RODRIGO MORETI DA SILVA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE α -FUCOSIDASES DIGESTIVAS
EM ARACHNIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Rios Lopes

**São Paulo
2010**

RESUMO

MORETI, R. **Isolamento e caracterização de α -fucosidases digestivas em Arachnida**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os artrópodes (insetos, aracnídeos e crustáceos) constituem as formas mais abundantes de vida animal no planeta, com aproximadamente um milhão de espécies. O sistema digestivo dos Arthropoda é uma das mais importantes superfícies de contato com o ambiente e muitas das adaptações que possibilitaram a ocupação dos mais diversos nichos ocorreram neste sistema, sendo um ótimo alvo para os estudos comparativo-evolutivos. A caracterização da digestão em alguns Arthropoda indica que os diversos grupos apresentam particularidades tanto quanto ao aspecto morfológico quanto molecular da digestão. O conhecimento a respeito da digestão em Arthropoda é amplo, principalmente para as classes Insecta e Crustacea. No entanto, para os aracnídeos faltam muitas informações a respeito do sistema digestivo e pouco se conhece a respeito dos aspectos moleculares da digestão em Arachnida, o que impossibilita estudos comparativos e evolutivos entre todos os grupos de Arthropoda. Identificamos neste trabalho as principais carboidrases digestivas em três Arachnida modelo *Tityus serrulatus*, *Amblyomma cajennense* e *Nephilengys cruentata*: α -amilase, quitinase, trealase, N-acetil- β -glucosaminidase e α -fucosidases. Estas carboidrases apresentam pHs ótimos ácidos, massas moleculares entre 39 kDa e 110 kDa e são relativamente termoestáveis. É a primeira vez que a atividade de α -fucosidase foi quantificada em aracnídeos. As α -fucosidases (EC 3.2.1.51) são glicosídeo hidrolases (GH família 29) que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,2; α -1,3; α -1,4 e α -1,6 entre uma fucose ligada a outro carboidrato ou outro tipo de molécula. Estas enzimas têm sido estudadas em diferentes organismos, principalmente moluscos e bactérias, além das α -fucosidases humanas, devido à possibilidade de sua utilização em síntese enzimática de carboidratos complexos. Estas enzimas são fundamentais no processamento de

glicoproteínas e glicolipídeos. Glicoproteínas que apresentam fucose são extremamente abundantes em insetos e seria esperada uma alta atividade de α -fucosidase em aracnídeos cuja dieta esteja baseada em insetos. Observamos altas atividades de α -fucosidases em todas as espécies estudadas, mesmo no hematófago *Amblyomma cajennense*. As α -fucosidases de *Tityus serrulatus*, *Amblyomma cajennense* e *Nephilengys cruentata* foram isoladas e caracterizadas. Estas enzimas apresentam massas moleculares de 76; 68 e 66,8 kDa respectivamente determinadas por SDS-PAGE. As massas moleculares determinadas por filtração em gel foram de 86,5; 110 e 88 kDa indicando, pelo menos para a α -fucosidase de *Amblyomma cajennense*, que há oligomerização em condições nativas. O pH ótimo destas enzimas é de aproximadamente 5,0-5,5. O pI foi de 6,4 para a α -fucosidase de *Tityus serrulatus*. As três enzimas apresentaram valores de K_M de 58,5 μ M, 45 μ M e 18 μ M utilizando 4-MU fucosídeo como substrato. Análise de sequências de α -fucosidase disponíveis no GenBank permitiram observar a conservação de resíduos essenciais para ligação ao substrato e para a catálise, e indicam que as α -fucosidases presentes em artrópodes, de uma maneira geral, pertencem à família 29, sugerindo que as enzimas aqui isoladas também devem pertencer a esta família.

Palavras-chave: Carboidrases digestivas. α -fucosidase. Arachnida. Artrópodes. Digestão.

ABSTRACT

MORETI, R. **Isolation and characterization of digestive α -fucosidases in Arachnida**. 2010. 99 p. [Masters thesis] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Arthropods (insects, arachnids and crustaceans) are the most abundant animal life form on the planet, with approximately one million species. The digestive system of Arthropoda is one of the most important areas of contact with the environment and is probable that many selected adaptations, which allowed the occupation of different niches, have occurred in this system. There is a lot of knowledge about insects and crustaceans digestion. However, the study of Arachnida digestive enzymes has been sporadic and remains a largely unexplored area. In this work, we identified the most important digestive carbohydrases in three Arachnida models: *Tityus serrulatus*, *Amblyomma cajennense* and *Nephilengys cruentata*: α -amylase, chitinase, trehalase, N-acetyl- β -glucosaminidase and α -fucosidases. These enzymes presented acidic pH optimum, molecular masses of 39 to 110 kDa and are relatively thermostable. It is the first time that α -fucosidases are quantified in Arachnida. The α -fucosidases (EC 3.2.1.51) are glycoside hydrolases (GH family 29) that catalyze the hydrolysis of glycosidic links α -1,2; α -1,3; α -1,4 e α -1,6 between a fucose linked to other carbohydrate or another type of molecule. These enzymes have been studied in different organisms, mainly molluscs and bacteria, beyond human α -fucosidases, due to the possibility of their use in enzymatic synthesis of complex carbohydrates. These enzymes are essential in the processing of glycoprotein and glycolipids. Glycoproteins with fucose are extremely abundant in insects. It would be expected a high activity of α -fucosidase in Arachnids whose diet is based on insects. We showed that all models tested presented high activities of digestive α -fucosidases even the hematophagous *Amblyomma cajennense*. The digestive α -fucosidases from *Tityus serrulatus*, *Amblyomma cajennense* and *Nephilengys cruentata* were isolated and characterized. These enzymes have molecular masses of 76, 68,

and 66.8 kDa respectively determined by SDS-PAGE. Molecular masses determined by gel filtration were 86.5; 110 and 88 kDa respectively and indicated, at least to *Amblyomma cajennense* α -fucosidase, the existence of oligomerization process under native conditions. The optimum pH of these enzymes is 5.0-5.5. The pI obtained to *Tityus serrulatus* α -fucosidase is 6.4. The three enzymes presented K_M values of 58.5 μ M, 45 μ M and 18 μ M using 4-MU fucoside as substrate. Sequence alignment of all Arthropoda α -fucosidases in GenBank allowed the observation that amino acid residues involved in substrate binding and catalysis are conserved to these enzymes and that Arthropoda α -fucosidases belong to family 29 of the glycoside hydrolases suggesting that the α -fucosidases characterized in this work are also from family 29.

