

Camila Cristina Coelho

**Proteases de *Panagrolaimus sp.* CEW2
(Nematoda, Rhabditida)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2020

Camila Cristina Coelho

**Proteases de *Panagrolaimus sp.* CEW2
(Nematoda, Rhabditida)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Coelho, Camila Cristina
Proteases de Panagrolaimus sp. CEW2 (Nematoda,
Rhabditida) / Camila Cristina Coelho; orientador
Carlos Eduardo Winter. -- São Paulo, 2020.
122 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Panagrolaimus sp.. 2. Proteases. 3.
Extremófilo. I. Winter, Carlos Eduardo , orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Cristina Coelho.

Título da Tese: Proteases de *Panagrolaimus sp.* CEW2
(Nematoda, Rhabditida).

Orientador(a): Prof. Dr(a) Carlos Eduardo Winter.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada ____ / ____ / ____, considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **784/2015** referente ao projeto intitulado: "***Proteases de Panagrolaimus sp. CEW2, um nematóide extremófilo de vida livre isolado da região amazônica***" sob a responsabilidade de ***Camila Cristina Coelho*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Carlos Eduardo Winter***, do Departamento de Parasitologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de dezembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1046/2019** referente ao projeto intitulado: **“Alimentação do nematoide de vida livre *Panagrolaimus* sp. CEW2 com lisado de hemácias humanas”** sob a responsabilidade de ***Camila Cristina Coelho*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Carlos Eduardo Winter***, do Departamento de Parasitologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 03 de setembro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzon Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Ao meu querido e amado avô Aníbal Alberto Coelho (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Winter, por todo o ensinamento durante este período (menos pelas piadas horríveis).

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Nematóide: Daniela Peres Almenara, Maira de Camargo Neves, Carolina Rossi, Marco Arantes e Danilo Ferraz. Por todas as conversas, discussões, aprendizado, ajudas infinitas no projeto e cafezinhos.

Ao Manoel Aparecido Peres, pelo apoio técnico, criatividade e soluções para tudo que apareceu ao longo do doutorado e principalmente pelo carinho e amizade.

Ao meu pai, Luís Claudio Coelho e minha avó Francisca Ralhada Coelho. Por sempre terem cuidado de mim e me incentivado a correr atrás do meu sonho e da minha carreira.

Ao meu noivo Leônidas Augusto Fernandes do Prado, por sempre estar do meu lado muito obrigada pelo amor, apoio e carinho.

Ao Dr. Rubens Akamine, por ter me apresentado à ciência. A Dra. Daniela Akamine, por ter dado as melhores aulas da graduação.

Aos professores do Departamento de Parasitologia do ICB-USP. Prof. Dra. **Andrea Cristina Fogaça**, Prof. Dra. **Alcira Tania Bijovsky Katzin**, Prof. Dr **Alejandro Miguel Katzin**, Prof. Dra. **Sílvia Celina Alfieri** e Prof. Dra **Sílvia Reni Bortolin Uliana**. Por todas as discussões, ótimas aulas, ensinamento e empréstimo de material e equipamento.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia do ICB- USP, pelo amparo técnico.

Aos colegas de I.C. e Pós-Graduandos do Departamento de Parasitologia do ICB-USP, por todas as conversas, ajuda e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.
George Bernard Shaw

Um cientista deve acima de tudo ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independente daquilo ser o que ele imaginava ver. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão você só vai ver o que espera ver.
Douglas Adams

RESUMO

COELHO, C. C. **Proteases de *Panagrolaimus* sp. CEW2 (Nematoda, Rhabditida)**. 2020. 122 f. Tese de Doutorado (Departamento de Parasitologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Nematoides de vida livre do gênero *Panagrolaimus* se caracterizam por apresentar hábitos extremófilos, sobrevivendo a condições de baixa temperatura e baixa umidade relativa. A linhagem dióica que utilizamos em nossos estudos (*Panagrolaimus* sp. CEW2) foi isolada em Rondônia e tem se mostrado resistente a dessecação, congelamento e alta força iônica/pressão osmótica. Proteases têm sido estudadas do ponto de vista bioquímico principalmente em nematoides parasitas. Apesar de 2% dos genes de *C. elegans* serem anotados como protease pouco se sabe sobre suas proteases digestivas. Os ensaios de atividade encontrados no extrato total de CEW2 foram realizados utilizando substratos sintéticos para tripsina, quimotripsina, aminopeptidase, elastases e catepsina. Desenvolvemos um método de crescimento em massa de *Panagrolaimus* sp. CEW2 utilizando meio S, *E. coli* linhagem NA22 e um substrato sólido feito com esponja de poliuretano. Este método aumentou em 3x a quantidade de nematoides obtidos quando comparados ao crescimento em placa de Petri com meio NGM. As atividades enzimáticas detectadas foram caracterizadas em relação ao seu pH ótimo, temperatura ótima e sensibilidade a íons metálicos e inibidores. Uma atividade elastásica detectada no homogeneizado de vermes era dependente de cálcio e inesperadamente ativada por sulfato de cobre. Atividades tipo tripsina e quimotripsina não foram detectadas nos homogeneizados.

Palavras-chave: *Panagrolaimus*, nematoide, protease, extremófilo

ABSTRACT

COELHO, C. C. Proteases from *Panagrolaimus* sp. CEW2 (Nematoda, Rhabditida). 2020. 122 p. Ph.D. These. (Department of Parasitology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Free-living nematodes of the genus *Panagrolaimus* are characterized by having extremophilic habits, surviving conditions of low temperature and low relative humidity. The dioecious lineage that we used in our studies (*Panagrolaimus* sp. CEW2) was isolated in Rondônia-BR and is resistant to desiccation, freezing and high ionic strength/osmotic pressure. Proteases have been studied from a biochemical point of view mainly in parasitic nematodes. Although 2% of *C. elegans* genes are noted as proteases, little is known about their digestive proteases. The proteolytic activity tests made in the total extract of CEW2 were carried out using synthetic substrates for trypsin, chymotrypsin, aminopeptidase, elastase, cathepsin. We developed a mass growth method for *Panagrolaimus* sp. CEW2 using a liquid medium, *E. coli* strain NA22 and a solid substrate composed of polyurethane sponge. This method increased three times the wet mass of nematodes obtained when compared to growth in Petri dishes. The enzymatic activities detected were characterized as to their optimum pH, optimum temperature and sensitivity to metal ions and inhibitors. An elastase activity present in the worm homogenates was shown to be calcium dependent and unexpectedly activated by copper sulfate. Chymotrypsin- or trypsin-like activities were not detected in CEW2 homogenates.

Keywords: *Panagrolaimus*, nematode, protease, extremophile

Lista de Figuras

Figura 1	Região do pseudoceloma em <i>C. elegans</i>	25
Figura 2	Filogenia do filo nematoda.....	26
Figura 3	Morfologia da boca de nematoides.....	27
Figura 4	Filogenia dos Rhabdida.....	29
Figura 5	Microscopia eletrônica de varredura de <i>Panagrolaimus superbus</i> dessecado.....	31
Figura 6	Nomenclatura da especificidade de substrato pela protease.....	32
Figura 7	Varição do pH ao longo do tubo digestório de <i>C. elegans</i>	37
Figura 8	Cultura em massa de CEW2.....	58
Figura 9	Cultura de CEW2 em hemácias humanas.....	60
Figura 10	Isolamento de vermes em gradiente de Iodixanol.....	61
Figura 11	Isolamento por magnetismo de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 obtido por cultura em lisado de hemácias.....	63
Figura 12	Tempo de vida de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2.....	64
Figura 13	Atividade proteolítica de homogeneizado de CEW2 sobre BSA (soro-albumina bovina).....	66
Figura 14	Atividade proteolítica de homogeneizado de CEW2 sobre caseína.....	67
Figura 15	Zona de hidrólise da caseína em diferentes pHs.....	68
Figura 16	Atividade proteolítica sobre L-Leucina-p-nitroanilida.....	69
Figura 17	Curva de L-Leucina-p-nitroanilida.....	71
Figura 18	pH ótimo de atividade sobre L-Leucina-p-nitroanilida.....	71
Figura 19	Análise da atividade enzimática sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro- Leu-p-nitroanilida.....	74
Figura 20	Curva de pH sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida....	75
Figura 21	Hidrólise do substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p- nitroanilida por homogeneizado de CEW2 em diferentes concentrações de substrato.....	76
Figura 22	Atividade enzimática sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p- nitroanilida.....	78

Figura 23	Curva de pH sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida....	79
Figura 24	Curva de substrato.....	80
Figura 25	Atividade proteolítica no substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida.....	83
Figura 26	Curva de Substrato- N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida.....	83
Figura 27	Curva de Substrato- Z-Phe-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina.....	86
Figura 28	pH ótimo de Z-FR-AMC.....	87
Figura 29	Curva de substrato Z-RR-AMC.....	90
Figura 30	Curva de pH no Z-RR-AMC.....	91
Figura 31	Curva de tempo da hidrólise de L-Leu-pNA pelo dialisado após precipitação com sulfato de amônio.....	95
Figura 32	Cromatografia de troca iônica da amostra do homogeneizado de CEW2 concentrada por sulfato de amônio.....	95
Figura 33	Cromatografia de Exclusão do homogeneizado de CEW2.....	97
Figura 34	Cromatografia de troca iônica aniônica.....	98
Figura 35	Cascata proteolítica da degradação de hemoglobina e CEW2 em cultura de hemácias não lisadas.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1	Espécies e distribuição do gênero <i>Panagrolaimus</i>	29
Tabela 2	Classes de enzimas presente na digestão de sangue em nematoides parasitas.....	34
Tabela 3	Possíveis papéis das proteases em nematoides.....	35
Tabela 4	Gradiente de Iodixanol.....	42
Tabela 5	Lista de Soluções.....	55
Tabela 6	Hidrólise de L-Leucina-p-nitroanilida em três diferentes temperaturas.....	70
Tabela 7	Efeito dos inibidores de proteases na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 sobre L-Leucina-p-nitroanilida.....	72
Tabela 8	Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 sobre L-leucina p-nitroanilida para aminopeptidase.....	73
Tabela 9	Estabilidade da atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 sobre L-Leu-p-nitroanilida (LPA).....	73
Tabela 10	Hidrólise em diferentes temperaturas da enzima de CEW2 sobre o substrato para elastase Suc-AAPL-pNA.....	75
Tabela 11	Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 no substrato Suc-AAPL-pNA para Elastase.....	76
Tabela 12	Efeito dos inibidores de protease no homogeneizado de CEW2 em AAPL-pNA.....	77
Tabela 13	Hidrólise de N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.....	79
Tabela 14	Efeito dos cátions metálicos na atividade da elastase presente no extrato total de CEW2 no substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.....	80
Tabela 15	Efeito dos inibidores de protease na atividade da elastase presente no extrato total de CEW2 no substrato Suc-AAPF-pNA.....	82
Tabela 16	Temperatura ideal de hidrólise de N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida....	84
Tabela 17	Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática no substrato Suc-AAA-pNA.....	84
Tabela 18	Atividade enzimática sobre Z-FR-AMC.....	86
Tabela 19	Hidrólise de Z-FR-AMC diferentes temperaturas.....	87
Tabela 20	Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática presente do homogeneizado de CEW2 sobre o substrato Z-FR-AMC para Catepsina.....	88

Tabela 21	Efeito dos inibidores de protease no homogeneizado de CEW2 em Z-FR-AMC.....	88
Tabela 22	Atividade enzimática sobre Z-RR-AMC.....	90
Tabela 23	Hidrólise de Z-RR-AMC em três diferentes temperaturas.....	91
Tabela 24	Efeito dos inibidores de protease no homogeneizado de CEW2 em Z-RR-AMC.....	92
Tabela 25	Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 no substrato Z-RR-AMC para catepsina.....	93
Tabela 26	Fracionamento das atividades presentes no homogeneizado de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 por Sulfato de amônio. Atividade total foi feita com o substrato para aminopeptidase (LAP).....	94
Tabela 27	Resumo das atividades da aminonopepididase de <i>Panagrolaimus</i> CEW2.....	104
Tabela 28	Resumo das atividades das Elastase de CEW2.....	105
Tabela 29	Resumo das atividades das catepsinas de CEW2.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMC**- *7-amino-4-methylcoumarin*
- APMSF**- *4-Amidinobenzylsulfonil fluoridehydrochloride*
- BAPNA**- *N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*
- BCA**- *Ácido Bicinchonínico*
- Bestatina**- *N-[(2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutyryl]-L-leucinehydrochloride*
- BSA**- *Albumina sérica bovina*
- CA-074**- *(L-3-trans-(Propylcarbamyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline*
- DDT** - *Ditiotreitól*
- DNA** - *Ácido Desoxirribonucléico*
- E-64**- *trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane*
- EDTA** - *Etilenodiaminotetracetato de sódio*
- EGTA**- *Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraaceticacid*
- Elastatinal**-*(2S)-2-[(4S)-2-Amino-1,4,5,6-tetrahydro4-pyrimidinyl]-N-[[[(1S)-1-carboxy-3-methylbutyl]amino]carbonyl]glycyl-N1-[(1S)-1-methyl-2-oxoethyl-L-glutamamide*
- g**- *Aceleração da gravidade (980,665cm/s²)*
- HEPES**- *(N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)*
- HSPs** - *“Heat Shock Protein”*
- INAs** – *“Ice Nucleating Agents”*
- kDa** - *Massa molecular de proteínas = 1000 daltons*
- LAP**- *L-Leucina-4-nitroanilida*
- LB** - *Luria-Bertani*
- LEA** - *“Late Embryogenesis Abundant proteins”*
- Leupeptina**- *N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininalhemisulfatesalt*
- m/v** - *Massa por volume*
- MES**- *2-(N-morpholino)ethanesulfonicacid*
- PBS**- *Tampão Fosfato-salino*
- PCMB**- *4-(Hydroxymercuri)benzoicacidsodiumsalt*

Pepstatina-*N-((N-(N-isovaleryl-L-valyl-L-valyl)-(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoyl)-L-alanyl)-(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid*

pH - $-\log aH^+$ (em solução diluída de ácido $pH = -\log [H^+]$)

PHEN- *1,10-Phenanthroline*

PMSF - *Phenylmethylsulfonylfluoride*

pNA- *para-nitroanilina*

SDS - *Dodecil Sulfato de Sódio*

SDS-PAGE -*Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio*

SSU rRNA- *RNA da subunidade menor do ribossomo*

TCA - *Ácido tricloroacético*

TE - *Tris-EDTA*

TEMED - *N,N,N',N'- tetrametilenodiamina*

THPs- *“Thermal Hysteresis Proteins”*

Tris - *Tris (hidroximetil) aminometano*

v/v -*Volume por volume*

Sumário

1.Introdução.....	24
1.1 Nematoides.....	25
1.2 Gênero <i>Panagrolaimus</i>	28
1.3 Proteases.....	31
1.4 Proteases em Nematoides.....	33
2. Objetivos.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1 Culturas de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW2.....	41
3.1.1 Cultura dos nematoides em meio solido.....	41
3.1.2 Cultura dos nematoides em meio liquido (espoja).....	41
3.1.3 Cultura dos nematoides em lisado de hemácias.....	41
3.2 Isolamento de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW2 da cultura em lisado de hemácia com gradiente de Iodixanol.....	41
3.3 Isolamento de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW2 da cultura em lisado de hemácia por magnetismo.....	42
3.4 Determinação do tempo de vida de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW2.....	43
3.5 Homogeneização dos vermes e obtenção do extrato bruto de atividade...	43
3.6 Dosagem de proteína.....	43
3.7 Ensaio com substratos protéicos.....	43
3.7.1 Soroalbumina Bovina (BSA).....	43
3.7.2 Azo-Albumina e Azo-caseína.....	44
3.7.3 Ensaio de atividade em meio sólido com caseína.....	44
3.8 Ensaio com substratos sintéticos com p-nitroanilina como cromóforo...	44
3.8.1 Aminopeptidase.....	44
3.8.1.1 <i>L-Leucina-p-nitroanilida</i>	44
3.8.1.1.1 <u>Teste de atividade enzimática por espectrofotometria.....</u>	<u>44</u>
3.8.1.1.2 <u>Determinação da temperatura ótima em leitor de placas.....</u>	<u>45</u>

