se a relação entre as várias β -glicosidases foi alterada. No bruchideo *Callisobruchus maculatus*, foi visto que só sobrevivem em dietas com alto nível de vicina (um β -glicosídeo tóxico) os indivíduos que são recessivos para o gene de β -glicosidase. Assim, os insetos desenvolveram-se normalmente ou morrem dependendo de sua imposição genética (Desroches *et al.*, 1997).

4.6. Sequenciamento aleatório de clones da biblioteca de cDNA

Em nosso laboratório temos uma biblioteca de cDNA feita a partir do epitélio do intestino médio de *D. saccharalis*.

Nós decidimos iniciar essa varredura porque *D. saccharalis* é um modelo interessante para estudar alguns aspectos relacionados à digestão, além de ser uma importante praga agrícola. Por isso, seria interessante conhecermos mais sobre os aspectos moleculares do seu tubo digestório.

Para isso, iniciamos uma determinação do transcriptoma do intestino médio de *D. saccharalis*. Nós obtivemos e sequenciamos 192 clones, mas apenas 94 foram considerados, porque os demais tinham um valor de e-value menor que 10^{-5} .

O grau de novidade obtido nos vários sequenciamentos continua alto o que era de se esperar pelas poucas seqüências analisadas até o momento (figura 24).

Figura 24: Taxa de novidade nos sequenciamentos. O grau de novidade é determinado a partir do surgimento de bases novas incorporadas à seqüências já existentes ou à novas seqüências.

Das 94 seqüências, 81 delas são seqüências únicas e 41 delas não tem similaridade com outras proteínas conhecidas (tabela 04). É interessante mencionar que a seqüência formada pelo maior número de seqüências parciais (17), não tem similaridade com nenhuma proteína conhecida. Essa é uma seqüência que deve ser terminada, pois elas deve ser importante no intestino médio da larva de *D. saccharalis*, a julgar pela representatividade.

Tabela 04: Clusters encontrados para o tubo digestivo de *Diatraea saccharalis*.

Cluster	Número de seqüências para formar o contig	Maior similaridade	E-value	Proteína Correspondente	Classe/Função
1	17	Sem similaridade	-	-	-
2	5	cytochrome oxidase subunit I [Thyridia psidii]	10^{-144}	citocromo	Metabolismo energético
3	3	allergen [Periplaneta americana]	5×10^{-15}	Alérgeno	desconhecida
4	3	chymotrypsin-like serine protease [Ostrinia nubilalis]	2×10^{-87}	quimotripsina	protease
5	3	cytochrome b [Ostrinia nubilalis]	10^{-115}	citocromo	Metabolismo energético
6	3	NADH dehydrogenase subunit 4 [Ostrinia nubilalis]	4×10^{-90}	NADH desidrogenase	Metabolismo energético
7	2	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) [Xenopus tropicalis]	8×10^{-15}		Maquinaria de transcrição
8	2	chymotrypsin-like protease [Helicoverpa armigera]	2×10^{-74}	quimotripsina	protease
9	2	cytochrome c oxidase subunit III [Adoxophyes honmai]	8×10^{-88}		Metabolismo energético
10	2	lipase 1 precursor [Aedes aegypti]	4×10^{-38}	lipase	Metabolismo de lipídeos
11	2	trypsin-like serine protease [Ostrinia nubilalis]	4×10^{-65}	tripsina	protease
12	2	Sem similaridade	-	-	-
13	2	Sem similaridade			
14	1	Ac1147-like protein [Diaphorina citri]	2×10^{-019}		?
15	1	actin [Aedes aegypti]	5×10^{-068}	actina	citoesqueleto
16	1	alpha-amylase 3 [Diatraea saccharalis]	3×10^{-053}	-	Metabolismo de carboidratos
17	1	ADP/ATP translocase [Apis mellifera]	6×10^{-013}	-	Metabolismo energético
18	1	ADP/ATP translocase [Bombyx mori]	5×10^{-093}	-	Metabolismo energético
19	1	ATP synthase subunit c [Manduca sexta]	2×10^{-013}	-	Metabolismo energético
20	1	beta tubulin [Culex pipiens pipiens]	7×10^{-061}	-	citoesqueleto

