UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DAS TRIPSINAS DE INSETOS

ADRIANA RIOS LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Dr. WALTER RIBEIRO TERRA

SÃO PAULO

1.999

"Caracterização das Tripsinas de Insetos".

ADRIANA RIOS LOPES

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

Aprovada por:

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ - USP

Prof. Dr. HELENA BONCIANI NADER
UNIFESP

SÃO PAULO
22 DE SETEMBRO DE 1999.

Aos meus pais Carlos e Herminia, a minha irmã Ana Carolina e ao meu noivo Lincoln por toda compreensão, carinho, apoio e paciência com os quais acompanharam o meu trabalho.

Agradecimentos

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

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra pela orientação e amizade durante o meu mestrado.

À Dra. Clélia Ferreira pela amizade e discussões.

Aos colegas de laboratório: Adriana Capella, Alcides Batista Jr., Alexandre Hamilton P. Ferreira, Dra. Beatriz Jordão, Érica Hotz Almeida, Fernando Ariel Genta, Lucas Blanes, Luciana Madeira da Silva, Maria Cícera Pereira da Silva, Plínio Tadeu Cristofoletti, Renata Bolognesi, Dra. Rita Heloisa Yoem, Rosana Regel, Dr. Sandro R. Marana, Tamara Azevedo e Uirá Lourenço pelas discussões e amizade.

À Carlos Peres Silva pela orientação durante o início da minha Iniciação Científica.

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

Aos professores Dr. Luis Juliano e Dra. Maria Aparecida Juliano pelos substratos de fluorescência apagada e pelas discussões.

À FAPESP pela bolsa concedida.

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

1 –INTRODUÇÃO **5**

1.1– CONSIDERAÇÕES GERAIS. 5

1.2– ENDOPEPTIDASES E SERINA ENDOPEPTIDASES: CARACTERIZAÇÃO GERAL. 7

1.3 – TRIPSINAS E DETERMINAÇÃO DE ESPECIFICIDADE EM SERINA ENDOPEPTIDASES. 9

1.4 – TRIPSINAS EM INSETOS. 12

2 – OBJETIVOS DESTA DISSERTAÇÃO **14**

3 – MATERIAIS E MÉTODOS **19**

3.1 – INSETOS. 19

3.1.1 – Periplaneta americana. *19*

3.1.2 – Tenebrio molitor. *19*

3.1.3 – Musca domestica. *21*

3.1.4 – Diatraea saccharalis. *21*

3.2 – PREPARO DAS AMOSTRAS. 21

3.2.1 – Periplaneta americana. *21*

3.2.2 – Tenebrio molitor. *22*

3.2.3 – Musca domestica. *22*

3.2.4 – Diatraea saccharalis. *23*

3.3 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA. 23

3.4 – DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE pH SOBRE AS ATIVIDADES DAS TRIPSINAS DOS DIFERENTES INSETOS. 25

3.5 – FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA. 25

3.6 – REMOÇÃO DE MOLÉCULAS DE BAIXO PESO MOLECULAR. 26

3.7 – DIÁLISE EM MICROTUBOS COM MEMBRANA DE DIÁLISE. 26

3.8 – ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS. 26

3.9 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Periplaneta americana.* 27

3.10 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Tenebrio molitor.* 27

3.11 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Musca domestica* 28

3.12 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Diatraea saccharalis*. 29

3.13 – DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS PARA SUBSTRATOS COM FLUORESCÊNCIA DIRETA E COM FLUORESCÊNCIA APAGADA 29

3.13.1 – Substratos com fluorescência direta. *29*

3.13.2 – Substratos com fluorescência apagada. *30*

4 – RESULTADOS. **31**

4.1 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Periplaneta americana*. 32

4.2 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Diatraea saccharalis* 32

4.3 – PURIFICAÇÃO DA TRIPSINA DE *Musca domestica*. 39

4.4 – PROPRIEDADES DAS TRIPSINAS DE DIVERSOS INSETOS 39

4.4.1. – Determinação do efeito de pH *39*

4.4.2 – Determinação de ponto isoelétrico. *42*

4.5 - CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DAS ESPECIFICIDADES DOS SUBSÍTIOS DAS TRIPSINAS PURIFICADAS DE DIFERENTES INSETOS. 42

4.5.1 – Estudos preliminares *42*

4.5.2 - Caracterização do subsítio S1 para as tripsinas de Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica e Diatraea saccharalis. *47*

4.5.3 – Caracterização dos subsítios adjacentes a S1 para as tripsinas de Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica e Diatraea saccharalis. *50*

4.5.3.1 – Caracterização do subsítio S2. 50

4.5.3.2 – Caracterização do subsítio S3. 61

4.5.3.3 – Caracterização do subsítio S1'. 69

4.5.3.4 - Lisina nas diferentes posições. 75

5 – DISCUSSÃO. **79**

5.1 – PEPTÍDEOS COMO SUBSTRATOS IDEAIS PARA AS TRIPSINAS DE *Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica e Diatraea saccharalis.* 79

5.2– A ESPECIFICIDADE DIFERENCIAL DO SUBSÍTIO S1. 79

5.3 – PROPRIEDADES GERAIS DOS SUBSÍTIOS ADJACENTES AO SUBSÍTIO S1 82

5.3.1 - A especificidade do subsítio S2 para as tripsinas de insetos *82*

5.3.2 – A especificidade dos subsítios S3 e S1' para as tripsinas de insetos. *83*

6 - RESUMO **84**

7 – ABSTRACT **85**

8 – REFERÊNCIAS **86**

Abreviaturas:

Abz: ácido orto-amino benzóico

BAMCA: Nα benzoyl-L-arginine-7-amido-4-methylcoumarin

BApNa: Nα benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide

DMSO: dimetil sulfóxido

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

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

ih: índice hidropático

kcat: constante catalítica

Km: constante de Michaelis-Menten

MCA: 7-amino-4-methylcoumarin

PAGE: eletroforese em géis de poliacrilamida

pI: ponto isoelétrico

pNa: p-nitroanilina

SBTI: Soy bean trypsin inhibitor

SDS: dodecil sulfato de sódio

Tris: tris-hidroximetil amino metano

val-Leu-Arg-pNa: (D)valina-leucina-arginina-p-nitroanilida

val-Leu-Lys-pNa: (D)valina-leucina-lisina-p-nitroanilida

Vm: velocidade máxima

ZAMCA: Nα carbobenzoxy-L-arginine 7-amido-4-methylcoumarin

1 –Introdução

1.1– Considerações gerais.

Os insetos constituem um grupo extremamente bem sucedido pela capacidade de ocupação dos mais diferentes nichos, podendo ser considerados os principais competidores do homem na Terra. Esta competição se dá, principalmente, pelo ataque direto à produção de alimentos, desde o cultivo até a estocagem dos produtos alimentícios, ou de forma indireta, sendo vetores de grande número de doenças que afetam o homem e os animais de criação (Gillott, 1995).

A proteção dos cultivares é de fundamental importância para a produção agrícola, pela crescente demanda de alimentos e pela organização das áreas produtoras. Tem sido evidenciado que a monocultura leva a um aumento dramático na população de insetos, aumentando desta forma, a perda da safra (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Algumas estimativas indicam a perda de pelo menos 15% da safra anual mundial devido à predação por insetos, excluindo as perdas ocasionadas indiretamente, onde os insetos são vetores de várias doenças vegetais (Wu *et al.*, 1996).

Até o presente momento, o controle de pragas agrícolas depende essencialmente da utilização de agroquímicos. Estudos de ecologia, nas áreas de cultivo, têm demonstrado que um programa de controle de pragas combinando o uso racional de praguicidas, rotação de cultivos, sanitização do campo e, principalmente, aumentando a hereditariabilidade de características que tornem as plantas resistentes aos seus predadores, são as soluções para a redução das perdas agrícolas. Nesta última categoria estão incluídas as plantas transgênicas.

Até os dias de hoje, duas estratégias têm sido fundamentais para a produção de cultivares resistentes: a utilização das δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* e a utilização de produtos do metabolismo vegetal.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gran-positiva que produz uma inclusão cristalina protéica durante a esporulação. Após a ingestão, esta inclusão cristalina é solubilizada no intestino médio do inseto, liberando as proteínas denominadas δ-endotoxinas. Estas proteínas são protoxinas, as quais tornam-se ativas quando hidrolisadas, em posições específicas, pelas proteases digestivas do inseto. Uma vez ativas, estas toxinas interagem com receptores presentes na membrana plasmática dos enterócitos, formando um canal que leva à extrusão do material citoplasmático e, consequentemente, à morte do inseto (English & Slatin, 1992).

A segunda estratégia tem por base a identificação de genes vegetais que possam conferir resistência (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Os vegetais apresentam alguns mecanismos naturais de defesa. Estes mecanismos estão baseados, principalmente, em dois tipos de defesa: física e química, sendo a defesa química a mais relevante para esta discussão.

As plantas, de uma forma geral, apresentam uma vasta capacidade metabólica e produzem muitos compostos secundários tóxicos, anti-nutricionais ou adversos aos seus predadores como, por exemplo, os terpenóides, glicosídeos cianogênicos e saponinas, os quais conferem proteção contra os insetos. Já um grupo mais reduzido de plantas tem por mecanismo de proteção a produção de proteínas. Como estas não podem ser volatilizadas, este mecanismo tem como alvo o sistema digestivo de seus predadores, na sua maioria constituído por insetos. Estas proteínas podem ser inibidores de enzimas fundamentais na digestão dos insetos, como inibidores de endopeptidases e inibidores de amilases, sendo que as duas enzimas estão envolvidas na digestão inicial de proteínas e carboidratos, respectivamente.

Vários inibidores de origem vegetal foram utilizados para verificação de seus efeitos na atividade proteásica digestiva de alguns insetos, conseguindo demonstrar que estes inibidores são bastante eficientes, sendo ótimos candidatos para construção de plantas transgênicas. Algumas destas construções foram obtidas, resultando em plantas resistentes aos seus predadores (Wu *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997 e Denholm *et al.*, 1998).

Por outro lado, existem evidências que têm mostrado que os insetos podem adaptar-se à ingestão de inibidores de endopeptidases de origem vegetal, superexpressando endopeptidases digestivas ou induzindo a produção de novas endopeptidases insensíveis a estes inibidores (Broadway, 1996; Jongsma & Bolter, 1997; Bown *et al.*, 1997, Gatehouse *et al.*, 1997 e Jouanin *et al.*, 1998).

Além disso, os insetos apresentam diferentes níveis de resistência aos inibidores, sendo mais ou menos capazes de responderem a uma molécula específica, assim como, também são capazes de produzirem respostas diferenciadas a famílias distintas de inibidores, quando estes estão presentes tanto em dietas artificiais, quanto na sua alimentação natural (Gatehouse *et al.*, 1997 e Broadway, 1997).

A resistência ou insensibilidade aos inibidores pode estar relacionada a diferenças de especificidade das diferentes endopeptidases digestivas expressas pelo inseto.

1.2– Endopeptidases e serina endopeptidases: caracterização geral.

Endopeptidases são enzimas que agem sobre ligações internas em cadeias protéicas para hidrólise das ligações peptídicas. Este grupo de enzimas está subdividido em cinco grupos de acordo com seus diferentes mecanismos catalíticos: serina endopeptidase, cisteína endopeptidase, treonina endopeptidase, aspártico endopeptidase e metalo endopeptidase (Barrett *et al.*, 1998).

O sítio ativo de enzimas proteolíticas está divido em um sítio catalítico e um sítio de ligação. O sítio catalítico consiste de um número limitado de resíduos de aminoácidos envolvidos na quebra de uma ligação peptídica, seja pela transferência de prótons ou pela ligação a um oxiânion do intermediário tetraédrico. O sítio de ligação é composto de vários resíduos de aminoácidos, os quais garantem um alinhamento apropriado do substrato para a catálise. Além disso, a energia de ligação é utilizada para transformar o substrato em seu estado de transição (Breddam *et al.*, 1992).

O sítio de ligação como definido por Schechter & Berger (1967) (ver Figura 1) pode estar subdividido em um número de subsítios, cada um garantindo, por múltiplas

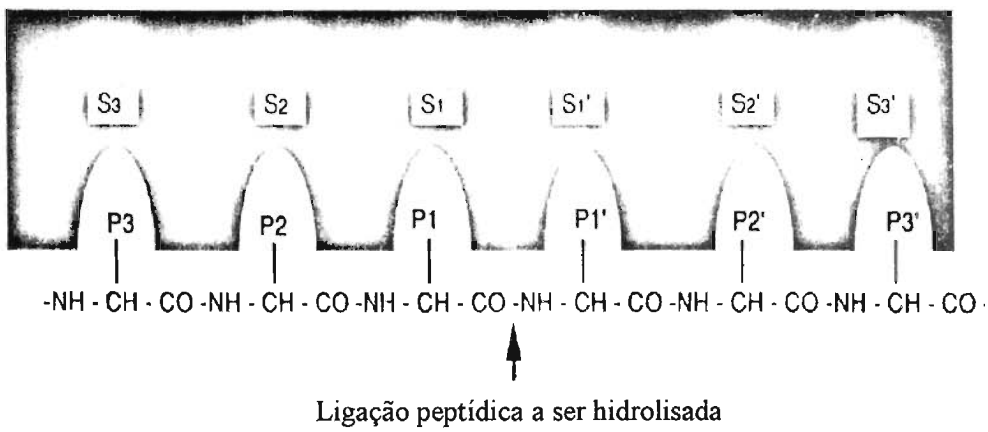


Figura 1: Representação esquemática e nomenclatura dos subsítios de ligação de endopeptidases e das posições dos resíduos de aminoácidos do substrato ocupante de cada subsítio segundo Schechter & Berger (1967).

interações, a ligação de um único resíduo de aminoácido do substrato. As propriedades dos resíduos de aminoácidos, os quais constituem um dado subsítio de ligação, determinam qual resíduo de aminoácido do substrato poderá se ligar e, desta forma, determinam a especificidade dos subsítios.

Endopeptidases cujo mecanismo catalítico depende de uma hidroxila de um resíduo de serina atuando como nucleófilo, o qual ataca a ligação peptídica, são chamadas serina endopeptidases. Existem aproximadamente 40 famílias de serina endopeptidases que são distinguíveis pelas suas estruturas primárias, sendo que estas famílias estão agrupadas em seis clãs pela comparação de suas estruturas terciárias (Barrett *et al.*, 1998). A maquinaria catalítica destas enzimas geralmente envolve, além do resíduo de serina, um doador de prótons. Nos clãs SA, SB, SC e SH o doador de prótons é um resíduo de histidina e apresenta uma tríade catalítica, pois é necessário um terceiro resíduo responsável, provavelmente, pela orientação do anel imidazol da histidina. Geralmente, este terceiro grupo é constituído de um resíduo de ácido aspártico ou até mesmo de uma outra histidina (Clã SH) (Barrett *et al.*, 1998).

O clã SA reúne as serina endopeptidases que apresentam uma estrutura terciária em duplo β barril (Figura 2) e os resíduos His, Asp e Ser dos aminoácidos participantes da triade catalítica na seguinte ordem. Este clã contém as famílias S1→S4 e S29→S32, sendo que as tripsinas pertencem à família S1 (Barrett *et al.*, 1998).

1.3 – Tripsinas e determinação de especificidade em serina endopeptidases.

Tripsinas (E.C. 3.4.21.4) são serina endopeptidases que apresentam uma estrutura em dois domínios β, típica do clã SA ao qual pertencem, sendo que o sítio catalítico está parcialmente dividido entre os dois domínios (Figura 2). Estas enzimas clivam cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos básicos como lisina ou arginina (Barrett *et al.*, 1998). A maior eficiência de hidrólise em relação a resíduos com cadeias laterais básicas é evidenciada pelos valores de eficiência catalítica (kcat/Km) de

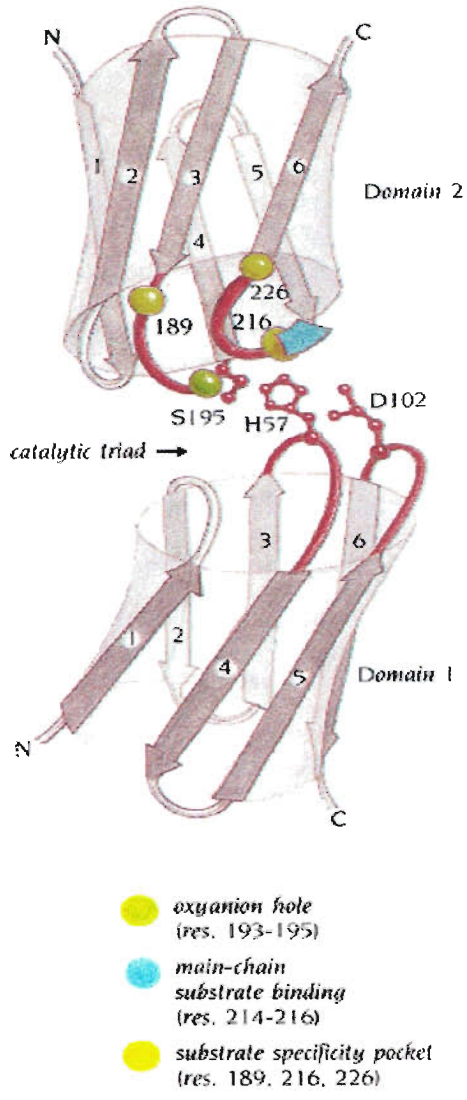


Figura 2: Diagrama topológico dos dois domínios de tripsina, mostrando que os resíduos essenciais do sítio ativo são parte de duas alças entre os dois domínios da proteína, incluindo os resíduos participantes da tríade catalítica e os determinantes da especificidade em S1 (Reproduzido de Branden & Tooze, 1998).

pelo menos 10^5 vezes maior do que para outros resíduos de aminoácidos naturais. A comparação da eficiência catalítica entre substratos que apresentem resíduos de arginina ou lisina em P1 (Figura 1), demonstra que a especificidade primária das tripsinas pode ser de 2 a 10 vezes mais favorável à hidrólise de ligações peptídicas apresentando arginina (Craik *et al.*, 1985).

Os fatores determinantes da especificidade primária no subsítio S1 são os resíduos de glicina 216 e 226 e o resíduo de ácido aspártico 189. Os resíduos de glicina estão relacionados, principalmente, ao favorecimento da hidrólise de ligações peptídicas formadas por arginina e o ácido aspártico está relacionado à determinação da especificidade por resíduos com cadeias laterais carregadas positivamente (Craik *et al.*, 1985).

É também bastante claro que a ocupação dos outros subsítios de ligação (subsítios de especificidade secundária), além daquele que contém a triade catalítica, contribui para um aumento da eficiência catalítica. A caracterização da especificidade tanto primária quanto secundária de tripsinas e a descoberta dos fatores envolvidos nesta determinação têm sido o resultado de estudos cinéticos e mutações sítio-dirigidas (Craik *et al.*, 1985; Hedstrom *et al.*, 1992; Hedstrom *et al.*, 1994 e Kurth *et al.*, 1997).

Métodos espectrofotométricos comumente utilizados para a determinação da atividade de tripsina e para o estudo de sua especificidade são baseados na hidrólise de p-nitroanilidas e β-naftilamidas derivadas de arginina ou lisina. Nestes substratos, os cromóforos estão diretamente envolvidos na ligação peptídica que será hidrolisada, sendo que a quebra resultará em uma mudança espectral significativa pela conversão de uma amida aromática em uma amina aromática. Estudos da especificidade dos subsítios S1, S2 e S3 foram realizados com estes tipos de substratos (Juliano & Juliano, 1985). Estes substratos, no entanto, não permitem a caracterização da especificidade dos subsítios S'.