3.8.1.1.3 <u>Curva de substrato em leitor de placas.....</u>	45
3.8.1.1.4 <u>Curva de pH em leitor de placas.....</u>	45
3.8.1.1.5 <u>Teste de inibição em leitor de placas.....</u>	45
3.8.1.1.6 <u>Teste de cátions metálicos em leitor de placas.....</u>	45
3.8.1.1.7 <u>Teste de estabilidade enzimática em leitor de placas.....</u>	46
3.8.2 Tripsina.....	46
3.8.2.1 <i>BAPNA(N-α-Benzoil DL- arginina p-nitroanilida).....</i>	46
3.8.3 Elastase.....	46
3.8.3.1 <i>N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida.....</i>	46
3.8.3.1.1 <u>Teste de atividade enzimática por espectrofotometria.....</u>	46
3.8.3.1.2 <u>Determinação da temperatura ótima em leitor de placas</u>	46
3.8.3.1.3 <u>Curva de substrato em leitor de placas.....</u>	46
3.8.3.1.4 <u>Determinação do pH ótimo em leitor de placas.....</u>	47
3.8.3.1.5 <u>Teste de inibição em leitor de placas.....</u>	47
3.8.3.1.6 <u>Teste de cátions metálicos em leitor de placas.....</u>	47
3.8.3.2 <i>N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.....</i>	47
3.8.3.2.1 <i>Teste de atividade enzimática por espectrofotometria.....</i>	47
3.8.3.2.2 <i>Determinação da temperatura ótima em leitor de placas.....</i>	47
3.8.3.2.3 <i>Curva de substrato em leitor de placas.....</i>	48
3.8.3.2.4 <i>Determinação do pH ótimo em leitor de placas.....</i>	48
3.8.3.2.5 <i>Teste de inibição em leitor de placas.....</i>	48
3.8.3.2.6 <i>Teste de cátions metálicos em leitor de placas</i>	48
3.8.3.3 <i>N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida.....</i>	48
3.8.3.3.1 <i>Teste de atividade enzimática por espectrofotometria.....</i>	49
3.8.3.3.2 <i>Determinação da temperatura ótima em leitor de placas.....</i>	49
3.8.3.3.3 <i>Curva de Substrato em leitor de placas.....</i>	49
3.8.3.3.4 <i>Determinação do pH ótimo em leitor de placas.....</i>	49
3.8.4 Quimotripsina.....	49
3.8.4.1 <i>SUPHEPA (N-Succinyl -Phenylalanine- p-nitroanilide).....</i>	50
3.9 Ensaios com substratos sintéticos com Metilcoumarina como	50
fluoroforo.....	
3.9.1 Catepsinas.....	50
3.9.1.1 <i>Z-Arg-Arg-7-amido-4-Methylcoumarin-Hydrochloride.....</i>	50

3.9.1.1.1 <u>Teste de atividade enzimática</u>	50
3.9.1.1.2 <u>Determinação da temperatura ótima</u>	50
3.9.1.1.3 <u>Curva de substrato</u>	50
3.9.1.1.4 <u>Determinação do pH ótimo</u>	50
3.9.1.1.5 <u>Teste de Inibição</u>	51
3.9.1.1.6 <u>Teste de cátions metálicos</u>	51
3.9.1.2 Z-Phe-Arg-7-amido-4-Methylcoumarin Hydrochloride.....	51
3.9.1.2.1 <u>Teste de atividade enzimática</u>	51
3.9.1.2.2 <u>Determinação da temperatura ótima</u>	51
3.9.1.2.3 <u>Curva de substrato</u>	52
3.9.1.2.4 <u>Determinação do pH ótimo</u>	52
3.9.1.2.5 <u>Teste de inibição</u>	52
3.9.1.2.6 <u>Teste de cátions metálicos</u>	52
3.10 Fracionamento por sulfato de amônio	52
3. 11 Diálise das frações	53
3.12 Fracionamento por Cromatografia	53
3.12.1 Cromatografia de troca iônica.....	53
3.12.2 Cromatografia de Exclusão.....	53
3.13 SDS-PAGE	53
3.14 Lista de soluções	54
4. Resultados	55
4.1 Cultura e isolamento	57
4.1.1 <u>Desenvolvimento da cultura em massa de <i>Panagrolaimus</i> sp.CEW2</u>	58
4.1.2 <u>Cultura de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 em lisado de hemácias</u>	58
4.1.3 <u>Isolamento de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 obtido em cultura com lisado de hemácias</u>	59
4.1.3.1 <u>Isolamento de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 utilizando gradiente de Iodixanol</u>	61
4.1.3.2 <u>Isolamento de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2 da cultura em lisado de hemácia por método magnético</u>	62
4.2 Tempo de vida de <i>Panagrolaimus</i> sp. CEW2	64
4.3 Análise das atividades proteolíticas em homogeneizados de CEW2	64

4.3.1 Seleção dos substratos protéicos.....	64
4.3.1.1 Atividade proteolítica sobre Soroalbumina Bovina (BSA).....	64
4.3.1.2 Caseína.....	67
4.3.2 Seleção dos substratos sintéticos.....	68
4.3.2.1 Atividade proteolítica do extrato total de <i>Panagrolaimos sp</i> CEW2.....	68
4.3.2.2 Tripsina.....	69
4.3.2.2.1 BAPNA (<i>N-α-Benzoil DL- arginina p-nitroanilida</i>).....	69
4.3.2.3 Aminopeptidase.....	69
4.3.2.3.1 LPA- L-Leucina-p-nitroanilida.....	69
4.3.2.4 Elastase.....	74
4.3.2.4.1 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida.....	74
4.3.2.4.2 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.....	78
4.3.2.4.3 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida.....	82
4.3.2.5 Catepsina	85
4.3.2.5.1 N-Benzoil-Phe-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina (Z-FR-AMC).....	85
4.3.2.5.2 N-Benzoil-Arg-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina (Z-RR-AMC).....	89
4.3.2.6 Quimotripsina.....	93
4.3.2.6.1 SUPHEPA (N-Succinyl –L-Phenylalanine- p-nitroanilide).....	93
4.4 Tentativas de purificação das atividades enzimáticas encontradas no extrato total de CEW2.....	93
4.4.1 Fracionamento por sulfato de amônio.....	93
4.4.2 Cromatografia de Troca- iônica aniônica.....	95
4.4.3 Cromatografia de Exclusão.....	96
5. Discussão.....	99
5.1 Desenvolvimento da cultura em massa de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW2.....	100
5.2 Cultura de <i>Panagrolaimus sp.</i> CEW 2 em lisado de hemácias.....	100
5.3 Atividades Proteolíticas.....	102
5.3.1 Substratos proteicos.....	102
5.3.2 Substratos sintéticos.....	102
5.3.2.1 <i>Tripsina e Quimotripsina</i>	103

5.3.2.2 <i>Aminopeptidase</i>	103
5.3.2.3 <i>Elastase</i>	104
5.3.2.4 <i>Catepsina</i>	107
5.4 Tentativas de purificação das atividades enzimáticas encontradas no extrato total de CEW2.....	108
6. Referências.....	111

1.Introdução.

1.1 Nematoides

Nematoides são animais metazoários, que pertencem ao filo com maior número de representantes com cerca de um a dez milhões de espécies. Atualmente apenas 25 mil espécies foram descritas (SOMMER e STREIT, 2011). Esses vermes são encontrados em diversos ambientes, tanto aquáticos como terrestres e podem ter variados hábitos de vida podendo ser de vida livre ou parasita de seres humanos, animais invertebrados, vertebrados e plantas. Estima-se que os nematoides representem cerca de 90% dos animais encontrados no fundo do mar e cerca de 80% de todos os animais encontrados na terra (VAN DER HOOGEN *et al.*, 2019).

Os nematoides apresentam uma importante adaptação que permitiu o sucesso das espécies em diferentes ambientes, terem o corpo coberto por uma cutícula constituída de colágeno, de origem epidérmica, impermeável e resistente. Possuem corpo cilíndrico e afunilado nas extremidades com simetria bilateral. São animais pseudocelomados e possuem uma cavidade entre a epiderme e a mesoderme onde se desenvolvem os sistemas (**Figura 1**) (WOOD, 1988).

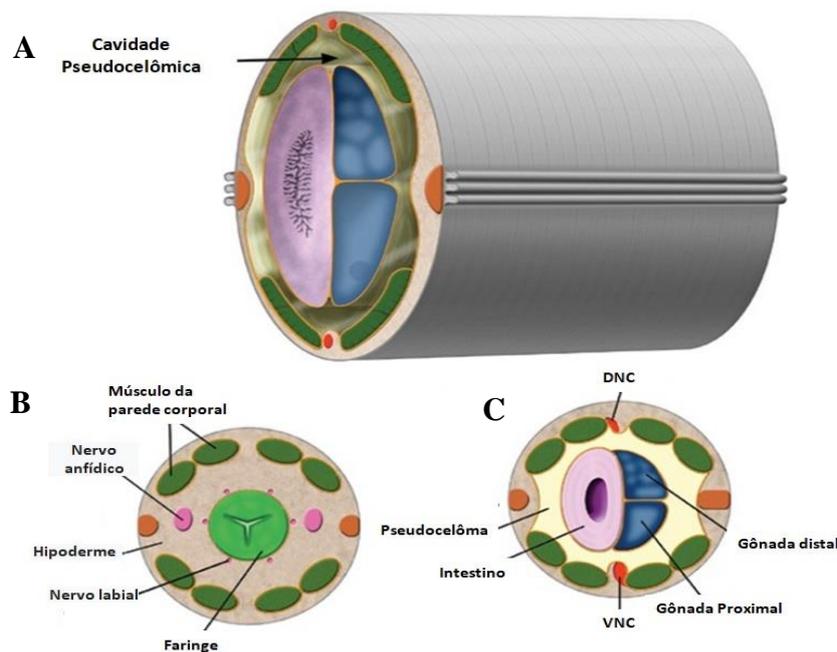


Figura 1. Região do pseudoceloma em *C. elegans*. (A) Parede do corpo (tubo externo) é separada do tubo interno (sistema alimentar, gônada) por um pseudoceloma. (B). Corte da parte anterior do corpo e (C) Corte da parte posterior. Modificado de ALTUN *et al.*, 2009 In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.1

Por mais que estas estruturas aparentem ser simples, apresentam grandes variações que foram associadas a características da biologia, ecologia e ao hábito de vida desses

animais, mostrando uma ampla variedade de estruturas como os aparelhos bucais e as ornamentações da cutícula (DE LEY, 2006).

Os nematoides possuem diferentes formas de reprodução. A maioria das espécies é dióica, ou seja, possuem indivíduos machos e fêmeas separados e sua reprodução é sexuada. Espécies do gênero *Mesorhabditis* têm reprodução partenogenética e espécies como os *Caenorhabditis elegans* são hermafroditas e se autofertilizam. (ELLIS e LIN, 2014). Existem ainda espécies trióicas com a presença de machos, fêmeas e hermafroditas, como o caso dos gêneros *Auanemae* e *Heterorhabditis* (KANZAKI *et al.*, 2017).

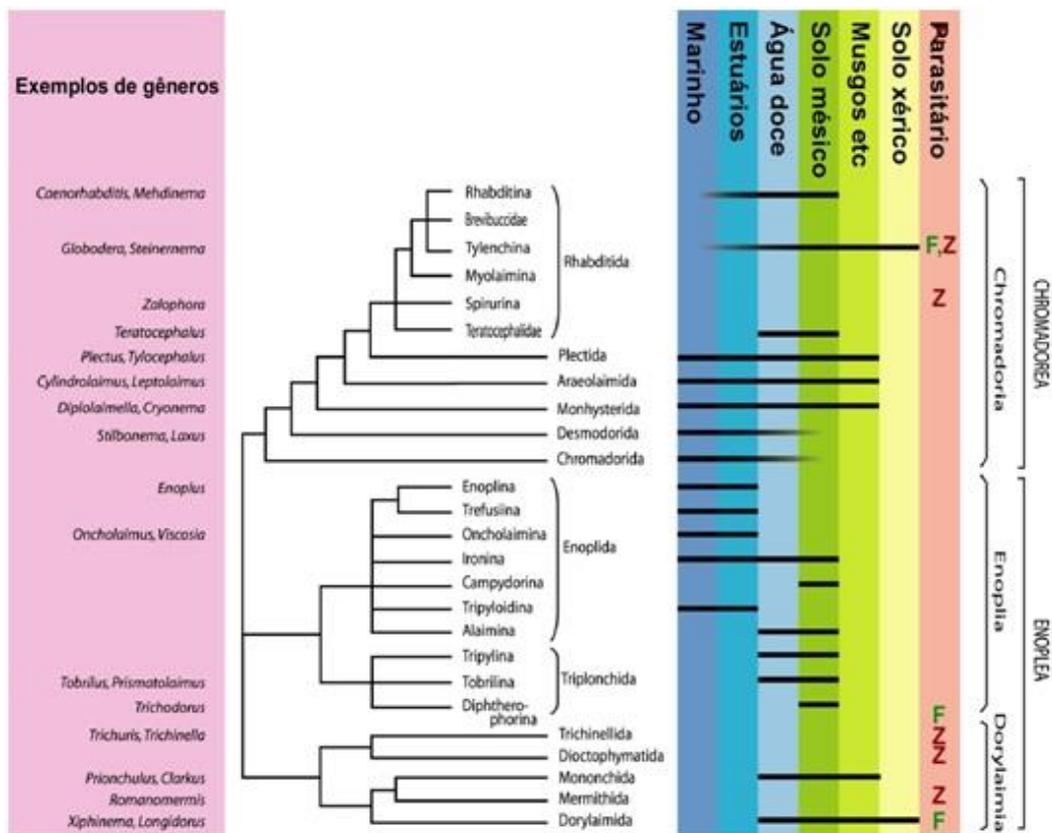


Figura 2. Filogenia do filo nematoda. Resumo da filogenia do filo Nematoda com exemplos de taxa, distribuição ecológica e classificação superior. F = fitoparasitas; Z = zooparasitas.

Figura extraída e modificada de

http://www.wormbook.org/chapters/www_quicktourdiversity/nematfig3.jpg

Filogeneticamente o filo Nematoda está dividido em três grandes grupos (Figura 2). O clado Enoplia compreende nematoides marinhos de vida livre encontrados em ecossistemas no fundo do mar e que se alimentam de diatomáceas e algas marinhas microscópicas. Podem também ser encontradas algumas espécies em água doce ou salobra. Os nematoides pertencentes ao clado Dorylaimia são parasitas de alguns tipos de plantas, vertebrados e invertebrados. No clado Chromadoria são

encontrados representantes em ambientes marinhos e terrestres que podem ser parasitas de animais e plantas (BLAXTER e KOUTSOVOULOS, 2014).

A alimentação também apresenta uma grande variação entre os organismos deste filo. Nematoides de vida livre podem se alimentar desde algas, fungos e bactérias até de pequenos animais, organismos e tecidos mortos (YEATES *et al.*, 1993). Os nematoides parasitas muitas vezes se alimentam de sangue e comumente podem parasitar o homem como as filarias, ancilostomídeos e ascarídeos, causando doenças ao homem (WILLIAMSON *et al.*, 2003). Esses diferentes hábitos alimentares se refletem numa variada morfologia da boca e dos sensílios na parte anterior do corpo dos nematoides (**Figura 3**).