Cluster	Número de seqüências para formar o contig	Maior similaridade	E-value	Proteína Correspondente	Classe/Função
21	1	carbonic anhydrase [Aedes aegypti]	1×10^{-040}	-	Metabolismo energético
22	1	chorion b-ZIP transcription factor [Bombyx mori]	3×10^{-034}	Fator de transcrição	Síntese de proteínas
23	1	diverged serine protease [Helicoverpa armigera]	2×10^{-031}	-	protease
24	1	ENSANGP00000017945 [Anopheles gambiae str. PEST]	4×10^{-027}	lipase	Metabolismo de lipídeos
25	1	ENSANGP00000020582 [Anopheles gambiae str. PEST]	2×10^{-030}	Glicosil transferase	Metabolismo de carboidratos
26	1	Fatty acid-binding protein 1 (FABP 1)	8×10^{-017}	-	Metabolismo de lipídeos?
27	1	FK506-binding protein [Manduca sexta]	2×10^{-024}	Peptidylprolyl isomerase	-
28	1	GA20334-PA [Drosophila pseudoobscura]	2×10^{-19}	Dipeptidyl aminopeptidase III	protease
29	1	GA21326-PA [Drosophila pseudoobscura]	1×10^{-019}	Transportador de fosfato sodio dependente	Transportador/ depósito
30	1	GA21464-PA [Drosophila pseudoobscura]	3×10^{-005}	poligalacturonase	metabolismo de carboidratos
31	1	gelsolin - American lobster	1×10^{-29}	gelsolina	Secreção
32	1	heat shock cognate 70 protein [Trichoplusia ni]	4×10^{-046}	-	resistência
33	1	lipase 1 precursor [Aedes aegypti]	2×10^{-055}	lipase	Metabolismo de lipídeos
34	1	NADP-dependent oxidoreductase [Bombyx mori]	1×10^{-082}	Álcool desidrogenase	Metabolismo energético
35	1	NADH dehydrogenase subunit 1 [Diatraea grandiosella]	5×10^{-087}		Metabolismo energético
36	1	peritrophic membrane chitin binding protein [Trichoplusia ni]	1×10^{-006}	-	Membrana peritrófica
37	1	potassium coupled amino acid transporter [Manduca sexta]	5×10^{-032}	-	Transportador (aminoácidos)/depósito
38	1	phosphate transport protein [Bombyx mori]	3×10^{-044}	-	Transportador/depósito

Cluster	Número de seqüências para formar o contig	Maior similaridade	E-value	Proteína Correspondente	Classe/Função
39	1	PREDICTED: similar to allantoicase [Strongylocentrotus purpuratus]	1×10^{-008}	catalyzes the conversion of allantoate into ureidoglycolate and urea	Degradação de purinas à uréia/metabolismo de aa
40	1	PREDICTED: similar to Centaurin beta 1 (Cnt-b1) [Danio rerio]	6×10^{-005}	a GTPase-activating protein	Transdução de sinal
41	1	PREDICTED: similar to CG3734-PA [Apis mellifera]	4×10^{-025}	Carboxipeptidase lisossomal	protease
42	1	PREDICTED: similar to CG5946-PB, isoform B [Tribolium castaneum]	2×10^{-073}	Citocromo b redutase	Metabolismo energético
43	1	PREDICTED: similar to CG9865-PA, isoform A [Tribolium castaneum]	5×10^{-018}	Glicosil transferase	Metabolismo de carboidratos
44	1	PREDICTED: similar to CG31871-PA [Tribolium - castaneum]	3×10^{-010}	lipase	Metabolismo de lipídeos
45	1	30kP protease A (43k peptide) precursor [Bombyx mori]	2×10^{-044}	Serina protease	protease
46	1	30kP protease A (43k peptide) precursor [Bombyx mori]	6×10^{-036}	quimotripsina	protease
47	1	Ribonucleas e E and G [Marinobacter aquaeolei VT8]	5×10^{-004}	-	Síntese de proteínas
48	1	ribosomal protein S25 [Spodoptera frugiperda]	1×10^{-039}	-	Síntese de proteínas
49	1	ribosomal protein S16 [Spodoptera frugiperda]	3×10^{-067}	-	Síntese de proteínas
50	1	ribosomal protein S2 [Danio rerio]	1×10^{-080}	-	Síntese de proteínas
51	1	syndecan binding protein [Bombyx mori]	7×10^{-053}	-	?
52	1	unknown [Schistosoma japonicum]	5×10^{-018}	Transportador integral de membrana	Tranportador/depósito
53	1	vacuolar ATP synthase subunit G [Bombyx mori]	2×10^{-28}	ATP sintase	Metabolismo energético
54	1	Sem similaridade	-	-	-
55	1	Sem similaridade	-	-	-