Uma das metodologias utilizadas para a caracterização dos subsítios S' tem por base a construção de peptídeos com fluorescência apagada (Oliveira *et al.*, 1992 e Grahn *et al.*, 1998). A transferência de energia não radiante é um fenômeno no qual a excitação de um cromóforo fluorescente (o doador) transfere a sua energia de excitação para o outro

cromóforo (aceptor), conforme esquema da Figura 3. Esta transferência resulta no apagamento da fluorescência do doador e o aparecimento da fluorescência do aceptor, mesmo este não sendo excitado diretamente. A clivagem enzimática resulta na separação do doador e do aceptor por difusão, o que ocasiona um rompimento na transferência de energia. Este efeito é utilizado para a determinação da atividade enzimática pela monitoração de um aumento de fluorescência do aceptor (Katchalski *et al.*, 1973).

Estudos de mutação sítio-dirigida têm demonstrado que a contribuição na eficiência catalítica para a determinação da especificidade de tripsina está relacionada não só aos resíduos determinadores de especificidade presentes em S1, como descrito anteriormente (Craik *et al.*, 1985), mas também a determinantes estruturais de especificidade não necessariamente relacionados a este subsítio. Dentre os determinantes estruturais de especificidade estão duas alças superficiais que não entram em contato direto com o substrato, mas são conectoras das paredes do subsítio S1 (Hedstrom *et al.*, 1992), duas alças determinates da estrutura do subsítio S1' (Kurth *et al.*, 1997) e aos resíduos 172 (Tyr) e 225 (Tyr ou Pro) (Hedstrom *et al.*, 1994 e Guinto *et al.*, 1999).

1.4 – Tripsinas em insetos.

Tripsinas são enzimas digestivas comuns à maioria dos insetos, estando várias destas enzimas já purificadas (Terra & Ferreira, 1994) e sequenciadas como as de *Manduca sexta* (Peterson *et al.*, 1994) e outras (Barrett *et al.*, 1998). Apesar de apresentarem propriedades gerais bastante semelhantes como peso molecular (20-35 kD), ponto isoelétrico (4 - 5) e pH ótimo (8 - 9), as tripsinas de insetos e vertebrados apresentam características distintas, como a não estabilização por cálcio nas tripsinas de insetos e respostas diferenciadas a inibidores protéicos de tripsina (Applebaum, 1985; Purcell *et al.*, 1992 e Terra & Ferreira, 1994).

Caracterizações da especificidade das endopeptidases em insetos foram realizadas para alguns representantes de poucas ordens; Hymenoptera (*Vespa crabro* e *Apis*

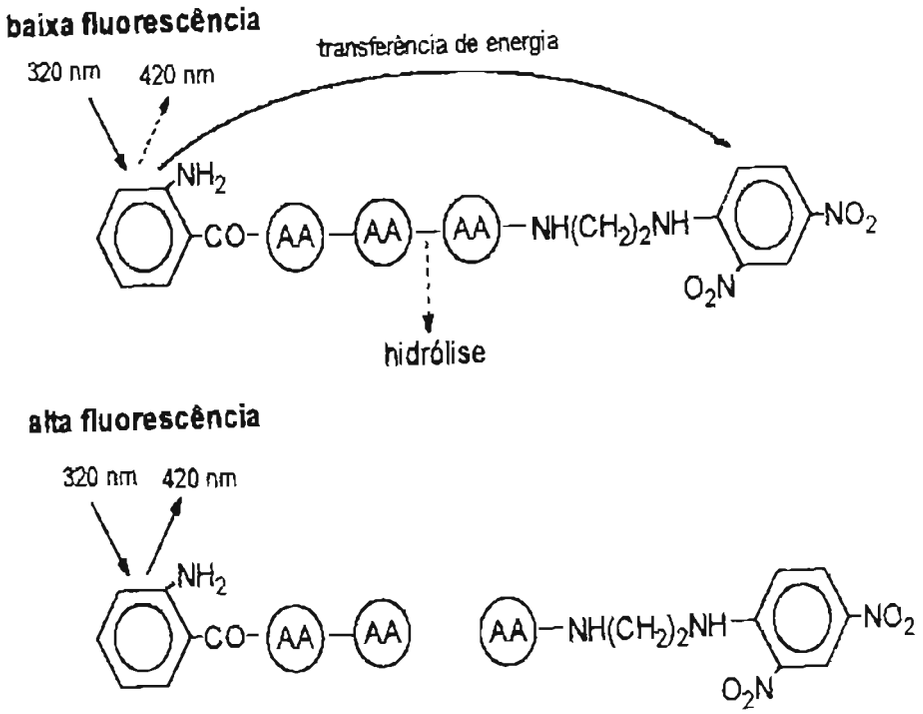


Figura 3: Representação esquemática do sistema de fluorescência apagada, demonstrando as transferências de energia entre o doador e o apagador.

mellifera) (Giebel *et al.*, 1971 e Jany *et al.*, 1972), Lepidoptera (*Pieris brassicae, Manduca sexta e Tineola bisselliella*) (Lecadet & Dedonder, 1966; Miller *et al.*, 1974 e Ward, 1975) e Diptera (*Hypoderma lineatum*) (Tong *et al.*, 1981). Estes estudos eram realizados usando polipeptídeos como substrato (geralmente cadeia β da insulina) e mostraram que as tripsinas de insetos são similares, mas não idênticas, às tripsinas de mamíferos. Entretanto, parte dessas análises foi realizada de forma semi-quantitativa, necessitando de uma caracterização mais detalhada e profunda. Além disso, estes estudos foram realizados em poucas ordens de insetos e em espécies pouco representativas dentro da ordem estudada (por exemplo, *Hypoderma lineatum*).

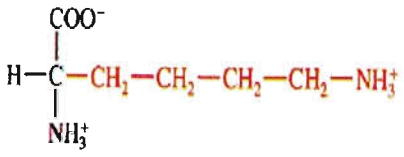
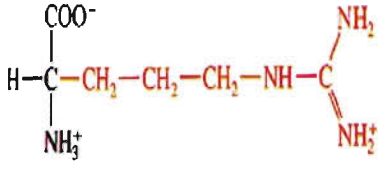
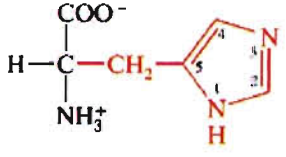
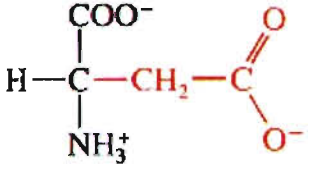
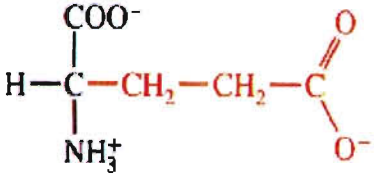
A purificação de tripsinas de insetos de diferentes ordens e a caracterização cinética da especificidade de seus subsítios com a utilização de substratos de fluorescência apagada permitiram verificar que estas enzimas apresentam diferentes especificidades. Além disso, a comparação das propriedades das cadeias laterais dos resíduos (índice de hidropaticidade e volume ver Figura 4) utilizados em P1, P2, P3 e P1', permite inferências sobre as características de cada um dos subsítios. Para uma melhor comparação dos diferentes comportamentos cinéticos, os resíduos de aminoácidos presentes nessas diferentes posições foram subdivididos em: resíduos de cadeia alifática polar não carregada hidroxilados (Thr e Ser) (a), resíduos de cadeia lateral aromática (Phe, Tyr) (b), resíduos de cadeia polar carregada negativamente (Asp e Glu) (c), resíduos de cadeia polar que apresentam uma amida (Asn e Gln) (d) e resíduos de cadeia lateral apolar (Ala, Leu, Ile, Met, Phe e Val) (e) e histidina (f) e lisina, sendo que este último resíduo será tratado distintamente em outro sub-item.

2 – Objetivos desta dissertação.

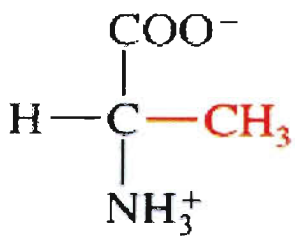
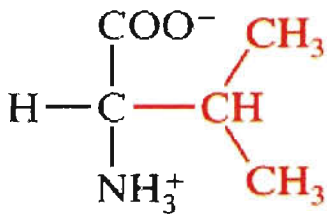
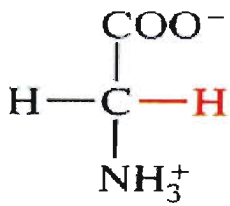
O objetivo dessa dissertação foi desvendar a especificidade dos subsítios de tripsinas de insetos escolhidos, procurando uma base cinética para o comportamento distinto dos insetos na presença de δ-endotoxinas e de inibidores protéicos dietéticos. Para isso as tripsinas de *Periplaneta americana* (Dictyoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera),

Figura 4: Estruturas, abreviações dos aminoácidos, pKas dos grupos ionizáveis, índices hidropáticos das cadeias laterais e volumes*.

aminoácido	Fórmula estrutural	pKa α-COOH	pKa α-NH_3^+	pka cadeia lateral	Índice hidropático**	Volume (A^3)
Serina Ser S		2,19	9,21		-0,8	89,0
Treonina Thr T		2,09	9,10		-0,7	116,1
Asparagina Asn N		2,14	8,72		-3,5	117,7
Glutamina Gln Q		2,17	9,13		-3,5	143,9
Tirosina Tyr Y		2,20	9,21	10,46	-1,3	1963,6

aminoácido	Fórmula estrutural	pKa α-COOH	pKa α-NH_3^+	pka cadeia lateral	Índice hidropático**	Volume (A^3)
Lisina Lys K		2,16	9,06	10,54	-3,9	168,7
Arginina Arg R		1,82	8,99	12,48	-4,5	173,4
Histidina His H		1,8	9,33	6,04	-3,2	153,2
Ac.Aspártico Asp D		1,99	9,9	3,90	-3,5	111,1
Ác. Glutâmico Glu E		2,10	9,47	4,07	-3,5	129,12

aminoácido	Fórmula estrutural	pKa α-COOH	pKa α-NH_3^+	pka cadeia lateral	Índice hidropático**	Volume (A^3)
Isoleucina Ile I		2,32	9,76		4,5	166,7
Metionina Met M		2,13	9,28		1,9	162,9
Leucina Leu L		2,33	9,74		3,8	166,7
Fenilalanina Phe F		2,20	9,31		2,8	189,9

aminoácido	Fórmula estrutural	pKa α-COOH	pKa α-NH_3^+	pka cadeia lateral	Índice hidropático**	Volume (A^3)
Alanina Ala A		2,35	9,87		1,8	88,6
Valina Val V		2,29	9,74		4,2	140,0
Glicina Gly G		2,35	9,78		-0,4	60,1

*Os aminoácidos ilustrados na tabela acima compõem o grupo de resíduos utilizados para o estudo da especificidade dos subsítios S1, S2, S3 e S1' das tripsinas de diferentes insetos.

**Escala que combina hidrofobicidade e hidrofilia e pode ser empregada para predizer quais aminoácidos serão encontrados em um ambiente aquoso (valores negativos) e em um ambiente hidrofóbico (valores positivos). Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-132 in Lehninger *et al,* 1995.

Volumes das cadeia laterais retirados de Greenstein J.P. & Winitz M. (1961) in Creighton (1984).

Musca domestica (Diptera) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera) foram purificadas e caracterizadas. Esses insetos foram escolhidos como representantes de ordens em importantes pontos da evolução dentro do grupo (Figura 5) e por serem importantes pragas agrícolas como, por exemplo, *Diatraea saccharalis* que é a broca da cana-de-açúcar. As tripsinas purificadas foram caracterizadas cineticamente com a utilização de substratos de fluorescência apagada, de forma a determinar a especificidade primária destas enzimas (subsítio S1) e a especificidade dos subsítios S2, S3 e S1' (Figura 1).

3 – Materiais e métodos.

3.1 – Insetos.

3.1.1 – Periplaneta americana.

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

3.1.2 – Tenebrio molitor.

Uma cultura de *Tenebrio molitor* (besouro da farinha; Coleoptera: Tenebrionidae) é mantida em laboratório em farelo de trigo sob condições naturais de luz a uma temperatura

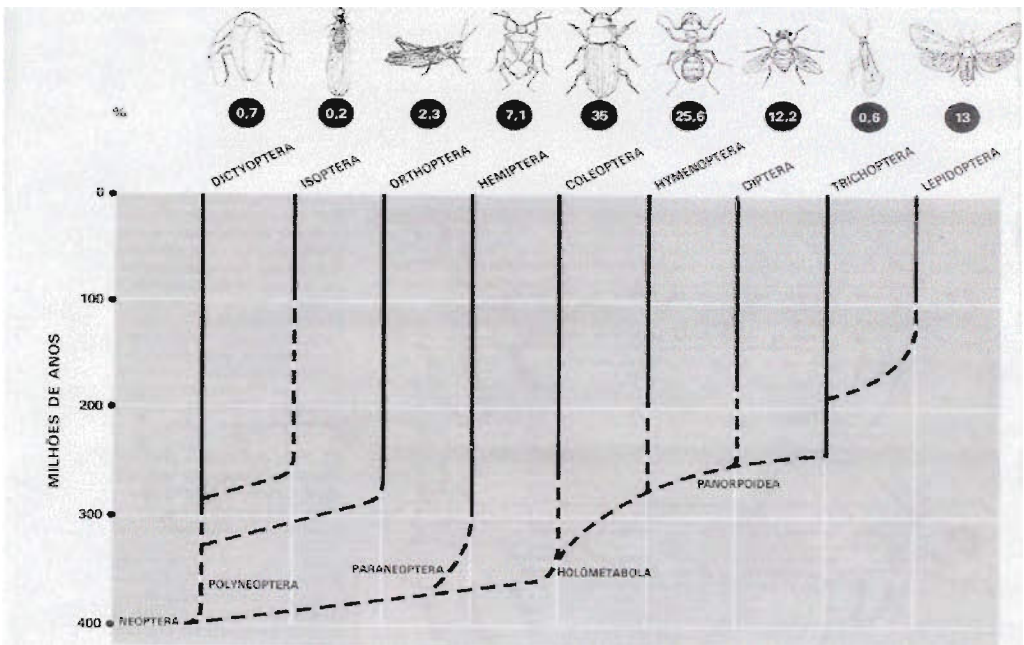


Figura 5: Relações filogenéticas entre as principais ordens de insetos e números aproximados de espécies atuais (percentagens do total de insetos, que somam cerca de 860 mil espécies). As linhas sólidas mostram os ramos a partir do momento em que aparecem no registro fóssil, e as linhas tracejadas mostram possíveis distribuições geológicas baseadas em evidências indireta (Reproduzido de Terra & Ferreira, 1991).

média de 25°C e umidade relativa de 70-75%. Foram utilizadas larvas com desenvolvimento próximo ao último estádio larval com o intestino médio repleto de alimento.

3.1.3 – Musca domestica.

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

3.1.4 – Diatraea saccharalis.

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

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

3.2 – Preparo das amostras.

3.2.1 – Periplaneta americana.

Adultos de *Periplaneta americana* foram coletados das caixas de criação e transferidos para pequenas câmaras com atmosfera de CO_2 para anestesiamento. Estes são então transferidos para uma caixa de isopor com gelo para dissecção de seus tubos digestivos em placas de parafina, utilizando solução de NaCl 220mM gelada. Estes tubos digestivos são homogeneizados em água bi-destilada gelada utilizando um homogeneizador Omni-Mixer, com 6 pulsos de 30 segundos cada, na velocidade 5,5, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos. O homogeneizado resultante é centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante desta centrifugação é filtrado em lã de vidro para remoção do excesso de gorduras. Os homogeneizados eram mantidos a -20°C até o uso.

3.2.2 – Tenebrio molitor.

Larvas de *Tenebrio molitor* foram imobilizadas em gelo e dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 343 mM gelada. Os intestinos médios isolados foram subdivididos em: ventrículo anterior mais ventrículo médio (2/3 anteriores do tubo digestivo), epitélio do ventrículo posterior e conteúdo do ventrículo posterior. Apenas o conteúdo do ventrículo posterior foi utilizado como fonte de tripsina, já que ele concentra a maior parte da tripsina intestinal (Terra & Cristofoletti, 1996). Este material é homogeneizado em água bi-destilada gelada com a utilização de homogeneizador Potter–Elvehjem, centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante desta centrifugação é filtrado em lã de vidro. Os homogeneizados eram mantidos a -20°C até o uso.

3.2.3 – Musca domestica.

As larvas de *Musca domestica* são lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e imobilizadas em gelo para dissecção sob estereomicroscópio em solução de NaCl 150mM gelada. Os tubos digestivos são homogeneizados em tampão acetato de sódio 0,1M pH 3,5 utilizando um homogeneizador Potter–Elvehjem e centrifugados a 20.000g por 30

minutos a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação é filtrado em lã de vidro. Este filtrado é dialisado em membranas com corte em 12kD (Sigma-Aldrich, EUA) por 4 horas a 4°C, contra 800 volumes de tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5. Os dialisados eram mantidos a -20°C.

3.2.4 – Diatraea saccharalis.

As larvas de *Diatraea saccharalis* são imobilizadas em gelo e dissecadas em solução NaCl 125mM gelada sob estereomicroscópio. O intestino médio deste inseto foi subdividido em conteúdo luminal e epitélio ventricular, sendo utilizado apenas o conteúdo luminal como fonte de tripsina. Os conteúdos luminais são homogeneizados em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 com a utilização de um homogeneizador Potter–Elvehjem. Este homogeneizado é centrifugado a 20.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante desta centrifugação é filtrado em lã de vidro. Os homogeneizados eram mantidos a -20°C até o uso.

3.3 – Ensaios enzimáticos e determinação de proteína.

Determinações colorimétricas da atividade de tripsina das diferentes preparações foram realizadas com α-N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BApNa – Sigma-Aldrich, EUA) 0,83 mM como substrato em tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5 a 30°C. As reações são interrompidas pela adição de ácido acético 30% e o produto da reação é medido em espectrofotômetro (Autofill, Amersham-Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia) a 410nm (Erlanger *et al.*, 1961).

Determinações fluorimétricas da atividade de tripsina das diferentes preparações foram realizadas com a utilização de dois substratos cumarínicos diferentes: Benzoyl-Arginine-7-amido-4-methyl-coumarin (BAMCA-Sigma-Aldrich) e Carbobenzoxy-Arginine-7-amido-4-methyl-coumarin (ZAMCA-Sigma-Aldrich), ambos na concentração de 0,01mM em tampão Tris-HCl 100mM pH 8,5 a 30°C e as reações são interrompidas pela adição de ácido acético 30%. A detecção dos produtos de hidrólise foi realizada em um

fluorímetro (F2000-Hitachi, Japão), utilizando um comprimento de onda de 380nm para excitação e 460nm para detecção da emissão de fluorescência (Alves *et al.*, 1996). Estes substratos são dissolvidos em 100% de DMSO para uma concentração de 1mM e são estocados a 4°C, sendo diluídos em tampão apenas no momento da utilização.