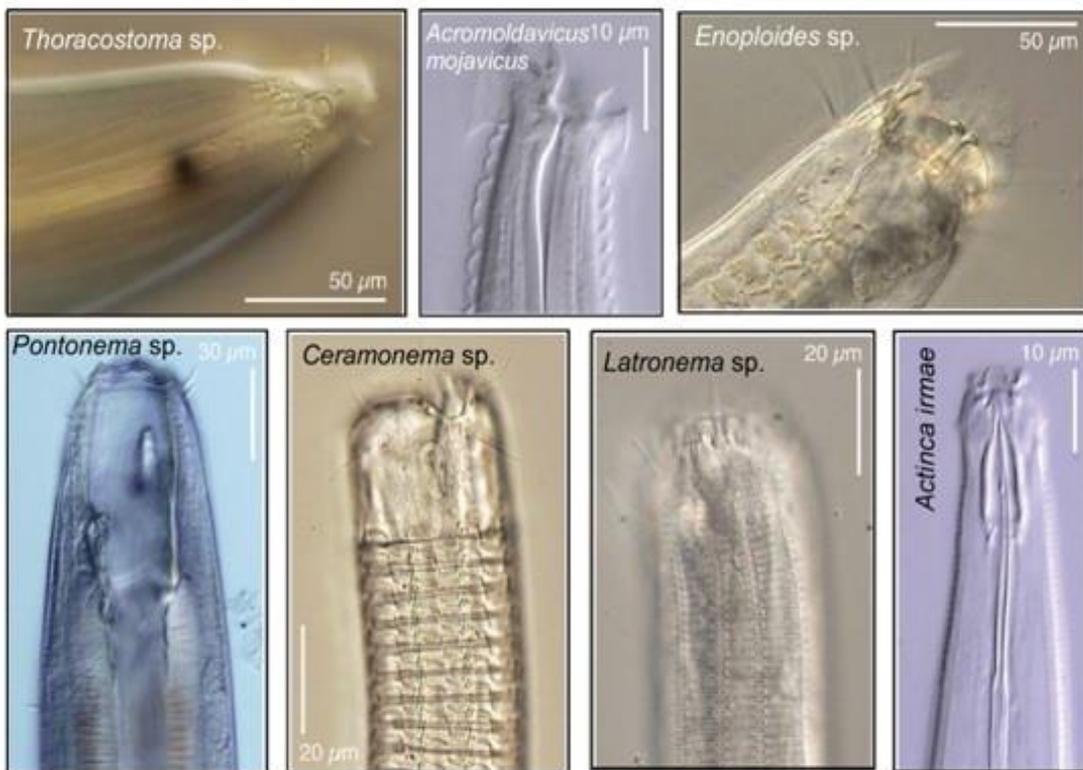


Figura 3. Morfologia da boca de nematoides. Exemplos de divergência na morfologia anterior de alguns nematoides de vida livre. Modificado de DELEY, 2006 (doi/10.1895/wormbook.1.41.1).

Nematoides são utilizados como modelo de pesquisa na área médica e biológica desde o século XIX por sua facilidade de obtenção ou cultivo em laboratório (SATZINGER, 2008). *Caenorhabditis elegans*, um nematoide da família Rhabditidae foi proposto em 1963 por Sidney Brenner como modelo de pesquisa sobre sistema nervoso e desenvolvimento (JORGENSEN e MANGO, 2002; NIGON e FÉLIX, 2017).

Além da fácil manutenção em laboratório *C. elegans* também possui um ciclo de vida curto, ovos translúcidos, e apresenta uma forma de resistência (dauer larva) capaz

de sobreviver por meses sem alimentação (BÜRGLIN, 1998). Atualmente *C. elegans* está sendo utilizada como modelo de estudos sobre câncer (KIRIENKO *et al.*, 2010) e longevidade (CHAUDHARI e KIPREOS, 2017). Também foi o primeiro metazoário a ter o seu genoma completamente sequenciado e anotado, mostrando a existência de quase 20.000 genes (KIM, 2001). Seu genoma mostrou similaridade com cerca de 74% do genoma humano mesmo sendo esses animais evolutivamente distantes (*C. elegans* Genome Sequencing Consortium, 1998).

Oscheius tipulae, outro nematoide de vida livre, foi usados em muitos trabalhos sobre genética de populações e genética do desenvolvimento da vulva (LOUVET-VALLÉE e cols., 2003; DICHTTEL-DANJOY e FÉLIX, 2004), tornando esse gênero um excelente modelo para compreensão da reprodução de nematoides parasitas de insetos (ALMENARA, 2013).

Nematoides fitoparasitas possuem características úteis para diagnósticos em campo por causarem doenças aparentes em raízes e galhas de plantas. Os principais gêneros que causam grandes perdas nas lavouras são *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Aphelenchoides* (VOVLAS *et al.*, 2005)

Estes estudos possibilitaram que outros nematoides tivessem sua biologia, hábitos de vida, parasitismo e resistência melhor compreendidos, podendo tornar-se possíveis modelos. O estudo de nematoides modelo pode ajudar na compreensão de fenômenos básicos comuns a todos os metazoários bem como entender os mecanismos de patogenicidade em nematoides parasitas causadores de doenças.

1.2 Gênero *Panagrolaimus*

O gênero *Panagrolaimus* foi estabelecido em 1930 por Fuchs. Espécies deste gênero são encontradas em diversas partes do mundo. Esses nematoides têm como principal característica serem extremófilos, ou seja, sobrevivem a condições extremas que seriam prejudiciais a maioria dos metazoários. Recentemente foram encontrados espécimes congelados de *Panagrolaimus detritophagus* em amostras de *permafrost* com 30-40.000 anos de idade que voltaram à vida quando retornados à temperatura ambiente (SHATILOVICH *et al.*, 2018). O gênero *Panagrolaimus* pertence à infraordem Panagrolaimomorpha, da qual são membros nematoides entomopatogênicos como *Steinernema* e parasitas de vertebrados como *Strongyloides* (**Figura 4**).

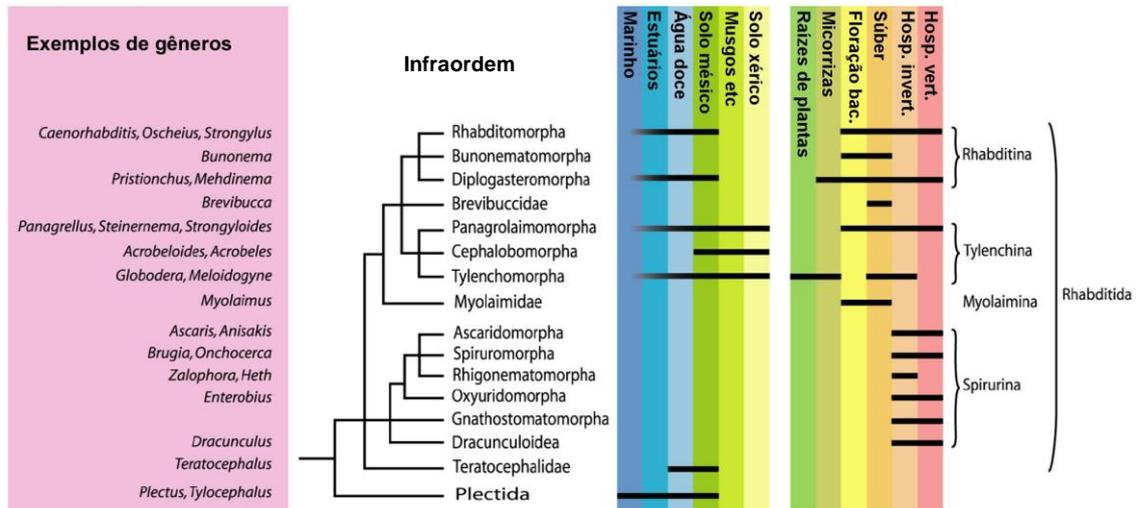


Figura 4. Filogenia dos Rhabditida. Resumo da filogenia da ordem Rhabditida com exemplos de taxa, localização ecológica e classificação superior. Figura extraída e modificada de http://www.wormbook.org/chapters/www_quicktourdiversity/nematfig3.jpg

Algumas espécies de *Panagrolaimus* podem ser dióicas, ou seja, possuir machos e fêmeas, apresentar hermafroditismo ou serem partenogênicas (LEWIS *et al.*, 2009). São bacterióvoros e seu ciclo de vida na natureza é desconhecido. Porém o ciclo *in vitro* de *Panagrolaimus rigidus* foi descrito e sua duração varia entre 9,5 e 13 dias (PAGANI e RICCI, 1997).

Tabela 1- Espécies e distribuição do gênero *Panagrolaimus*

Espécie	Distribuição
<i>P. detritophagus</i>	Solo agrícola, América do Norte, América do Sul e Europa
<i>P. hygrophilus</i>	Encontrado em tubérculos de <i>Nelumbium nucifera</i> .
<i>P. margarethae</i>	Em torno de arbustos no lado oeste de Morro Rock, Morro Bay, CA, EUA.
<i>P. paetzoldi</i>	Solo, Áustria, Alemanha e Holanda
<i>P. peruensis</i>	Em rizomas doentes de gengibre do Peru
<i>P. rigidus</i>	Material vegetal e flores mortas de crisântemo, <i>Gaillardia</i> sp. e <i>Zinnia</i> sp. no Sri Lanka
<i>P. subelongatus</i>	Romênia
<i>P. thienemanni</i>	Suriname
<i>P. leperisini</i>	Associado a sementes de capim na África do Sul
<i>P. subelongatus</i>	Plantação de abóboras na África do Sul

Espécie	Distribuição
<i>Panagrolaimus sp.</i>	Ilha de Ross na Antártida
DAW1	
<i>P. magnivulvatus</i>	África do Sul

Várias espécies de *Panagrolaimus* como *Panagrolaimus rigidus* isolado da superfície de musgos (PAGANI e RICCI, 1997) e *Panagrolaimus sp.* DAW1 (sin. *Panagrolaimus davidi*) isolado na ilha de Ross na Antártida (McGILL *et al.*, 2015) sobrevivem a condições de extrema falta d'água (**Figura 5**) e ao congelamento (RAYMOND e WHARTON, 2013). Após ser submetido a essas condições *P. sp.* DAW1 ainda é capaz de produzir progênie após a volta das condições ambientais normais, isto é um fenômeno raro entre os organismos extremófilos (THORNE *et al.*, 2017)

Algumas espécies de nematoides desse gênero também são encontradas em partes de plantas como a espécie *P. magnivulvatus* geralmente encontrada em raízes, folhas, caule, sementes de milho e grãos de arroz (PANCHBHAI *et al.* 1986) e *P. subelongatus* que pode estar associado com o cancro-do-corniso em caules jovens de *Cornus florida L.* uma espécie de abrunheiro-bravo (SANTAMOUR e McARDLE, 1987).

As espécies do gênero *Panagrolaimus* eram pouco estudadas até recentemente, mas devido ao seu hábito de vida extremófilo se tornaram importantes modelos de estudo para a compreensão dos mecanismos de resistência a ambientes extremos. No entanto pouco se sabe sobre sua biologia no ambiente natural. (MUSCHIOL e TRAUNSPURGER, 2007). Essas adaptações a ambientes com variações extremas de temperatura ou umidade são provavelmente filogeneticamente antigas (BURNELL e TUNNACLIFFE, 2011).

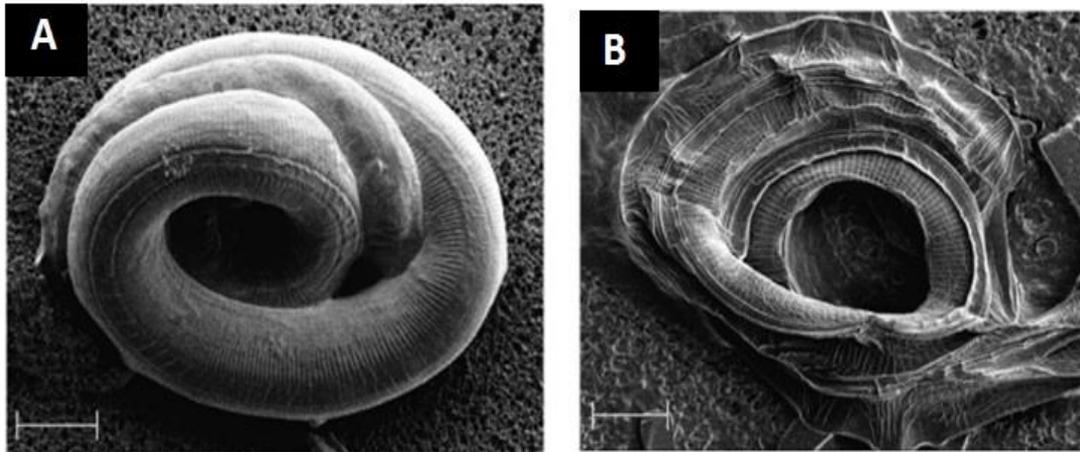


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de *Panagrolaimus superbis* dessecado(A) Dessecação sem pré-condicionamento, diretamente em sílica gel. Barras de escala, 15 µm **(B)** *Panagrolaimus* pré-condicionado por 72 horas antes de ser submetido a dessecação em sílica gel. Barras de escala, 15 µm. Adaptado de (SHANNON *et al*, 2005).

Nos experimentos de sobrevivência com *Panagrolaimus* sp. CEW2 realizados em nosso laboratório cerca de 98% das larvas resistiram a dessecação extrema com umidade relativa próxima de 0%. Larvas de CEW2 quando congeladas a -196°C apresentam cerca de 60% de sobrevivência. E tanto os vermes adultos quanto as larvas apresentaram uma sobrevivência média de 80% quando submetidos a estresse osmótico em soluções de até 500 mM de cloreto de sódio (COELHO, 2015). Também observamos que *Panagrolaimus* sp. CEW2 possuía uma grande quantidade de atividade proteolítica diferente de outros nematoides de vida livre estudados em nosso laboratório como *C. elegans* e *O. tipulae* (COELHO, 2015).

Recentemente foi utilizado em *Panagrolaimus* sp. DAW1 a técnica de qPCR para rastrear o aumento ou diminuição da expressão gênica de possíveis genes relacionados a tolerância a dessecação e congelamento. Foi mostrado que nos nematoides aclimatados a 5°C antes do congelamento ocorre um aumento na expressão dos genes relacionados à biossíntese de trealose (*tps-2a*, *tps-2b* e *gob-1*) e também do gene *lea-1* (late embryogenesis abundant protein) (SEYBOLD *et al.*, 2017). As proteínas LEA são particularmente interessantes pois estão envolvidas em animais e plantas com a redução da agregação de outras proteínas devido a dessecação ou choque osmótico, associados com baixas temperaturas (GOYAL *et al.*, 2005).

1.3 Proteases

O termo protease é sinônimo com o termo peptidase e descreve qualquer enzima

que hidrolise ligações peptídicas. Peptidases são divididas em **exopeptidases** que agem no ou próximo das pontas de uma cadeia polipeptídica e **endopeptidases** que agem internamente em cadeias polipeptídicas (IUBMB, 2015).

As exopeptidases agem somente próximo do fim das cadeias polipeptídicas, e as que agem no N-terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (**aminopeptidases**, EC 3.4.11), ou um dipeptídeo ou um tripeptídeo (**dipeptidil-peptidases** e **tripeptidil-peptidases**, EC 3.4.14). As exopeptidases que agem no C-terminal podem liberar um único resíduo de amino-ácido (**carboxipeptidases**, EC 3.4.16-18) ou um dipeptídeo (**peptidil-dipeptidases**, EC 3.4.15). As carboxipeptidases são colocadas em quatro grupos com base no mecanismo catalítico: as **serina carboxipeptidases** (EC 3.4.16), as **metalo-carboxipeptidases** (EC 3.4.17) e as **cisteína carboxipeptidases** (EC 3.4.18). Outras exopeptidases são específicas para dipeptídeos (**dipeptidases**, EC 3.4.13), ou removem resíduos terminais que são substituídos, cíclicos ou ligados por ligações isopeptídicas (ligações peptídicas diferentes daquela entre a α -carboxila de um aminoácido o grupo α -amino de outro) (**peptidases omega**, EC 3.4.19) (IUBMB, 2015).

O termo proteinase também pode ser usado para endopeptidases. As proteinases (endopeptidases) podem ser divididas em grupos, baseados no mecanismo de catálise: **serina endopeptidases** (EC 3.4.21), **cisteína endopeptidases** (EC 3.4.22), **aspártico endopeptidases** (EC 3.4.23), **metaloendopeptidases** (EC 3.4.24) e **treonina endopeptidases** (EC 3.4.25) (IUBMB, 2015).