Cluster	Número de seqüências para formar o contig	Maior similaridade	E-value	Proteína Correspondente	Classe/Função
56	1	Sem similaridade	-	-	-
57	1	Sem similaridade	-	-	-
58	1	Sem similaridade	-	-	-
59	1	Sem similaridade	-	-	-
60	1	Sem similaridade	-	-	-
61	1	Sem similaridade	-	-	-
62	1	Sem similaridade	-	-	-
63	1	Sem similaridade	-	-	-
64	1	Sem similaridade	-	-	-
65	1	Sem similaridade	-	-	-
66	1	Sem similaridade	-	-	-
67	1	Sem similaridade	-	-	-
68	1	Sem similaridade	-	-	-
69	1	Sem similaridade	-	-	-
70	1	Sem similaridade	-	-	-
71	1	Sem similaridade	-	-	-
72	1	Sem similaridade	-	-	-
73	1	Sem similaridade	-	-	-
74	1	Sem similaridade	-	-	-
75	1	Sem similaridade	-	-	-
76	1	Sem similaridade	-	-	-
77	1	Sem similaridade	-	-	-
78	1	Sem similaridade	-	-	-

Cluster	Número de seqüências para formar o contig	Maior similaridade	E-value	Proteína Correspondente	Classe/Função
79	1	Sem similaridade	-	-	-
80	1	Sem similaridade	-	-	-
81	1	Sem similaridade	-	-	-
82	1	Sem similaridade	-	-	-
83	1	Sem similaridade	-	-	-
84	1	Sem similaridade	-	-	-
85	1	Sem similaridade	-	-	-
86	1	Sem similaridade	-	-	-
87	1	Sem similaridade	-	-	-
88	1	Sem similaridade	-	-	-
89	1	Sem similaridade	-	-	-
90	1	Sem similaridade	-	-	-
91	1	Sem similaridade	-	-	-
92	1	Sem similaridade	-	-	-
93	1	Sem similaridade	-	-	-
94	1	Sem similaridade	-	-	-

Três seqüências parciais formaram uma sequência semelhante ao alérgeno de barata (*Periplaneta americana*). Essa proteína é bastante encontrada nas preparações de membranas microvilares do Coleoptera *Tenebrio molitor* e recentemente foi proposta que sua função seria de ajudar na montagem da membrana peritrófica (Ferreira *et al.*, 2008).

Além dessas proteínas, poucas seqüências parecem estar mais intimamente relacionadas com a função digestiva. Uma delas é a proteína que liga quitina, que está provavelmente envolvida na estrutura da membrana peritrófica. Outra é a amilase 3, que foi seqüenciada em nosso laboratório e da qual já temos o cDNA clonado.

Outras possíveis enzimas digestivas são as 2 quimotripsinas e uma tripsina e dois precursores de lipase.

Pelo menos até agora, nenhuma seqüência de β -glicosidase foi encontrada, o que significa que elas não são expressas em grandes quantidades, pelo menos nas condições em que as larvas estão sendo criadas, que é uma dieta artificial.

Certamente essa análise deve ser continuada para verificar se podemos obter seqüências importantes para o funcionamento do tubo digestório, tais como enzimas, transportadores de nutrientes e proteínas envolvidas na secreção microapócrina, típica da região anterior do intestino médio da larva de Lepidoptera (Jordão *et al.*, 1999).

5. DISCUSSÃO

5.1. Sequenciamento das β -glicosidases intestinais de *D.saccharalis*

Nosso principal objetivo nesse trabalho era estudar a enzima que aparentemente é ativa sobre O- e S- glicosídeos. Como não é factível obtê-la em quantidades suficientes a partir do animal, precisamos de uma enzima recombinante. O primeiro passo nesse sentido é clonar os cDNAs codificantes das β -glicosidases presentes na biblioteca de expressão feita a partir do intestino médio da larva e correlacionar as seqüências obtidas com as enzimas anteriormente purificadas a partir do animal.