As séries de substratos de fluorescência apagada variantes em P1' (Abz-AGGR**X**AAGQ-EDDnp), P1 (Abz-AGG**X**GAAGQ-EDDnp), P2 (Abz-AG**X**RGAAGQ-EDDnp), P3 (Abz-A**X**GRGAAGQ-EDDnp) têm por fluoróforo ácido orto-amino benzóico (Abz) e por apagador de fluorescência N-(2,4-dinitrofenil) etilenodiamida (EDDnp). Estes substratos foram sintetizados e fornecidos pelos professores Dr. Luis Juliano e Dra. Maria Aparecida Juliano, do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo. Estes substratos foram dissolvidos em 100% de DMSO e tiveram suas concentrações determinadas pela absorbância medida em comprimento de onda de 365nm e pela aplicação da lei de Lambert-Beer, usando 17.300 como coeficiente de extinção molar do peptídeo na presença do fluoróforo e do apagador. Após a dissolução, estes substratos foram mantidos a 4°C até o ensaio de atividade, quando foram diluídos para as concentrações apropriadas em tampão Tris-HCl 100mM pH 8,5 e incubados a 30°C. As reações foram interrompidas pela adição de ácido acético 30% e os produtos de hidrólise foram detectados com a utilização de um fluorímetro (F2000-Hitachi, Japão) utilizando um comprimento de onda de 320nm para excitação e 420nm para detecção da emissão de fluorescência (Oliveira *et al.*, 1992). Hidrolisados totais destes substratos obtidos para cada uma das tripsinas estudadas foram analisados por espectrometria de massa para verificação dos pontos de hidrólise pela Dra. Maria Aparecida Juliano do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

Uma unidade de enzima é definida pela quantidade que hidrolisa 1μmol de substrato por minuto.

As determinações de proteína para todas as amostras foi realizada com o método de Bradford (1976), usando ovoalbumina como padrão.

3.4 – Determinação do efeito de pH sobre as atividades das tripsinas dos diferentes insetos.

Foi utilizada para a determinação do efeito do pH sobre a atividade das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* uma série de tampões de pH 7,0 a 12 com variações de 0,5 unidade de pH (7-9: tampão Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,2M; 9-10,5: tampão glicina-NaOH 0,1M contendo NaCl 0,2M e 10,5-12: tampão fosfato-NaOH 0,1M contendo NaCl 0,2M), com força iônica controlada. ZAMCA foi utilizado como substrato para as determinações de pH ótimo. Substratos fluorescentes são mais eficientes para a realização destes experimentos do que BApNA, pois este último apresenta altas taxas de hidrólise espontânea em pHs acima de 9,0, impedindo as medidas. Tanto os ensaios quanto as determinações de pH das misturas de substrato e tampão foram realizadas a 30°C.

3.5 – Focalização isoelétrica em géis de poliacrilamida.

A focalização isoelétrica foi realizada em géis cilíndricos de poliacrilamida 7,5% contendo anfolito 1% pH 3–10 (Pharmalyte, Pharmacia, Suécia) como detalhado em Terra *et al.* (1978). Após pré-focalização (30 minutos), as amostras foram aplicadas sobre uma mistura de glicerol 8% e anfolito 4% em água, colocadas no topo do gel, evitando assim que a amostra entrasse em contato com a solução de NaOH presente na parte superior da cuba de focalização. A eletrofocalização é realizada a 4 °C por 2 horas com voltagem de 31V/cm. Após a focalização, os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador (Autogeldivider, Savant Instruments, EUA) em tampão Tris-HCl 20mM pH 8,5. O pH ao longo do gel é determinado fracionando-se um gel controle em água bi-destilada e medindo-se o pH de cada fração com a utilização de um pHmetro.

3.6 – Remoção de moléculas de baixo peso molecular.

Trocas de tampão e separação de moléculas de alto peso molecular de moléculas de menor peso foram efetuadas passando as soluções por colunas Hitrap desalting (Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia). Este é um procedimento eficiente e rápido por ser realizado manualmente com auxílio de seringas. A coluna é equilibrada com 20ml do tampão de interesse; 1,5 ml da amostra são aplicados a esta coluna e a eluição é realizada com 2,0 ml do tampão utilizado para equilibrar a coluna. Este procedimento garante a retirada do sal e uma pequena diluição da amostra inicial.

3.7 – Diálise em microtubos com membrana de diálise.

As amostras de interesse são colocadas em microtubos virgens sem tampa com capacidade para 1,5 ml. Membranas de diálise previamente equilibradas por uma hora em água Milli-Q (Millipore, EUA) são cortadas de modo a recobrirem a abertura do tubo e presas por um anel de borracha de forma que não haja vazamento da amostra. Os tubos são devidamente posicionados em suportes plásticos de forma que a membrana fique em contato com a solução de diálise, no caso, água Milli-Q ou bi-destilada geladas numa proporção de pelo menos 1000 vezes o volume a ser dialisado. A diálise é mantida sob agitação a 4°C, por pelo menos 3 horas (tempo necessário para que os dois meios entrem em equilíbrio). Este tipo de diálise foi utilizado para amostras eluídas da cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, como descrito nos itens 3.11 e 3.12.

3.8 – Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS.

Eletroforese em géis de poliacrilamida sob condições desnaturantes foram realizadas segundo Laemmli (1970), em géis de poliacrilamida 12% contendo SDS 0,1%, utilizando-se o equipamento Mini-Protean II (BioRad, EUA). As amostras das diversas frações obtidas

durante as diferentes marchas de purificação foram misturadas ao tampão de amostra, composto de Tris 60mM pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v). Esta mistura foi fervida por 5 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese sob voltagem constante de 200V. Para a coloração dos géis após a eletroforese foi utilizada metodologia de coloração por prata (Blum *et al.*, 1987).

3.9 – Purificação da tripsina de *Periplaneta americana.*

A tripsina de *Periplaneta americana* foi purificada a partir do filtrado do sobrenadante da centrifugação do homogeneizado dos tubos digestivos deste inseto. Em sequência, este material foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão Econo System (Bio-Rad, EUA) utilizando-se uma coluna EconoPac HighQ (Bio-Rad, EUA), equilibrada em tampão piperazina 20mM pH 5,0. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0M no mesmo tampão em que a coluna foi equilibrada. As frações contendo atividade de tripsina (determinadas com a utilização de BApNa como substrato) foram reunidas e submetidas a uma nova cromatografia de troca aniônica em sistema de alta pressão (FPLC System, Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia), utilizando uma coluna MonoQ (Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia). Esta coluna foi equilibrada em tampão piperazina 20mM pH 10,0. A eluição foi realizada utilizando um gradiente linear de NaCl 0 a 1,0 M. As frações eluídas com atividade sobre BApNa foram reunidas e utilizadas para as determinações cinéticas e SDS-PAGE.

3.10 – Purificação da tripsina de *Tenebrio molitor.*

A purificação da tripsina de *Tenebrio molitor* (Levinsky *et al.*, 1977; modificado por Cristofoletti & Terra, comunicação pessoal) tem início na dissecção do intestino médio deste inseto, o qual é subdividido em várias porções, sendo utilizada para esta purificação apenas o conteúdo luminal do último terço do intestino médio. Preparações desta porção são submetidas a uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão

(EconoSystem-BioRad, EUA) utilizando uma coluna EconoPac HighQ (BioRad). Esta coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02M pH 7,0. As frações contendo atividade não ligada à coluna são reunidas e aplicadas a uma coluna Hitrap-desalting (Pharmacia-LKB Biotechnology), equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02M pH 9,0, para colocá-las no tampão que será utilizado em novo passo de purificação. É realizada uma segunda cromatografia de troca aniônica, agora em sistema de alta pressão (FPLC – Pharmacia-LKB Biotechnology, Suécia), utilizando uma coluna MonoQ. Esta coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,02M pH 9,0 e a eluição foi realizada em um gradiente linear de NaCl 0 a 1,0 M. As frações com atividade sobre BApNa foram reunidas e utilizadas para as determinações cinéticas e SDS-PAGE.

3.11 – Purificação da tripsina de *Musca domestica*

Uma marcha de purificação para a tripsina de *Musca domestica* havia sido estabelecida (Lemos & Terra, 1992) utilizando uma combinação de precipitação por pH, cromatografia de troca catiônica e cromatografia de afinidade em colunas de SBTI-Agarose. Esta metodologia foi modificada de forma a obter uma purificação de realização mais fácil e com rendimento semelhante ao anteriormente descrito.

A purificação da tripsina de *Musca domestica* tem início com a homogeneização em pH ácido dos tubos digestivos dissecados de larvas deste inseto. Muitas proteínas não são solúveis neste pH, tornando a preparação mais enriquecida em tripsina. Após centrifugação, o sobrenadante é dialisado para troca de tampão. O dialisado é submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de Benzamidina-Sepharose (Pharmacia), utilizando um sistema de baixa pressão (EconoSytem – BioRad, EUA). A coluna foi equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5. Para a eluição de ligantes inespecíficos foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo KCl 0,025M. Para a eluição específica da atividade de tripsina foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo benzamidina 0,5M. As frações contendo atividade de tripsina (determinadas com ZAMCA) foram reunidas. Uma alíquota deste preparado foi dialisada, seca por centrifugação a vácuo e utilizada para SDS-PAGE. Outra alíquota do eluído após cromatografia de afinidade foi aplicada a uma coluna Hitrap-

desalting equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5 para redução da concentração de benzamidina. O eluído desta coluna foi utilizado para as determinações cinéticas.

3.12 – Purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*.

A metodologia utilizada para a purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis* utiliza uma cromatografia de afinidade em coluna de Benzamidina-Sepharose equilibrada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e realizada em sistema de baixa pressão (EconoSystem – BioRad). A amostra aplicada na coluna de afinidade é o sobrenadante da centrifugação do homogeneizado do conteúdo luminal de *Diatraea saccharalis* (3,5mg de proteína). A eluição dos ligantes inespecíficos foi realizada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo KCl 0,5M, enquanto que a eluição específica empregou tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo benzamidina 0,5M. A utilização de substratos fluorescentes tendo 7-amino-4-metil-cumarina como fluoróforo, por sua maior sensibilidade em relação aos ensaios colorimétricos, permite a localização da atividade eluída, mesmo na presença do inibidor. As frações ativas desta cromatografia foram reunidas. Uma alíquota foi dialisada, seca por centrifugação a vácuo e utilizada em SDS-PAGE. O restante desta preparação foi submetido a cromatografia em coluna Hitrap-desalting previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5. O eluído desta cromatografia foi utilizado para as determinações cinéticas da especificidade dos subsítios.

3.13 – Determinação dos parâmetros cinéticos para substratos com fluorescência direta e com fluorescência apagada.

3.13.1 – Substratos com fluorescência direta.

Estudos do efeito da concentração de BAMCA e ZAMCA na atividade de tripsina foram realizados utilizando 14 diferentes concentrações numa faixa de 1 a 100 μM. As

incubações com as tripsinas purificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* foram mantidas a 30°C por intervalos de tempo específicos para cada uma das enzimas. Os dados obtidos foram aplicados ao programa Enzfitter (Elsevier Biosoft) para obtenção de valores da constante de Michaelis-Mentem e da velocidade máxima.

3.13.2 – Substratos com fluorescência apagada.

Para a caracterização dos subsítios das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* foi necessária a utilização de substratos peptídicos com fluorescência apagada. Este tipo de peptídeo permite a caracterização dos subsítios tanto a N-terminal a hidrólise quanto a C-terminal (Grahn *et al.*, 1998), diferentemente dos substratos p-nitroanilídicos (Juliano & Juliano, 1985) e dos com fluorescência direta (Alves *et al.*, 1996).

Um peptídeo de origem (a partir do qual são realizadas as variações sistemáticas dos resíduos) foi utilizado: Abz-AGGRGAGQ-EDDnp. A síntese dos peptídeos com fluorescência apagada foi realizada pelos professores Dra. Maria Aparecida Juliano e Dr. Luis Juliano do departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

As determinações cinéticas da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima, permitem o cálculo dos valores relativos da eficiência catalítica, caracterizando a especificidade de um determinado subsítio.

(a) caracterização cinética do subsítio S1

Estudos do efeito da concentração dos peptídeos P1 variantes Abz-AGGXGAGQ-EDDnp, onde X representa os resíduos de arginina ou lisina, foram realizados utilizando 15 diferentes concentrações numa faixa de 0,5 μM a 10μM para a tripsina de *Tenebrio molitor* e 1μM a 20 μM para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Musca domestica* e *Diatraea*

saccharalis. As incubações foram realizadas a 30°C por intervalos de tempo específicos para cada enzima.

(b) caracterização cinética do subsítio S2

Estudos do efeito da concentração dos peptídeos P2 variantes Abz-AG**X**RGAGQ-EDDnp foram realizados utilizando 15 diferentes concentrações numa faixa de 1μM a 20μM para as tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Periplaneta americana* e de 1,5 μM a 30 μM para as tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. As incubações foram realizadas a 30°C em intervalos de tempo específicos para cada enzima.

(c) caracterização cinética do subsítio S3

Estudos do efeito da concentração dos peptídeos P3 variantes Abz-A**X**GRGAGQ-EDDnp, foram realizados utilizando 15 diferentes concentrações numa faixa de 0,5μM a 10μM para a tripsina de *Tenebrio molitor* e de 1 μM a 20 μM para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. As incubações foram realizadas a 30°C em intervalos de tempo específicos para cada enzima.

(d) caracterização cinética do subsítio S1'

Estudos do efeito da concentração dos peptídeos P1' variantes Abz-AGGR**X**AGQ-EDDnp foram realizados utilizando 15 diferentes concentrações numa faixa de 0,5 μM a 10 μM para a tripsina de *Tenebrio molitor* e 1 μM a 100 μM para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*. As incubações foram realizadas a 30°C em intervalos de tempo específicos para cada enzima.

4 – Resultados.

4.1 – Purificação da tripsina de *Periplaneta americana*.

A purificação da tripsina de *Periplaneta americana* a partir de homogeneizados do tubo digestivo deste inseto foi realizada com a utilização de cromatografias de troca aniônica. Como primeiro passo após a homogeneização e centrifugação (Materiais e Métodos) foi utilizada uma cromatografia de troca aniônica em sistema de baixa pressão (EconoSystem – BioRad) utilizando uma coluna EconoPac HighQ. O perfil de atividade após esta cromatografia é apresentado na figura 6A. A recuperação da atividade neste procedimento é de 90 a 100% e o enriquecimento é de 3,2 vezes em relação à preparação inicial. O eluído ativo é reunido e submetido a outra cromatografia de troca aniônica em sistema de alta pressão (FPLC, Pharmacia – LKB), utilizando uma coluna MonoQ. O perfil de atividade eluída desta cromatografia está representado na figura 6B. A recuperação neste procedimento é de 30% e há um enriquecimento de 37 vezes. Os rendimentos e os enriquecimentos desta marcha de purificação estão listados na Tabela 1. Alíquotas dos eluídos com atividade de tripsina de todos os passos cromatográficos foram submetidos a um SDS-PAGE (Figura 7). A proteína purificada apresenta um peso molecular de 29 kD determinado por SDS-PAGE.

4.2 – Purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*.

Para a purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis* foram utilizados diversos tipos de cromatografias como, por exemplo, cromatografias de troca iônica, cromatografias hidrofóbicas e de afinidade (SBTI-Agarose). Apesar de estas apresentarem boas recuperações e enriquecimentos da proteína de interesse, não era possível a continuação destas marchas cromatográficas para a purificação desta enzima pois, após estes passos, era verificado um intenso processo de autólise, levando à perda da atividade enzimática.

O método encontrado de maior eficiência foi uma cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose (Amersham-Pharmacia), utilizando um sistema de baixa pressão (EconoSystem–BioRad). O método consiste na aplicação do sobrenadante do homogeneizado do conteúdo luminal em uma coluna de afinidade que tem por grupo ligante

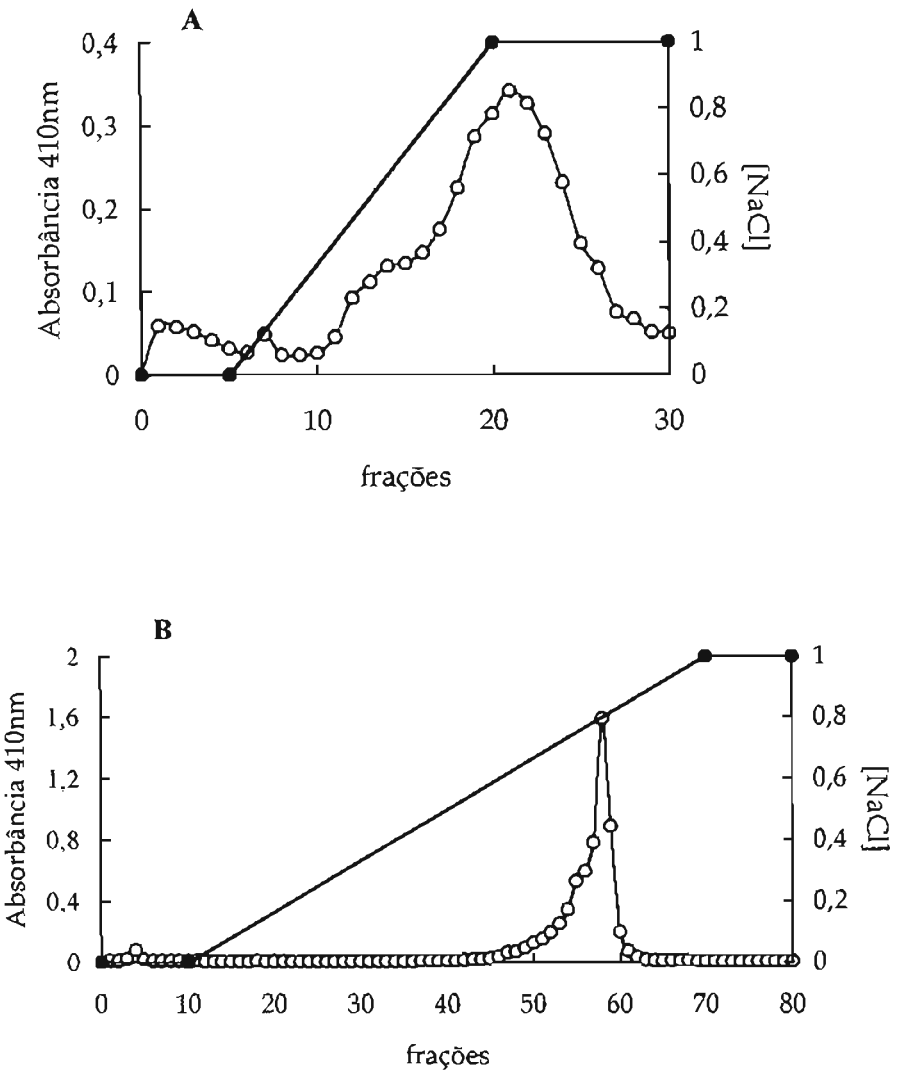


Figura 6: Perfis de atividade sobre BapNa das cromatografias de troca aniônica utilizadas para a purificação da tripsina de *Periplaneta americana*. (A) Cromatografia de troca aniônica em coluna HighQ (EconoSystem – BioRad) do sobrenadante obtido por centrifugação do homogeneizado de tubos digestivos de adultos de *Periplaneta americana*. (B) Cromatografia de troca aniônica em MonoQ (FPLC System, Pharmacia-LKB) do eluído ativo da coluna HighQ. (●) gradiente de NaCl e (○) atividade de tripsina utilizando BApNA como substrato.