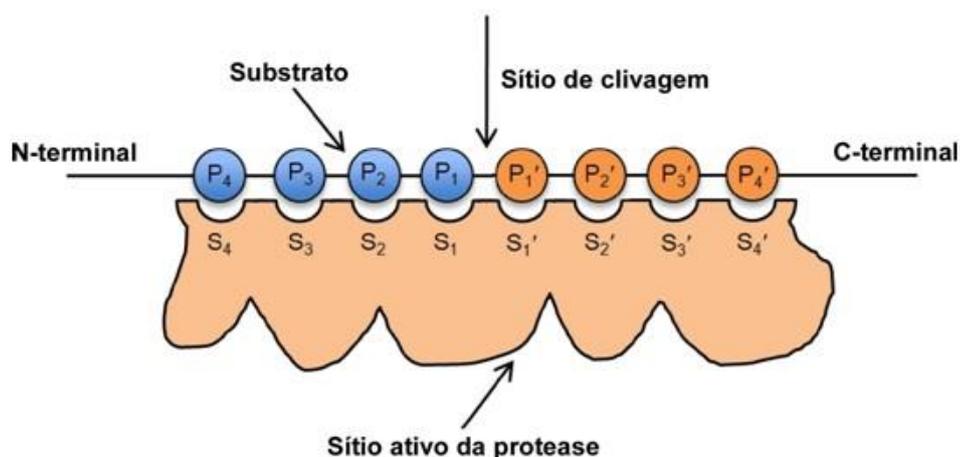


Figura 6. Nomenclatura da especificidade de substrato pela protease. Modificado de <https://prosper.erc.monash.edu.au/methodology.html>

O sítio catalítico de uma endopeptidase está delimitado em ambos os lados por

sub-sítios específicos, cada um capaz de aceitar a cadeia lateral de um resíduo de aminoácido do substrato. Este sítio é numerado a partir do resíduo catalítico como S_1 até S_n em direção ao lado N-terminal da estrutura e S'_1 até S'_n em direção ao lado C-terminal. Os resíduos do substrato que interagem com esses sub-sítios são denominados P_1 a P_n e P'_1 a P'_n (**Figura 6**).

Todas estas sub-subclasses de proteases compartilham a capacidade de catabolizar proteínas, porém elas variam em quase todos os outros parâmetros como tamanho, localização e estrutura quaternária. Por isso as proteases são agrupadas em famílias com base em seu mecanismo catalítico. Cisteína, serina e treonina proteases usam resíduos nucleofílicos do sítio ativo para hidrolizar as ligações peptídicas, enquanto aspártico e metaloproteases usam resíduos do sítio ativo para ativar moléculas de água que fazem o ataque nucleofílico (SANMAN e BOGYO, 2014). As principais proteases digestivas solúveis pertencem à sub-subclasse das endopeptidases (ou endoproteases) (BARRETT et al., 1998; IUBMB, 2015).

1.4 Proteases em Nematoides

As proteases encontradas em nematoides são bem conservadas em sequência de aminoácidos entre as diferentes espécies. Com os dados obtidos a partir do sequenciamento do genoma de vários nematoides parasitas e de vida livre, o número e a diversidade de proteases conhecidas estão se tornando cada vez maiores (BRITTON, 2013).

O estudo de enzimas digestivas em *C. elegans* tem sido realizado indiretamente através do uso de RNA de interferência e mutantes (MAEDA *et al.*, 2001; KAMATH *et al.*, 2003). Estes experimentos levaram à identificação de algumas proteases e substratos específicos, através de abordagens proteômicas e peptidômicas e buscas de genes homólogos ou com uma função semelhante em parasitas (RAWLINGS *et al.*, 2010). No entanto, esta abordagem carece de precisão, uma vez que muitas enzimas podem ser traduzidas e permanecer inativas até o momento de sua utilização e, portanto, medidas da quantidade de mRNAs intracelulares não refletem obrigatoriamente o nível de atividade das enzimas codificadas nestas moléculas (SANMAN e BOGYO, 2014). Poucas hidrolases digestivas foram bioquimicamente caracterizadas em nematoides, o que torna o processo de digestão de proteínas nestes Ecdisozoa praticamente desconhecido.

Algumas proteases encontradas no intestino de nematoides parasitas foram mais bem estudadas por estarem diretamente envolvidas com a patogenicidade destes vermes. As proteases aspárticas encontradas em nematoides parasitas como *Ancylostoma caninum* permitem a sua alimentação contínua de sangue no hospedeiro (WILLIAMSON *et al.*, 2002, 2003a). Enzimas digestivas usadas durante a infecção do hospedeiro pelo parasita podem ser alvos de vacinas ou drogas (McKERROW *et al.*, 2006).

Tabela 2- Classes de enzimas presente na digestão de sangue em nematoides parasitas

Espécie	Classe	pH ótimo	Função Putativa
<i>Necator americanus</i> <i>Ancylostomacanthum</i>	Catepsina D (Asp)	ácido	Digestão de Hemoglobina, soro e proteínas do tecido conjuntivo
<i>N. americanus</i>	Nemepsina (Asp)	5,0	Digestão de Hemoglobina e proteínas do soro
<i>A. caninum</i>	Catepsina B (Cys)	ácido	Digestão de Hemoglobina e proteínas do soro
<i>A. caninum</i>	Metalo- neprilisina	6-8	Degradação de tecido
<i>Haemonchus contortus</i>	Catepsina B (Cys)	ácido	Digestão de hemoglobina
<i>H. contortus</i>	Metalo- neprilisina B	6-8	Digestão de sangue
<i>H. contortus</i>	Catepsina B (Cys)	ácido	Digestão de sangue

As cisteína proteases digestivas tipo catepsina B biossintetizadas no intestino de *H. contortus* (REDMOND e KNOX, 2004) e *A. caninum* (LOUKAS *et al.*, 2004) foram consideradas como alvos para o desenvolvimento de vacinas. Vacinas produzidas a partir destas proteases induzem imunidade protetora, bloqueando a atividade das enzimas e interferindo no processo digestivo do parasita, levando-o à inanição (WILLIAMSON *et al.*, 2003).

As catepsinas L em nematoides parasitas também estão relacionadas com a digestão de nutrientes e estão presentes na muda, embriogênese, invasão dos tecidos e evasão da resposta imune (KOIWA *et al.*, 2000). Vários homólogos foram encontrados em *C. elegans* sugerindo que estas enzimas têm funções conservadas em espécies de nematoides de diferentes hábitos. (HASHMI *et al.*, 2002).

Algumas enzimas ajudam na migração e invasão do parasita no hospedeiro. Em *H. contortus*, foram observados que alguns tipos de cisteína proteases causam degradação de tecidos extracelular *in vitro* sugerindo que essas hidrolases ajudam o nematoide a penetrar na mucosa do trato digestivo (RHOADS *et al.*, 1997). Uma hialuronidase descrita em diversos parasitas como *A. caninum* (HOTEZ *et al.*, 1994) e *A. suum* (RHOADS, *et al.*, 2001) participa da invasão tecidual do hospedeiro. Essa enzima possui um pH ótimo mais ácidos (4-6) e facilita a migração através da pele, vasos sanguíneos, ceco, colón, pulmões etc.

Dados de expressão gênica de uma enzima da família das zinco metaloproteases neutras, neprilisinas (TURNER, 2003), expressa no intestino de *H. contortus* (Hc-MEP 1-4) e *A. caninum* (Ac-MEP-1) (REDMOND *et al.*, 1997; HOTEZ, 2002) mostram que estas enzimas podem estar envolvida na digestão de proteínas do sangue ou estão envolvidas na manutenção da homeostase intestinal. Em *C. elegans* uma enzima semelhante chamada NEP-22, pode estar envolvida na homeostase, motilidade e secreção no intestino (COUPAR, 1987).

Tabela 3- Possíveis papéis das proteases em nematoides (adaptado de BRITTON, 2013)

Família	Possível Papel
Neprilisina Aminopeptidase	Regulação da homeostase e a motilidade Processo de muda do estágio larval de L3 para L4 e possível enzima digestiva
Astacinas	Degradação de proteínas presentes no envoltório vitelínico ou camadas exteriores da casca de ovo
Serina Proteases	Envolvidas no processamento de colágeno cuticular
Aspártico proteases	Envolvidas na degradação da hemoglobina
Cisteína proteases	Envolvidas na degradação da hemoglobina (Catepsina G); papel no processo de muda (Catepsina L e Z); possível papel no sistema nervoso e envolvida na digestão (Catepsina F); remodelação da membrana, transdução de sinal e morte celular (Calpaina); apoptose durante o desenvolvimento da vulva (Caspase).

As metaloproteases secretadas pelas larvas de *S. stercoralis* mostraram ter um importante papel na penetração dos nematoides parasitas pelo tecido do hospedeiro

mamífero. Essas zincoendometalopectidase têm a capacidade de degradar as elastinas, glicoproteínas e colágenos na matriz celular (McKERROW *et al.*, 1990).

A protease aspártica ASP-1 de *C. elegans* é expressa e secretada para a luz do intestino de embriões tardios e larvas precoces (TCHEREPANOVA *et al.*, 2000). Em vermes do gênero *Ancylostoma* a protease aspártica APR-1 foi relacionada com a clivagem da hemoglobina humana na digestão dos vermes e sua recombinante tem sido usada em vacinas para cães, diminuindo a produção de ovos e a patogenicidade no hospedeiro (WILLIAMSON *et al.*, 2002).

Nos nematoides as aminopeptidases estão presentes em diversos processos e fases do desenvolvimento. Em *H. contortus* foi mostrado dentro do fluido entre as duas cutículas uma Leucina aminopeptidase sugerindo que esta enzima possui a capacidade de digerir a bainha cuticular durante a muda dos estádios larvais de (ROGERS, 1982). Também foi observada neste nematoide que a presença da enzima é um estímulo de eclosão e mudança na permeabilidade do ovo (ROGERS, 1982).

A maioria das enzimas encontradas em nematoides de vida livre localiza-se no tubo digestório e há poucas informações sobre o seu funcionamento. Em *C. elegans* foi mostrado que há regiões com diferentes pHs que variam durante o ciclo de bombeamento da faringe (**Figura 7**). O pH médio na luz da faringe varia entre 5,0 e 6,0. A partir daí, em direção ao lado posterior do tubo digestório o pH declina rapidamente no terço anterior do intestino e a partir do terço mediano o pH se estabiliza entre 3,5 e 4,0 (CHAUHAN *et al.*, 2013).

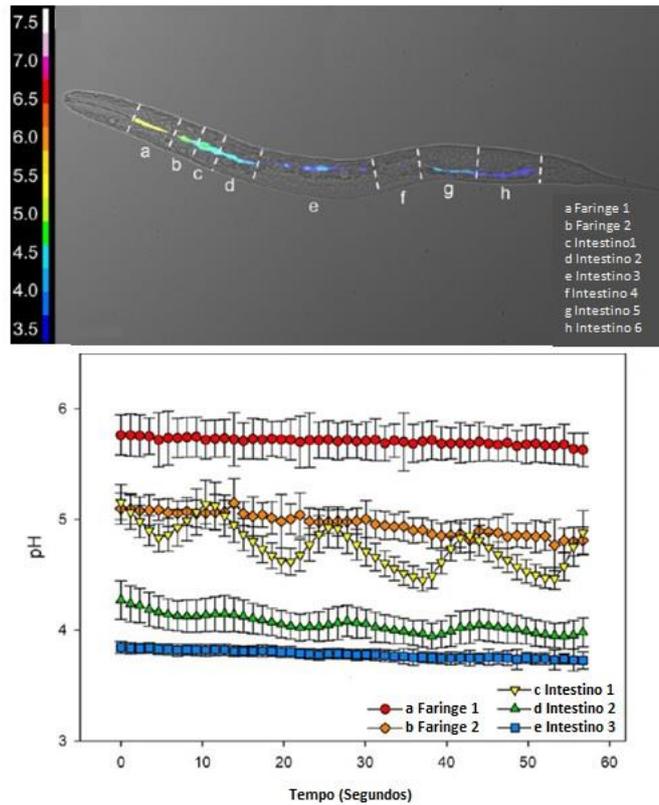


Figura 7. Variação do pH ao longo do tubo digestório de *C. elegans*. Adaptado de CHAUHAN et al, 2013.

Em *C. elegans* através de imunolocalização foi observada a presença de uma aminopeptidase na cavidade bucal, faringe, intestino anterior e reto sugerindo que ela seja uma enzima digestiva. Também foi observado que em mutantes nulos de *C. elegans* para essa enzima ocorria um desenvolvimento mais lento e um início tardio da postura dos ovos (ROGERS, 1982).

À medida que estes dados se tornam disponíveis, será possível determinar os papéis dessas proteases na adaptação, evolução e sobrevivência dos nematoides. Porém ainda há pouca informação sobre o papel e funcionamento delas em nematoides de vida livre.

2.Objetivos.

2.1 Objetivo Geral

O nosso objetivo principal neste projeto foi caracterizar preliminarmente algumas atividades proteolíticas com possível ação durante a digestão de *Panagrolaimus* sp. CEW2

2.2 Objetivos Específicos

1. Desenvolver um sistema de crescimento em massa de *Panagrolaimus* sp. CEW2.
2. Caracterização enzimática da atividade proteolítica total presente em extratos de CEW2.
3. Desenvolvimento de estratégia de inibidores dessas atividades proteolíticas que permitam estabelecer um protocolo padrão para purificação de proteínas a partir de homogeneizados de ovos, larvas e adultos de CEW2.

3. Material e Métodos.

3.1 Culturas de *Panagrolaimus sp.* CEW2

3.1.1 Cultura dos nematoides em meio sólido

A cultura de *Panagrolaimus sp.* CEW2 foi mantida de acordo com o método descrito para *Caenorhabditis elegans* (BRENNER, 1974). Os nematoides foram cultivados a 22 °C em placas de Petri com NGM [Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0; Colesterol 5µg/mL; Peptona 0,25% (m/v); Bacto-agar 2,5% (m/v); NaCl 102 mM; CaCl₂ 1 mM; MgSO₄ 1 mM], contendo pré-inoculo de *Escherichia coli* linhagem NA22, cedida pelo Dr. Thomas Blumenthal (University of Colorado, Boulder, CO).

3.1.2 Cultura dos nematoides em meio líquido (esponja)

A cultura líquida de *Panagrolaimus sp.* CEW2 foi feita em meio S [NaCl 102 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 3 mM, K₂HPO₄ 6,9 mM, KH₂PO₄ 53 mM, FeSO₄ 25 µM, MnCl₂ 10 µM, ZnSO₄ 10 µM, CuSO₄ 1 µM, EDTA 50 µM, Citrato de sódio 13 mM, Colesterol 5µg/mL] com esponja de poliuretano (Blaner Filterschaum 10 ppi, JBL GmbH&Co. KG, Neuhofen, Germany) e um pré-inoculo de 1,5g de *Escherichia coli* linhagem NA22. A cultura é feita a 22 °C sob agitação orbital a 75 rpm (diâmetro orbital 1,9 cm) por 7 dias em ShakerThermo MaxQ6000.

3.1.3 Cultura dos nematoides em lisado de hemácias

A cultura de *Panagrolaimus sp.* CEW2 foi feita em solução Alsever [dextrose 2,05% (m/v), citrato de sódio 0,8% (m/v), ácido cítrico 0,055% (m/v), Cloreto de sódio 0,42% (m/v)], colesterol 5µg/mL, Gentamicina 500 µg/mL e um inóculo de 300 µL/mL de lisado de hemácias. As hemácias foram lisadas em Cloreto de sódio 0,42% (m/v) e ácido cítrico 0,055% (m/v). O lisado foi submetido à centrifugação (centrífuga HettichMikro 200R, rotor 1195-A) a 10.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente e ao sobrenadante foi adicionada dextrose para final 2,05% (m/v) e citrato de sódio para final 0,8% (m/v). A cultura foi mantida a 22 °C sob leve agitação em um agitador basculante por 15 dias.

3.2 Isolamento de *Panagrolaimus sp.* CEW2 da cultura em lisado de hemácia com gradiente de Iodixanol

O gradiente, com volume final de 7,68 mL, foi feito com três camadas de diferentes concentrações de Iodixanol (Visipaque 320™, Sanofi) em PBS 1X. A

concentração da solução estoque de Visipaque é de 625 mg/mL de *Iodixanol*, numa solução isosmótica (~0,290 mOsm/g). Contendo, de acordo com o fabricante, Tris 4,7 mM, NaCl 19 mM, CaCl₂ 300 mM, EDTA 0,26 mM, pH 6,8-7,6.