Comparando as seqüências de peptídeos obtidas após digestão trípica das enzimas purificadas, foi possível fazer algumas inferências sobre os cDNAs que nós sequenciamos.

A seqüência denominada aqui como Ds β glyA, é a que codifica a β gly1 anteriormente caracterizada (Azevedo *et al.*, 2003). Essa correlação pode ser feita porque peptídeos contendo 9 aminoácidos cada um foram seqüenciados a partir da proteína e essas seqüências são codificadas pelo cDNA Ds β glyA.

Purificando a β gly2 (Azevedo *et al.*, 2003) e analisando os peptídeos obtidos após sua clivagem trípica, nós conseguimos 4 seqüências de aminoácidos com 7, 8, 9 e 10 resíduos. Essas seqüências não são codificadas por nenhum dos 3 cDNAs que nós sequenciamos completamente. É possível que ela seja codificada pelo outro cDNA, do qual ainda não conseguimos obter a seqüência completa.

A tio-glicosidase de *Brevicoryne brassicae* apresenta como único resíduo específico perto do sítio ativo, a Tyr 180 (Husebye *et al.*, 2005). Nenhuma outra β -glicosidase cujo alinhamento está apresentado na figura 25 apresenta esse resíduo. Em

Leucophaea e *Neotermes* há uma Met nessa posição, que é substituída por uma Phe na β -glicosidase de *T.molitor* e por Lys nas enzimas dos 3 lepidópteras. O resíduo de Lys 173 na enzima de *B.brassicae* deve ser o responsável pela interação com o grupo sulfato. Esse resíduo só está presente na S-glicosidase, sendo razoavelmente variável nas demais enzimas cujo alinhamento de sequências é mostrado na figura 11. Todas essas enzimas pertencem a família 1 das glicosídeo hidrolases e apresentam as sequências NEP e TENG, nas quais encontram-se os Glu catalíticos. A enzima de *B.brassicae* possui, como as β -glicosidases, um Trp na posição 424, enquanto as mirosinases de plantas apresentam uma Phe nessa posição (Husebye *et al.*, 2005).

Embora a S-glicosidase de *B.brassicae* tenha apresentado a maior identidade e similaridade com a β -glicosidase de *S.frugiperda*, essa última não cliva S-glicosídeos (resultados não mostrados). Nem Ds β glyA, Ds β glyB ou Ds β glyC, cujas sequências nós determinamos, apresentam os resíduos característicos da S-glicosidase do afídeo e são muito semelhantes, em sequência, as β -glicosidases de outros Lepidoptera que já tiveram suas propriedades caracterizadas (ver Terra e Ferreira, 2005).

Como nós ainda não conseguimos obter a sequência completa da enzima de *D. saccharalis* que cliva O- e S-glicosídeos, não sabemos se a enzima tem ou não a Tyr característica das tioglicosidases.

É possível observar 4 β -glicosidases no intestino médio de *D. saccharalis* (uma delas nem sempre está presente) e nós conseguimos obter 4 sequências de cDNA (3 completas e 1 parcial) que poderiam codificar essas proteínas. Provavelmente nós conseguimos as sequências de todas as β -glicosidases dessa larva e a sequência

parcial deve ser a que codifica a β gly2 caracterizada anteriormente (Azevedo *et al.*, 2003).

Não podemos saber qual das seqüências completas corresponde ao cDNA que codifica a β gly3 (Azevedo *et al.*, 2003).

As tabelas 01, 02 e 03 apresentam as proteínas que tem maior identidade e similaridade com as enzimas de *D. saccharalis*, além de compará-las entre si. A Ds β glyA é mais semelhante à β -glicosidase de *Spodoptera frugiperda*, seguida de *Neotermes koshunensis* e de *Tenebrio molitor* (Tabela 01). O mesmo é verdade para a Ds β glyC. Entre as seqüências de *D. saccharalis*, as mais semelhantes são a Ds β glyA e Ds β glyC.

Uma vez que a β gly1 e a β gly3 tem propriedades muito semelhantes (Azevedo *et al.*, 2003), poderíamos sugerir que a β gly3 é codificada pela sequência Ds β glyC, mas isso só pode ser confirmado expressando a proteína a partir do cDNA Ds β glyC ou purificando a β gly3 e obtendo a sequência parcial de seus aminoácidos.