Key words: Digestive carbohydrases. α -fucosidase. Arachnida. Arthropods. Digestion.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Filo Arthropoda

Os artrópodes (do grego *arthros*: articulado e *podos*: pés, patas, apêndices) constituem o maior filo existente correspondendo a cerca de 70% de todas as espécies descritas atualmente (GRIMALDI e ENGEL, 2005). A grande capacidade adaptativa dos artrópodes possibilitou a este grupo sobreviver em praticamente todos os ambientes.

A origem dos artrópodes bem como a relação entre eles é controversa. Inicialmente, achava-se que pertenciam a um mesmo filo derivado de vermes segmentados semelhantes aos anelídeos atuais (MOORE, 2006). Existem algumas evidências que demonstram esta relação: (1) artrópodes, assim como anelídeos, são organismos metaméricos (segmentados); (2) nas condições primitivas cada segmento do corpo dos artrópodes possui um par de apêndices como visto em poliquetas; (3) o sistema nervoso tanto de artrópodes como de anelídeos são estruturados no mesmo plano, um cérebro anterior dorsal é seguido por um cordão nervoso ventral contendo protuberâncias gangliônicas em cada segmento; (4) o desenvolvimento embrionário de alguns artrópodes ainda mostra clivagem holoblástica determinada, com o mesoderma nestas formas surgindo de um blastômero (BARNES, 1987). Porém, recentemente, foi demonstrado através de estudos genéticos que os artrópodes estão mais próximos filogeneticamente aos onicóforos (Onychophora) conhecidos como vermes aveludados e aos tardígrados (Tardigrada) conhecidos como ursos d'água (DUNN et al., 2008).

Os artrópodes vivos têm sido tradicionalmente divididos em dois subfilos distintos através de análises morfológicas: o subfilo Chelicerata, cujas principais características são a presença de quelíceras e a ausência de antenas e têm como principais representantes aranhas, escorpiões, ácaros e carrapatos; e o subfilo Mandibulata cujas principais características são a presença de mandíbulas ao invés de quelíceras e a presença de antenas. Neste grupo estão incluídos todos os insetos, crustáceos, quilópodes (lacrarias) e diplópodes (piolhos-de-cobra).

1.1.1 Arachnida

Os aracnídeos constituem a maior e mais importante classe dentro do subfilo Chelicerata. Os organismos mais representativos desta classe são aranhas (Ordem Araneae), escorpiões (Ordem Scorpiones), opiliões (Ordem Opiliones), ácaros e carrapatos (Ordem Acari) (Figura 1).

Os aracnídeos são um grupo antigo, podendo ser encontrados registros fósseis de todas as ordens oriundas do período Carbonífero (350-300 ma) e alguns registros fósseis de escorpiões do período Siluriano (443-416 ma). Os primeiros aracnídeos foram aquáticos, contemporâneos dos euripterídeos, do qual se acredita que tenham evoluído. Os primeiros aracnídeos terrestres surgiram no período Devoniano (416-359 ma). Exceto por alguns grupos que adotaram a condição aquática (límulos, por exemplo), os aracnídeos viventes são quelicerados terrestres (BARNES, 1987).

Apesar da sua diversidade, os aracnídeos apresentam diversas características em comum. O prossoma não-segmentado é geralmente coberto dorsalmente por uma carapaça sólida. O abdômen primitivo é segmentado. Os apêndices, comuns a todos os aracnídeos, são originados do prossoma e consistem em um par de quelíceras, um par de pedipalpos e quatro pares de pernas (STORER e USINGER, 1991).

Figura 1 – Cladograma demonstrando as relações filogenéticas entre as diversas ordens de Arachnida.
Fonte: Shultz (1990).

1.1.2 A digestão em Arthropoda

Os artrópodes são o grupo animal de maior diversidade, ocupando os mais diversos nichos. A ocupação de nichos tão diversificados certamente ocorreu pela seleção de adaptações do sistema digestivo ao longo do processo evolutivo em Arthropoda. O intestino dos artrópodes, de uma maneira geral, apresenta duas porções derivadas da ectoderme, as quais são revestidas por quitina e constituem o intestino anterior e o intestino posterior. O intestino anterior está relacionado com a ingestão, trituração e armazenamento de alimento. Suas porções são modificadas para estas funções dependendo do tipo de dieta e do modo de alimentação. O intestino posterior está associado com a absorção de água e a formação de fezes (BARNES, 1987). A porção contida entre estas é de origem endodérmica e constitui o intestino médio, estando este último envolvido no processo digestivo propriamente dito por ser sítio de produção de enzimas, digestão e absorção (Figura 2).

O sistema digestivo em Arachnida apresenta suas peculiaridades. A maior parte da digestão em Arachnida ocorre extracorporeamente, o que torna possível o consumo de uma presa maior do que o predador. A digestão extracorpórea ou pré-oral (EOD) pode ser dividida em dois tipos: tipo I, na qual a liquefação química ocorre completamente dentro do corpo da presa, tornando o exoesqueleto da presa praticamente uma extensão do intestino do predador como ocorre em aranhas e; do tipo II, na qual a trituração da presa e a digestão química dos componentes ricos nutricionalmente ocorrem na cavidade oral como visto em escorpiões (COHEN, 1995). Desta forma, o intestino anterior dos aracnídeos apresenta, em geral, adaptações para a sucção do produto da digestão extraoral como é o caso do estômago sugador em aranhas (FOELIX, 1996). Além disso, há uma grande diverticulação do intestino médio destes animais. Estas diverticulações podem aumentar a eficiência do processo digestivo e da absorção de nutrientes, bem como, ampliar a capacidade de estocagem de reserva, adaptações necessárias para predadores que não apresentam eventos de alimentação frequente e que podem permanecer longos períodos em jejum. Há ainda controvérsias na literatura quanto à natureza destes divertículos em Arachnida, sendo estes cecos do intestino médio ou glândulas associadas ao processo digestivo. Estas diverticulações

têm sido tratadas na literatura como hepatopâncreas (POLIS, 1990) e esta nomenclatura será também mantida neste trabalho.

Figura 2 – Representação esquemática da organização do sistema digestivo em (A) escorpião, (B) carrapato, (C) aranha, (D) inseto.
Fonte: Polis, 1990; Edwards et al., 2009; Comstock, 1912; Chapman, 1998.

Poucos trabalhos na literatura descrevem as enzimas envolvidas no processo digestivo em Arachnida sejam para a digestão de proteínas, lipídeos ou carboidratos. Este trabalho terá como foco o estudo das carboidrases digestivas neste grupo. Os aspectos moleculares da digestão estão bem descritos para Crustacea (XIE et al., 2007; ZIMER e BRUNE, 2005; HU e LEUNG, 2007; SCHWAZENBERGER et al., 2010) e para Insecta (TERRA e

FERREIRA, 2005). No entanto, os aspectos moleculares da digestão em Arachnida são ainda pouco conhecidos.