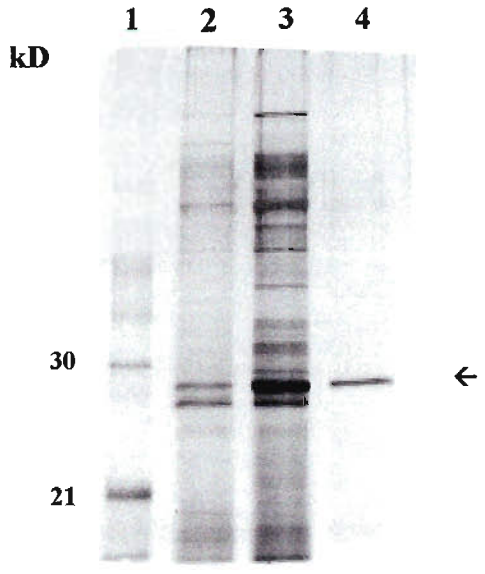


Figura 7: SDS-PAGE das amostras obtidas após os diferentes passos cromatográficos da marcha de purificação da tripsina de *Periplaneta americana*. Raia 1: marcadores de peso molecular; raia 2: sobrenadante obtido após centrifugação do homogeneizado de tubos digestivos de *Periplaneta. americana*; raia 3: eluído ativo da cromatografia em coluna High Q e raia 4: eluído ativo da cromatografia em coluna MonoQ. A seta indica a tripsina purificada de *Periplaneta americana*. Os pesos moleculares estão ao lado da figura.

Tabela 1: Rendimento dos passos da marcha de purificação da tripsina de *Periplaneta americana*.

Passos cromatográficos	Atividade total (mU)	Proteína total (mg)	Atividade específica (mU/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Homogeneizado	2.130	87	25	1	100
EconoPac HighQ	2.130	27	79	3,2	100
MonoQ	639	0,7	913	37	30

Homogeneizado consiste do sobrenadante obtido após centrifugação de um homogeneizado de tubos digestivos de adultos de *Periplaneta americana* . EconoPAC HighQ e MonoQ consistem da reunião das frações ativas eluídas após cromatografia nessas resinas.

uma p-aminobenzamidina. A amostra é aplicada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0. A eluição de ligantes inespecíficos é realizada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo KCl 0,5M. A eluição específica da tripsina é realizada em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo benzamidina 0,5 M. A localização da atividade da tripsina eluída é realizada utilizando BAMCA ou ZAMCA como substrato (Figura 8). A eluição da tripsina de *Diatraea saccharalis* em benzamidina 0,5M reduz o problema de autólise, tornando possível estudos com a enzima purificada.

As frações ativas obtidas nos passos cromatográficos foram dialisadas, secas por centrifugação a vácuo e submetidas a uma eletroforese em condições desnaturantes. Desta forma, foi possível observar a presença de uma única banda de proteína (Figura 9). A proteína purificada apresenta um peso molecular de 28,7 kD determinado por SDS-PAGE.

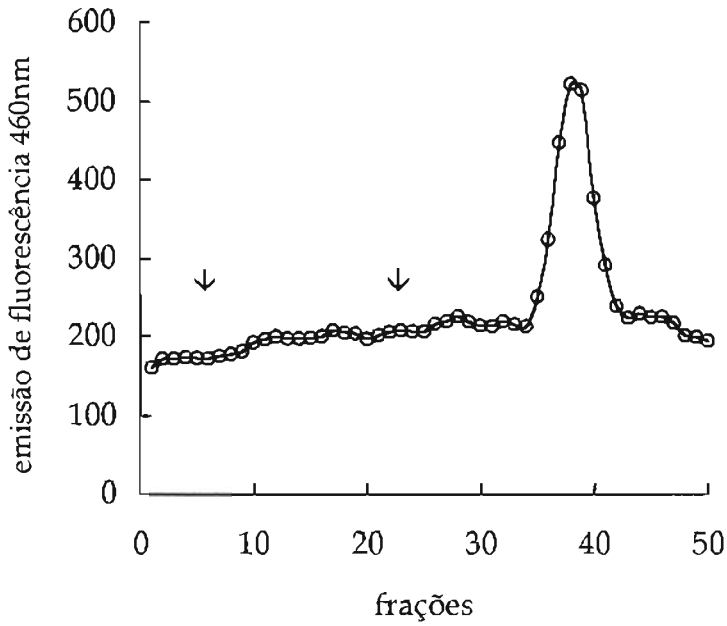


Figura 8: Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose (Pharmacia) para a purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*. Esta cromatografia tem por material inicial o sobrenadante resultante da centrifugação do homogeneizado do conteúdo luminal do intestino médio de larvas de *Diatraea saccharalis*. As setas indicam o início da eluição inespecífica utilizando tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo KCl 0,5M. e o início da eluição específica utilizando tampão fosfato 0,1M pH 7,0 contendo benzamidina 0,5M.

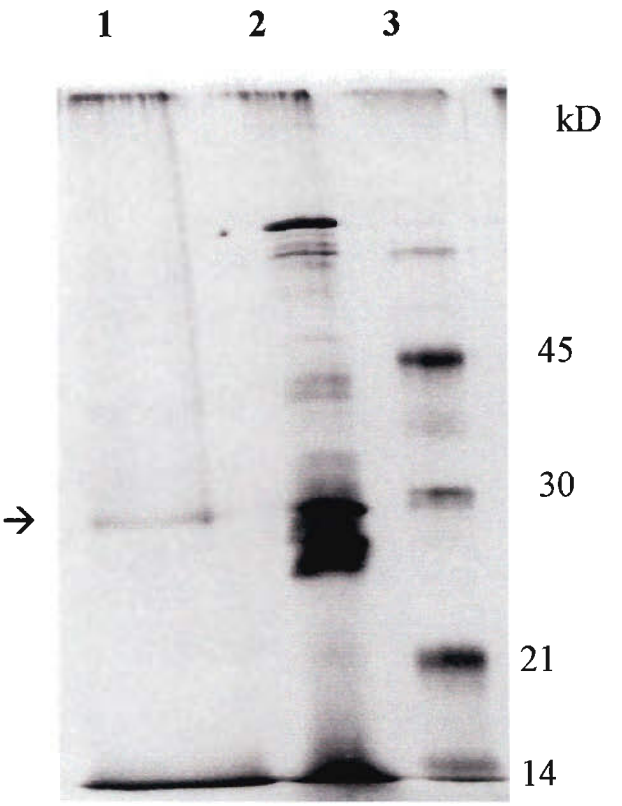


Figura 9: SDS PAGE das amostras obtidas após os diferentes passos cromatográficos da marcha de purificação da tripsina de *Diatraea saccharalis*. Raia 1: eluído ativo da cromatografia de Benzamidina-Sepharose após diálise; raia 2: homogeneizado do conteúdo luminal de larvas de *Diatraea saccharalis* e raia 3: padrões de peso molecular. A seta indica a tripsina de *Diatraea saccharalis* purificada. Os pesos moleculares estão indicados ao lado da figura.

4.3 – Purificação da tripsina de *Musca domestica.*

Como discutido anteriormente, a purificação da tripsina de *Musca domestica* já havia sido descrita por Lemos & Terra (1992), utilizando precipitação de proteínas por pH, cromatografia de troca catiônica e cromatografia de afinidade em SBTI-Agarose. A modificação desta marcha de purificação teve por objetivo encontrar uma metodologia de eficiência equivalente, mas com menor investimento de tempo. Neste novo procedimento a precipitação por pH foi mantida. Após este passo, a amostra é submetida a uma cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose (Pharmacia). O perfil de atividade desta cromatografia está representado na figura 10. As frações ativas são reunidas. Alíquotas dos passos da marcha de purificação foram submetidas a um SDS-PAGE (Figura 11). Devido à presença de benzamidina, inibidor de tripsina, não é possível a determinação da recuperação deste processo e de seu enriquecimento pelo cálculo da atividade específica. No entanto, a estimativa da quantidade de proteína purificada por SDS-PAGE demonstra que a eficiência da purificação utilizando cromatografia em Benzamidina-Sepharose é, no mínimo, semelhante à obtida com cromatografias sequenciais de troca catiônica e afinidade (Lemos & Terra, 1992), isto é um rendimento de 67 % e uma atividade específica de cerca de 20 U/mg. A proteína purificada apresenta um peso molecular de 26,6 kD determinado por SDS-PAGE.

4.4 – Propriedades das tripsinas de diversos insetos.

4.4.1. – Determinação do efeito de pH

Ensaios de quatro tempos para verificação do efeito do pH sobre a atividade de tripsina de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* foram realizados utilizando as tripsinas purificadas a partir dos tubos digestivos destes insetos.

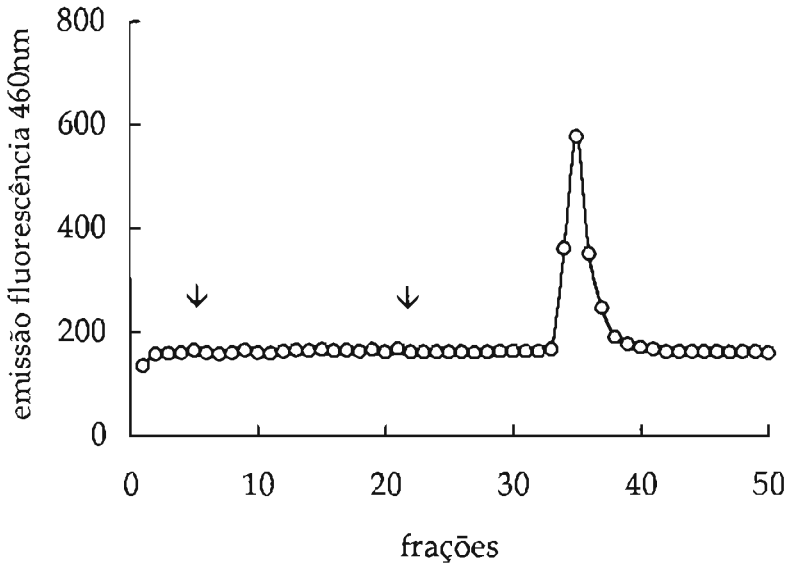


Figura 10: Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose (Pharmacia) para a purificação da tripsina de *Musca domestica*. Esta cromatografia tem por material inicial o dialisado do sobrenadante após precipitação de proteínas por pH (materiais e métodos). As setas indicam o início da eluição inespecífica utilizando tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo KCl 0,025M. e o ínicio da eluição específica utilizando tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,5 contendo benzamidina 0,5M.

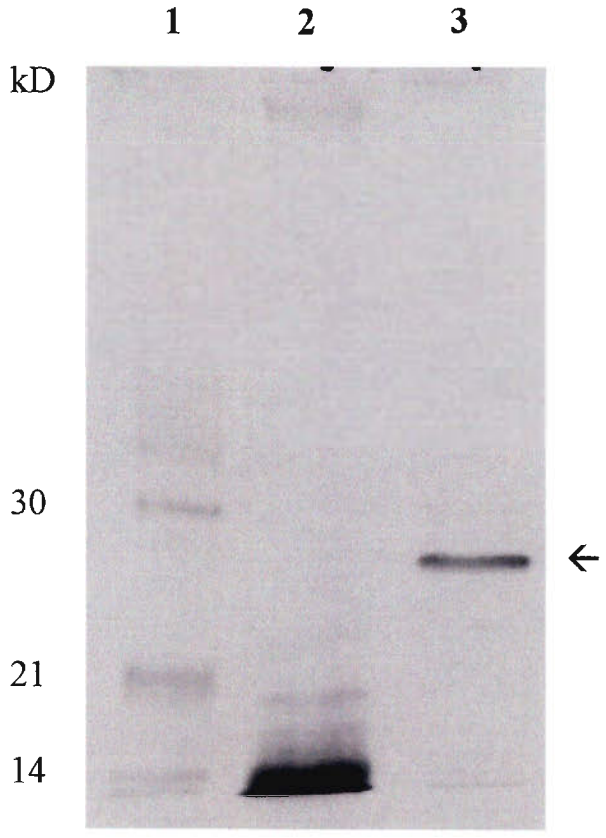


Figura 11: SDS PAGE das amostras obtidas após os diferentes passos cromatográficos da marcha de purificação da tripsina de *Musca domestica*. Raia 1: Padrões de peso molecular; raia 2: homogeneizado do tubo digestivo de larvas de *Musca domestica* em pH ácido após centrifugação e raia 3: eluído ativo da cromatografia de Benzamidina-Sepharose após diálise. A seta indica a tripsina de *Musca domestica* purificada. Os pesos moleculares estão indicados ao lado da figura.

Estes resultados possibilitaram a obtenção de uma curva de atividade de tripsina em função do pH e a determinação do pH ótimo destas enzimas em 9,0 para a tripsina de *Periplaneta americana*; 8,5 para a tripsina de *Tenebrio molitor* e 10,5 para a tripsina de *Diatraea saccharalis* (Figura 12). O pH ótimo da tripsina de *Musca domestica* já havia sido previamente caracterizado como 8,5 (Lemos & Terra, 1992).

4.4.2 – Determinação de ponto isoelétrico.

Experimentos de focalização isoelétrica foram realizados para a determinação do ponto isoelétrico das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* (Figura 13), sendo que a tripsina de *Periplaneta americana* apresenta um pI de 6,0 e a tripsina de *Diatraea saccharalis* de 4,5. O pI para a tripsina de *Tenebrio molitor* já havia sido descrito como 8,0 (Levinsky *et al.*, 1977). Os valores de pI encontrados são semelhantes aos determinados para outros insetos (Terra & Ferreira, 1994).

4.5 - Caracterização cinética das especificidades dos subsítios das tripsinas purificadas de diferentes insetos.

4.5.1 – Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados com substratos colorimétricos (val-Leu-Arg-pNa e val-Leu-Lys-pNa) utilizando homogeneizados dos intestinos médios de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* com intuito de verificar uma atividade específica diferencial em relação à presença de Arginina ou Lisina em P1 (Tabelas 2 e 3). Estes estudos evidenciaram uma atividade equivalente da tripsina de *Diatraea saccharalis* sobre os dois substratos, enquanto os outros insetos apresentam uma melhor hidrólise do peptídeo contendo Arg em P1. Para uma caracterização cinética das

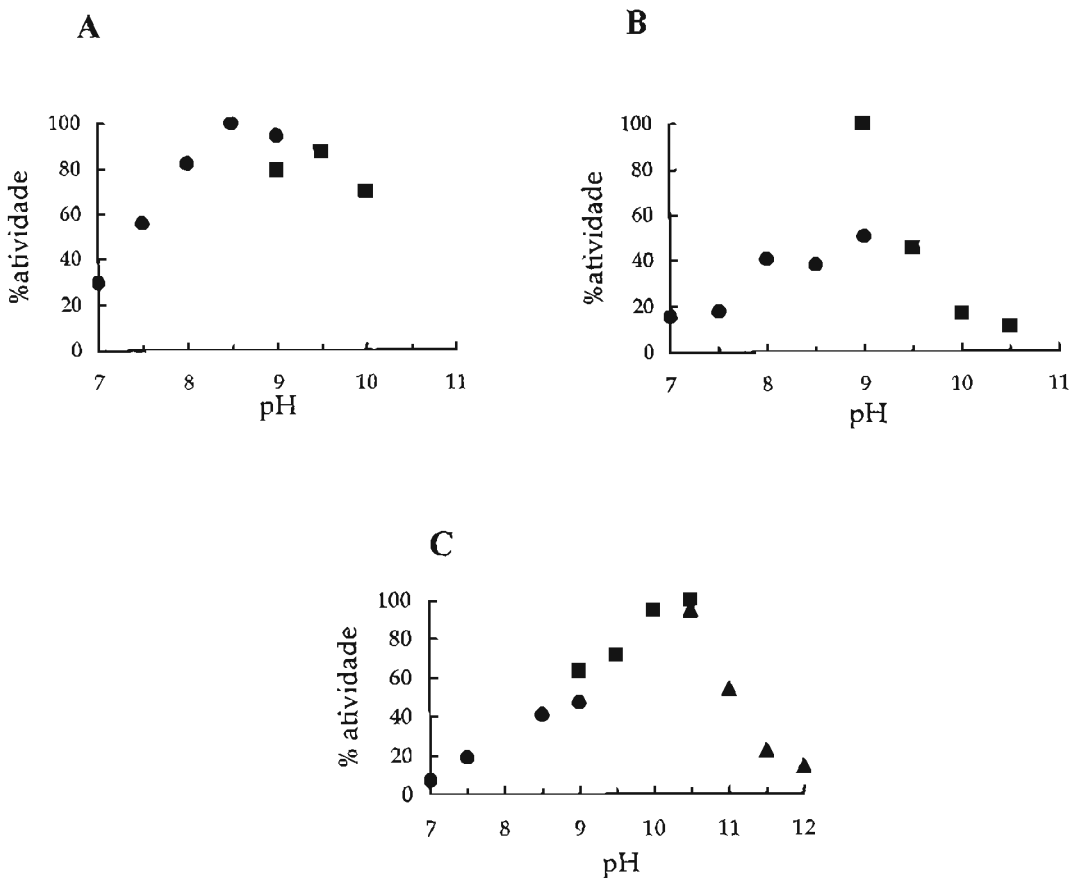


Figura 12: Efeito de pH sobre a atividade das preparações de tripsina dos diferentes insetos. (A) *Tenebrio T. molitor*, (B) *Periplaneta americana* e (C) *Diatraea saccharalis*. Para este estudo foi utilizada uma série de tampões composta por: pHs 7-9 (•):tampão Tris-HCl 0,1M contendo NaCl 0,2M; pHs 9-10,5 (▪): tampão Glicina-NaOH 0,1M contendo NaCl 0,2M e pHs 10,5-12 (▲): tampão fosfato-NaOH 0,1M contendo NaCl 0,2M.

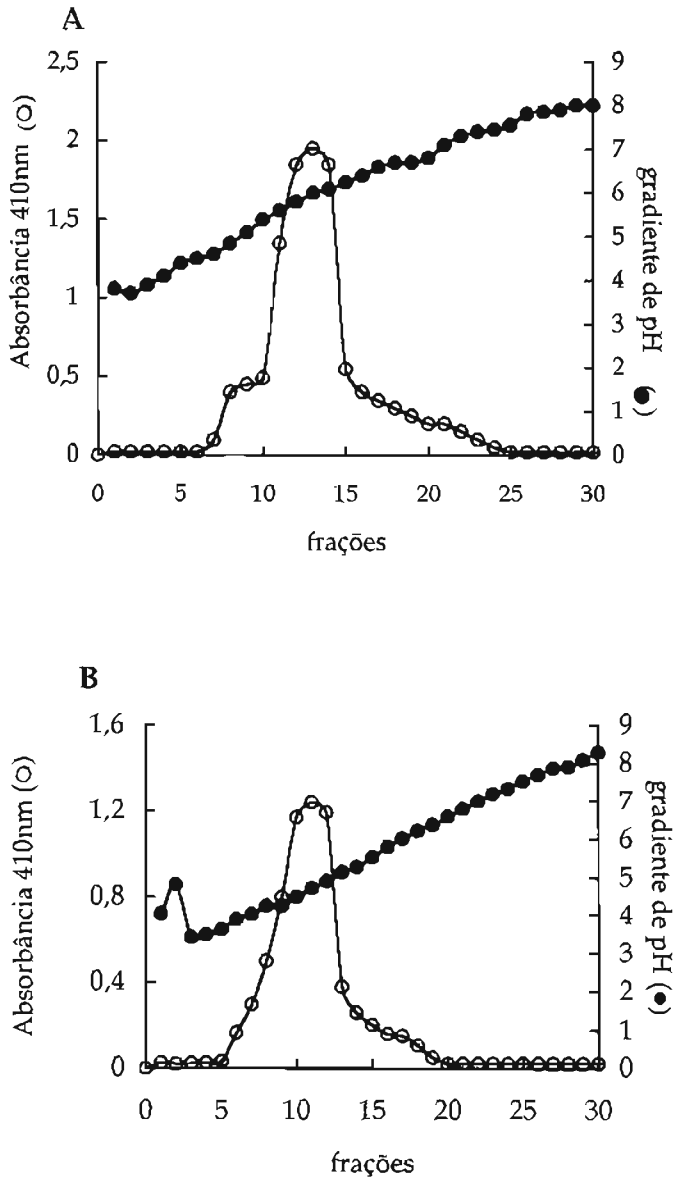


Figura 13: Focalização isoelétrica das tripsinas de *Periplaneta americana* (A) e *Diatraea saccharalis* (B) determinados como 6,0 e 4,5, respectivamente.