Tabela4: Gradiente de Iodixanol

Camada	Iodixanol (%; m/v)	ρ (g/mL)	Visipaque 320™ (mL)	PBS (mL)
1	16,3	1,0880	0,64 mL	1,92 mL
2	21,6	1,1166	0,85 mL	1,71 mL
3	27,2	1,1469	1,07 mL	1,49 mL

Os vermes foram removidos da cultura com hemácias lisadas e centrifugados à temperatura ambiente, por 1 minuto a 1.000 g em rotor 1195-A numa centrífuga HettichMikro 200R.

O gradiente descontínuo de iodixanol foi construído da seguinte maneira. As diferentes soluções de iodixanol, foram adicionadas da concentração menor para a maior utilizando uma bomba peristáltica Pharmacia P-3 (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Suécia) a um fluxo de 3 mL/min. Os vermes foram colocados no topo do gradiente feito em um tubo Corex de 15 ml. Depois de aproximadamente 1 hora os vermes distribuídos em cada camada do gradiente foram coletados e lavados por centrifugação, como descrito acima, em PBS ou água destilada. Larvas foram retiradas das camadas 1 e 2 e os adultos retirados da camada 3.

3.3 Isolamento de *Panagrolaimus* sp. CEW2 da cultura em lisado de hemácia por magnetismo

Os vermes foram retirados direto da cultura de hemácias lisadas por uma bomba peristáltica Pharmacia P-3 (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Suécia) a um fluxo de 3 mL/min. Os nematoides passaram por dentro de um tubo de Tygon contendo um fio de aço. O tubo foi enrolado em volta de um ímã onde os nematoides ficaram presos. Após remoção do ímã, os vermes presos foram lavados com dois volumes de *PBS IX*.

3.4 Determinação do tempo de vida de *Panagrolaimus* sp. CEW2

Os nematoides foram cultivados a 22 °C em tampa de placa (Insero Transwell 24 poços 6,5 mm – Corning) em uma gota de 10 µL com meio NGG- [TPK (50 mM pH 6,0); Colesterol 5µg/mL; Gelzan (G1910 Sigma-Aldrich) 1% (m/v); CaCl₂ 1 mM; MgSO₄ 1 mM] e pré-inóculo de *Escherichia coli* linhagem NA22. Os vermes eram transferidos todos os dias para uma nova gota de NGG e acompanhados de L1 recém eclodidas até sua morte.

3.5 Homogeneização dos vermes e obtenção do extrato bruto de atividade

Os vermes retirados das placas de Petri foram lavados com água destilada e congelados em nitrogênio líquido. Os vermes congelados foram moídos em gral e ressuspensos em NaCl 100 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 1.500 g durante 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore (Merck Millipore – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) de 0,22 µm.

3.6 Dosagem de proteína

Proteínas totais nas amostras foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985). Foi utilizado o kit “BCA ProteinAssay kit” (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Para construção da curva padrão, foi utilizada uma solução de γ -globulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), cuja concentração foi determinada por absorvância a 280 nm, levando em conta a absorvância dessa proteína (TANFORD, 1961).

3.7 Ensaio com substratos proteicos

3.7.1 Soroalbumina Bovina (BSA)

O ensaio foi feito em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 a 37°C. Diferentes quantidades de homogeneizado de vermes foram incubadas com BSA (~47 mg/mL) por 3 horas. As reações foram terminadas com TCA para concentração final de 16,5% (v/v). As amostras foram centrifugadas (8000 g por 5 minutos) e o sobrenadante coletado. Os peptídeos solúveis em TCA, presentes no sobrenadante foram quantificados pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) modificado para neutralizar o ácido presente na solução. A solução C foi feita na hora misturando 50 partes de solução A (Na₂CO₃ 189 mM, NaOH 400 mM, tartarato de sódio e potássio 0,71 mM) e 1 parte de solução B (CuSO₄ 20 mM). Foram retirados 200 µL do sobrenadante e 1 mL de solução C foi

adicionado. Depois de 5 minutos, foram adicionados 100 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu não diluído. Após 30 minutos, a absorbância a 750 nm foi determinada para cada uma das amostras.

3.7.2 Azo-Albumina e Azo-caseína

O ensaio enzimático com azocaseína ou azoalbumina foi feito em tampão fosfato 100 mM pH 7 a 37°C. Diferentes quantidades de proteína do homogeneizado de vermes foram incubadas com 1,25% (m/v) de azo-caseína por até 1 hora. As reações foram paradas com TCA para concentração final de 7,5% (v/v). As amostras foram centrifugadas (8000 g por 5 minutos) e o sobrenadante coletado. NaOH foi adicionado ao sobrenadante da etapa anterior para concentração final de 500 mM e a absorbância a 440 nm determinada para cada uma das amostras.

3.7.3 Ensaio de atividade em meio sólido com caseína

O ensaio foi feito em placa de Petri com meio sólido contendo 1% (m/v) de Caseína e Agarose 1% (m/v) em tampão apropriado. Após a solidificação foram furados poços com 0,38 mm de diâmetro e o homogeneizado de CEW2 foi adicionado em cada poço. Essa operação foi repetida a cada 12 horas por 3 dias. As placas foram incubadas em diferentes condições de temperatura (22 °C, 27 °C, 37 °C, 45 °C) e pHs (MES 100 mM pH 6, HEPES 100 mM pH 7 e Tris 100 mM pH 8).

3.8 Ensaios com substratos sintéticos com p-nitroanilina como cromóforo

A p-nitroanilina liberada foi quantificada a 405nm usando um espectrofotômetro Beckman modelo DU640 assumindo um $\epsilon_{405nm} = 9.500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ou leitor de placa POLARstarOmega (BMG-Labtech).

3.8.1 Aminopeptidase

3.8.1.1 *L-Leucina-p-nitroanilida*

Substrato específico para leucina aminopeptidase (LAP), uma proteinase intracelular (SIEW *et al.*, 2013).

3.8.1.1.1 Teste de atividade enzimática por espectrofotometria

A reação foi feita em tampão Tris 100 mM pH 8,0, homogeneizado de vermes e 400 μ M de substrato num volume total de 300 μ L. A reação ocorreu a 37 °C por duas horas e foi parada com a adição de 500 μ L de etanol.

3.8.1.1.2 Determinação da temperatura ótima em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão Tris 100 mM pH 8,0, 2,83 μ g/ μ L de homogeneizado de vermes, 500 μ M de substrato e NaCl 50 mM e um volume total de 300 μ L. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas e as incubações em diferentes temperaturas a 25 °C, 27 °C e 37 °C.

3.8.1.1.3 Curva de substrato em leitor de placas em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão Tris 100 mM pH 8,0, 2,83 μ g/ μ L de homogeneizado de vermes, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (150 μ M, 300 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M e 1.500 μ M) em um volume total de 300 μ L. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas e incubação a 37 °C.

3.8.1.1.4 Curva de pH em leitor de placas

As reações para determinação do pH ótimo de reação foram realizadas nos seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão citrato-fosfato 400 mM. As reações continham NaCl 50 mM, 3,41 μ g/ μ L de extrato de CEW2 e 500 μ M de substrato. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.1.1.5 Teste de inibição em leitor de placas

Os testes de inibição enzimática foram realizados com os seguintes inibidores Bestatina 100 μ M e 250 μ M, E-64 10 μ M e 50 μ M, Leupeptina 20 μ M e 50 μ M, PMSF 1 mM e 5 mM, PHEN 1 mM e 10 mM. A reação continha tampão Tris pH 8,0, NaCl 50 mM, 2,91 μ g/ μ L de extrato de CEW2 e 500 μ M de substrato num volume final de 300 μ L. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.1.1.6 Teste de cátions metálicos em leitor de placas

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂ nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão Tris 100 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, extrato de CEW2 e 500 μ M de

substrato num volume final de 300 μL . As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.1.1.7 Teste de estabilidade enzimática em leitor de placas

O extrato do verme foi incubado por 1 hora em diferentes temperaturas 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C antes de ser adicionado à reação. As reações continham tampão Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM, 2,91 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de extrato de CEW2 e substrato 500 μM num volume final de 300 μL . As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.2 Tripsina

3.8.2.1 *BAPNA(N- α -Benzoil DL- arginina p-nitroanilida)*

A mistura de reação foi feita contendo Tris 100 mM pH 8,0, homogeneizado de CEW2 e 0,5 mM de substrato num volume total de 300 μL . A reação foi realizada a 37 °C por duas horas e parada com a adição de 500 μL de etanol.

3.8.3 Elastase

3.8.3.1 *N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida*

3.8.3.1.1 Teste de atividade enzimática por espectrofotometria

A reação foi feita em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,83 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de homogeneizado de CEW2 e 300 μM de substrato num volume total de 300 μL . A reação ocorreu a 37 °C por duas horas e foi parada com a adição de 500 μL de etanol.

3.8.3.1.2 Determinação da temperatura ótima em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de homogeneizado de CEW2, 300 μM de substrato e NaCl 50 mM e um volume total de 300 μL . As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas e as incubações em diferentes temperaturas a 27 °C, 37 °C e 45 °C.

3.8.3.1.3 Curva de substrato em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 µg/µL de homogeneizado de CEW2, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (150 µM, 300 µM, 500 µM e 1.000 µM) em um volume total de 300 µL. A incubação foi feita a 37 °C e as leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas.

3.8.3.1.4 Determinação do pH ótimo em leitor de placas

As reações para determinação do pH ótimo foram realizadas nos seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão citrato-fosfato 400 mM. As reações continham NaCl 50 mM, 2,86 µg/µL de extrato de CEW2 e 300 µM de substrato. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.1.5 Teste de inibição em leitor de placas

Os testes de inibição enzimática foram realizados com os seguintes inibidores Elastatinal 100 µM e 500 µM, E-64 100 µM e 500 µM, PMSF 100 µM e 500 µM, e 1 mM, PCMB 100 µM, APMSF 100 µM e 500 µM, EDTA 1 mM e 5 mM, EGTA 1 mM e 5 mM e PHEN 100 µM e 500 µM. A reação continha tampão HEPES pH 6,0, NaCl 50 mM, 2,86 µg/µL de extrato de verme e 300 µM de substrato num volume final de 300 µM. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.1.6 Teste de cátions metálicos em leitor de placas

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão HEPES 100 mM pH 7,6, NaCl 50 mM, 3,52 µg/µL de extrato de verme e 300 µM de substrato num volume final de 300 µM. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.2 *N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.*

3.8.3.2.1 Teste de atividade enzimática por espectrofotometria

A reação foi feita em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,83 µg/µL homogeneizado de CEW2 e 500 µM de substrato num volume total de 300 µL. A reação ocorreu a 37 °C por duas horas e foi parada com a adição de 500 µL de etanol.

3.8.3.2.2 Determinação da temperatura ótima em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 µg/µL de homogeneizado de CEW2, 500 µM de substrato e NaCl 50 mM e um volume total de 300 µL. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas e as incubações em diferentes temperaturas a 25 °C, 27 °C, 37 °C e 45 °C.

3.8.3.2.3 Curva de substrato em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 µg/µL de homogeneizado de CEW2, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (150 µM, 300 µM, 500 µM, 1.000 µM e 1.500 µM) em um volume total de 300 µL. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas de incubação a 37 °C.

3.8.3.2.4 Determinação do pH ótimo em leitor de placas

As reações para determinação do pH ótimo foram realizadas nos seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão citrato-fosfato 400 mM. As reações continham NaCl 50 mM, 2,86 µg/µL de extrato de CEW2 e 300 µM de substrato. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.2.5 Teste de inibição em leitor de placas

Os testes de inibição enzimática foram realizados com os seguintes inibidores Elastatinal 100 µM e 500 µM, E-64 100 µM e 500 µM, PMSF 100 µM e 500 µM, e 1 mM, PCMB 100 µM, APMSF 100 µM e 500 µM, EDTA 1 mM e 5 mM, EGTA 1 mM e 5 mM e PHEN 100 µM e 500 µM. A reação continha tampão HEPES pH 6,0, NaCl 50 mM, 2,86 µg/µL de extrato de CEW2 e 300 µM de substrato num volume final de 500 µM. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.2.6 Teste de cátions metálicos em leitor de placas

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão HEPES 100 mM pH 7,6, NaCl 50 mM, 3,52 µg/µL de extrato de CEW2 e 500 µM de substrato num volume final de 300 µM. As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.3 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida

3.8.3.3.1 Teste de atividade enzimática por espectrofotometria

A reação foi feita em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,83 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ homogeneizado de CEW2 e 500 μM de substrato e CaCl_2 50 mM em um volume total de 300 μL . A reação ocorreu a 37 °C por duas horas e foi parada com a adição de 500 μL de etanol.

3.8.3.3.2 Determinação da temperatura ótima em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de homogeneizado de CEW2, substrato 1.000 μM , NaCl 50 mM e CaCl_2 50 mM em um volume total de 300 μL . As leituras foram realizadas a cada 2 minutos por 2 horas e as incubações em diferentes temperaturas a 25 °C, 27 °C e 37 °C.

3.8.3.3.3 Curva de Substrato em leitor de placas

As reações foram feitas em tampão HEPES 100 mM pH 7,6, 2,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de homogeneizado de CEW2, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (150 μM , 500 μM , 1.000 μM e 1.500 μM) em um volume total de 300 μL . As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas e incubação a 37 °C.

3.8.3.3.4 Determinação do pH ótimo em leitor de placas

As reações para determinação do pH ótimo de reação foram realizadas nos seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão de citrato-fosfato 400 mM em diferentes proporções. As reações continham NaCl 50 mM, 2,86 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de extrato de CEW2, substrato 1.000 μM e CaCl_2 50 mM. As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.3.3.5 Teste de Cátions Metálicos em leitor de placas

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl_2 , MnCl_2 , MnSO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , MgSO_4 , ZnSO_4 , ZnCl_2 , nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão HEPES 100 mM pH 7,6, NaCl 50 mM, 3,52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de extrato de verme, 1.000 μM de substrato e CaCl_2 200 μM num volume final de 300 μM . As leituras foram realizadas a cada dois minutos por 2 horas a 37 °C.

3.8.4 Quimotripsina

3.8.4.1 SUPHEPA (*N-Succinyl -Phenylalanine- p-nitroanilide*)

A mistura de reação continha Tris 100 mM pH 8,0, homogeneizado de vermes e 1 mM de substrato num volume total de 300 μ L. A reação foi realizada a 37 °C por duas horas e parada com a adição de 500 μ L de etanol.

3.9 Ensaios com substratos sintéticos com Metilcumarina como fluoróforo

Para os testes foram utilizados um leitor de placa POLARstarOmega (BMG-Labtech) e a leitura foi feita com excitação no comprimento de onda de 360 nm e emissão de 450 nm.

3.9.1 Catepsina

3.9.1.1 Z-Arg-Arg-7-amido-4-Methylcoumarin-Hydrochloride

3.9.1.1.1 Teste de atividade enzimática

A reação foi feita em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0, homogeneizado de CEW2 em diferentes concentrações (0,423 μ g, 0,845 μ g e 6,9 μ g), substrato 20 μ M e NaCl 20 mM em um volume total de 300 μ L. A reação ocorreu a 28 °C por 30 min.

3.9.1.1.2 Determinação da temperatura ótima

As reações foram feitas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, 3,24 μ g/ μ L de homogeneizado de CEW2, substrato 30 μ M, NaCl 20 mM e DTT 1 mM e um volume total de 300 μ L. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora e as incubações em diferentes temperaturas a 25 °C, 37 °C e 45 °C.

3.9.1.1.3 Curva de substrato

As reações foram feitas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, 3,24 μ g/ μ L de homogeneizado de vermes, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, 35 μ M e 50 μ M) e DTT 1 mM em um volume total de 300 μ L. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora e a incubação foi feita a 37 °C.

3.9.1.1.4 Determinação do pH ótimo

As reações para determinação do pH ótimo de atividade foram realizadas nas seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão citrato-fosfato 400 mM em diferentes proporções. As reações continham NaCl 20 mM, 2,15 µg/µL de extrato de CEW2, substrato 30 µM e DTT 1 mM. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora a 37°C.