Neste trabalho, os aspectos moleculares da digestão de carboidratos foram focados utilizando-se três modelos animais: o escorpião (*Tityus serrulatus*), a aranha (*Nephilengys cruentata*) e o carrapato (*Amblyomma cajennense*) (Figura 3). O escorpião-amarelo *Tityus serrulatus* (Buthidae) foi selecionado pelo fato dos escorpiões serem um grupo basal dentre os quelicerados vivos. Mesmo com a passagem para o ambiente terrestre, os escorpiões mantiveram a maior parte de suas características ao longo da evolução (POLIS, 1990). Portanto, este grupo é fundamental para a pesquisa comparativo-evolutiva das carboidrases entre diferentes grupos de Arthropoda. Outro fato relevante é que esta espécie é responsável pela maior parte dos acidentes causados por envenenamento no Estado de São Paulo, sendo de grande importância para a saúde pública (VON EICKSTEDT, 1996).

Figura 3 – Modelos de Arachnida utilizados neste trabalho. O escorpião (A) *Tityus serrulatus*, o carrapato (B) *Amblyomma cajennense* e a aranha (C) *Nephilengys cruentata*.

Fonte: Instituto Butantan ([2010]); Amici (2010), Kuntner (2007).

A aranha *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae) (KUNTNER, 2007) foi escolhida para este trabalho devido à sua disponibilidade, facilidade de obtenção de material para estudo e tamanho. O terceiro modelo escolhido

foi o carrapato-estrela *Amblyomma cajennense* (Ixodidae). Um modelo Acari é interessante para uma análise comparativa por sua dieta hematófaga, diferenciando dos outros modelos selecionados e sendo importante para comparar a relação entre o tipo de dieta e/ou filogenia com as atividades das α -fucosidases e também de outras glicosidases. Além disso, *Amblyomma cajennense* é, no Brasil, o principal vetor da febre maculosa causada por *Rickettsia rickettsii* (SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias – SP, 2010).

1.1.3 Enzimas envolvidas no processamento de carboidratos e a digestão de carboidratos em Arachnida

A variedade e complexidade de estruturas que os oligossacarídeos e polissacarídeos podem adotar tornam este grupo de moléculas essenciais e estas são empregadas pelos organismos vivos para uma grande quantidade e variedade de funções biológicas, como reserva energética, função estrutural e eventos de sinalização (GEISLER-LEE, 2006). Naturalmente, uma grande variedade de enzimas está relacionada ao processamento desta diversidade de sacarídeos e podem ser subdivididas em quatro subgrupos: carboidrato esterases (CE), polissacarídeo liases (PL), glicosil transferases (GT) e glicosídeo hidrolases (GH) (Carbohydrate Active enZymes database – CAZy, 2010; CANTAREL et al., 2008). As enzimas atuantes na digestão de carboidratos obtidos da dieta são glicosídeo hidrolases. A classificação das glicosídeo hidrolases em famílias com base na sequência de aminoácidos e estrutura terciária foi proposta há alguns anos, sendo que a versão corrente contém 115 famílias (HENRISSAT, 1991; CANTAREL et al., 2008).

Algumas carboidrases digestivas já foram identificadas em Arachnida. Em aranhas, algumas enzimas envolvidas na digestão de carboidratos foram quantificadas sendo estas: α -amilase, quitinase, β -glucosaminidase, α -glicosidase, β -glicosidase, trealase e β -glucoronidase (MOMMSEN, 1978; MOMMSEN, 1978b; MOMMSEN, 1980). Estas enzimas apresentam um pH ótimo ácido (faixa entre 4,5 a 6,75), de acordo com os pHs dos sucos digestivos das espécies de aranha estudadas. As atividades de α -amilase (EC

3.2.1.1) nas aranhas *Tegenaria atrica* e *Cupiennius salei* foram separadas por eletroforese em condições nativas indicando a presença de três isoformas de α -amilase presentes no suco digestivo das duas aranhas. A α -amilase majoritária de *Tegenaria atrica* apresenta massa molecular de 58 kDa, enquanto que a α -amilase majoritária de *Cupiennius salei* tem massa de 63 kDa. Estas enzimas têm pH ótimo de 7,4, ativação por cloreto e dependência de Ca^{+2} (MOMMSEN, 1978b) e hidrolisam com eficiências semelhantes os substratos amido e glicogênio. Atividade de α -amilase também foi demonstrada no ácaro *Pergamasus longicornis* (BOWMAN, 1987) e nos escorpiões *Heterometrus scaber* (VIJAYALEKSHMI e KURUP, 1969) e *Scorpio maurus* (LOUATI et al., 2010) sendo que neste último a α -amilase foi purificada e caracterizada.

Duas atividades de quitinase foram purificadas do suco digestivo de *Cupiennius salei* (MOMMSEN, 1980) sendo que uma tem atividade quitinolítica típica e apresenta peso molecular de 48 kDa e pH ótimo de 7,2, e a outra foi classificada como uma β -N-acetilhexosaminidase com pH ótimo de 5,4 e peso molecular de 108 kDa. Em carrapatos, algumas enzimas envolvidas na digestão de carboidratos também já foram identificadas. Em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi quantificada a atividade de β -N-acetilhexosaminidase (DEL PINO et al., 1999). Uma lisozima do intestino de *Ornithodoros moubata* foi clonada e sequenciada (GRUNCLOVÁ et al., 2003), tendo provável papel no controle do desenvolvimento de bactérias no alimento ingerido. Altos níveis de expressão de quitinase foram demonstrados no intestino médio de *Hemaphysalis longicornis* (YOU et al., 2003). Foi verificada qualitativamente atividade de α -fucosidase no ácaro *Pergamasus longicornis* (BOWMAN, 1987). A caracterização das carboidrases digestivas em Arachnida, como será visto pelos resultados apresentados nesta dissertação, possibilitou a identificação de uma série de carboidrases digestivas nos animais modelos e também de α -fucosidases nos três modelos.

1.1.4 Fucosidases

L-fucose é um dos monossacarídeos mais comuns na extremidade não redutora de muitas glicanas, de mamíferos, insetos e parede celular de plantas, e são ligados preferencialmente à galactose e a N-acetilglicosamina. Um dos exemplos mais conhecidos de moléculas que contém modificações pós-traducionais contendo fucose é o sistema de antígenos sanguíneos ABO (ROOS et al., 2002).

As α -fucosidases (GH famílias 29 e 95) catalisam a remoção de L-fucose da extremidade não redutora ligada via ligações α -1,2; α -1,3; α -1,4 ou α -1,6 a oligossacarídeos e seus conjugados (Figura 4).