Tabela 2: Atividade da tripsina dos diferentes insetos sobre diferentes substratos sintéticos contendo um resíduo de arginina ou lisina em P1*.

Tripsina	BapNA (mU/mg)	val-Leu-Arg-pNa (mU/mg)	val-Leu-Lys-pNa (mU/mg)
Periplaneta americana[1]	102	1.480	400
Tenebrio molitor[2]	500	117.000	36.800
Musca domestica[3]	260	1.220	418
Diatraea saccharalis[4]	183	2.230	2.180

*As determinações foram realizadas com a utilização das seguintes preparações:

1 - homogeneizado do tubo digestivo de *Periplaneta americana*

2 - tripsina purificada de *Tenebrio molitor*

3 - homogeneizado intestinal de *Musca domestica*

4 - homogeneizado do conteúdo luminal de *Diatraea saccharalis*

Tabela 3: Especificidade primária das tripsinas dos diferentes insetos em estudo.*

Tripsina	Razão Arg/Lys
Periplaneta americana	3,7
Tenebrio molitor	3,2
Musca domestica	3,0
Diatraea saccharalis	1,0

* Estes resultados foram calculados a partir das atividades determinadas sobre val-Leu-Arg-pNa e val-Leu-Lys-pNa demonstradas na Tabela 2.

especificidades deste subsítio e dos subsítios adjacentes S1', S2 e S3 (Schechter e Berger, 1967) foram purificadas as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

Estas enzimas foram caracterizadas inicialmente quanto às suas especificidades em relação ao bloqueador da extremidade N-terminal de substratos fluorescentes BAMCA e ZAMCA (Tabela 4). As tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* apresentam um mesmo valor de Km para os dois substratos e uma variação dos valores de Vm, resultando em uma maior eficiência catalítica destas enzimas em relação ao substrato que apresenta um grupo benzoil na extremidade N-terminal. Já a tripsina de *Diatraea saccharalis* (Tabela 4), apresenta variação tanto de Km quanto de Vm em relação a estes substratos, hidrolisando com maior eficiência o substrato que apresenta um grupo carbobenzoxi na extremidade N-terminal.

4.5.2 - Caracterização do subsítio S1 para as tripsinas de Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica e Diatraea saccharalis.

As tripsinas hidrolisam ligações peptídicas na porção carboxílica de aminoácidos básicos como Lisina e Arginina (P1). A hidrólise de ligações peptídicas formadas por outros resíduos, nesta mesma posição, é da ordem de 10^5 vezes menor, sendo desconsideradas como hidrólises possíveis (Barrett *et al.*, 1998). Portanto, para a caracterização destes subsítios foram utilizados substratos de fluorescência apagada partindo-se de um peptídeo de origem (AbzAGGXGAGQ-EDDnp), sendo X um resíduo de Arginina ou Lisina.

Os resultados determinados com substratos de fluorescência apagada usando enzimas purificadas confirmam os dados preliminares obtidos com a utilização de substratos colorimétricos e enzimas brutas.

As tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* apresentam maior eficiência catalítica sobre o substrato que possui Arginina em P1 (Tabelas 5 e 6), em relação ao que possui Lisina. As únicas diferenças verificadas são as razões de hidrólise Arg/Lys em relação aos substratos colorimétricos ou de fluorescência apagada para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, que anteriormente eram de 3,7

Tabela 4: Parâmetros cinéticos de tripsinas purificadas de diferentes insetos em relação a dois substratos fluorescentes.

Tripsina	Substrato	Km (μM)	Vm (mmoles/min. $^{-1}$)	Vm/Km(min^{-1})
Periplaneta americana	BAMCA	2,6	2.092	805
Periplaneta americana	ZAMCA	2,2	870	396
Tenebrio molitor	BAMCA	2,0	3,4	1,7
Tenebrio molitor	ZAMCA	2,0	1,4	0,7
Diatraea saccharalis	BAMCA	7,8	3.025	388
Diatraea saccharalis	ZAMCA	4,4	6.093	1.385

As tripsinas purificadas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* foram incubadas com 14 diferentes concentrações de cada um dos substratos acima listados em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5 a 30°C. Os parâmetros cinéticos foram determinados com a utilização do programa Enzfitter.

Tabela 5: Determinação cinética da especificidade do subsítio S1 das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Substrato P1 variante	*Periplaneta americana*				*Tenebrio molitor*			
	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (moles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGGRGAGQ-EDDnp	7,4	1,70	230	100	3,1	0,64	210.000	100
AbzAGGKGAGQ-EDDnp	16,0	1,25	78	34	10,0	0,23	23.000	11

Tabela 6: Determinação cinética da especificidade do subsítio S1 das tripsinas de *Musca domestica e Diatraea saccharalis*.

Substrato P1 variante	*Musca domestica*				*Diatraea saccharalis*			
	Km (μM)	Vm (μmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (μmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGGRGAGQ-EDDnp	6	29	4,8	100	15	19	1,3	94
AbzAGGKGAGQ-EDDnp	11	18	1,6	34	23	31	1,4	100

vezes e 3,2 vezes (Tabelas 3 e 5) e que foram agora determinadas como 3,0 vezes e 9,0 vezes, respectivamente. Estas diferenças para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* estão provavelmente relacionadas aos resíduos vizinhos presentes nos dois grupos de substratos (substrato colorimétrico: val-Leu-Arg/Lys-pNa, substrato de fluorescência apagada: AbzAGGR/KGAGQEDDnp).

4.5.3 – Caracterização dos subsítios adjacentes a S1 para as tripsinas de Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica e Diatraea saccharalis.

4.5.3.1 – Caracterização do subsítio S2.

Este subsítio, de uma forma geral, caracteriza-se pela hidrólise preferencial de peptídeos que apresentam em P2 resíduos hidrofóbicos para as tripsinas de todos os insetos em estudo, sendo que as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis* apresentam maior eficiência catalítica em relação ao peptídeo que possui uma leucina em P2 (Tabelas 7 e 8). Já as tripsinas de *Musca domestica* e *Tenebrio molitor* apresentam maior eficiência catalítica em relação aos peptídeos P2Phe e P2Ala, respectivamente. A variação de resíduos ocasiona, com algumas exceções, uma alteração mais significativa das velocidades máximas, devido a diferentes kcats, do que uma variação das constantes de dissociação (Km). A variação da eficiência catalítica para as tripsinas de mamíferos, assim como para as enzimas estudadas, também está relacionada a uma alteração da constante catalítica e não a uma melhor ligação da enzima ao substrato (Craik *et al.*, 1985 e Hedstrom *et al.*, 1994).

Apesar do favorecimento ocasionado pela presença de resíduos hidrofóbicos neste subsítio para a hidrólise, as diferentes enzimas apresentam comportamentos muito distintos em relação aos outros resíduos de aminoácidos presentes nesta posição. Estes diferentes comportamentos cinéticos podem estar relacionados, por exemplo, ao volume e ao índice hidropático das cadeias laterais destes resíduos.

Tabela 7: Determinação cinética da especificidade do subsítio S2 das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Substrato P2 variante	*Periplaneta americana*				*Tenebrio molitor*			
	Km (μM)	Vm x 10^3 (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (moles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGARGAGQEDDnp	8,0	12,0	1.500	22	**1,4**	**0,130**	**930.000**	**100**
AbzAGIRGAGQEDDnp	40,0	46,0	1.200	18	1,8	0,130	720.000	78
AbzAGFRGAGQEDDnp	1,8	6,50	3.600	56	1,5	0,130	870.000	93
AbzAGERGAGQEDDnp	9,1	2,0	220	3	5,3	0,025	46.000	5
AbzAGVRGAGQEDDnp	2,5	11,0	4.400	68	1,4	0,115	820.000	88
AbzAGQRGAGQEDDnp	1,7	5,5	3.200	50	1,4	0,076	540.000	58
AbzAGKRGAGQEDDnp	**1,8**	**12,5**	**6.900**	**107**	**4,4**	**0,430**	**980.000**	**105**
AbzAGDRGAGQEDDnp	3,8	0,7	180	3	18,5	0,025	14.000	1,5
AbzAGYRGAGQEDDnp	1,8	7,1	3.900	61	2,3	0,013	55.000	6
AbzAGMRGAGQEDDnp	2,4	14,0	5.800	90	1,2	0,089	750.000	81
AbzAGLRGAGQEDDnp	**1,7**	**11,0**	**6.500**	**100**	1,3	0,100	800.000	86
AbzAGNRGAGQEDDnp	1,3	0,8	620	10	0,4	0,107	270.000	29
AbzAGHRGAGQEDDnp	0,5	2,4	4.800	74	0,2	0,155	780.000	83
AbzAGTRGAGQEDDnp	10,0	3,8	380	6	7,2	0,060	83.000	9
AbzAGSRGAGQEDDnp	5,1	2,5	490	8	1,2	0,065	54.000	58

Destaque em azul para o peptídeo P2 variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.
Destaque em vermelho para o peptídeo P2Lys.

Tabela 8: Determinação cinética da especificidade do subsítio S2 das tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

Substrato P2 variante	*Musca domestica*				*Diatraea saccharalis*			
	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGARGAGQEDDnp	27,0	0,79	29,0	53	47,0	1,60	34,0	97
AbzAGIRGAGQEDDnp	29,0	0,40	14,0	26	15,0	0,26	18,0	50
AbzAGFRGAGQEDDnp	**8,5**	**0,45**	**53,0**	**100**	19,0	0,56	29,0	82
AbzAGERGAGQEDDnp	22,0	0,09	4,0	8	23,0	0,31	14,0	38
AbzAGVRGAGQEDDnp	18,0	0,42	24,0	45	19,0	0,57	31,0	87
AbzAGQRGAGQEDDnp	15,0	0,28	18,0	34	25,0	0,64	26,0	73
AbzAGKRGAGQEDDnp	**5,3**	**0,42**	**79,0**	**150**	**18,0**	**0,91**	**52,0**	**147**
AbzAGDRGAGQEDDnp	36,0	0,03	0,9	1,7	19,0	0,13	7,0	20
AbzAGYRGAGQEDDnp	11,0	0,32	28,0	53	13,0	0,24	19,0	52
AbzAGMRGAGQEDDnp	15,0	0,36	25,0	47	17,0	0,37	22,0	63
AbzAGLRGAGQEDDnp	12,0	0,27	23,0	43	**12,0**	**0,41**	**35,0**	**100**
AbzAGNRGAGQEDDnp	17,0	0,09	53,0	10	24,0	0,31	13,0	37
AbzAGHRGAGQEDDnp	8,3	0,09	11,0	20	17,0	0,31	19,0	52
AbzAGTRGAGQEDDnp	16,0	0,14	9,0	17	176,0	2,40	13,0	38
AbzAGSRGAGQEDDnp	28,0	0,17	6,0	11	23,0	0,30	13,0	38

Destaque em azul para o peptídeo P2 variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Musca domestica e Diatraea saccharalis*.
Destaque em vermelho para o peptídeo P2Lys.

(a) resíduos de cadeia alifática polar não carregada hidroxilados (Thr e Ser)

De uma forma geral, a presença de hidroxilas em cadeias alifáticas na posição P2 prejudica a hidrólise do substrato (Tabelas 7 e 8). Os Kms são mais elevados e as velocidades são inferiores se comparadas aos demais resíduos, demonstrando piores ligação e hidrólise na presença de uma hidroxila. Com exceção da tripsina de *Tenebrio molitor,* os peptídeos P2Ser e P2Thr só são melhores substratos que os peptídeos que apresentam nesta mesma posição resíduos de cadeias laterais carregadas negativamente (Tabela 7). Nas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* a serina apresenta uma melhor hidrólise em relação a treonina (Tabela 7), o que não ocorre para as tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* (Tabela 8), sendo treonina um melhor resíduo. A distinção entre treonina e serina pode estar relacionada à posição da hidroxila na cadeia lateral dos resíduos de treonina e serina e ao volume destes resíduos (Figura 4, Tabela 9).

A comparação da cadeia lateral dos resíduos de serina e alanina, permite uma visualização clara da interferência da existência de uma hidroxila à uma cadeia lateral alifática (Figura 4, Tabelas 7 e 8). Para as tripsinas de *Diatraea saccharalis* e *Periplaneta americana* a presença da hidroxila leva a uma alteração tanto da ligação quanto da hidrólise do substrato, sendo mais significativa a alteração das constantes envolvidas na catálise. Para as tripsinas de *Musca domestica* e *Tenebrio molitor* ocorrem alterações apenas da constante de catálise.

(b) resíduos de cadeia lateral aromática (Phe, Tyr)

Os substratos que apresentam um grupo aromático em P2 são relativamente bem hidrolisados pelas tripsinas de *Periplaneta americana*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. Apesar da presença de uma hidroxila, o substrato contendo P2Tyr é tão bem hidrolisado quanto o substrato P2Phe pela tripsina de *Periplaneta americana* (Tabela 7). Para as tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, a existência de uma hidroxila em um grupo aromático leva a uma redução significativa da catálise, sendo que a ligação da enzima ao substrato não é afetada. A comparação da eficiência catalítica entre os peptídeos

que apresentam anéis aromáticos ou cadeias alifáticas com ou sem hidroxilas, para a tripsina de *Tenebrio molitor* demonstra ser de maior influência a adição de uma hidroxila em cadeias laterais aromáticas, sendo que, quanto maior o volume da cadeia lateral à qual esta hidroxila é adicionada, menor será a eficiência catalítica (Tabela 9). Diferentemente da tripsina de *Tenebrio molitor*, as tripsinas de *Diatraea saccharalis* e *Musca domestica* hidrolisam com maior eficiência resíduos de maior volume que apresentem hidroxilas (Tabela 10 e Figura 4).

(c) resíduos de cadeia polar carregadas negativamente (Asp e Glu)

Este grupo de resíduos compõe os substratos que apresentam menor hidrólise pelas tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* e, estão entre os substratos menos hidrolisados pela tripsina de *Diatraea saccharalis*. Tanto a constante de afinidade quanto a constante de catálise são alteradas nas tripsinas destes insetos, mas de forma diferenciada. Para a tripsina de *Periplaneta americana* (Tabela 7) a eficiência de hidrólise é semelhante para os dois resíduos, sendo que o ácido glutâmico apresenta um maior Km, mas uma maior velocidade. Para a tripsina de *Tenebrio molitor* (Tabela 7), o ácido glutâmico apresenta uma melhor ligação e velocidade igual à de ácido aspártico, sendo mais eficiente a hidrólise do primeiro. A tripsina de *Musca domestica* (Tabela 8), assim como a de *Tenebrio molitor* (Tabela 7) apresenta uma melhor ligação ao ácido glutâmico, mas também apresenta alteração da constante catalítica (Tabela 8). Diferentemente, a tripsina de *Diatraea saccharalis* (Tabela 8), apresenta Kms muito semelhantes para os peptídeos P2Glu e P2Asp, mas apresenta melhor hidrólise sobre o peptídeo P2Glu inclusive em relação aos peptídeos cujos resíduos em P2 são treonina, serina e asparagina, indicando que a presença de uma carga negativa no subsítio S2 da tripsina deste inseto exerce menor influência em relação a eficiência de hidrólise.

(d) resíduos de cadeia polar que apresentam uma amida (Asn e Gln)

Todas as tripsinas apresentaram hidrólise mais eficiente sobre o substrato que possui glutamina em P2.

As tripsinas de *Periplaneta americana*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* apresentam uma mesma constante de ligação entre os dois substratos, sendo a alteração observada na constante catalítica. É notável que a diferença entre a eficiência de hidrólise do peptídeo apresentando glutamina ou asparagina em P2 varia conforme a enzima em estudo (Velocidade Gln/Asn: *Periplaneta americana* 7 vezes, *Musca domestica* 3 vezes e *Diatraea saccharalis* 2 vezes). No entanto, comparativamente com os outros resíduos estudados, a glutamina torna-se cada vez mais favorável que a asparagina e outros resíduos ao longo da escala filogenética. Para a tripsina de *Diatraea saccharalis*, por exemplo, a glutamina em P2 torna o peptídeo melhor substrato que a presença de metionina, tirosina, histidina, isoleucina, ácido glutâmico, treonina, serina e por fim asparagina e ácido aspártico nesta posição (Tabela 8).

A tripsina de *Tenebrio molitor* apresenta um comportamento distinto das enzimas discutidas acima. O incremento da hidrólise do peptídeo que apresenta glutamina, em relação ao peptídeo que apresenta asparagina, deve-se à constante catalítica e, principalmente, a uma melhor ligação do peptídeo P2Gln (Tabela 7). Esta diferença pode estar relacionada a fatores como profundidade do subsítio, volume da cadeia lateral e outros, ocasionando um rearranjo mais favorável do conjunto de subsítios, favorecendo a ligação do peptídeo e a hidrólise da ligação peptídica entre P1 e P1'.

(e) resíduos de cadeia lateral apolar (Ala, Leu, Ile, Met, Phe e Val)

Todas as tripsinas apresentam como resíduo favorável em P2, aminoácidos de cadeia lateral apolar (Leu para *Periplaneta americana* e *Diatraea saccharalis*, Ala para *Tenebrio molitor* e Phe para *Musca domestica*). Porém, estas enzimas apresentam um comportamento cinético muito distinto em relação aos peptídeos com resíduos apolares variantes.

A tripsina de *Periplaneta americana* tem leucina por melhor resíduo em P2. Há grande variação entre os Kms em relação aos peptídeos P2 variantes com resíduos de cadeia lateral apolar. Os Kms em relação aos peptídeos P2Ala e P2Ile são os que diferem mais

notavelmente dos demais (Tabela 7). De qualquer forma, há um favorecimento da hidrólise de peptídeos que apresentem em P2 cadeias laterais alifáticas não polares volumosas e cadeias laterais aromáticas (Tabela 7 e Figura 4).

A tripsina de *Tenebrio molitor* apresenta uma eficiência catalítica muito semelhante à descrita em relação aos peptídeos P2 variantes com resíduos de cadeia lateral apolar, sendo o peptídeo P2Ala o mais bem hidrolisado. A presença de uma cadeia lateral aromática sem hidroxila em P2 é bastante favorável tanto à ligação quanto à hidrólise do substrato. Dentre as cadeias alifáticas não polares, quanto maior o volume menor a eficiência catalítica (Figura 4 e Tabela 9).

A tripsina de *Musca domestica* apresenta uma maior atividade sobre o peptídeo P2Phe. Diferentemente das tripsinas dos outros insetos, a eficiência relativa do peptídeo melhor hidrolisado pela tripsina de *Musca domestica* é bastante distinta em relação aos outros substratos (Tabela 8). Esta enzima apresenta uma maior eficiência sobre resíduos de cadeia lateral aromática, sendo seguidos pelos resíduos de cadeias laterais não polares alifáticas.

A tripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta maior atividade sobre o peptídeo P2Leu e, diferentemente das outras tripsinas, aparenta não apresentar uma distinção em P2 em relação a resíduos de cadeia lateral aromática ou alifática ou cadeias laterais de maior ou menor volume (Tabela 10).

As tripsinas de *Periplaneta americana*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, apesar da hidrolisarem favoravelmente o peptídeo que apresenta alanina em P2, apresentam Kms muito altos para este peptídeo, indicando uma ligação desfavorável deste resíduo a este subsítio.