Como esperado, o fato das seqüências Ds β glyA e Ds β glyB serem mais semelhantes, respectivamente, à enzima de *S. frugiperda* e de *B. mori* é evidenciado no cladograma apresentado na figura 12.

Essas semelhanças não necessariamente refletem semelhanças nas propriedades das enzimas. É possível aferir quanto um sítio ativo é semelhante a outro usando relações lineares de energia livre. Determina-se k_{cat}/K_m para 2 enzimas agindo sobre vários substratos e é feito um gráfico de log de k_{cat}/K_m de uma versus log de k_{cat}/K_m da outra. Se os estados de transição são iguais é obtida uma reta com inclinação 1 e coeficiente de correlação linear igual a 1 (Withers e Rupitz, 1990).

Quando as β -glicosidases 1 e 3 de *D. saccharalis* foram comparadas com a β -glicosidase de *T. molitor* e de *S. frugiperda* que estão no cladograma, a β gly1 mostrou-se mais semelhante à enzima de *S. frugiperda*, enquanto a β gly3 é mais semelhante à enzima de *T. molitor* (Azevedo *et al.*, 2003).

Entretanto, entre as β -glicosidases de *T. molitor* a β gly1 de *D. saccharalis* é mais semelhante a outra enzima que não está representada no cladograma. Talvez, se todas estivessem seqüenciadas, a relação entre elas seria mais clara.

De qualquer maneira, comparando-se as várias β -glicosidases presentes em *D. saccharalis* pela seqüência (esse trabalho) ou pelas propriedades (Azevedo *et al.*, 2003), elas são mais semelhantes a enzimas presentes em outros insetos que entre si.

O fato de vários insetos apresentarem mais de uma β -glicosidase intestinal, aliado ao fato delas serem mais semelhantes as presentes em outros insetos do que entre si, pode significar que elas desempenhem papéis importantes e específicos nesses órgãos.

O significado da presença dessas várias enzimas só poderia ser melhor compreendido com um estudo mais amplo, no qual um número maior de β -glicosidases intestinais de diferentes insetos fossem seqüenciadas e tivessem suas especificidades determinadas.

5.2. Especificidade da β -glicosidase 2 de *D. saccharalis*

O fato da inativação por carbodiimida apresentar o mesmo k_{obs} quando é seguida ensaiando-se atividade sobre sinigrina ou NP β gal, sugere que um só sítio ativo é responsável pelo processamento de ambos os substratos. A mesma sugestão é feita quando se verifica a capacidade de um substrato inibir a hidrólise do outro. Se as

enzimas operam segundo uma cinética de equilíbrio rápido, o K_m é a constante de dissociação do complexo enzima substrato. Se determinarmos o K_i com que o substrato A inibe a hidrólise do substrato B, estamos determinando a constante de dissociação do complexo enzima-A. Portanto, se o K_m do substrato A for igual a seu K_i quando ele inibe a hidrólise do substrato B, ambos se ligam ao mesmo sítio ativo. Para ter-se mais segurança, o oposto é feito, ou seja, verifica-se o K_i de B inibindo a hidrólise do substrato A.

No caso da β -glicosidase de *Diatraea saccharalis*, os K_i s foram semelhantes aos K_m s, o que nos leva a supor que ambos substratos são processados pela mesma enzima. Conforme levantado anteriormente, a atividade sobre os dois substratos é semelhante, o que é um resultado ainda não descrito para outra β -glicosidase.

O sequenciamento e clonagem do cDNA que codifica essa enzima, com a posterior expressão da enzima recombinante, permitirá estudos mais detalhados de sua especificidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic local alignment serrate tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Azevedo T. R. , Terra W. R., Ferreira C. (2003) Purification and characterization of three β -glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. Insect Biochem. Molec. Biol. 33: 81-92.
- Baker J.E. & Woo S.M. (1992) β -glucosidases in the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: Purification, properties and activity levels in wheat- and legume-feeding strains. Insect Biochem. Molec. Biol. 22: 499-504.
- Blanes L. (2004) β -Glicosidases e β -Tioglicosidases de insetos. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Carraway,K.L. and Koshland Jr., D.E. (1972) Carbodiimide modification of proteins. Meth. Enzymol. 25: 616-623.
- Coutinho P.M.A., Henrissat B. (1999) Carbohydrate-active enzymes:an integrated database approach. In: Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. Ed. by Gilbert H.J., Davies G., Henrissat B., Svensson B., eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 3-12
- Dahlqvist A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 22: 99-107.