Oligosaccharide	Structure
α -L-Fuc-O-Me	Fucα1 →Me
2'FL	Fucα1 →2Gal β 1→4Glc
3FL	Fucα1 →3Glc 4 ↑ Gal α 1
LNFP I	Fucα1 →2Gal β 1→3GlcNac β 1→ 3Gal β 1→4Glc
LNFP II	Fucα1 →4GlcNac β 1→3Gal β 1→4Glc 3 ↑ Gal1 β 1

Figura 4 – Oligossacarídeos fucosilados hidrolisados por α -fucosidase. 2'FL - 2'-fucosil lactose; 3'FL - 3'-fucosil lactose; Fuc - fucose; Gal - galactose; Glc - glicose; GlcNac - N-acetil-glicosamina; LNFP I - lacto-N-fucopentose I; LNFP II - lacto-N-fucopentose II; Me – Metil.
Fonte: Berteau et al. (2004).

A distinção entre as duas famílias de α -fucosidases se dá pelo mecanismo catalítico. As α -fucosidases da família 29 das glicosídeo-hidrolases (CAZy, 2010) apresentam um resíduo de aspartato atuando como nucleófilo e um glutamato atuando como catalisador ácido/base (SULZENBACHER et al., 2004; LIU et al., 2009) apresentando um mecanismo retentor da configuração anomérica do substrato no produto formado. As α -fucosidases da família 95

são inversoras (também chamadas 1,2- α -L-fucosidases – EC 3.2.1.63) alterando a configuração anomérica do produto em relação ao substrato e apresentam, em seu sítio ativo, uma asparagina ativada por aspartato e um glutamato atuando em catálise ácido/base (KATAYAMA et al., 2004).

As principais α -fucosidases estudadas são a α -fucosidase humana, a α -fucosidase bacteriana e a α -fucosidase digestiva presente em moluscos, todas da família 29. Representantes da família 95 só foram identificadas em bactérias e foram bem descritas para *Bifidobacterium bifidum* (KATAYAMA et al., 2004).

Os primeiros estudos de α -fucosidase foram realizados com as enzimas de mamíferos e, particularmente, estudos sobre a α -fucosidase lisossômica humana. A ausência desta enzima em humanos está associada à fucosidose, uma doença autossômica recessiva que ocasiona o acúmulo de fucoglicoconjugados nos lisossomos das células de diferentes tecidos ocasionando diversos fenótipos severos como deterioração neurológica, retardo de crescimento, podendo até ser fatal (WILLEMS et al., 1988; SULZENBACHER et al., 2004).

Atividades alteradas de α -fucosidase em humanos também estão relacionadas a uma série de condições patológicas como inflamação (ANGSTWURN et al., 1995), câncer (GIARDINA et al., 1998) e fibrose cística (SCANLIN e GLICK, 1999).

Levy e McAllan (1961) descreveram α -fucosidase de diversos tecidos de mamíferos como rato, porco e boi. A maior atividade enzimática de α -fucosidase em mamíferos foi verificada em epidídimo de rato adulto sendo que esta enzima apresenta um pH ótimo de 6,1, estabilidade ao pH entre 4,5 e 6,0 e um valor de $K_M = 0,21$ mM, usando PNP fucosídeo como substrato. Esta atividade elevada em epidídimo pode estar relacionada a alguma função na inseminação.

Alhadeff et al. (1975) caracterizaram as propriedades da α -fucosidase hepática humana envolvida no metabolismo de moléculas contendo L-fucose. Sua purificação envolveu cromatografias por afinidade, utilizando amino-caproil-fucosamina como ligante, com um enriquecimento final de 6300 vezes. A massa molecular foi determinada através de SDS-PAGE e filtração em gel sendo obtidos valores de massa molecular de 50 kDa e 175 kDa,

respectivamente, indicando possível oligomerização em condições fisiológicas. O ponto isoelétrico obteve seis picos distintos sugerindo diferentes formas isoelétricas presentes de α -fucosidase na amostra purificada. O pH ótimo foi de 4,6. Esta α -fucosidase apresentou um $K_M = 0,22$ mM e $V_{MAX} = 14$ μ mol/mg/min, utilizando 4-MU fucosídeo como substrato, e $K_M = 0,43$ mM e $V_{MAX} = 19,6$ μ mol/mg/min utilizando PNP fucosídeo como substrato. Foi descrito também que L-fucose é inibidor competitivo de α -fucosidase. Além disso, a fucosidase hepática humana purificada demonstrou ser altamente termolábil. Além dos estudos das α -fucosidases de mamíferos, foram estudadas as α -fucosidases bacterianas e as α -fucosidases de moluscos.

O uso de polissacarídeos tem se tornado cada vez mais diversificado. Algas marrons apresentam grandes quantidades de fucanas sulfatadas também denominadas de fucoidan como componentes de suas paredes celulares (MICHEL et al., 2010). O fucoidan e derivados de sua hidrólise apresentam uma série de usos farmacológicos inclusive como antitumoral e antiviral (PONCE et al., 2003) e enzimas envolvidas no seu processamento ou síntese são de grande interesse (BERTEAU et al., 2002; BERTEAU e MULLOY, 2003). Foi demonstrada a presença de α -fucosidases digestivas em várias espécies de moluscos e estes animais têm como principal item de sua dieta para obtenção de nutrientes as algas marrons. Foi verificado que as enzimas digestivas dos moluscos têm alta eficiência de processamento das fucanas sulfatadas.

Reglero e Cabezas (1976) purificaram e caracterizaram a α -fucosidase de hepatopâncreas do molusco bivalve *Chamelea gallina* (Mollusca: Bivalvia). O isolamento da enzima foi obtido a partir de precipitação em sulfato de amônio (45-55%), precipitação ácida (pH 4,0), tratamento térmico a 60 °C e cromatografia por filtração em gel, respectivamente, com um enriquecimento de 270 vezes. O pH ótimo da enzima purificada foi de 5,2 e a estabilidade ao pH entre 4,0 e 6,0. A α -fucosidase permaneceu ativa até 65 °C. A focalização isoelétrica apresentou dois picos distintos em 6,3 e 6,6. O valor de K_M foi de 0,7 μ M e a $V_{MAX} = 3,5$ μ mol/mg/min utilizando PNP fucosídeo como substrato. Endo e colaboradores (1993) isolaram a α -fucosidase do caramujo *Pomacea canaliculata* buscando elucidar as funções biológicas de oligossacarídeos

fucosilados. Esta enzima apresenta massa molecular determinada por SDS-PAGE de 60 kDa e por filtração em gel 260 kDa, indicando que a enzima é composta de um tetrâmero com subunidades idênticas. O pH ótimo apresentou dois picos em 2,5 e 5,0. Os valores de K_M e V_{MAX} foram de 0,45 mM e 1,46 $\mu\text{mol/mg/min}$ respectivamente, utilizando PNP fucosídeo como substrato, e 1,18 mM e 28,8 nmol/mg/min utilizando 2-fucosil lactitol como substrato.