Com a intenção de inferir um grau de hidrofobicidade aos subsítios das diferentes tripsinas em estudo, foram comparados os índices de hidropaticidade das cadeias laterais dos resíduos presentes em P2 e médias (somatória dos índices hidropáticos dos resíduos, dividido pelo número de resíduos considerados) foram realizadas. Os seis melhores resíduos hidrolisados por cada uma das tripsinas (em geral, 50% do valor relativo Vm/Km não considerando lisina), foram considerados para determinar o grau de hidrofobicidade dos subsítios (Tabelas 7 e 8 e Figura 4).

Tabela 9: Correlação entre eficiência catalítica relativa e volume de resíduos nos subsítios das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* *

Periplaneta americana						*Tenebrio molitor*					
P1′		P2		P3		P1′		P2		P3	
AA	Volume	AA	Volume	AA	volume	AA	Volume	AA	Volume	AA	Volume
Met	162.9	Leu	166,7	Gln	143,9	Ile	166,7	Ala	88,6	Met	162,9
Ala	88,6	Met	162,9	Met	162,9	Ala	88,6	Phe	189,9	Ala	88,6
Gln	143,9	His	153,2	Leu	166,7	Met	162,9	Val	140,0	Leu	166,7
Phe	189,9	Val	189,9	Ala	88,6	Phe	189,9	Leu	166,7	Gln	143,9
Asn	117,7	Tyr	117,7	Ser	89,0	Asn	117,7	His	153,2	Phe	189,9
Ser	89	Phe	89,0	Tyr	193,6	Gln	143,9	Met	162,9	Tyr	193,6
Thr	116,1	Gln	116,1	Phe	189,9	Thr	116,1	Ile	166,7	Ile	166,7
Tyr	193,6	Ala	193,6	His	153,2	Leu	166,7	Gln	143,9	His	153,2
Leu	166,7	Ile	166,7	Ile	166,7	His	153,2	Ser	89,0	Val	140,0
Val	140	Asn	140	Thr	116,1	Val	140,0	Asn	117,7	Ser	89,0
Ile	166,7	Ser	166,7	Asn	117,7	Tyr	193,6	Thr	116,1	Asn	117,7
His	153,2	Thr	153,2	Glu	138,4	Asp	111,1	Tyr	193,6	Thr	116,1
Asp	111,1	Glu	111,1	Val	140,0	Ser	89,0	Glu	138,4	Glu	138,4
Glu	138,4	Asp	138,4	Asp	111,1	Glu	138,4	Asp	111,1	Asp	111,1

*Os resíduos listados na coluna AA são, em ordem decrescente de eficiência catalítica, os resíduos presentes nas posições especificadas nos peptídeos hidrolisados pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* .

Os valores listados na coluna volume, são os volumes das cadeias laterais (A^3) de cada um dos resíduos (Creighton, 1984).

As cores estão relacionadas a cada um dos grupos de resíduos: azul (cadeia lateral apolar), rosa (cadeia lateral alifática polar hidroxilados), violeta (cadeia lateral aromática), vermelho (cadeia lateral carregados negativamente), verde (resíduos de cadia lateral polar que apresentam uma amida).

Tabela 10: Correlação entre eficiência catalítica relativa e volume de resíduos nos subsítios das tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* *

Musca domestica				*Diatraea saccharalis*					
P2		P3		P1′		P2		P3	
AA	Volume	AA	volume	AA	Volume	AA	Volume	AA	Volume
Phe	189,9	Val	140,0	Ala	88,6	Leu	166,7	Ala	88,6
Ala	88,6	Met	162,9	Phe	189,9	Ala	88,6	Phe	189,9
Tyr	193,6	Gln	143,9	Ser	89,0	Val	140,0	Gln	143,9
Met	162,9	Ala	88,6	Ile	166,7	Phe	189,9	Leu	166,7
Val	140,0	Ile	166,7	Gln	143,9	Gln	143,9	Ile	166,7
Leu	166,7	Ser	89,0	Val	140,0	Met	162,9	Met	162,9
Gln	143,9	Tyr	193,6	Tyr	193,6	Tyr	193,6	Val	140,0
Ile	166,7	Leu	166,7	Asp	111,1	His	153,2	Glu	138,4
His	153,2	Glu	138,4	Glu	138,4	Ile	166,7		
Thr	116,1	Asn	117,7			Glu	138,4		
Ser	89,0	Asp	111,1			Thr	116,1		
Asn	117,7					Ser	89,0		
Glu	138,4					Asn	117,7		
Asp	111,1					Asp	111,1		

* Os resíduos listados na coluna AA são, em ordem decrescente de eficiência catalítica, os resíduos presentes nas posições especificadas nos peptídeos hidrolisados pelas tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

Os valores listados na coluna volume, são os volumes (A^3) das cadeias laterais de cada um dos resíduos (Creighton, 1984).

As cores estão relacionadas a cada um dos grupos de resíduos: azul (cadeia lateral apolar), rosa (cadeia lateral alifática polar hidroxilados), violeta (cadeia lateral aromática), vermelho (cadeia lateral carregados negativamente), verde (resíduos de cadia lateral polar que apresentam uma amida).

De uma maneira geral, o subsítio S2 é bastante hidrofóbico, sendo os maiores índices verificados para as tripsinas de *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. A tripsina de *Periplaneta americana* apresenta o subsítio S2 de menor hidrofobicidade.

(f) histidina

A histidina não pode ser tratada como um resíduo de cadeia lateral carregada positivamente, pois o pKa do grupo imidazol presente na cadeia lateral é de 6,0. Desta forma, este grupo encontra-se desprotonado, uma vez que todas as determinações foram realizadas em pH 8,5.

As tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* apresentam baixos valores de Km em relação ao peptídeo P2His. Para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* a alta velocidade de hidrólise deste peptídeo resulta em uma alta eficiência catalítica, sendo o peptídeo P2His um dos melhores substratos (Tabela 7). Já para as tripsinas de *Musca domestica* e de *Diatraea saccharalis* a eficiência catalítica para este substrato é baixa, sendo que para a tripsina de *Diatraea saccharalis* o Km em relação a este peptídeo não proporciona boa ligação como descrito para as outras tripsinas (Tabelas 7 e 8). As diferenças no comportamento das tripsinas dos insetos em estudo em relação a P2His pode estar relacionada, por exemplo, à presença do grupo imidazol e ao volume da cadeia lateral, como pode ser verificado para a tripsina de *Periplaneta americana* (Tabela 9).

4.5.3.2 – Caracterização do subsítio S3.

A tripsina de *Periplaneta americana* hidrolisa com maior eficiência o peptídeo P3Gln, um resíduo de cadeia lateral polar não carregada, diferentemente das tripsinas de *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, as quais hidrolisam melhor os peptídeos que apresentam metionina, valina/metionina e alanina em P3, respectivamente.

A comparação dos valores tanto de Km quanto de Vm para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, demonstra que não há grandes variações entre os

valores das constantes de ligação e de catálise em relação aos diferentes peptídeos, indicando que o subsítio S3 tenha menor influência na eficiência catalítica de um determinado substrato, assim como para a tripsina de mamíferos (Schellenberger *et al.*, 1994). O mesmo tipo de comparação realizada para as tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis* demonstra que ainda há grandes variações, principalmente de Vm, sendo que a tripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisou uma série de variantes em P3. Estes resultados podem indicar um número diferenciado de subsítios nestas tripsinas. Pela comparação dos índices hidropáticos das cadeias laterais dos resíduos (Figura 4) presentes em P3 dos peptídeos mais bem hidrolisados, é possível observar uma tendência a tornar este subsítio mais hidrofóbico ao longo da evolução dos insetos (Figura 14, Tabela 11). As implicações evolutivas serão discutidas adiante.

(a) resíduos de cadeia alifática polar não carregada hidroxilados (Thr e Ser)

Os peptídeos que apresentam em P3 resíduos de cadeia alifática polar não carregada hidroxilados são, em geral, peptídeos bem hidrolisados pelas tripsinas em estudo com exceção daquela de *Diatraea saccharalis*.

Para a tripsina de *Periplaneta americana* não há distinção entre a eficiência de hidrólise dos peptídeos que apresentam em P3 um resíduo de cadeia lateral alifática hidroxilada (Ser) e de cadeia lateral aromática hidroxilada (Tabela 12). Entretanto, há uma diferença significativa de eficiência de hidrólise entre os peptídeos que apresentam em P3 uma serina ou uma treonina. Esta diferença pode estar relacionada à posição da hidroxila na cadeia lateral da treonina (Figura 4 e Tabela 12). Ocorre também uma hidrólise mais eficiente sobre peptídeos cujos resíduos apresentem em P3 um menor índice hidropático. Este argumento vem a favor da característica menos hidrofóbica do subsítio S3 da tripsina de *Periplaneta americana*. A tripsina de *Tenebrio molitor* hidrolisa mais eficientemente o peptídeo que apresenta um resíduo de metionina em P3, evidenciando um caráter mais hidrofóbico deste subsítio. Os peptídeos P3Ser, P3Thr e P3Tyr são variavelmente bem hidrolisados conforme o índice hidropático da cadeia lateral do resíduo e da característica da cadeia lateral, se aromática ou alifática. Dentre os hidroxilados, o peptídeo P3Tyr é o mais

Figura 14: Representação esquemática da hidrofobicidade dos subsítios das tripsinas de *Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica* e *Diatraea saccharalis.*

Periplaneta americana			*Tenebrio molitor*			*Musca domestica*			*Diatraea saccharalis*		
S1′	S2	S3	S1′	S2	S3	S1′	S2	S3	S1′	S2	S3
M	L	Q	I	A	M		F	V	A	L	A
A	M	M	A	F	A		A	M	F	A	P
Q	H	L	M	V	L		Y	Q	S	V	G
G	V	A	F	L	Q		M	A	I	F	L
F	Y	Y	G	H	F		V	I	Q	Q	I
N	F	S	N	M	Y		L	S	V	M	M
S	Q	F	Q	I	I		Q	Y	Y	Y	V
T	A	H	T	Q	H		I	L	D	H	E
Y	I	I	L	S	V		H	E	E	I	---
L	N	T	H	N	S		T	N		E	---
V	S	N	V	T	N		S	D		T	---
I	T	E	Y	Y	T		N			S	---
H	E	V	D	E	E		E			N	---
D	D	D	S	D	D		D			D	---
E			E								

Esta representação tem por base a ordem dos resíduos de acordo com os valores relativos de Vm/Km determinados para cada um dos subsítios com exceção d resíduos de lisina. A seta ao lado da tabela indica uma ordem crescente dos valores de eficiência catalítica relativa, sendo que cada célula possui a representação resíduo utilizado para a caracterização da especificidade. As células preenchidas por cores indicam a presença de resíduos de cadeia lateral de índice hidropát positivo. As células não preenchidas indicam resíduos ou subsítio não caracterizado e (---) indicam peptídeos não hidrolisados.

Tabela 11: Determinação da hidrofobicidade dos subsítios das tripsinas de *Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

Periplaneta americana			*Tenebrio molitor*			*Musca domestica*			*Diatraea saccharalis*		
S1′	S2	S3	S1′	S2	S3	S1′	S2	S3	S1′	S2	S3
1,9 (met)	3,8 (leu)	-3,5 (gln)	4,5 (ile)	1,8 (ala)	1,9 (met)	-	2,8 (phe)	4,2 (val)	1,8 (ala)	3,8 (leu)	1,8 (ala)
1,8 (ala)	1,9 (met)	1,9 (met)	1,8 (ala)	2,8 (phe)	1,8 (ala)	-	1,8 (ala)	1,9 (met)	2,8(phe)	1,8 (ala)	2,8(phe)
-3,5 (gln)	-3,2 (his)	3,8 (leu)	1,9 (met)	4,2 (val)	3,8 (leu)	-	-1,3 (tyr)	-3,5 (gln)	-0,8 (ser)	4,2 (val)	-3,5 (gln)
-0,4 (gly)	4,2 (val)	1,8 (ala)	2,8 (phe)	3,8 (leu)	-3,5 (gln)	-	1,9 (met)	1,8 (ala)	4,5 (ile)	2,8 (phe)	3,8 (leu)
2,8 (phe)	-1,3 (tyr)	-1,3 (tyr)	-0,4 (gly)	-3,2 (his)	2,8 (phe)	-	4,2 (val)	4,5 (ile)	-3,5 (gln)	-3,5 (gln)	4,5 (ile)
-3,5 (asn)	2,8 (phe)	-0,8 (ser)	-3,5 (asn)	1,9 (met)	-1,3 (tyr)	-	3,8 (leu)	-0,8 (ser)	4,2 (val)	1,9 (met)	1,9 (met)
X=-0,2	X=1,4	X=0,3	X= 1,2	X=1,9	X=0,9	-	X=2,2	X=1,4	X=1,5	X=1,8	X=1,9

Valores de índice hidropático das cadeias laterais dos resíduos em P1′, P2 e P3 dos seis peptídeos melhor hidrolisados.
X= média de hidropaticidade dos resíduos em P1′, P2 e P3 dos 6 peptídeos melhor hidrolisados. - subsítio não caracterizado.

Tabela 12: Determinação cinética da especificidade do subsítio S3 das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Substrato P3 variante	*Periplaneta americana*				*Tenebrio molitor*			
	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km X10²(min⁻¹)	%	Km (μM)	Vm (moles/min)	Vm/Km (min⁻¹)	%
AbzAAGRGAGQEDDnp	1,8	2,00	1.100	67	1,3	0,40	310.000	82
AbzAIGRGAGQEDDnp	1,7	1,20	710	40	1,5	0,29	190.000	52
AbzAFGRGAGQEDDnp	2,9	1,80	620	60	2,0	0,43	220.000	57
AbzAEGRGAGQEDDnp	3,7	0,79	210	26	3,3	0,27	82.000	22
AbzAVGRGAGQEDDnp	1,7	1,30	770	26	1,5	0,28	190.000	50
AbzASGRGAGQEDDnp	2,4	1,90	790	63	1,7	0,30	180.000	47
AbzAQGRGAGQEDDnp	3,1	3,00	970	100	1,7	0,40	240.000	63
AbzAKGRGAGQEDDnp	1,2	2,50	2.100	83	1,0	0,33	330.000	88
AbzADGRGAGQEDDnp	7,3	0,23	30	8	5,4	0,09	16.000	4
AbzAYGRGAGQEDDnp	2,4	1,90	790	63	1,4	0,30	210.000	57
AbzAMGRGAGQEDDnp	1,8	2,50	1.400	83	0,8	0,30	380.000	100
AbzALGRGAGQEDDnp	2,5	2,10	820	69	1,3	0,31	240.000	64
AbzANGRGAGQEDDnp	2,4	0,98	410	33	2,8	0,26	93.000	25
AbzAHGRGAGQEDDnp	2,2	1,60	730	53	1,3	0,25	190.000	51
AbzATGRGAGQEDDnp	3,4	0,99	290	33	4,1	0,36	88.000	23

Destaque em violeta para o peptídeo P3 variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.
Destaque em vermelho para o peptídeo P3Lys.

eficientemente hidrolisado, enquanto serina e treonina, que são resíduos de cadeia lateral com índices hidropáticos maiores, são menos bem hidrolisados. Treonina, inclusive, só apresenta melhor eficiência hidrolítica que os peptídeos P3 variantes com cadeias laterais carregadas negativamente (Tabela 12).

Já a tripsina de *Musca domestica* hidrolisa com alta eficiência tanto P3Ser quanto P3Tyr (Tabela 13). A tripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisou nenhum destes resíduos (Tabela 13).

(b) resíduos de cadeia lateral aromática (Phe, Tyr)

A presença de anéis aromáticos na cadeia lateral dos resíduos em P3 propicia uma boa eficiência de hidrólise destes substratos pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* (Tabela 12), mesmo com a presença de uma hidroxila em tirosina, grupo que nem sempre é favorável. Já para a tripsina de *Musca domestica* (Tabela 13), P3Tyr foi um substrato razoavelmente bem hidrolisado, sendo provavelmente, um substrato melhor que P3Phe, pois este, nas concentrações utilizadas, não satura a enzima. A tripsina de *Diatraea saccharalis* hidrolisou com uma alta eficiência catalítica apenas o substrato que apresenta fenilalanina em P3, demonstrando que a presença de uma cadeia lateral aromática é favorável nesta posição (Tabela 13).

(c) resíduos de cadeia polar carregada negativamente (Asp e Glu)

Assim como nos outros subsítios, a presença de cadeias laterais carregadas negativamente em P3 não são favoráveis à hidrólise do peptídeo. Para a tripsina de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* tanto o Km e mais expressivamente o kcat afetam a eficiência de hidrólise dos peptídeos P3Glu e P3Asp, sendo que o ácido glutâmico é melhor resíduo que ácido aspártico nessa posição (Tabela 12). Para a tripsina de *Periplaneta americana*, o peptídeo P3Glu é, inclusive, melhor que o peptídeo P3Val. Ácido glutâmico também é o melhor resíduo em P3, dentre os carregados negativamente, para a tripsina de *Musca domestica*, mas diferentemente das tripsinas acima descritas, apenas a

Tabela 13: Determinação cinética da especificidade do subsítio S3 das tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

Substrato P3 variante	*Musca domestica*				*Diatraea saccharalis*			
	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (μmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAAGRGAGQEDDnp	44,5	0,57	13,0	79	5,2	25,0	4,80	100
AbzAIGRGAGQEDDnp	24,4	0,27	11,0	67	3,2	7,9	2,50	51
AbzAFGRGAGQEDDnp	Ns	----	----	---	7,1	25,0	3,50	73
AbzAEGRGAGQEDDnp	17,3	0,09	5,2	32	9,5	14,0	1,50	31
AbzAVGRGAGQEDDnp	37,0	0,60	16,0	100	13	20,0	1,5	32
AbzASGRGAGQEDDnp	19,0	0,19	10,0	62	Nh	-----	-----	---
AbzAQGRGAGQEDDnp	13,3	0,20	15,0	91	9,5	30,0	3,20	66
AbzAKGRGAGQEDDnp	29,6	0,18	6,2	38	7,9	46,0	5,90	121
AbzADGRGAGQEDDnp	18,0	0,01	0,8	5	Nh	-----	-----	---
AbzAYGRGAGQEDDnp	15,0	0,14	9,3	58	Nh	-----	-----	---
AbzAMGRGAGQEDDnp	14,2	0,23	16,2	100	18,6	43,0	2,30	48
AbzALGRGAGQEDDnp	16,4	0,13	7,9	49	8,4	21,0	2,50	52
AbzANGRGAGQEDDnp	6,4	0,01	1,4	9	Nh	-----	-----	---
AbzAHGRGAGQEDDnp	----	----	----	---	Nh	-----	-----	---
AbzATGRGAGQEDDnp	----	----	----	---	Nh	-----	-----	---

Destaque em violeta para o peptídeo P3 variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Musca domestica e Diatraea saccharalis*.
Destaque em vermelho para o peptídeo P3Lys.Ns: não saturada nas condições realizadas; Nh: não hidrolisados; ---- determinação não realizada.

constante catalítica interfere para uma mudança significativa da eficiência de hidrólise deste peptídeo, sendo inclusive melhor substrato que P3Asn (Tabela 13). A tripsina de *Diatraea saccharalis* hidrolisou apenas o peptídeo que apresenta ácido glutâmico em P3, sendo este também melhor substrato que P3Asp (Tabela 13).