- Desroches, P., Mandon, N., Beaeher, J.C., Huignard, J. (1977). Mediation of host-plant use by a glucoside in *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera; Bruchidae). J.Insect Physiol. 43: 439-446.
- Ewing B., Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer tracer using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 8 (3): 186-194.
- Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochem. 56: 5-51.
- Ferreira A.H.P., Cristofolletti P.T., Pimenta D.C., Ribeiro A.F., Terra W.R., Ferreira C. (2008) Structure, processing and midgut secretion of utative neutrophilic membrane ancillary protein (PMAP) from *Tenebrio molitor* larvae. Insect Biochem. Molec. Biol. 38: 233-243.
- Ferreira A.H.P., Terra W.R., Ferreira C. (2003) Characterization of a β -glycosidase highly active on disaccharides and of a β -galactosidase from *Tenebrio molitor* midgut lumen. Insect Biochem. Molec. Biol. 33: 253-265.
- Ferreira A.H.P, Marana S., Terra W.R., Ferreira .C. (2001). Purification, sequencing, and properties of a β -glycosidase purified from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. Insect Biochem. Molec. Biol. 31:1065-1076.
- Ferreira C., Torres B.B., Terra W. R. (1998). Substrate specificities of midgut β -glycosidases from insects of different orders. Comp. Biochem. Physiol. 119B: 219-225

- Ferreira C., Parra J.R.P., Terra W.R. (1997). The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidases from *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*. Insect. Biochem. Molec. Biol. 27: 55-59.
- Gillot C. (1995) Entomology 2nd ed. Plenum Press, New York. 798pp.
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998). *Consed*: A Graphical Tool for Sequence Finishing. Genome Res. 8: 195-202.
- Husebye H., Arzt S., Burmeister W.P., Härtel F.V., Brandt A., Rossiter J.T., Bones A.M. (2005) Crystal structure at 1.1 Å resolution of an insect myrosinase from *Brevicoryne brassicae* shows its close relationship to β -glucosidases. Insect Biochem. Molec. Biol. 35: 1311-1320
- Jones A.M.E., Bridges M., Bones A.M., Cole R., Rossiter J.T. (2001). Purification and characterization of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*(L.). Insect Biochem. Molec. Biol. 31: 1-5.
- Jones A.M.E., Winge P., Bones A.M., Cole R., Rossiter J.T. (2002) Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. Insect Biochem. Molec. Biol. 32: 275-284.
- Jordão B.P., Capella A., Terra W.T., Ferreira C. (1999) Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase and trypsin and secretory mechanism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. J. Insect Physiol. 45: 29-37.
- Laemli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lindroth R.L. (1988) Hydrolysis of phenolic glycosides by midgut β -glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. Insect Biochem. 18: 789-792.

- Mainguet A.M., Louveaux A., Sayed G.El, Rolin P. (2000). Aqbiblity of a generalist insect, *Schistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation? Entomol. Exp. Applicata. 94: 309-317.
- Marana S.R., Jacobs-Lorena M., Terra W.R., Ferreira C.F. (2001). Amino acid residues involved in substrate binding and catalysis in an insect digestive β -glycosidase. Biochim. Biophys. Acta 1545: 41-52
- Marana, S.R., Terra, W.R., Ferreira, C. (1995). Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities, and function. Insect. Biochem. Molec. Biol. 25: 835-843.
- Marana S.R., Terra W.R., Ferreira C. (2000). Purification and properties of a β -glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. Insect Biochem. Molec. Biol. 30: 1139-1146.
- Muller C., Agerbirk N., Olsen C.E., Boeve Jean-Luc, Schaffner U., Brakefield P.M. (2001) Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive hemolymph of the sawfly. J. Chem. Ecol. 27: 2505-2516.
- Nishida R. (2002) Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol. 47: 57-92.
- Panda N., Kush G.S. (1995) Host plant resistance to insects. Cab International, Wallingford.
- Parra J.R.P., Botelho P.S.M., Corrêa-Ferreira B.S., Bento J.M.S. (2002) Controle biológico no Brasil. Parasitóides e predadores. Editora Manole Ltda, Barueri.