Berteau et al. (2002) procuraram compreender as propriedades biológicas e a estrutura molecular do fucoidan. Para isso, foi caracterizada a α -fucosidase das glândulas digestivas do molusco bivalve *Pecten maximus* que é rica fonte de glicosidases e catalisa a hidrólise do fucoidan da alga marrom *Ascophillum nodosum*. A purificação da α -fucosidase foi realizada através de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca catiônica e cromatografias por afinidade (com zinco imobilizado e DMJ como ligantes), respectivamente. A massa molecular foi determinada por SDS-PAGE em 50 kDa e por filtração em gel em 200 kDa, também indicando que a enzima nativa é um tetrâmero composto por subunidades idênticas de 50 kDa. O pI foi encontrado por focalização isoeletrica em 6,3. O pH ótimo foi de 4,0 e mais de 50% da atividade de α -fucosidase foi mantida em pH 3,0-5,5. O K_M encontrado foi de 650 μM utilizando PNP fucosídeo como substrato. Os autores do trabalho puderam concluir que a presença de uma sulfatase atuando junto com a α -fucosidase aumenta as taxas de hidrólise do fucoidan.

Quanto às α -fucosidases bacterianas, o principal modelo estudado é a α -fucosidase da bactéria termófila *Thermotoga maritima*. Esta enzima é o único modelo cristalizado da família 29 (Figura 5). Esta enzima é uma proteína de dois domínios sendo que o domínio N-terminal tem uma estrutura em α / β barril e o domínio C-terminal é, basicamente, constituído de folhas β . Uma depressão na região C-terminal das folhas β do domínio α / β barril contém o sítio ativo. Na forma cristalina a α -fucosidase de *Thermotoga maritima* forma um hexâmero e evidências experimentais indicam que esta seja a forma nativa. A forma monomérica desta α -fucosidase apresenta 52 kDa. A co-cristalização desta α -fucosidase com L-fucose permitiu identificar o sítio ativo da enzima bem como o sítio de ligação à fucose. O sítio de ligação à fucose comporta

apenas uma fucose, o que é condizente com a atividade exoglicosídica desempenhada por esta enzima.

Pelos estudos de co-cristalização também foi possível observar que cada grupo funcional do açúcar apresenta pelo menos uma interação com as cadeias laterais de uma série de resíduos da enzima (Figura 5B). A hidroxila do carbono 2 interage com a His129 e o Trp67. Os resíduos de His128 e His34 estabilizam a hidroxila 4 axial enquanto a hidroxila 1 forma uma ponte de hidrogênio com o Asp224. O grupo metil do carbono exocíclico 6 é mantido em um bolso hidrofóbico formado pelas cadeias laterais dos resíduos conservados Phe32, Tyr171, Trp222 e Phe290.

Figura 5 – (A) Estrutura da α -fucosidase de *Thermotoga maritima* mostrando os domínios N-terminal e o C-terminal, tal como os resíduos envolvidos em catálise. (B) Bolso catalítico da α -fucosidase de *Thermotoga maritima*.
Fonte: Sulzenbacher et al. (2004).

Diferentemente do que é verificado para o sítio de ligação da fucose, o sítio de ligação ao aglicone é constituído de uma vasta cavidade a qual, aparentemente, não ocasiona nenhum tipo de restrição estérica à ligação desta porção do substrato, o que também está de acordo com a função biológica das α -fucosidases.

Três carboxilas estão presentes no sítio ativo Glu66, Asp224 e Glu266 sendo que o resíduo de Asp224 foi identificado por modificação química, por mutação sítio dirigida (TARLING et al., 2003) e no cristal (SULZENBACHER et al., 2004) como um dos resíduos envolvidos em catálise nestas enzimas. Estudos de mutação sítio dirigida demonstraram que o resíduo Glu66 está relacionado à ligação ao substrato enquanto o resíduo Glu266 está, aparentemente, envolvido em catálise.

Alinhamentos das sequências de α -fucosidase permitiram verificar que a α -fucosidase de *Thermotoga maritima* apresenta uma identidade de sequências de 38% com a α -fucosidase humana, o que permitiu, por modelagem molecular, verificar que os domínios catalíticos das duas enzimas são bastante semelhantes (SULZENBACHER et al., 2004). No entanto, alinhamentos múltiplos demonstram que o resíduo de Glu266 não é conservado.

Recentemente Liu et al. (2009) também se utilizaram de estudos de modelagem da α -fucosidase hepática humana e da α -fucosidase de *Thermotoga maritima* e identificaram nove resíduos candidatos a serem os resíduos catalíticos. Estes resíduos foram substituídos por mutação sítio dirigida na α -fucosidase humana expressa em *Escherichia coli*. Os autores verificaram que o resíduo de Asp225 (correspondente ao resíduo 224 de *Thermotoga maritima*) é realmente o nucleófilo. No entanto, dentre todos os mutantes testados o único que resultou em alteração da eficiência catalítica foi o mutante na posição 289 (Glu289) e os autores demonstraram que este resíduo é responsável pela catálise ácido / base nesta enzima.

Estudos cinéticos de α -fucosidases de diferentes organismos têm indicado que estas enzimas apresentam especificidade em relação ao substrato diretamente relacionado à espécie biológica as quais pertencem, sendo desta forma espécie-específicas, o que torna fundamental o estudo de novos modelos para a possível aplicação destas enzimas em processos de síntese de carboidratos complexos (OSANJO et al., 2007).

Nos aracnídeos o papel das α -fucosidases no processo digestivo não está claro. No entanto, a glicosilação de proteínas em insetos, as principais presas de aranhas e escorpiões, é abundante e está bem caracterizada, principalmente devido aos estudos de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto (ALTMANN, 1997). A glicosilação de proteínas em insetos envolve com frequência a presença de L-fucose, como é o caso das apolipoforinas, proteínas extremamente abundantes na hemolinfa de muitos insetos, principalmente aqueles que utilizam lipídeos como fonte de energia para o voo. As apolipoforinas associam-se ao HDLp (diacilglicerol ligado a uma lipoforina de alta densidade) gerado da degradação de triacilgliceróis do corpo gorduroso transformando HDLp em uma LDLp (lipoforina de baixa densidade) (HARD et al., 1993).

Devido às altas concentrações destas proteínas na hemolinfa dos insetos, a digestão desta e outras glicoproteínas pode ser importante para predadores, indicando a possível presença de atividades importantes de α -fucosidases em aranhas e escorpiões.