(d) resíduos de cadeia polar que apresentam uma amida (Asn e Gln)

Dentre estes peptídeos está o melhor substrato para a tripsina de *Periplaneta americana,* o peptídeo P3Gln (Tabela 12). Contrariamente, a asparagina é um dos peptídeos menos hidrolisados. Um favoritismo da hidrólise do peptídeo P3Gln em relação ao peptídeo P3Asn, também é evidenciado pelas determinações cinéticas realizadas para as tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* (Tabelas 12 e 13) e, provavelmente, para a tripsina de *Diatraea saccharalis*, pois esta enzima hidrolisou apenas o peptídeo P3Gln.

(e) resíduos de cadeia lateral apolar (Ala, Leu, Ile, Met, Phe e Val)

Metionina em P3 é o melhor resíduo tanto para a tripsina de *Tenebrio molitor* quanto para a tripsina de *Musca domestica.* Para a tripsina de *Periplaneta americana,* dentre os resíduos hidrofóbicos em P3, metionina também é o resíduo que ocasiona uma melhor eficiência catalítica. O substrato P3Met só não é bem hidrolisado pela tripsina de *Diatraea saccharalis*, a qual apresenta melhor hidrólise sobre o peptídeo P3Ala. De uma maneira geral, a eficiência hidrolítica dos substratos que apresentam cadeias laterais apolares em P3 parece não estar correlacionada nem ao volume e nem ao índice hidropático destas cadeias (Tabelas 9 ,10 e 11). O fato de a metionina ser um bom resíduo nesta posição, pode estar relacionado a presença de um enxofre na cadeia lateral, proporcionando algum tipo de interação favorável à hidrólise da ligação peptídica entre P1 e P1' (Figura 5). O peptídeo P3Val também é hidrolisado com 100% de eficiência catalítica relativa pela tripsina de *Musca domestica*, diferentemente das outras tripsinas onde a presença de valina em P3 leva a uma redução da eficiência catalítica. Para o peptídeo P3Met, o Km é o fator determinante da alta eficiência catalítica comparativamente aos outros resíduos (Tabela 13), enquanto

para o peptídeo P3Val o fator determinante da alta eficiência hidrolítica é um aumento da constante catalítica (Tabela 13).

(f) histidina

A presença de histidina em P3 resulta em eficiências catalíticas muito diferentes das verificadas quando da presença de histidina em P2 (Tabelas 7, 8, 12 e 13). Para o subsítio S3, a presença de histidina não proporciona tão boa ligação da enzima ao substrato quanto para o subsítio S2 e a velocidade de hidrólise também é inferior. A tripsina de *Diatraea saccharalis* não hidrolisa este peptídeo.

4.5.3.3 – Caracterização do subsítio S1'.

Este subsítio foi caracterizado apenas para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. De uma maneira geral, assim como para os outros subsítios, os valores de Km são relativamente constantes, apresentando uma variação da velocidade máxima. Como descrito para o subsítio S3, o subsítio S1' parece apresentar uma menor variação dos valores de velocidade máxima, o que acarretaria em uma menor seletividade de resíduos nesta posição. Todas as enzimas caracterizadas apresentam melhor hidrólise sobre peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos em P1' (*Periplaneta americana*, metionina; *Tenebrio molitor*, isoleucina/ alanina e *Diatraea saccharalis*, alanina). Mas diferentemente das tripsinas dos outros insetos em estudo a tripsina de *Periplaneta americana* apresenta um grau de hidropaticidade negativo, indicando que este subsítio é o mais hidrofílico que hidrofóbico. A análise comparativa da hidrólise dos peptídeos P1' variantes também demonstra diferenças importantes no comportamento cinético destas tripsinas.

(a) resíduos de cadeia alifática polar não carregada hidroxilados (Thr e Ser)

Para a tripsina de *Periplaneta americana* a presença de uma hidroxila sempre leva a uma redução da eficiência catalítica, sendo que dentre os hidroxilados serina apresenta-se como o melhor resíduo nesta posição (Tabela 14). A comparação dos parâmetros cinéticos obtidos com os peptídeos P1'Ala, P1'Ser e P1'Thr demonstra que a adição de uma hidroxila a uma cadeia alifática é desfavorável à ligação da enzima ao substrato conforme a posição na qual encontra-se esta hidroxila (Figura 4), pois as constantes de dissociação (Km) em relação a P1'Ala e P1'Thr são muito semelhantes (Tabela 14). Já a comparação destes parâmetros entre P1'Ser, P1'Thr e P1'Tyr demonstra que quanto maior o volume da cadeia lateral à qual a hidroxila está associada pior será a hidrólise. Por outro lado, os valores das constantes de dissociação demonstram que, quanto maior o volume da cadeia lateral hidroxilada, melhor a ligação. A posição da hidroxila também está relacionada a ligação da tripsina de *Tenebrio molitor* aos peptídeos P1'Ser, P1'Thr e P1'Tyr (Tabela 14, Figura 4), a hidroxila "lateral" da treonina é mais favorável à ligação da enzima ao peptídeo. Aparentemente, há uma relação entre a velocidade de hidrólise e o volume da cadeia lateral para a tripsina de *Tenebrio molitor*, sendo que esta enzima apresenta uma maior velocidade de hidrólise deste peptídeo. Em termos de eficiência catalítica, treonina é um melhor resíduo nesta posição para a tripsina de *Tenebrio molitor*, diferentemente do verificado para a tripsina de *Periplaneta americana*. Além disso, é destacável que serina em P1' leva a uma redução significativa da eficiência catalítica, sendo esta idêntica à dos peptídeos com resíduos P1' de cadeia lateral carregada negativamente. A presença de um resíduo de serina na posição P1' no substrato para a tripsina de *Diatraea saccharalis* não afeta a ligação da enzima a este peptídeo, assim como esta tripsina apresenta uma maior eficiência de hidrólise sobre este peptídeo que as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, mesmo sendo a presença de hidroxila menos favorável que a ausência deste grupo. A presença de uma hidroxila associada a uma cadeia lateral aromática (Tyr) resulta em uma eficiência de hidrólise semelhante às obtidas para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14: Determinação cinética da especificidade do subsítio S1′ das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Substrato P1′ variante	*Periplaneta americana*				*Tenebrio molitor*			
	Km (μM)	Vm (mmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%	Km (μM)	Vm (moles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGGRAAGQEDDnp	3,7	1,45	390	82	2,4	0,76	320.000	10(
AbzAGGRIAGQEDDnp	5,9	0,80	130	28	1,6	0,51	320.000	10(
AbzAGGRFAGQEDDnp	4,1	1,30	32	66	5,8	1,20	210.000	65
AbzAGGREAGQEDDnp	18,0	0,80	4	9	5,0	0,16	32.000	10
AbzAGGRVAGQEDDnp	4,0	0,82	200	43	2,9	0,39	130.000	42
AbzAGGRGAGQEDDnp	3,5	1,20	340	72	3,1	0,64	210.000	65
AbzAGGRQAGQEDDnp	3,9	1,40	360	75	4,7	0,79	170.000	53
AbzAGGRSAGQEDDnp	8,5	2,40	28	59	8,0	0,36	45.000	14
AbzAGGRKAGQEDDnp	2,1	1,40	670	140	0,9	0,43	480.000	15(
AbzAGGRDAGQEDDnp	8,0	0,74	93	19	3,3	0,16	49.000	15
AbzAGGRYAGQEDDnp	4,0	1,00	250	52	8,3	0,80	96.000	30
AbzAGGRMAGQEDDnp	2,5	1,20	480	100	2,6	0,62	240.000	75
AbzAGGRLAGQEDDnp	3,6	0,83	230	48	3,5	0,53	150.000	48
AbzAGGRNAGQEDDnp	6,2	1,80	290	60	4,4	0,77	180.000	55
AbzAGGRHAGQEDDnp	9,8	1,15	120	24	2,8	0,40	140.000	45
AbzAGGRTAGQEDDnp	4,3	1,20	280	58	4,3	0,66	160.000	49

Destaque em azul para o peptídeo P1′ variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*. Destaque em vermelho para o peptídeo P1′Lys.

Tabela 15: Determinação cinética da especificidade do subsítio S1′ das tripsinas de *Diatraea saccharalis*.

Substrato P1′ variante	*Diatraea saccharalis*			
	Km (μM)	Vm (μmoles/min)	Vm/Km (min^{-1})	%
AbzAGGRAAGQEDDnp	14,0	2,85	240	100
AbzAGGRIAGQEDDnp	12,0	1,80	150	74
AbzAGGRFAGQEDDnp	8,6	1,60	180	90
AbzAGGREAGQEDDnp	33,5	1,60	48	23
AbzAGGRVAGQEDDnp	19,2	1,80	94	46
AbzAGGRGAGQEDDnp	----	----	----	---
AbzAGGRQAGQEDDnp	19,4	2,55	130	64
AbzAGGRSAGQEDDnp	17,0	3,00	180	87
AbzAGGRKAGQEDDnp	6,0	2,70	450	221
AbzAGGRDAGQEDDnp	35,2	1,80	52	26
AbzAGGRYAGQEDDnp	10	0,92	92	45
AbzAGGRMAGQEDDnp	----	----	----	---
AbzAGGRLAGQEDDnp	----	----	----	---
AbzAGGRNAGQEDDnp	----	----	----	---
AbzAGGRHAGQEDDnp	----	----	----	---
AbzAGGRTAGQEDDnp	----	----	----	---

Destaque em azul para o peptídeo P1′ variante melhor hidrolisado pelas tripsinas de *Diatraea saccharalis*. Destaque em vermelho para o peptídeo P1′Lys; --- Não determinados.

(b) resíduos de cadeia lateral aromática (Phe, Tyr)

A presença de uma cadeia lateral aromática para a tripsina de *Periplaneta americana* é favorável a hidrólise deste peptídeo, mas a presença de uma hidroxila leva a uma redução da eficiência catalítica (Tabela 14), da mesma forma para as tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* (Tabelas 14 e 15).

(c) resíduos de cadeia polar carregada negativamente (Asp e Glu)

Os resíduos de cadeia lateral carregada negativamente, assim como verificado para os outros subsítios previamente descritos, são desfavoráveis à hidrólise. Porém, no subsítio S1' ocorre uma inversão da importância dos resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico, sendo este último melhor hidrolisado pelas três tripsinas descritas. A tripsina de *Periplaneta americana* apresenta uma baixa afinidade pelo peptídeo P1'Glu, sendo este o pior Km. A catálise dos dois resíduos negativamente carregados é bastante semelhante, portanto a ligação da enzima a estes peptídeos determina a eficiência de hidrólise. Quanto mais longa a cadeia lateral negativamente carregada pior a ligação. Este comportamento sugere a presença de uma carga negativa neste subsítio. A proximidade de duas cargas negativas levaria a uma maior repulsão. Já para a tripsina de *Tenebrio molitor*, os Kms em relação aos peptídeos que apresentam Asp e Glu são iguais aos dos outros resíduos, estando reduzidas a velocidade de catálise em relação a estes peptídeos. A tripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta baixa afinidade pelos peptídeos P1'Asp e P1'Glu, independentemente do comprimento da cadeia lateral à qual esta carga esteja associada. A baixa ligação destes peptídeos está diretamente relacionada à baixa eficiência catalítica em relação a estes substratos, pois as velocidades são iguais ou maiores do que as de resíduos eficientemente clivados (Tabela 15).

(d) resíduos de cadeia polar que apresentam uma amida (Asn e Gln)

De uma forma geral, a presença de resíduos de cadeia lateral polar apresentando uma amida em P1' são bons substratos para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis*. A tripsina de *Periplaneta americana* apresenta melhor hidrólise sobre o peptídeo P1'Gln, enquanto a tripsina de *Tenebrio molitor* apresenta hidrólise muito semelhante em relação aos dois peptídeos.

(e) resíduos de cadeia lateral apolar (Ala, Leu, Ile, Met, Phe e Val)

Assim como verificado para S3, há um aumento da hidrofobicidade do subsítio S1' da tripsina de acordo com a posição evolutiva ocupada pela ordem do inseto em estudo. O subsítio S1' da tripsina de *Periplaneta americana* distingue-se por sua menor hidrofobicidade, apresentando um grau de hidrofobicidade negativo (Figura 4, Tabela 14). Apesar disso, os peptídeos mais bem hidrolisados por esta enzima apresentam metionina e alanina em P1'. Estes resíduos possuem os mais baixos índices hidropáticos dentre os resíduos hidrofóbicos. A tripsina de *Tenebrio molitor* é bastante diferente da tripsina de *Periplaneta americana*, hidrolisando melhor os peptídeos que apresentam resíduos hidrofóbicos de altos índices hidropáticos em P1'. Dentre os peptídeos que foram utilizados para a caracterização da tripsina de *Diatraea saccharalis*, é possível observar uma maior hidrólise dos peptídeos que apresentam resíduos hidrofóbicos em P1', apresentando um padrão semelhante ao obtido para a tripsina de *Tenebrio molitor*.

(f) histidina

O peptídeo que apresenta histidina na posição P1' não apresenta boa ligação à enzima tanto para a tripsina de *Periplaneta americana* quanto para a tripsina de *Tenebrio molitor*. Em *Periplaneta americana*, o peptídeo P1'His apresenta baixa afinidade e eficiência de hidrólise semelhante a verificada para os peptídeos P1'Asp e P1'Glu (Tabela 14). Para a tripsina de *Tenebrio molitor* o peptídeo que apresenta histidina não apresenta uma hidrólise eficiente, mas também não está entre os peptídeos mal hidrolisados (Tabela 14).

4.5.3.4 - Lisina nas diferentes posições.

Em peptídeos de fluorescência apagada, como os que estão sendo utilizados para a caracterização da especificidade dos subsítios das diferentes tripsinas, a hidrólise de qualquer uma das ligações peptídicas provoca a separação da porção fluorescente e da porção apagadora. Portanto nos peptídeos P2Lys, P3Lys e P1'Lys, a lisina representa um segundo ponto possível de hidrólise (Figura 15). Desta forma, um peptídeo que, por exemplo, apresente lisina em P2 e arginina em P1 poderá ser hidrolisado na ligação peptídica entre Lys e Arg, passando a ser o resíduo de lisina o ocupante de S1. Deste modo, mesmo que indiretamente, é possível avaliar uma série de fatores ligados à especificidade das tripsinas destes insetos como eficiência de hidrólise dos peptídeos que apresentam Arg ou Lys em P1, confirmando os dados já obtidos para este tipo de caracterização; a influência na catálise de resíduos de cadeia lateral carregadas positivamente para os vários subsítios e a relação da eficiência de hidrólise com a ligação ou a catálise destes substratos. A comparação dos dados obtidos para os insetos em estudo podem ainda evidenciar outras particularidades dos subsítios das diferentes tripsinas. No peptídeo P1'Lys a ligação poderá ocorrer tanto em S1 quanto em S1'. Este segundo ponto de hidrólise é claramente determinado para a tripsina de *Diatraea saccharalis*. Esta tripsina apresenta alanina como melhor resíduo para a posição P1'. É verificada para o peptídeo P1'Lys uma porcentagem de 225% (Tabela 15), isto é 2,25 vezes maior do que para o melhor resíduo em P1', demonstrando tanto uma hidrólise dupla quanto o favorecimento de lisina em P1. Além disso, a hidrólise desta ligação pode também estar sendo favorecida pela presença de uma alanina após a lisina na sequência peptídica do substrato (Tabela 15). Sendo o peptídeo P1'Ala o substrato de hidrólise mais eficiente e estando a lisina em P1, esta hidrólise pode ser mais efetiva que a hidrólise entre dois resíduos de cadeias laterais positivamente carregadas como é o caso da ligação Arg-Lys. Este favorecimento de P1Lys P1'Ala também pode estar ocorrendo para a tripsina de *Tenebrio molitor* (Tabela 14), que apresenta uma porcentagem de eficiência catalítica de 150%, mesmo sendo a especificidade de S1 por arginina. A tripsina de *Periplaneta americana* apresenta uma porcentagem relativa de

Figura 15: Representação esquemática dos possíveis pontos de hidrólise dos peptídeos de fluorescência apagada na presença de um resíduo de lisina nas posições P2, P3 e P1′.

eficiência de hidrólise de 140%, portanto inferior inclusive a tripsina de *Tenebrio molitor* que apresenta a maior razão Arg/Lys (Tabela 4). Este fato pode também estar relacionado à presença de alanina em P1', associado a diferença de eficiência catalítica do peptídeo que apresenta Ala em P1' para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* (Tabela 14).

A presença de lisina em P2 poderá gerar um substrato hidrolisável tendo por resíduos em P2, P1 e P1', respectivamente Gly, Lys e Arg, possibilitando a análise da presença de uma cadeia lateral carregada positivamente em P1'. Para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* há uma redução da porcentagem relativa da eficiência catalítica para valores próximos de 100% (Tabela 7). Este decréscimo da porcentagem pode estar relacionado: a presença de uma cadeia lateral carregada positivamente em P2 (a própria lisina), à presença de uma cadeia lateral positivamente carregada em P1'. Como a tripsina de *Musca domestica* apresenta um comportamento cinético em relação à proporção de hidrólise Arg/Lys semelhante ao das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* era esperado que as porcentagens relativas de hidrólise para a presença de lisina em P2 fossem também semelhantes. Os dados obtidos resultam em uma porcentagem de 150%, mesma porcentagem obtida para a tripsina de *Diatraea saccharalis*. Este resultado leva a crer que, diferentemente das tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, a presença de uma cadeia lateral carregada positivamente em P2 ou P1' pode ser favorável a hidrólise. Já para a tripsina de *Diatraea saccharalis* esperava-se uma porcentagem semelhante à verificada para o peptídeo P1'Lys (Tabela 15). Em *Diatraea saccharalis* ocorre uma redução desta porcentagem indicando uma redução da eficiência catalítica quando da presença de uma cadeia lateral carregada positivamente em P2 (Lys) ou em P1'(Arg), assim como para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*.

Em S3, a redução da porcentagem relativa da eficiência catalítica para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* são bastante significativas (*Periplaneta americana* 83%, *Tenebrio molitor* 88% e *Musca domestica* 38%). Esta redução para as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor* podem estar relacionadas principalmente a dois fatores: ao fato de a lisina estar mais próxima à extremidade N-terminal do peptídeo, o que reduz a eficiência catalítica, ou pelo fato de S3 ter uma menor

influência na variação da eficiência catalítica e da especificidade para estas tripsinas como discutido anteriormente.

Para a tripsina de *Musca domestica*, a presença de uma cadeia lateral carregada positivamente em P3 ocasiona uma alteração ainda mais significativa da eficiência de hidrólise deste substrato, estando associada provavelmente tanto a ligação deste peptídeo quanto à sua hidrólise (Tabela 13). Este dado está também de acordo com o argumento que S3 ainda influencia significativamente na determinação da especificidade das tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. Por fim, a tripsina de *Diatraea saccharalis* também apresenta uma redução da porcentagem relativa da eficiência catalítica em relação a este peptídeo, mas ainda assim esta porcentagem é de 121%. Esta redução pode estar relacionada tanto ao fato da lisina estar mais próxima da extremidade N-terminal, quanto à influência de uma cadeia lateral positivamente carregada em S3. Ainda é de interesse destacar que os determinantes de uma maior ou menor eficiência catalítica dos peptídeos apresentando lisina em qualquer uma das posições podem ser tanto uma melhor ligação da enzima ao substrato quanto uma catálise mais efetiva. A importância destes fatores é variável dentre as tripsinas dos diferentes insetos. Para a tripsina de *Periplaneta americana*, em geral (S1', S3 e S2 – P1'Lys, P2Lys, P3Lys), uma melhor ligação dos peptídeos é responsável pelas altas eficiências catalíticas. A tripsina de *Tenebrio molitor* apresenta um comportamento semelhante ao da tripsina de *Periplaneta americana*, diferenciando-se apenas em S2 (P2Lys), onde a alta eficiência catalítica está relacionada a uma alta constante de catálise. Apresentando um mecanismo catalítico diferenciado, a tripsina de *Diatraea saccharalis* determina as altas taxas de eficiência catalítica dos peptídeos apresentando lisina, em geral, com um aumento da constante de catálise, sendo exceção apenas o subsitio S1', no qual a presença de Lys leva a uma melhor ligação. Os resultados para a tripsina de *Musca domestica* dão indícios de que esta tripsina ainda apresenta um terceiro comportamento, sendo o melhor kcat em S3 e a melhor ligação em S2 em relação aos peptídeos apresentando Lisina nas diferentes posições.