3.9.1.1.5 Teste de Inibição

Os testes de inibição enzimática foram realizados com os seguintes inibidores Antipaina 100 µM, 500 µM e 1 mM, Quimostatina 100 µM, 500 µM e 1 mM, E-64 10 µM, 100 µM e 500 µM, PHEN 10 µM, 100 µM e 500 µM, Leupeptina 10 µM, 50 µM e 100 µM, CA-074 10 µM, 50 µM e 100 µM e Pepstatina 10 µM, 50 µM e 100µM. A reação continha tampão acetato de sódio 100 pH 5,0, NaCl 50 mM, 2,15 µg/µL de extrato de CEW2 e 35 µM de substrato em um volume final de 300 µL. As leituras foram realizadas a cada 1 minutos por 1 hora a 37°C.

3.9.1.1.6 Teste de cátions metálicos

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão Acetato de sódio 100 mM pH 5,0, NaCl 50 mM, 4,21 µg/µL de extrato de verme, substrato 35 µM e DTT 1 mM em um volume final de 300 µM. As leituras foram realizadas a cada um minutos por 1 hora a 37 °C.

3.9.1.2 *Z-Phe-Arg-7-amido-4-Methylcoumarin Hydrochloride*

3.9.1.2.1 Teste de atividade enzimática

A reação foi feita em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,0, homogeneizado de CEW2 em diferentes concentrações (0,423 µg, 0,845 µg e 6,9 µg), substrato 20 µM e NaCl 20 mM em um volume total de 300 µL. A reação ocorreu a 28 °C por 30 min.

3.9.1.2.2 Determinação da temperatura ótima

As reações foram feitas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 mM, 3,24 µg/µL de homogeneizado de CEW2, substrato 40 µM e NaCl 20 mM em um volume total de 300 µL. As leituras foram realiza das a cada 1 minuto por 1 hora e as incubações em diferentes temperaturas a 25 °C, 37 °C e 45 °C.

3.9.1.2.3 Curva de substrato

As reações foram feitas em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, 3,24 µg/µL de homogeneizado de vermes, NaCl 50 mM com diferentes concentrações de substrato (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM) em um volume total de 300 µL. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora e a incubação foi feita a 37 °C.

3.9.1.2.4 Determinação do pH ótimo

As reações para determinação do pH ótimo de reação foram realizadas nos seguintes pHs: 3,0, 3,6, 4,0, 4,6, 5,0, 5,6, 6,0, 6,6, 7,0, 7,6 e 8,0 em tampão de contendo tampão citrato-fosfato 400 mM. As reações continham NaCl 20 mM, 2,15 µg/µL de extrato de CEW2, substrato 40 µM e DTT 1mM. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora a 37 °C.

3.9.1.2.5 Teste de inibição

Os testes de inibição enzimática foram realizados com os seguintes inibidores Antipaina 100 µM, 500 µM e 1 mM, Quimostatina 100 µM, 500 µM e 1 mM, E-64 10 µM, 100 µM e 500 µM, PHEN 10 µM, 100 µM e 500 µM, Leupeptina 10 µM, 50 µM e 100 µM, CA-74 10 µM, 50 µM e 100 µM e Pepstatina 10 µM, 50 µM e 100 µM. A reação continha tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, NaCl 50 mM, 2,15 µg/µL de extrato de CEW2 e substrato 40 µM em um volume final de 300 µM. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora a 37°C.

3.9.1.2.6 Teste de cátions metálicos

Os testes com cátions metálicos foram realizados com CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄, ZnSO₄, ZnCl₂, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM. As reações continham tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0, NaCl 50 mM, 4,21 µg/µL de extrato de CEW2 e substrato 40 µM em um volume final de 300 µL. As leituras foram realizadas a cada 1 minuto por 1 hora a 37 °C.

3.10 **Fracionamento por sulfato de amônio.**

Foi utilizada uma solução de sulfato de amônio (BREWER et al., 1974), saturada a 4 °C, pH 7,0 e ajustado com amônia 3,0 N. A solução de sulfato de amônio foi adicionada lentamente (3 mL/min), sob agitação, ao homogeneizado, a 4 °C. Após

24 horas, o precipitado foi separado por centrifugação (8000 g a 4 °C por 45 minutos) e ressuspensão em tampão Tris pH 8,0.

3.11 Diálise das frações

Após precipitação com sulfato de amônio, as proteínas solubilizadas em tampão Tris pH 8,0 foram submetida a diálise em um cassete para diálise Slide-A-Lyzer® 10K Dialysis Cassette (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos da América). O tampão da diálise foi trocado após 6 horas, e até que não foi possível detectar mais sulfato de amônio em teste visual com Cloreto de bário. Foram feitos cortes em 50%, 60% e 80% da saturação de sulfato de amônio e a atividade proteolítica foi dosada tanto no precipitado como no sobrenadante, após a diálise.

3.12 Fracionamento por Cromatografia.

As cromatografias e registros de absorvância das frações foram realizados em 280 nm, num equipamento ÄKTAprime™ plus (GE HealthCare Life Sciences), pelo software PrimeView™ (GE HealthCare Life Sciences). Os dados foram tabulados e analisados com o software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

3.12.1 Cromatografia de troca iônica.

Os extrato de CEW2 foram submetidos à cromatografia de troca iônica realizada em colunas Resource-Q (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Suécia) em tampão Tris 20 mM num fluxo de 0.5 mL/min. As proteínas adsorvidas à coluna foram eluídas em um gradiente linear de 0,1 a 1 M de NaCl em tampão de eluição (Tris 20 mM pH 8,0) em um fluxo de 0.5 mL/min.

3.12.2 Cromatografia de ExClusão.

As amostras foram submetidas à cromatografia de exClusão em colunas pré-montada Superdex 200 (16/600) (GE HealthCare Life Sciences). A corrida foi feita em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM em um fluxo 1 mL/min. Como padrão de massa molecular foram utilizados- Quimotripsinogênio A (25.000 Da); Ovoalbumina (43.000 Da); Albumina (67.000 Da); Aldolase (158.000 Da); Catalase (232.000 Da); Ferretina (440.000 Da); Tiroglobulina (669,000 Da). Para determinação do V_o foi utilizado Azul de Dextrana 2000.

3.13 SDS-PAGE

Todas as eletroforeses foram realizadas a 90 Volts por aproximadamente 3 horas em cuba SE250 MightySmall (Hoefer Inc., Holliston, Massachusetts, Estados Unidos da America) em gel de poliacrilamida com concentração total de monômeros (T) de 10% a temperatura de 25 °C em *tampão de corrida* para SDS-PAGE. Todas as proteínas foram dissolvidas em *tampão de amostra* (WINTER, 1992) e aquecidas a 100 °C durante 5 minutos, centrifugadas 10.000 x g por 1 minuto e aplicadas aos poços do gel de empilhamento. Após o término da eletroforese, para a detecção das proteínas separadas, os géis foram fixados durante 30 minutos com uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os géis fixados foram corados de acordo com o método de Schägger e Jagow (1987), com Coomassie Blue R-350 (PhastGel Blue; GE LifeSciences, Piscataway, New Jersey, Estados Unidos da América) 0,025% (p/v), dissolvido em metanol:ácidoacético:água (33:9:58; v/v/v) contendo CuSO₄ 4 mM, como descrito pelo fabricante. A descoloração foi realizada com ácido acético 1,2 M.

2.14 Lista de soluções

Tabela 5- Lista de Soluções

<i>Solução</i>	<i>Composição</i>
Meio NGMagar	CaCl ₂ 1 mM; MgSO ₄ 1 mM; TPK; Colesterol 5 µg /ml; Peptona 0,25% (m/v); Bacto-agar 2,5% (m/v); NaCl 51 mM
Meio S (cultura líquida nematoide)	NaCl 102 mM, CaCl ₂ 3 mM, MgSO ₄ 3mM, K ₂ HPO ₄ 6,9 mM, KH ₂ PO ₄ 53 mM, FeSO ₄ 25 µM, MnCl ₂ 10 µM, ZnSO ₄ 10 µM, CuSO ₄ 1 µM, EDTA 50 µM, Citrato de sódio 13 mM, Colesterol 5µg/mL
Meio LB (cultura bactéria)	Triptona 1% (m/v); Extrato de Levedura 0,5% (m/v); NaCl 170 mM
Meio LB Agar (cultura bactéria)	Triptona 1% (m/v); Extrato de Levedura 0,5% (m/v); NaCl 170 mM; Bacto-agar 2,5% (m/v)
Alsever	Dextrose 2,05% (m/v), Citrato de sódio 0,8% (m/v), Ácido cítrico 0,055% (m/v), Cloreto de sódio 0,42% (m/v)
PBS	Na ₂ HPO ₄ 16 mM, NaH ₂ PO ₄ 4 mM, NaCl 150 mM
Meio NGG	[TPK 50 mM pH 6,0; Colesterol 5µg/mL; Gellan 1% (m/v); CaCl ₂ 1 mM; MgSO ₄ 1 mM
TPK	Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0
Tampão pH 3	Ácido cítrico 200 mM 8,11 mL; Fosfato dissódico 400 mM 1,89 mL
Tampão pH 3,6	Ácido cítrico 200 mM 6,87 mL; Fosfato dissódico 400 mM 3,13 mL
Tampão pH 4	Ácido cítrico 200 mM 6,19 mL; Fosfato dissódico 400 mM 3,81 mL
Tampão pH 4,6	Ácido cítrico 200 mM 5,38 mL; Fosfato dissódico 400 mM 4,62 mL
Tampão pH 5	Ácido cítrico 200 mM 4,90 mL; Fosfato dissódico 400 mM 5,1 mL
Tampão pH 5,6	Ácido cítrico 200 mM 4,26 mL; Fosfato dissódico 400 mM 5,74 mL
Tampão pH 6	Ácido cítrico 200 mM 3,75 mL; Fosfato dissódico 400 mM 6,25 mL
Tampão pH 6,6	Ácido cítrico 200 mM 2,71 mL; Fosfato dissódico 400 mM 7,29 mL
Tampão pH 7	Ácido cítrico 200 mM 1,78 mL; Fosfato dissódico 400 mM 8,22 mL

Solução	Composição
<i>Tampão pH 7,6</i>	Ácido cítrico 200 mM 0,650 mL; Fosfato dissódico 400 mM 9,35 mL
<i>Tampão pH 8</i>	Ácido cítrico 200 mM 0,280 mL; Fosfato dissódico 400 mM 9,72 mL
<i>Tampão de amostra para SDS-PAGE</i>	Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; glicerol 20% (v/v); EDTA 0,5 mM, azul de bromofenol 0,0015% (v/v); DTT 62,4 mM ou 2-mercaptoetanol 2.5% (v/v) (Winter, 1992)
<i>Tampão de corrida para SDS-PAGE</i>	Tris 25 mM pH 8.3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (m/v)

4. Resultados.

4.1 Cultura e isolamento.

4.1.1 Desenvolvimento da cultura em massa de *Panagrolaimus* sp. CEW2.

Para realização dos experimentos descritos nesta tese tivemos que desenvolver um protocolo para o crescimento em massa de *Panagrolaimus* sp. CEW2. Os protocolos estabelecidos para cultura em massa de *C. elegans* (populações compostas quase exclusivamente de hermafroditas) não surtiram efeito com CEW2. Utilizamos uma suspensão da bactéria *Escherichia coli* em meio S, um meio líquido usado para o crescimento de *C. elegans*, porém com algumas modificações. Por CEW2 ser dióico, ou seja, possuir machos e fêmeas a cultura em agitador orbital a alta rotação como utilizada para *C. elegans* dificultaria o encontro dos machos com as fêmeas. Resolvemos esse problema adicionando um substrato sólido e permeável ao meio S+bactérias. Optamos assim por utilizar meio semi-sólido, composto de meio S+bactérias embebidas numa esponja de poliuretano. A incubação em meio semi-sólido foi realizada em agitador orbital em baixa rotação (75 rpm; diâmetro orbital de 1,9 cm) para manter as bactérias em suspensão. Testes realizados desta maneira, mas sem agitação levaram à morte de todos os vermes (resultados não apresentados). A comparação entre os resultados obtidos com meio semi-sólido e placas com meio sólido (NGM-ágar) está apresentada na **Figura 8**.

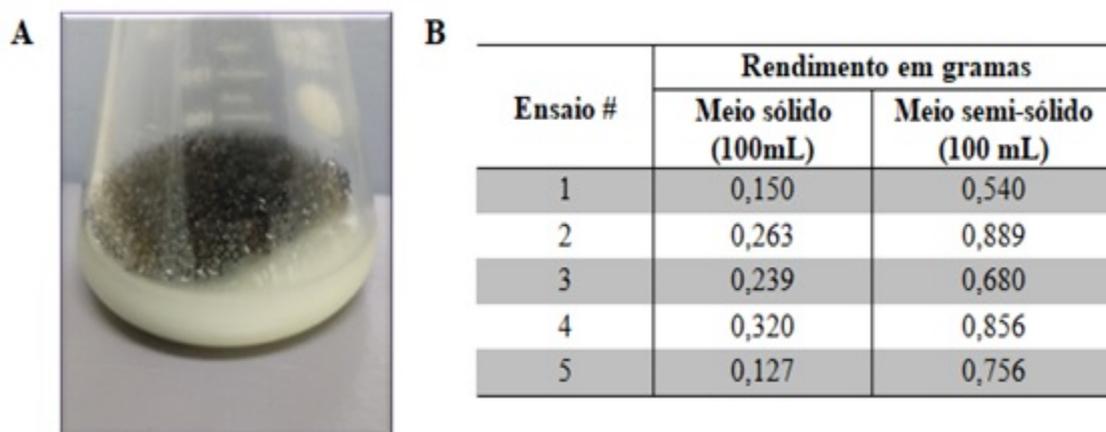


Figura 8. Cultura em massa de CEW2- A. A cultura em meio semi-sólido foi feita em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio S+bactérias e um pedaço de esponja de poliuretano. B. Rendimento da cultura em massa de *Panagrolaimus* sp. CEW2. A cultura em meio sólido foi realizada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio NGM-ágar, como descrito em Material e Métodos.

4.1.2 Cultura de *Panagrolaimus* sp. CEW2 em lisado de hemácias.

Encontramos em *Panagrolaimus* sp. CEW2 algumas possíveis enzimas presentes na cascata proteolítica responsável pela degradação de hemoglobina e por isso resolvemos desenvolver uma cultura utilizando hemácias como fonte de alimento para observarmos o comportamento de CEW2 visto que esse tipo de alimentação é observado em nematoides parasitas, mas não em nematoides de vida livre bacteriófagos como as espécies de *Panagrolaimus*.

A cultura foi preparada como descrito em Material e Métodos e após incubação dos vermes com antibiótico por 30 minutos para garantir a esterilidade, os nematoides foram inoculados na cultura contendo hemácias humanas não lisadas.

Após uma semana de incubação observamos que os nematoides não se desenvolviam, não havia mudança de estádios larvais, nem reprodução e postura de ovos. Em uma cultura utilizando bactérias como fonte de alimento essas mudanças são notadas a partir do terceiro dia de cultura. Além disso, observamos que o intestino de CEW2 permaneceu vazio (**Figura 9. A**) e notamos que as hemácias eram maiores que o diâmetro da abertura bucal de CEW2 e que os vermes morreram, provavelmente, por falta de alimentação.

Fizemos uma nova cultura do mesmo modo que a anterior, porém lisamos as hemácias antes de adicionarmos à cultura e observamos que após uma semana os vermes mostravam algumas precipitações escuras no intestino indicando que estavam se alimentando das hemácias lisadas **Figura 9.B**. Acreditamos que essas precipitações possam ser cristais de hemozoína que é um derivado do grupo heme observado em alguns organismos que utilizam hemoglobina como fonte de alimento (PISHCHANY e SKAAR, 2012).

O desenvolvimento de *Panagrolaimus* sp. CEW2 em cultura de hemácias lisadas mostrou um desenvolvimento mais lento que a cultura em meio líquido semi-sólido descrita acima e que a cultura em placa de Petri com meio NGM-agar e *E.coli* linhagem NA22 como fonte de alimento. Em ambas as culturas o desenvolvimento de CEW2 dura aproximadamente 15 dias e observamos que na cultura com hemácias lisadas o tempo de desenvolvimento do nematoide chega a triplicar. Fizemos os mesmos testes utilizando *C. elegans* como modelo e observamos que ele não sobreviveu em ambas às culturas, tanto com hemácias lisadas quanto com hemácias inteiras (dados não mostrados).