A identificação e caracterização das principais carboidrases nos três animais modelo de Arachnida, *Amblyomma cajennense*, *Tityus serrulatus* e *Nephilengys cruentata*, bem como o isolamento e caracterização das α -fucosidases digestivas, possibilitarão as primeiras comparações entre as enzimas envolvidas na digestão de carboidratos nos principais grupos de Arthropoda.

5 CONCLUSÕES

A caracterização das enzimas envolvidas na digestão de carboidratos de três modelos de Arachnida, o carrapato *Amblyomma cajennense*, o escorpião *Tityus serrulatus* e a aranha *Nephilengys cruentata* permitiu verificar diferenças entre as enzimas majoritárias presentes nestes animais. Apesar dos estudos realizados até o momento permitirem uma comparação entre as carboidrases de diferentes espécies de aranha, estas pertencentes a diferentes grupos filogenéticos (Figura 24), não é possível ainda fazer inferências quanto à relação entre as enzimas e as diferentes famílias de aranha. Mesmo num âmbito maior, a comparação dos aspectos moleculares da digestão entre as diferentes ordens de Arachnida ainda está dificultada pela quantidade de dados disponíveis na literatura. No entanto, este trabalho vem acrescentar algumas considerações iniciais e importantes a respeito da digestão de carboidratos neste grupo animal.

O grupo Arachnida conserva o caráter ácido da digestão de carboidratos já observado para a maioria dos grupos de Arthropoda. Muitas das enzimas descritas aqui apresentam propriedades semelhantes a estas enzimas em outros artrópodes indicando uma conservação de alguns aspectos da fisiologia do processo digestivo mesmo em um grupo tão diverso.

No entanto, fica também evidente, neste trabalho, que existem diferenças de composição das principais enzimas envolvidas no processamento de carboidratos dentre os aracnídeos. Pela escassez de dados não é possível afirmar se estas alterações estão relacionadas à dieta ou à filogenia do grupo. Algumas evidências sugerem uma relação filogenética no padrão de enzimas digestivas em Arachnida, como é o caso da presença de um complexo quitinolítico como demonstramos ou a presença de α -fucosidases digestivas independente da dieta. O complexo quitinolítico formado por uma quitinase e por uma β -glucosaminidase é conservado em todos os grupos estudados. O papel fisiológico de um complexo enzimático para a digestão de quitina é bastante evidente para predadores de insetos como aranhas e escorpiões, no entanto, não é evidente para vetores hematófagos. Existe a

possibilidade de que, principalmente a β -glucosaminidase esteja envolvida na digestão de bactérias, papel que também foi atribuído a uma lisozima digestiva de outro carrapato. Apesar de o papel fisiológico da α -fucosidase ainda não ter sido completamente esclarecido o seu destaque como uma enzima digestiva fica evidente em todo o grupo.

Estas α -fucosidases inclusive apresentam características semelhantes entre elas e em relação às α -fucosidases digestivas de Crustacea. Talvez Crustacea e Arachnida tenham mantido uma α -fucosidase digestiva de um ancestral comum. O papel das α -fucosidases digestivas em insetos ainda não foi caracterizado. Dados preliminares indicam atividade de α -fucosidase em intestino médio de *Aedes aegypti* (100 mU/animal). Foram isoladas as α -fucosidases dos animais modelos. Estas α -fucosidases apresentam pH ótimo de 5,3; 5,0 e 5,5, respectivamente, massas moleculares de 110 kDa, 86,5 kDa e 88 kDa por filtração em gel e 68 kDa, 76 kDa e 66,8 kDa por SDS-PAGE, são relativamente termoestáveis. A caracterização cinética indica não haver diferenças muito grandes de afinidade em relação ao substrato 4-MU fucosídeo. No entanto, ensaios com outros substratos serão necessários para avaliar diferenças mais significativas de especificidade entre estas enzimas.

Os dados obtidos e descritos nesta dissertação suscitam novas questões a serem abordadas e novas perspectivas de trabalho.

REFERÊNCIAS¹

- ALHADEFF, J. A.; MILLER, A. L.; WENAAS, H.; VEDVICK, T.; O'BRIEN, J. S. Human liver α -L-Fucosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 18, p. 7106-7113, 1975.
- ALTMANN, F. More than silk and honey – or, can insect cells serve in the production of therapeutic glycoproteins?. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 643-646, 1997.
- AMICI. **Sabendo um pouco mais: febre maculosa**. Disponível em: <<http://www.amicinet.com.br/>>. Acesso em: 05 out. 2010.
- ANGSTWURN, K.; WEBER, J. R.; SEGERT, A.; BÜRGER, W.; WEIH, M.; FREYER, D.; EINHÄUPL, K. M.; DIRNAGL, U. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. **Neuroscience Letters**, v. 191, p. 1-4, 1995.
- ARAKANE, Y.; ZHU, Q.; MATSUMIYA, M.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J. Properties of catalytic, linker and in soluble substrate binding domains of insect chitinase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 631-648, 2003.
- BAKER, J. E.; WOO, S. M. β -Glucosidases in the rice weevil *Sitophilus oryzae*: purification, properties and activity levels in wheat and legume-feeding strains. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 495-504, 1992.
- BARNARD, E. A. Comparative biochemistry of digestive enzymes. In: _____. **Comparative animal physiology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders and Co, 1973. p. 139-146.
- BARNES, R. D. Invertebrate zoology. In: _____. **Introduction to the Arthropods: the Trilobites**. 5. ed. Philadelphia: Saunders College International Edition, 1987. p. 472-480.
- BERTEAU, O.; MCCORT, I.; GOASDOUÉ, N.; TISSOT, N.; DANIEL, R. Characterization of a new α -fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of α -fucose from algal fucoidan *Ascophyllum nodosum*. **Glycobiology**, v. 12, p. 273-282, 2002.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, 2003.

BERTEAU, O.; BIELICKI, J.; KILONDA, A.; MACHY, D.; ANSON, D. S.; KENNE, L. α -L-Fucosidases: exoglycosidases with unusual transglycosylation properties. **Biochemistry**, v. 43, p. 7881-7891, 2004.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOLOGNESI, R.; ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. J.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 1249-1259, 2005.

BOWMAN, C. E. Digestion in the soil predatory mite *pergamus longicornis* (Berless) (Acari: Mesostigmata: Parasitidae) detectable hydrolases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, pt. B, p. 385-391, 1987.

BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System. **EC 3.2.1.51 - α -L-fucosidase**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org>>. Acesso em: 17 abr. 2010.

BRODY, A. R.; MCGRATH, J. C.; WHARTON, G. W. *Dermatophagoides farinae*: the digestive system. **Journal of the New York Entomological Society**, v. 80, p. 152-177, 1972.

BUTTERS, T. D.; SCUDDER, P.; ROTSART, J.; PETURSSON, S.; FLEET, G. W. J.; WILLENBROCK, W.; JACOB, G. S. Purification to homogeneity of *Charonia lampas* α -fucosidase by using sequential ligand-affinity chromatography. **Biochemical Journal**, v. 279, p. 189-195, 1991.