5 – Discussão.

5.1 – Peptídeos como substratos ideais para as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

A determinação das especificidades de cada um dos subsítios para as tripsinas dos diferentes insetos nos permite propor o que poderia ser um substrato ideal para estas enzimas, o que não necessariamente é real, pois a especificidade de uma enzima em qualquer um dos subsítios é influenciada pela ocupação dos subsítios vizinhos (Schellenberger *et al.*, 1994). Desta forma podemos verificar qual é a especificidade de um único subsítio com a utilização de peptídeos sistematicamente variados, mas não podemos afirmar que um peptídeo formado por todos os resíduos de maior eficiência catalítica relativa será um excelente substrato. No entanto, estão esquematizados na figura 16 quais seriam os substratos ideais para cada uma das tripsinas estudadas, demonstrando a diferença em suas especificidades.

5.2– A especificidade diferencial do subsítio S1.

Em relação à especificidade de S1, as tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor* e *Musca domestica* são semelhantes às tripsinas de mamíferos, as quais hidrolisam com maior eficiência peptídeos que apresentam Arginina em P1 (Craik *et al.*, 1985 e Barrett *et al.*, 1998). Já a tripsina de *Diatraea saccharalis*, diferentemente dos insetos já descritos, apresenta maior eficiência catalítica sobre o peptídeo P1Lys (Tabela 6).

A especificidade primária desta tripsina é semelhante à especificidade de uma tripsina de rato modificada por mutação sítio-dirigida (Craik *et al.*, 1985). Utilizando este mutante como modelo, os autores verificaram que a substituição da glicina 226 (um dos resíduos envolvidos em determinação da especificidade primária em tripsinas) por alanina ocasiona uma alteração da eficiência catalítica com que são hidrolisados substratos P1Arg ou P1Lys, sendo o último melhor hidrolisado. O aumento da eficiência de hidrólise de

Periplaneta americana

Gln-Leu-Arg--Met

Musca domestica

Val-Phe-Arg--Nd
Met

Tenebrio molitor

Met-Ala-Arg--Ile
Ala

Diatraea saccharalis

Ala-Leu-Lys--Ala

Figura 16: Peptídeos ideais desenhados para as tripsinas de *Periplaneta americana, Tenebrio molitor, Musca domestica* e *Diatraea saccharalis,* a partir da caracterização da especificidade de cada um dos subsítios estudados para estas enzimas. Nd: não determinados. Resíduos em azul: resíduos de cadeia lateral apolar; resíduos em verde: resíduos de cadeia lateral polar e resíduos em vermelho: resíduos de cadeia lateral carregadas positivamente.

P1Lys está diretamente relacionado à constante catalítica e não a uma melhor ligação da enzima ao substrato. Da mesma forma ocorre para a tripsina de *Diatraea saccharalis* (Tabela 6), indicando a possibilidade de uma mutação, nesta tripsina, dos resíduos envolvidos diretamente com determinação da especificidade primária.

A tripsina de *Diatraea saccharalis* apresenta uma especificidade primária distinta tanto das tripsinas dos outros insetos estudados, quanto das tripsinas de vertebrados, hidrolisando com maior eficiência ligações peptídicas formadas por um resíduo de lisina.

Uma possível implicação fisiológica para a alteração da especificidade em relação ao resíduo em P1 seria a resistência a inibidores vegetais.

Esses inibidores são, na realidade, substratos de proteólise limitada de suas enzimas alvo (Laskowski & Kato, 1980 e Bode & Huber, 1992). Na superfície de cada um destes inibidores existe ao menos uma ligação peptídica chamada sítio reativo, a qual interage especificamente com o sítio ativo da enzima alvo. Os valores das relações kcat/Km dos inibidores são extremamente baixos, sendo muitas vezes inferior aos valores determinados para os substratos. Sendo assim, o sistema comporta-se como um equilíbrio simples entre as formas da enzima e do inibidor livres e do complexo enzima-inibidor (Laskowski & Kato, 1980 e Bode & Huber, 1992).

As principais famílias de inibidores protéicos presentes em plantas apresentam uma lisina em P1 (Laskowski & Kato, 1980). Portanto, a troca do resíduo preferencial na posição P1 poderia implicar em uma menor eficiência dos inibidores. Este tipo de pressão seletiva teria sido maior no grupo Lepidoptera (*Diatraea saccharalis*), pois este grupo de insetos apresenta como endopeptidases apenas serina endopeptidases, enquanto as outras ordens estudadas (Dictyoptera, Coleoptera e Diptera) apresentam, pelo menos duas diferentes classes de endopeptidases (Terra & Ferreira, 1994).

A alteração da especificidade das tripsinas também pode estar relacionada à resistência às δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* e à ativação de suas pró-toxinas. Tem sido demonstrado que a resistência em insetos às toxinas de *Bacillus thuringiensis* está relacionada a múltiplos mecanismos fisiológicos dos quais a regulação da ativação das pró-toxinas é um deles (Oppert *et al.*, 1997). Estas pró-toxinas são ativadas por endopeptidases em pontos específicos que determinam a sua toxicidade e a sua especificidade de ligação

aos receptores presentes na membrana plasmática. A alteração na especificidade primária pode favorecer a hidrólise de outras ligações peptídicas que não as determinantes da toxicicidade.

5.3 – Propriedades gerais dos subsítios adjacentes ao subsítio S1.

De uma forma geral, os subsítios das tripsinas de insetos tendem a ser hidrofóbicos. As diferenças de especificidade são, como se podia esperar, de certo modo sutis, mas não menos interessantes. Fatores como o volume e o índice de hidropaticidade da cadeia lateral dos resíduos ligantes em cada um dos subsítios foram de muita importância na caracterização e diferenciação das especificidades das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*.

5.3.1 - A especificidade do subsítio S2 para as tripsinas de insetos

Peptídeos que apresentam resíduos hidrofóbicos em P2 são melhor hidrolisados pelas tripsinas estudadas, o que caracteriza o subsítio correspondente como hidrofóbico. A estimativa da hidrofobicidade do subsítio pelos índices de hidropaticidade das cadeias laterais dos resíduos de melhor hidrólise, demonstra que a hidrofobicidade de S2 é idêntica para as tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Diatraea saccharalis* (Figura 14 e Tabela 11), mas não para a tripsina de *Musca domestica* que apresenta maior grau de hidropaticidade parecendo ser, além de uma tendência na escala evolutiva, uma adaptação própria da ordem Diptera. A hidrofobicidade deste subsítio parece ser de muita importância na catálise. Mesmo para a tripsina de *Periplaneta americana*, na qual a média dos índices de hidropaticidade é inferior, este subsítio apresenta a maior hidrofobicidade se compararmos S1', S2 e S3 da tripsina de *Periplaneta americana*. A presença de alguns resíduos no subsítio pode garantir a interação com determinados resíduos no substrato, como é o caso da presença de um serina, que assim como no subsítio S1 de quimotripsina, garante interações com um resíduo hidrofóbico (Hedstrom *et al.*, 1994 e Branden & Tooze, 1998).

5.3.2 – A especificidade dos subsítios S3 e S1' para as tripsinas de insetos.

A diferença da especificidade e a menor hidrofobicidade dos subsítios da tripsina de *Periplaneta americana* são bastante claras nestes subsítios. O subsítio S1' apresenta uma média de hidropaticidade negativa e em P3 o substrato melhor hidrolisado foi o peptídeo P3Gln, um resíduo de cadeia polar apresentando uma amida.

A hidrofobicidade comparativa de S3 e S1' é um dos fatores mais interessantes destes subsítios. Há um aumento crescente de hidrofobicidade entre os subsítios das diferentes enzimas, sendo os subsítios mais hidrofóbicos os subsítios da tripsina de *Diatraea saccharalis*. Diferentemente das tripsinas dos outros insetos, o subsítio S3 da tripsina de *Diatraea saccharalis* é o subsítio mais hidrofóbico. Evolutivamente este inseto representa a ordem mais derivada dentro da classe Insecta (Terra & Ferreira, 1994), podendo apresentar diferenças em suas especificidades que não ocorrem nos outros grupos. Novamente, estas adaptações podem estar relacionadas a uma maior eficiência hidrolítica e consequentemente a uma resistência a inibidores protéicos de endopeptidases.

Além da hidrofobicidade do subsítio S3, outro fator interessante é a influência da especificidade deste subsítio em relação à eficiência catalítica. Assim como para a tripsina de mamíferos, as tripsinas de *Periplaneta americana* e *Tenebrio molitor*, parecem apresentar um subsítio S3 de importância reduzida na eficiência catalítica (Schellenberger *et al.*, 1994). Já para as tripsinas de *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*, a especificidade de S3 parece tão importante quanto a especificidade de S2. Esta diferença mostra uma tendência de alteração da especificidade dentro do grupo Panorpóide e do número de subsítios formadores do sítio de ligação.

Portanto, a presente caracterização da especificidade das tripsinas de diferentes ordens de insetos demonstra uma diferença entre as especificidades dos subsítios, que podem resultar de evidências evolutivas no sentido de aumentar a adaptação à presença de inibidores de tripsina e a toxinas de *Bacillus thuringiensis* na dieta dos diferentes insetos.

6 - Resumo

Tripsinas são enzimas comuns à maioria dos insetos e de fundamental importância para a digestão inicial de proteínas. Desta forma, tornam-se alvos importantes para orientar a construção de plantas transgênicas resistentes a insetos. As tripsinas são serina endopeptidases que clivam cadeias protéicas na porção carboxílica de resíduos de aminoácidos básicos como lisina e arginina, sendo que a hidrólise da ligação peptídica formada por um resíduo de arginina é de duas a dez vezes mais eficiente que a hidrólise da ligação peptídica formada por lisina. A purificação das tripsinas de insetos de diferentes ordens e o estudo da especificidade de seus subsítios utilizando substratos de fluorescência apagada servem de base para a seleção de um método mais eficiente de inibição da sua atividade, assim como para desvendar as tendências evolutivas da especificidade destas enzimas. O trabalho dessa dissertação levou ao desenvolvimento de processos de purificação das tripsinas de *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* e *Diatraea saccharalis*. O estudo da especificidade dos subsítios S1, S2, S3 e S1' das tripsinas demonstraram que, diferentemente das tripsinas dos outros insetos e das tripsinas de mamíferos, a tripsina de *Diatraea saccharalis* hidrolisa com maior eficiência substratos que apresentem lisina em P1, demonstrando uma diferença na especificidade primária desta enzima. Além disso, é possível verificar ao longo da evolução dos grupos de insetos estudados uma tendência a tornar os subsítios cada vez mais hidrofóbicos.

7 – Abstract

Trypsins are serine endopeptidases that hydrolyze peptide bonds at the carboxyl side of positively charged residues: arginine and lysine. Mammalian trypsin preferentially cleaves the peptide bond formed by arginine. Site directed mutagenesis has shown that trypsin specificity is related to residues present at the primary specificity site and to structural determinants like two surface loops.

Differences in trypsins specificity may be the cause of some insects be resistant to serine endopeptidases plant inhibitors and to *Bacillus thuringiensis* toxins.

Trypsins are usual enzymes in insects and are very important to protein digestion. There are few studies dealing with insect trypsin specificity. They generally consist in analyses of fragments formed by the action of the enzyme on peptide chains like insulin β chain. As these studies were semi-quantitative, insect trypsin specificity requires a better characterization. This dissertation describes the purification of trypsins from *Periplaneta americana*, *Tenebrio molitor*, *Musca domestica* and *Diatraea saccharalis* and the characterization of the specificity of the subsites S1, S2, S3 e S1' by the use of quenched fluorescence peptide substrates.

The results showed that trypsins from the mentioned insects have different specificities, including the primary specificity. Thus, *Diatraea saccharalis* trypsin cleaves at Lys more efficiently than at Arg, whereas the contrary is true for the other insects. The data also showed that trypsin subsites tend to become more hydrophobic as the insects are more evolved.

8 – Referências

Alves L.C., Almeida P.C., Franzoni L., Juliano L. & Juliano M.A. (1996) - Synthesis of Nα-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Peptide Res.* 9, 92-96.

Anderson M.A., Health R.L., Mcdonald G., Christeller J.T., Lee M., Bateman K., West J. & Heeswijck R.V. (1997) - Proteinase inhibitors from *Nicotiana alata* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect Physiol.*, **43,** 833-842.

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

Barrett A.J., Rawlings N.D. & Wosner JF. (1998) - *Handbook of proteolytic enzymes*- Academic Press, Inc., London.

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

Bode W. & Huber R. (1992) - Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.

Bown D.P., Wilkinson H.S. & Gatehouse J.A. (1997) - Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes form the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem.Molec.Biol.* **27,** 625-638.

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

Branden C. & Tooze J. (1998) - Introduction to protein structure 2nd ed.. Garland Publishing, Inc., New York.

Breddam K., Gron H. & Medal M. (1992) - Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* **31**, 6011-6018.

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

Broadway R. (1997) - Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* **43**, 855-874.

Craik C.S., Largman C., Fletcher T., Roczniak S., Barr P.J., Fletterick R. & Rutter W.J. (1985) - Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science* **228**, 291-297.

Creighton T.E. (1984) - Proteins: structures and molecular properties 1st ed.. W.H.Freeman & Company, New York.

Denholm I., Schuler T.H., Poppy G.M. & Kerry B.R. (1998) - Insect-resistant transgenic plants. *Tibtech* **16**, 168-174.

English L. & Slatin S.L. (1992) - Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 1-7.

Erlanger B.F., Kokowsky N. & Cohen W. (1961) - The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271-278.

Gatehouse A.M.R. & Gatehouse J.A. (1998) - Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* **52**, 165-175.

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

Giebel W., Zwilling R. & Pfleiderer G. (1971) - The evolution of endopeptidases - XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **38B**, 197-210.

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

Grahn S., Ulmann D. & Jakubke H.D. (1998) - Design and synthesis of fluorogenic trypsin peptide substrates based on resonance energy transfer. *Analyt. Biochem.* **265**, 225-231.

Guinto E.R., Caccia S., Rose T., Fütterer K., Waksman G. & Di Cera E. (1999) - Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **96**, 1852-1857.

Hedstrom L., Szilagyi L., & Rutter W.J. (1992) - Converting trypsin to chymotrypsin – The role of surface loops. *Science* **255**, 1249-1253.

Hedstrom L., Perona J. & Rutter W.J. (1994) - Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant. *Biochemistry* **33**, 8757-8763.

Jany K.D., Haug H. & Ishay J. (1978) - Trypsin-like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. *Insect Biochem.* **8**, 221-230.

Jongsma M.A. & Bolter C. (1997) - The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* **43**, 885-895.

Jouanin L., Bonadé-Bottino M., Girard C., Morrot G & Giband M. (1998) - Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* **131**, 1-11.

Juliano L. & Juliano M.A. (1985) - Synthesis and kinetic parameters of hydrolysis by trypsin of some acyl-arginyl-p-nitroanilides and peptides containing arginyl-p-nitroanilide. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **18**, 435-445.

Katchalski E., Carmel A., Zur M. & Yaron A. (1973) - Use of substrates with fluorescent donor and acceptor chromophores for the kinetic assay of hydrolases. *FEBS Letters* **30**, 11-14.

Kurth T., Ullmann D., Jakubke H-D & Hedstrom L. (1997) - Converting trypsin to chymotrypsin: structural determinants of S1' specificity. *Biochemistry* **36**, 10098-10014.

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

Laskowski, M & Kato I. (1980) - Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 593-626.

Lecadet M.M. & Dedonder R. (1966) - Les protéases de *Pieris brassicae*. II. Spécificité. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 661-691.

Lemos F.J.A. & Terra W.R. (1992) - Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 613-619.

Lehninger A.L., Nelson D.L. & Cox M.M. (1993) - Principles of biochemistry 2nd ed..Worth Publishers, Inc., New York.

Levinsky H., Birk Y. & Applebaum S.W. (1977) - Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from *Tenebrio molitor* L. larvae. *Int. J. Pep. Prot. Res.* **10**, 252-264.

Miller J. W., Kramer K.J. & Law J.H. (1974) - Isolation and parcial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*, Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **48B,** 117-129.

Oliveira M.C.F., Hirata I.Y., Chagas J.R., Boschcov P., Gomes R.A.S., Figueiredo A.F.S. & Juliano L (1992) - Intramolecular quenched fluorogenic peptide substrate for human renin. *Analytical Biochemistry* **203**, 39-46.

Oppert B., Kramer K.J., Beeman R.W., Johnson D., McGaughey W.H. (1997) - Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* **272**, 23473-23476.

Parra J.R.P. & Mihsfeldt L.J. (1992) - Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson T.E.; Leppla N.C. (eds). *Advances in insect rearing for research and pest management*. Boulder, CO: Westview Press.

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

Purcell J.P., Greenplate J.T. & Sammons R.D. (1992) - Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 41-47.

Schechter, I. & Berger, A. (1967) - On the size of active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.

Schellenberger V., Turck C.W. & Rutter W.J. (1994) - Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, α-lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry* **33**, 4251-4257.

Targa H. J. and Peres C. A. (1979) - Radiation-induced dominant lethal mutations in oocytes of *Musca domestica*. *Mutation Res.* **63**, 153-160.

Terra W.R. & Ferreira C. (1991) - A digestão em insetos. *Ciência hoje* **12**, 28-38.

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

Terra W.R. & Cristofoletti P.T. (1996) - Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* **113B**, 725-730.

Terra W.R., Ferreira C. & De Bianchi A.G. (1978) - Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 79-85.

Tong N.T., Imhoff J.M., Lecroisey A. & Keil B. (1981) - Hypodermin A, a trypsin neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 209-219.

Ward C.W. (1975) - Properties and specificity of the major anionic trypsin like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochim.Biophys. Acta* **410**, 201-211.

Wu R., Duan X., Li X., Xue Q., Abo-El-Saad M. & Xu D.(1996) - Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnol.* **14,** 494-498.

CURRICULUM VITAE

Nome: Adriana Rios Lopes

Local e data de Nascimento: São Paulo, SP, 13 de Junho de 1.975.

EDUCAÇÃO

Escola Estadual de Primeiro Grau "Experimental" Dr. Edmundo de Carvalho (1982-1988), São Paulo, SP.
Colégio Stella Maris (1989-1992), São Paulo, SP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Bacharelado em Ciências Biológicas, 1993-1996.
Licenciatura Curta em Ciências Biológicas, 1993-1996.
Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, 1993-1996.

OCUPAÇÃO

Bolsista da FAPESP a nível de Mestrado.

PUBLICAÇÃO

Silva C.P., Terra W.R., Xavier-Filho J., de Sá Maria F. Grossi, Lopes A.R. & Pontes E.G. (1999) – Digestion in larvae of *Calosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α-amylases and oligosacharidases. *J. Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 355-366.

Paulillo L.C., Lopes A.R., Cristofoletti P.T, Parra J.R.P., Terra W.R. and Silva-Filho M.C. – Changes in midgut activity of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. Trabalho submetido à revista Journal Economical Entomology.