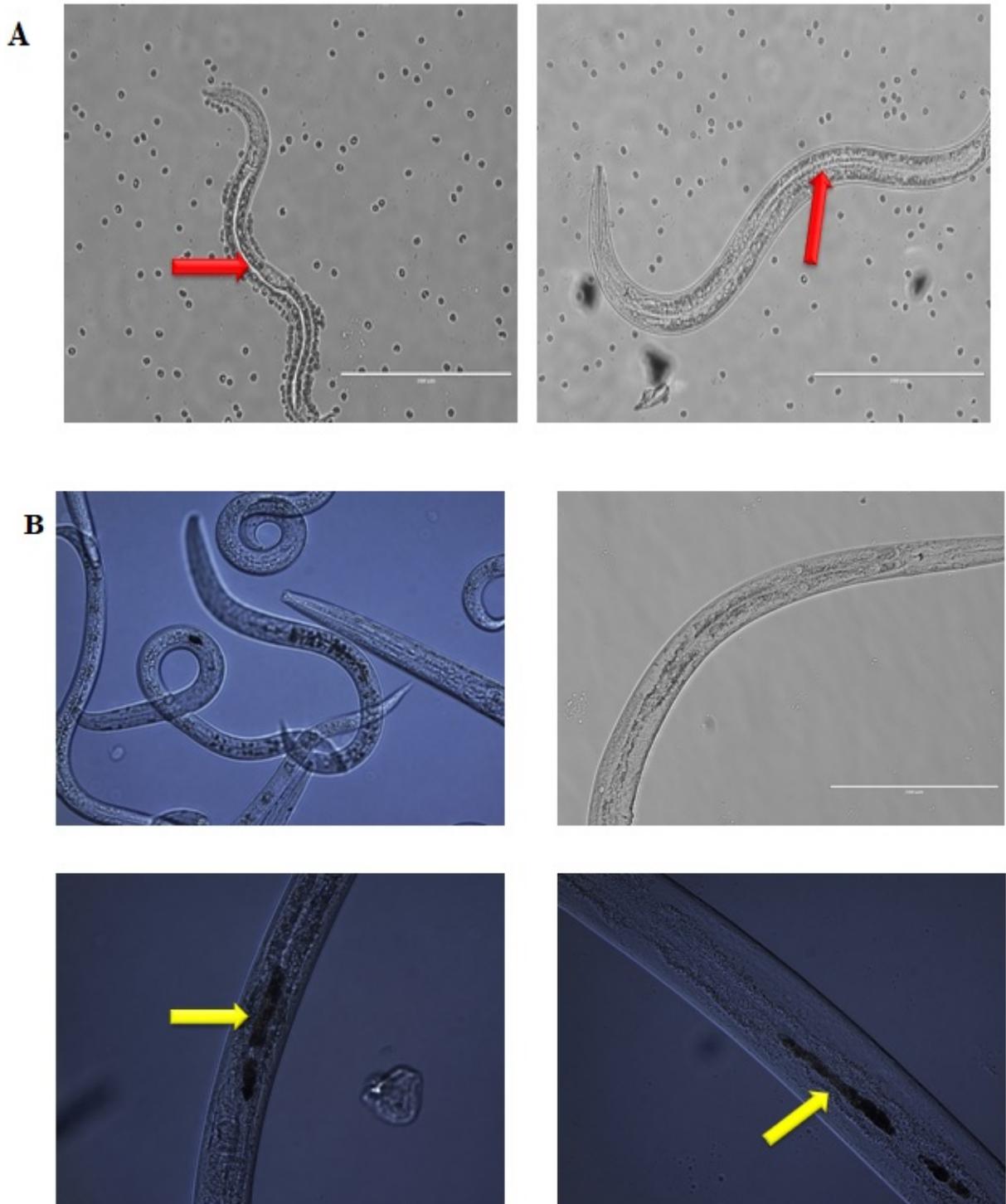


Figura 9. Cultura de CEW2 em hemácias humanas - A. Cultura feita com hemácias inteiras. As setas vermelhas indicam o intestino de CEW2 sem alimento e é possível observarmos que as hemácias inteiras são maiores que a abertura bucal de CEW2 impedindo que o nematoide se alimente. **B.** Cultura feita com hemácias lisadas. As setas amarelas indicam o tubo digestório dos vermes após alimentação com hemácias lisadas.

4.1.3 Isolamento de *Panagrolaimus* sp. CEW2 obtido em cultura com lisado de hemácias

Encontramos dificuldade em separar os nematoides da cultura feita com hemácias. Durante a cultura os vermes formam agregados com os restos das hemácias lisadas que são difíceis de separar por centrifugação e lavagens impedindo o uso dos nematoides nos experimentos. Adaptamos um método utilizando gradiente de Iodixanol e usamos separação magnética como desenvolvido para isolar as fases de desenvolvimento de *Plasmodium* spp. (RIBAUT, et. al. 2008).

4.1.3.1 *Isolamento de Panagrolaimus* sp. CEW2 utilizando gradiente de Iodixanol

Adaptamos um gradiente descontínuo, desenvolvido anteriormente (Coelho, 2015), para a separação dos nematoides da cultura em lisado de hemácias. **Figura 10.** Esse método permite analisar cada fase do desenvolvimento do verme.

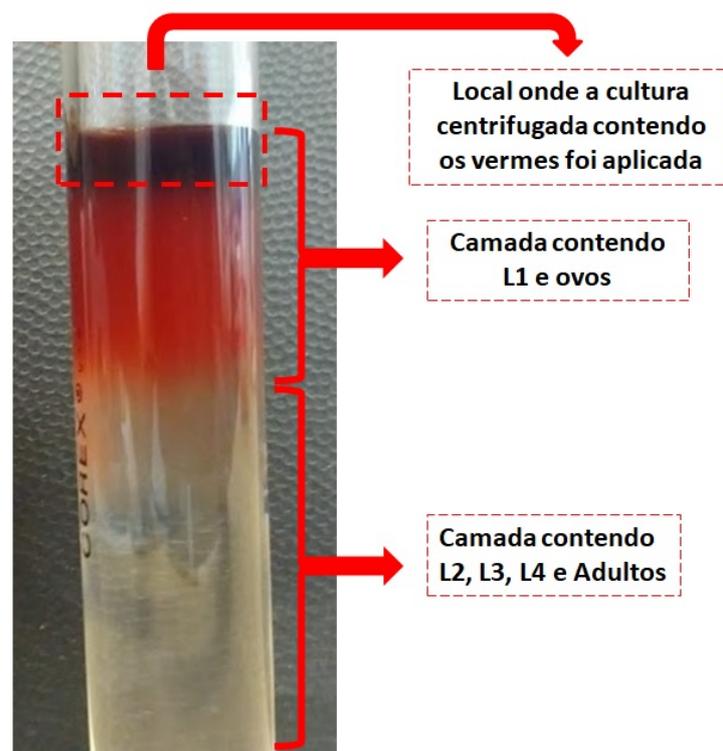


Figura 10- Isolamento de vermes em gradiente de Iodixanol- Nematoides obtidos por cultura em lisado de hemácias foram fracionados em gradiente descontínuo de Iodixanol. A foto mostra o resultado obtido 1h em repouso após a amostra inicial ser aplicada sobre a primeira camada do gradiente. O retângulo pontilhado mostra a região da segunda camada onde se encontram vermes L2, L3, L4 e adultos.

Montamos o gradiente como descrito em Material e Métodos e após concentração por centrifugação dos vermes e ovos obtidos em cultura, aplicamos a amostra no gradiente. Os estádios larvais mais velhos que larvas de primeiro estágio e os vermes adultos migram para as camadas de densidades maiores e por isso se separam dos agregados formados pelas hemácias lisadas. Conseguimos assim, separar os estádios larvais L2, L3, L4 e adultos, porém não conseguimos isolar L1 e ovos, pois eles são encontrados na primeira camada do gradiente onde aplicamos a amostra da cultura centrifugada.

4.1.3.2 *Isolamento de Panagrolaimus sp. CEW2 da cultura em lisado de hemácia por método magnético*

Como podemos observar na **Figura 9. B** os nematoides alimentados com hemácias lisadas mostram um precipitado dentro do intestino que acreditamos serem cristais de hemozoína. Produtos do catabolismo de heme, inclusive hemozoína, possuem propriedades magnéticas (BREN et al., 2015). Assim, adaptamos o método descrito para purificação de estágios do desenvolvimento de *Plasmodium* spp. (RIBAUT et al., 2008) por magnetismo para separar os nematoides obtidos em cultura de lisado de hemácias (**Figura 11. A**).

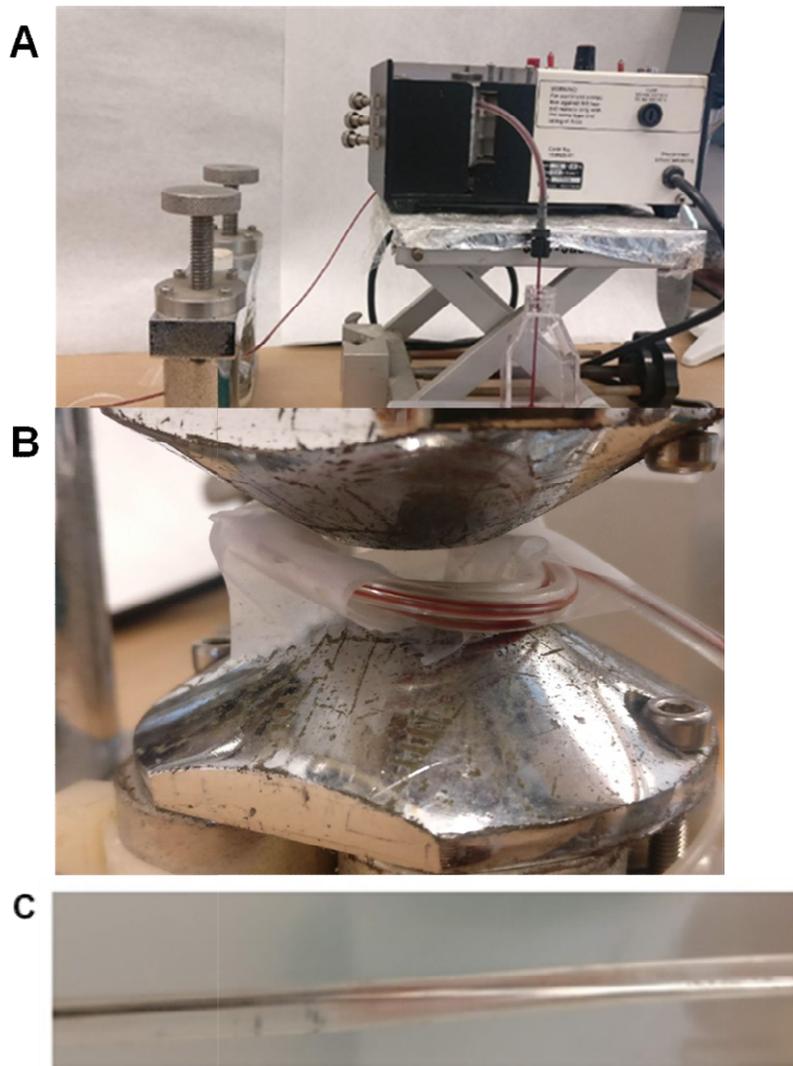


Figura 11. Isolamento por magnetismo de *Panagrolaimus* sp. CEW2 obtido por cultura em lisado de hemácias- A- Sistema de separação utilizando uma bomba peristáltica e um ímã. B- Ímã com CEW2 presos por magnetismo. C-Detalhe do tubo contendo vermes que ficaram presos por magnetismo, após lavagem com PBS 1X a 3 mL/min por 3,0 min.

Os vermes foram retirados da cultura por uma bomba peristáltica com um fluxo de 3 mL/minuto (**Figura 11. A**). Dentro do tubo de Tygon por onde a cultura passou havia um fio de aço em que os vermes ficaram presos quando passavam pelo ímã **Figura 11. B**.

Os vermes presos no ímã foram lavados com 2 volumes de PBS 1x sempre mantendo o fluxo de 3 mL/minuto. Deste modo os nematoides com propriedades magnéticas foram separados do meio de cultura de lisado de hemácias (**Figura 11. C**).

Esse método é mais simples que o descrito acima com gradiente de iodixanol, porém muitos vermes não aderem ao ímã e há uma perda dos ovos e de vermes com menor quantidade de precipitado no intestino.

4.2 Tempo de vida de *Panagrolaimus sp.* CEW2

Sabemos que o tempo de vida dos nematoides varia de acordo com as espécies. Para estabelecermos o tempo do ciclo de vida de CEW2 sincronizamos uma cultura e utilizamos as larvas recém eclodidas (L1) para este ensaio.

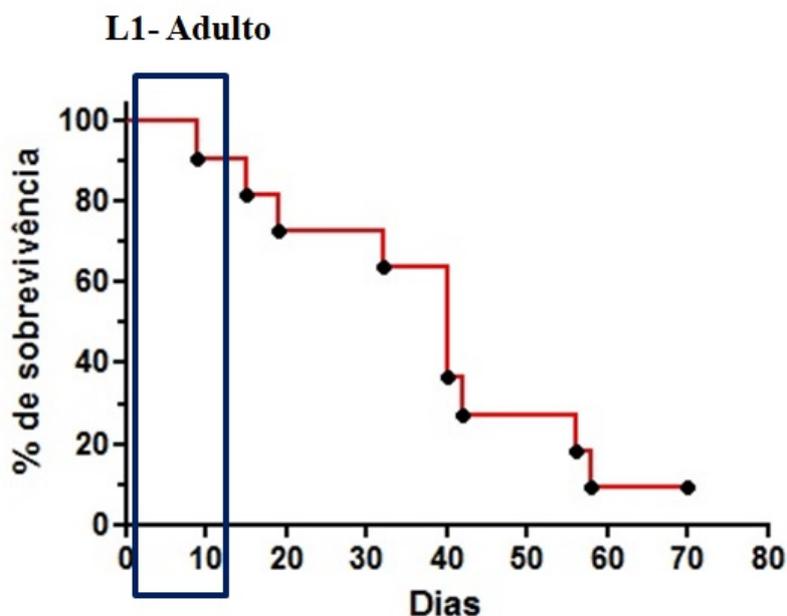


Figura 12- Tempo de vida de *Panagrolaimus sp.* CEW2. Utilizamos cerca de 20 indivíduos para esse ensaio do momento da eclosão até sua morte. O quadrado azul mostra o tempo de vida de CEW2 da fase L1 até a fase adulta.

As larvas foram separadas e colocadas cada uma em uma gota de meio de cultura feito com Gelzan e *E. coli* linhagem NA22 mantida a 22 °C como descrito em Material e Métodos. O número de vermes vivos restantes foi analisado todos os dias até a morte da última larva.

Observamos que *Panagrolaimus sp.* CEW2 tem um ciclo de vida em média de 16 dias desde a eclosão dos ovos até a forma adulta. Também observamos que os vermes após atingirem o estágio adulto vivem em média 40 dias, como mostrado na **Figura 12**. Porém alguns vermes adultos chegam a sobreviver por até 70 dias.

4.3 Análise das atividades proteolíticas em homogeneizados de CEW2

4.3.1 Seleção dos substratos proteicos

Testamos quatro tipos de substratos proteicos (BSA, Azo-Albumina, Azo-caseína e Caseína, Ovoalbumina e Tiroglobulina) para observar a presença de atividades proteolíticas no homogeneizado de CEW2.

Observamos que não houve atividade enzimática nos substratos proteicos de Azo-Albumina e Azo-caseína em solução, mesmo depois de aumentar a quantidade de enzima e substrato nas reações. Porém conseguimos observar atividade proteolítica sobre Soroalbumina Bovina (BSA) e Caseína como descrito abaixo.

Não foram observadas atividades proteolíticas do homogeneizado de CEW2 sobre Tiroglobulina e Ovoalbumina, após análise por SDS-PAGE.