CANTAREL B. L.; COUTINHO P. M.; RANCUREL C.; BERNARD T.; LOMBARD V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233-238, 2008.

CAZy - Carbohydrate Active enZymes database. **Glycoside hidrolase family classification**. Disponível em: <<http://www.cazy.org>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 4. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 1998.

CHUANG N.; YEH C.; LIN K. The basic isoelectric form of α -L-fucosidase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* (crustacea: decapoda). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99, pt. B, n. 2, p. 395-398, 1991.

COHEN, A. C. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 85-103, 1995.

COMSTOCK, J. H. **The spider book**: a manual for the study of the spiders and their near relatives, the scorpions, pseudoscorpions, whip-scorpions, harvestmen, and other members of the class Arachnida, found in America north of Mexico, with analytical keys for their classification and popular accounts of their habits. Garden City, N.Y.: Doubleday, Page & Company, 1912.

DAHLQUIST, A. Assay of intestinal dissaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 99-107, 1968.

DEL PINO, F. A. B.; BRANDELLI, A.; TERMIGNONI, C.; GONZALES, J. C.; HENRIQUES, J. A. P.; DEWES, H. Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from bovine tick *Boophilus microplus* (Ixodide) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 123, pt. B, p. 193-200, 1999.

DUNN, C. W.; HEJNOL, A.; MATUS, D. Q.; PANG, K.; BROWNE, W. E.; SMITH, S. A.; SEAVER, E.; ROUSE, G. W.; OBST, M.; EDGECOMBE, G. D.; SORENSEN, M. V.; HADDOCK, S. H. D.; SCHMIDT-RHAESA, A.; OKUSU, A.; KRISTENSEN, R. M.; WHEELER, W. C.; MARTINDALE, M. Q.; GIRIBET, G. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. **Nature**, v. 452, p. 745-749, 2008.

EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A. S. Examination of internal morphology of the Ixodid tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a "How-to" pictorial dissection guide. **Midsouth Entomologist**, v. 2, p. 28-39, 2009.

ENDO, T.; TSUKADA, T.; HIRAIWA, M.; UDA, Y.; KOBATA, A. Purification and characterization of a α -L-fucosidase from *Pomacea canaliculata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 302, p. 152-160, 1993.

FOELIX, R. F. **Biology of spiders**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 1996.

GEISLER-LEE, J.; GEISLER, M.; COUTINHO, P. M.; SERGERMAN, B.; NISHIKUBO, N.; TAKAHASHI, J.; ASPERGORG, H.; DJERBI, S.; MASTER, E.; ANDERSSON-GUNNERAS, S.; SUNDBERG, B.; KARPINSKI, S.; TEERI, T. T.; KLECZKOWSKI, L. A.; HENRISSAT, B.; MELLEROWICZ, E. J. Poplar carbohydrate-active enzymes. Gene identification and expression analysis. **Plant Physiology**, v. 140, n. 3, p. 946-962, 2006.

GENTA, F. A.; BLANES, L.; CRISTOFOLETTI, P. T.; LAGO, C. L.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Purification, characterization and molecular cloning of the major chitinase from *Tenebrio molitor* larval midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 789-800, 2006.

GIARDINA, M. G.; MATARAZZO, M.; MORANTE, R.; LUCARIELLO, A.; VARRIALE, A.; GUARDASOLE, V.; DE MARCO, G. Serum α -L-fucosidase activity and early detection of hepatocellular carcinoma. **American Cancer Society**, p. 2468-2474, 1998.

GIRARD, C.; JOUANIN, L. Molecular cloning of a gut-specific chitinase cDNA from the beetle *Phaedon cochleariae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, p. 549-556, 1999.

GRIGOR'EVA, L. A.; AMOSOVA, L. I. Peritrophic matrix in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae). **Parazitologiya**, v. 38, p. 3-11, 2004.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

GRUNCLOVA', L.; FOUQUIER, H.; HYPS'A, V.; KOPA'C'EK, P. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 651-660, 2003.

HARD, K.; VAN DOORN, J. M.; THOMAS-OATES, J. E.; KAMERLING, J. P.; VAN DER HORSTS, D. Structure of the Asn-linked oligosaccharides of apolipoprotein 111 from the insect *Locusta migratoria*. Carbohydrate-linked 2-aminoethylphosphonate as a constituent of a glycoprotein. **Biochemistry**, v. 32, p. 766-775, 1993.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991.

HORN M.; NUSSBAUMEROVÁ M.; MILOSLAV S.; KOVAROVA Z.; SRBA J.; FRANTA Z.; SOJKA D.; BOGYO M.; CAFFREY C. R.; KOPACEK P.; MARES M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. **Chemistry & Biology**, v. 16, p. 1053-1063, 2009.

HU, K.; LEUNG, P. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, pt. B, p. 69-80, 2007.

KATAYAMA, T.; SAKUMA, A.; KIMURA, T.; MAKIMURA, Y.; HIRATAKE, J.; SAKATA, K.; YAMANOI, T.; KUMAGAI, H.; YAMAMOTO, H. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95). **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 15, p. 4885-4893, 2004.

KOGA, D.; HOSHIKA, H.; MATSUSHITA, M.; TANAKA, A.; IDE, A.; KONO, M. Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase from the liver of a prawn, *Penaeus japonicus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 194-199, 1996.

KUNTNER, M. A monograph of *Nephilengys*, the pantropical 'hermit spiders' (Araneae, Nephilidae, Nephilinae). **Systematic Entomology**, v. 32, p. 95-135, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEVY, G. A.; MCALLAN, A. Mammalian fucosidases. **Biochemical Journal**, v. 80, p. 435-439, 1961.

LIU, S.; CHEN, C.; CHANG, S.; MONG, K. T.; LIN, C.; CHANG, C.; TANG, C. Y.; LI, Y. Identification of essential residues of human α -L-Fucosidase and tests of its mechanism. **Biochemistry**, v. 48, p. 110-120, 2009.

LOUATI H.; ZOUARI N.; FENDRI A.; GARGOURI Y. Digestive amylase of a primitive animal, the scorpion: purification and biochemical characterization. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 853-860, 2010.

MATHIESON, B. R. F.; LEHANE, M. J. Ultrastructure of the alimentary canal of the sheep scab mite, *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae). **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 151-166, 2002.

MATSUO, T.; SATO, M.; INOUE, N.; YOKOYAMA, N.; TAYLOR, D.; FUJISAKI, K. Morphological studies on the extracellular structure of a tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 90, p. 243-248, 2003.

MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytologist**, v. 188, p. 82-97, 2010.