- Parra, J.R.P., Mishfeldt, 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, C.O. Westview press.
- Pontoppidan B., Ekbom B., Eriksson S., Meijer J. (2001) Purification and characterization of myrosinase from the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a brassica herbivore. *Eur. J. Biochem.* 268: 1041-1048.
- Ratzka A., Vogel H., Kliebenstein D. J., Mitchell-Olds T., Kroymann J. (2002) Disarming the mustard oil bomb. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 11223-11228.
- Resh V.H. , Cardé R.T. (2003) *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, 1266p.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Segel I.H. (1993) *Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 957p.
- Silva M.C.P., Terra W.R., Ferreira C. (2006) Absorption of toxic β -glucosides produced by plants and its effect in trehalases of several tissues from different insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 143B: 367-373.
- Silva M.C.P., Terra W.R., Ferreira C. (2004) The role of carboxyl, Arg and His groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34: 1089-1099.
- Spencer, K.C. (1988). Chemical mediation of coevolution in the *Passiflora-Heliconius* interaction. In: Spencer, K.C. (Ed.) *Chemical mediation of coevolution*. Academic Press, Inc, pp. 167-240.

- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) Mega 4: molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec.Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tattersall., D.B., Bak S., Jones, P.R., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Hansen, M.L., Hoj, P.B., Moller, B.L. (2001). Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* 293: 1826-1828.
- Terra W.R., Ferreira C., De Bianchi A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25: 487-494.
- Terra, W. R. (1988) Physiology and Biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21: 675-734.
- Terra W.R., Ferreira C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62 .
- Terra W.R., Ferreira C. (2005). Biochemistry of digestion. In In Gilbert L. I., Iatov K. e Gill S. (eds). *Comprehensive insect physiology, biochemistry, pharmacology and molecular biology*. Vol. 4, Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Oxford.
- Van Beers E.H., Büller H.A., Grand R.J., Einerhand A.W.C., Dekker J. (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: Structure, function and development. *Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol.* 30: 197-262.
- Wheeler, D. L., Chappey, C., Lash, A.E., Leipe, D.D., Madden, T.L., Schuler, G.D., Tatusova, T.A., Rapp, B.A. (2000). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.*, 28(1), 10–14.
- Witers S.G., Ruptiz K. (1990) Measurement of active-site homology between potato and rabbit muscle alpha-glucan phosphorylases through use of a linear free-energy relationship. *Biochem.* 29: 6405-6409.

- Wittstock U., Agerbirk N., Stauber E.J., Olsen C.E., Hippler M., Mitchell-Olds T., Gershenzon J., Vogel H. (2004) Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc. Nat. acad. Sci.* 101: 4859-4864.
- Zagrobelny M., Bak S., Rasmussen A.V., Jorgensen B., Naumann C.M., Moller B.L. (2004) Cyanogenic glucosides and plant insect interactions. *Phytochemistry.* 65: 293-306.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandra Frealdo Dumont

Local e data de nascimento: Campinas, 05/02/1982

EDUCAÇÃO

1. Integral Curso e Colégio, 1999

2. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2004

Bacharel em Ciências Biológicas

3. Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2008

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, CNPq, 02/2005 a 02/2007

PUBLICAÇÕES

1. Genta F.A., Dumont, A.F., Marana S.R., Terra. W.R., Ferreira C. (2007) **The interplay of processivity, substrate inhibition and a secondary substrate 3 binding site of an insect α -1,3-glucanase** Biochem. Biophys. Acta Proteins & Proteomics 1774 (9): 1079-1091.

2. Sequencing of *Diatraea saccharalis* (Insecta:Lepidoptera) midgut beta-glycosidases and detection of a putative O- and S- beta-glycosidase..XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2006.

3. Substrate inhibition, processivity and accessory substrate binding sites at an α -1,3-glucanase from *Abracris flavolineata* (Orthoptera)..XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2005.

4. Laminarinase inhibition by high amounts of substrate: a model for processivity in glycosyl-hydrolases.XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2004..
5. Action pattern and active-site catalytic groups of *Abracris flavolineata* (Orthoptera) laminarinase.XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2003.
6. Padrão de Ação e grupos catalíticos do sítio ativo da laminarinase de *Abracris flavolineata* (Orthoptera).Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. 2003.