MOMMSEN, T. P. Digestive enzymes of a spider (*Tegeneria atrica* Koch) .2. Carbohydrases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 60, pt. A, p. 371-375, 1978.

MOMMSEN, T. P. Comparison of digestive α -amilases from two species of spiders (*Tegeneria atrica* and *Cupiennius salei*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 127, p. 355-361, 1978b.

MOMMSEN, T. P. Chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider, *Cupiennius salei*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 612, p. 361-372, 1980.

MOORE, J. **An introduction to the Invertebrates**. 2. ed., Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 03 set. 2010.

NOELTING, G; BERNFELD, P. Sur lès enzymes amylolytiques. III. La beta-amylase: dosage d' activité et controle de l'absence d'alfa-amylase. **Helvetica Chimica Acta**, v. 31, p. 286-290, 1948.

OSANJO, G.; DION, M.; DRONE, J.; SOLLEUX, C.; TRAN, V.; RABILLER, C.; TELLIER, C. Directed evolution of the α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an α -L-transfucosidase. **Biochemistry**, v. 46, p. 1022-1033, 2007.

PAPADOPOULOS, J. S.; AGARWALA, R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. **Bioinformatics**, v. 23, n. 9, p. 1073-1079, 2007.

PETERS, G.; SABOROWSKI, R.; MENTLEIN, R.; BUCHHOLZ, F. Isoforms of an N-acetyl- β -D-glucosaminidase from the antarctic krill, *Euphausia superba*: purification and antibody production **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, pt. B, p. 743-751, 1998.

POLIS, G. A. **The Biology of Scorpions**. California: Stanford University Press, 1990.

PONCE, N. M. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; FLORES, M. L.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 153-165, 2003.

PRENDECKA, M.; BUCZYNSKA, A.; ROGALSKI, J. Purification and characterization of beta-mannosidases from white rot fungus *Phlebia radiata*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 139-147, 2007.

PROESPRAIWONG, P.; TASSANAKAJON, A.; RIMPHANITCHAYAKIT, V. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 156, pt. B, p. 86-96, 2010.

RAMALHO-ORTIGAO, J. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Molecular characterization of L1chit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 279-287, 2003.

REGLERO, A.; CABEZAS, J. A. Glycosidases of molluscs. Purification and properties of α -L-fucosidase from *Chamelea gallina* L. **European Journal of Biochemistry**, v. 66, p. 379- 387, 1976.

ROOS, C.; KOLMER, M.; MATTILA, P.; RENKONEN, R. Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 3168-3175, 2002.

SCANLIN, T. F; GLICK, M. C. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1455, p. 241-253, 1999.

SCHWARZENBERGER, A.; ZITT, A.; KROTH, P.; MUELLER, S.; VON ELERT, E. Research gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. **BMC Physiology**, v. 10, n. 6, p. 1-15, 2010.

SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. Characterization of a novel gut-specific chitinase gene from the human malaria vector *Anopheles gambiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28895-28900, 1997.

SHULTZ, J. W. Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. **Cladistics**, v. 6, p. 1-38, 1990.

SILVA M. C. P.; TERRA W. R.; FERREIRA C. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from an insect larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 1089-1099, 2004.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. São Paulo: Editora Nacional, 1991. 816p.

SULZENBACHER, G.; BIGNON, C.; NISHIMURA, T.; TARLING, C. A.; WITHERS, S. G.; HENRISSAT, B.; BOURNE, Y. Crystal structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 13119-13128, 2004.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO – SUCEN. **Vetores e Doenças - Febre Maculosa**. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/maculo.html>> Acesso em: 09 ago. 2010.

TARLING, C. A.; HE, S.; SULZENBACHER, G.; BIGNON, C.; BOURNE, Y.; HENRISSAT, B.; WITHERS, S. G. Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 47394-47399, 2003.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 56, pt. B, n. 2, p. 201-209, 1977.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 524, p. 131-141, 1978.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109, pt. B, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L. I.; LATROV, K.; GILL, S. (Org.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier BV, 2005. p. 171-224.

THOMPSON, S. N.; BORCHARDT, D. B. Glucogenic blood sugar formation in an insect *Manduca sexta* L.: asymmetric synthesis of trehalose from ¹³C enriched pyruvate. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, pt. B, p. 461-471, 2003.

TREE OF LIFE WEB PROJECT. **Arachnida**. Disponível em: <<http://tolweb.org>>. Acesso em: 28 set. 2010.

VAN DER BORGHT, O. Peritrophic membranes in Arachnida (Arthropoda). **Nature**, v. 210, p. 751-752, 1966.

VIJAYALEKSHMI, N. R.; KURUP, P. A. Alpha-amylase of the hepatopancreas of the scorpion, *Heterometrus scaber*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 7, p. 266-267, 1969.

VON EICKSTEDT, V. R. D.; RIBEIRO, L. A.; CANDIDO, D. M.; ALBUQUERQUE, M. J.; JORGE, M. T. Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello) and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, p. 92-105, 1996.

VONK, H. J.; WESTERN, J. R. H. **Comparative Biochemistry and Physiology of enzymatic digestion**. London: Academic Press, 1984.

WHARTON, G. W.; BRODY, A. R. The peritrophic membrane of the mite, *Dermatophagoides farinae*: acariformes. **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 4, p. 801-804, 1972.

WILLEMS, P. J.; DARBY, J. K.; DICIOCCIO, R. A.; NAKASHIMA, P.; ENG, C.; KRETZ, K. A.; CAVALLI-SFORZA, L. L.; SHOOTER, E. M.; O'BRIEN, J. S. Identification of a mutation in the structural α -L-fucosidase gene in fucosidosis. **The American Journal of Human Genetics**, v. 43, p. 756-763, 1988.

XIE, X.; DU, J.; HUANG, Q.; SHI, Y.; CHEN, Q. Inhibitory kinetics of bromacetic acid on β -N-acetyl-d-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 308–313, 2007.

YOU, M.; XUAN, X.; TSUJI, N.; KAMIO, T.; TAYLOR, D.; SUZUKI, N.; FUJISAKI, K. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 8556-8563, 2003.

ZEE, J. P. V.; GERACI, N. S.; GUERRERO, F. D.; WIKEL, S. K.; STUART, J. J.; NENE, V. M. HILL, C. A. Tick genomics: The Ixodes genome project and beyond. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1297-1305, 2007.

ZIMMER, M.; BRUNE, A. Physiological properties of the gut lumen of terrestrial isopods (Isopoda:Oniscidea): adaptive to digesting lignocellulose? **Journal of Comparative Physiology**, v. 175, p 275-283, 2005.

ZHU, Z.; GERN, L.; AESCHLIMANN, A. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. **Parasitology Research**, v. 77, p. 635-641, 1991.