4.3.1.1 *Atividade proteolítica sobre Soroalbumina Bovina (BSA)*

A amostra contendo o extrato total de CEW2 foi incubada com BSA como descrito em Material e Métodos. Após precipitação foi possível observar pequena atividade proteolítica do homogeneizado sobre BSA, como mostrado na curva de enzima (**Figura 13. A**). Se a proteólise gerasse só fragmentos grandes de BSA eles não seriam observados por esse método que depende da dosagem de peptídeos solúveis em TCA 10% (v. Material e Métodos).

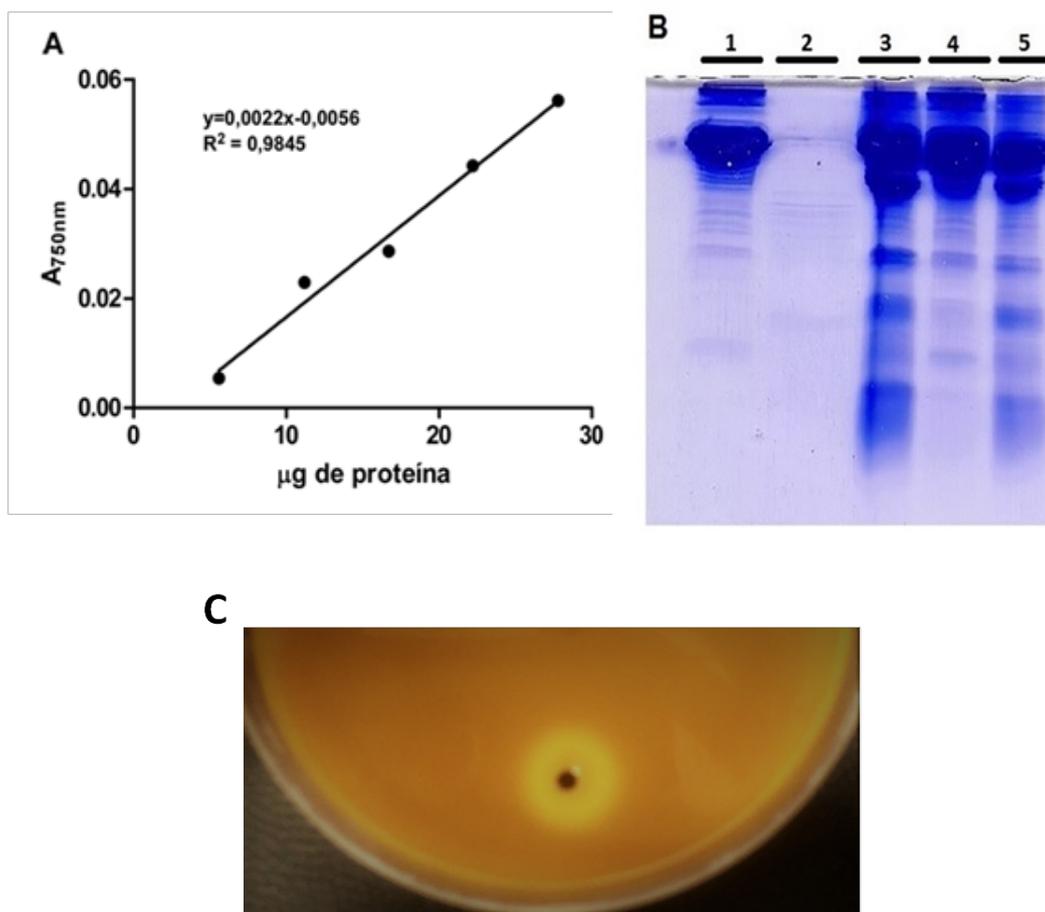


Figura 13. Atividade proteolítica de homogeneizado de CEW2 sobre BSA (soro-albumina bovina). (A) Curva de enzima da atividade proteolítica sobre 80 µg de albumina; o produto de hidrólise foi quantificado colorimetricamente pelo método de Lowry (1951) como descrito em Material e Métodos. As incubações ocorreram a 37 °C por 3h em tampão fosfato pH 7,0. (B) SDS-PAGE (T=10%) de BSA incubada com homogeneizado de CEW2: foram incubadas 12 mg de BSA com 1,4 mg de homogeneizado num volume final de 500 µL; amostras aplicadas no gel com 180 µg de BSA + 21 µg de homogeneizado: 1, branco de substrato; 2, branco de enzima; 3, incubação a 37 °C; 4, incubação a 25 °C; 5, incubação a 37°C com NaN₃ 0,1% (m/v). As incubações foram realizadas por 3h. (C) Atividade proteolítica observada em agarose contendo azo-albumina incubada por 3 dias a 37 °C.

Para melhor analisar a hidrólise de BSA pelo homogeneizado realizamos um SDS-PAGE após a incubação (**Figura 13. B**). A reação foi feita nas mesmas condições que a reação da atividade mostrada na **Figura 13. A**. O gel mostrou a hidrólise parcial da BSA pelo extrato total de CEW2 nos poços 3, 4 e 5. Também conseguimos observar após três dias de incubação a 37 °C uma zona de hidrólise (**Figura 13. C**) no ensaio em substrato sólido contendo azo-albumina, mostrando que a albumina pode ser hidrolisada pelo extrato total de CEW2.

4.3.1.2 Caseína

Os testes de atividade enzimática do extrato total utilizando caseína como substrato, foram realizados em agarose contendo caseína, como descrito em Material e Métodos e incubados em diferentes temperaturas por três dias.

Observamos zonas de hidrólise em Tris 100 mM, pH 7,0 nas temperaturas de 27 °C (B) e 37 °C (C) indicando atividade caseinolítica do homogeneizado de CEW2. Não observamos a mesma atividade em placas incubadas a 22 °C (A) ou a 45 °C (D), indicando que a caseinólise ocorre melhor nas temperaturas de 27 °C a 37 °C.

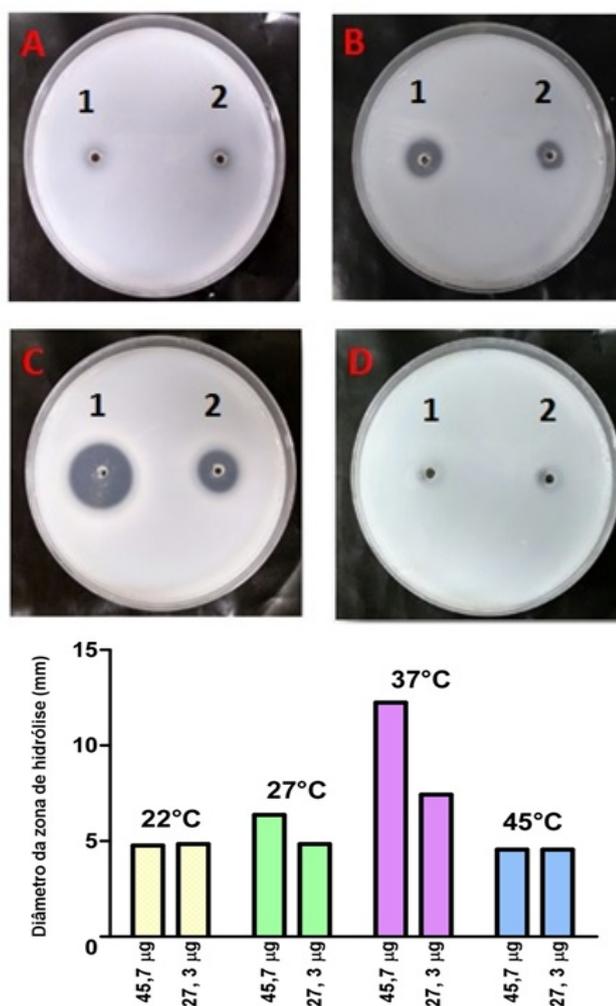


Figura 14. Atividade proteolítica de homogeneizado de CEW2 sobre caseína. Placas de Petri com agarose 1% contendo 1% (m/v) de caseína em Tris 100 mM pH 7,0. Placas foram incubadas em diferentes temperaturas por 3 dias a (A) 22 °C; (B) 27 °C; (C) 37 °C; (D) 45 °C. Os poços numerados com 1 continham 45,7 µg de proteína de homogeneizado e os numerados com 2 continham 27,3 µg de proteína.

Também testamos a atividade de hidrólise enzimática do homogeneizado de CEW2 em caseína em 3 pHs diferentes utilizando tampão MES 100 mM pH 6,0, tampão HEPES 100 mM pH 7,0 e em tampão Tris 100 mM pH 8,0 incubados a 37 °C.

A incubação feita em pH 6,0 (**Figura 15.A**) mostrou uma zona de hidrólise de 5,4 mm. Em pH 7,0 (**Figura 15.B**) a atividade caseinolítica foi maior e sua zona de hidrólise foi de 6,8 mm. Não observamos zona de hidrólise em pH 8,0 (**Figura 15.C**).

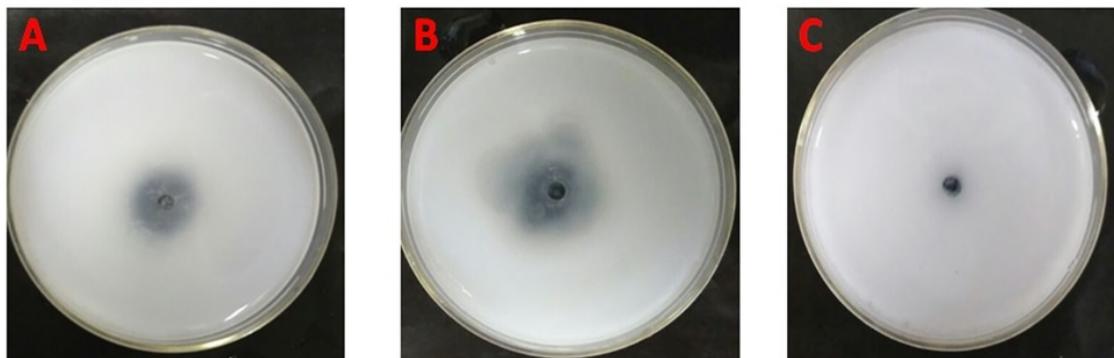


Figura 15. Zona de hidrólise da caseína em diferentes pHs. Foram aplicados 90 µg do homogeneizado de CEW2 em cada poço e o experimento foi realizada de acordo com o descrito em Material e Métodos. A incubação foi feita a 37 °C em tampão Mes 100 mM pH 6 (A), tampão Hepes 100 mM pH 7.0 (B) e em tampão Tris 100 mM pH 8.0 (C).

4.3.2 Seleção dos substratos sintéticos

Selecionamos alguns substratos sintéticos seletivos para algumas classes de peptidases, como Quimotripsina, Tripsina, Aminopeptidase, Elastase e Catepsinas. Essas enzimas são abundantes no reino animal e possuem atividade significativa em vários nematoides (BRITTON, 2013). Algumas dessas atividades foram encontradas em extrato total de CEW2 e serão descritas a seguir.

4.3.2.1 Atividade proteolítica do extrato total de *Panagrolaimos sp* CEW2

4.3.2.2 *Tripsina*

4.3.2.2.1 BAPNA (*N*- α -Benzoil *DL*- arginina *p*-nitroanilida)

BAPNA é um substrato seletivo para serina-peptidases do tipo tripsina. Encontramos uma baixíssima atividade proteolítica da enzima do tipo tripsina em CEW2 no experimento realizado como descrito em Material e Métodos.

Mesmo variando a concentração do substrato (150 μ M, 300 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M e 1.500 μ M), mudando as condições de pH (6,0 a 8,0), temperatura de incubação (25 °C, 30 °C e 37 °C) e o tempo de reação, não encontramos um sinal proteolítico suficiente que indicasse a presença deste tipo de atividade em CEW2.

4.3.2.3 *Amino peptidase*

4.3.2.3.1 LPA (L-Leucina-*p*-nitroanilida)

L-Leucina-*p*-nitroanilida é um substrato para a determinação colorimétrica de leucina-amino peptidases (LAPs). Incubamos o homogeneizado de CEW2 com o substrato para LAP como descrito em Material e Métodos. Observamos que houve sinal proteolítico alto mesmo quando incubado com uma baixa concentração do homogeneizado de CEW2 (**Figura 16**).

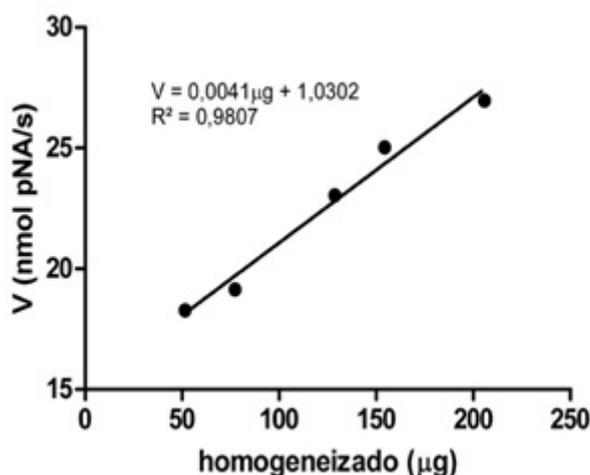


Figura 16. Atividade proteolítica sobre L-Leucina-*p*-nitroanilida- Curva de enzima do homogeneizado. O produto (*p*-nitroanilina, pNA) foi quantificado a 405 nm, como descrito em Material e Métodos. A incubação ocorreu a 37 °C por 2h em tampão Tris pH 8,0 e a leitura foi realizada em espectrofotômetro após a reação ser terminada pela adição de etanol. pNA = para-nitroanilina.

Testamos algumas temperaturas para determinarmos qual temperatura é a ideal para o funcionamento da enzima. O equipamento utilizado para medir a temperatura vai de 25 °C a 45 °C. Seleccionamos 3 temperaturas, 25 °C pois é a temperatura mais próxima da qual os nematoide são mantidos, 27 °C e 37 °C com base nos resultados mostrados na incubação do homogeneizado com a caseína em diferentes temperaturas apresentados acima.

Como esperado, a medida que aumentamos a temperatura a velocidade de reação aumenta. Os resultados obtidos mostram que a velocidade de reação mais alta ocorre a 37 °C. A 25 °C e 27 °C as velocidades de hidrólise são menores (**Tabela 6**).

Tabela 6. Hidrólise de L-Leucina-p-nitroanilida em três diferentes temperaturas

Temperatura	$\mu A_{405nm} \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$
25 °C	$1,05 \times 10^{-3}$
27 °C	$2,30 \times 10^{-3}$
37 °C	$4,54 \times 10^{-3}$

Atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 sobre o substrato, em diferentes temperaturas.

Testamos a concentração de substrato ideal para o funcionamento da enzima entre 150 μM e 1.500 μM de substrato. A reação foi feita em tampão Tris pH 8.0 100 mM e a incubação a 37 °C.

Observamos que há um aumento da atividade hidrolítica com as concentrações de substrato entre 150 μM e 300 μM chegando no maximo da hidrólise em 500 μM e caindo a atividade hidrolítica em 1.000 μM e 1.500 μM como mostrado na **Figura17**.

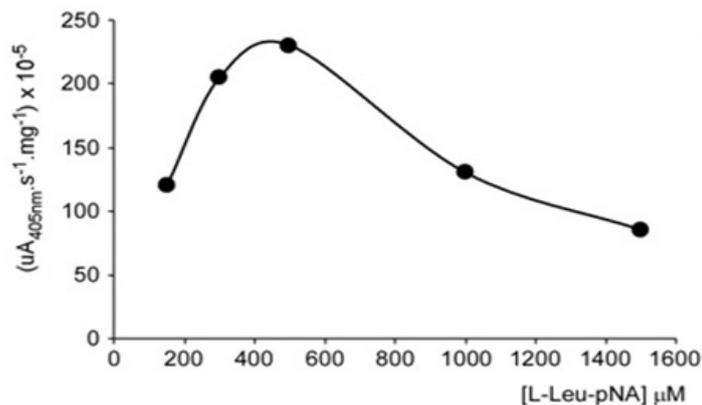


Figura 17. Curva de L-Leucina-p-nitroanilida– Atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 (2,34 μg proteína/ μL) incubado em diferentes concentrações de substrato, em tampão Tris-HCl pH 8.0 por duas horas a 37 °C.

Para determinarmos qual o pH ideal para a enzima foram realizados ensaios em pHs entre 3,0 e 8,0 em tampão universal citrato-fosfato como descrito em Material e Métodos. Os dados de pHs 3,0-5,6 não puderam ser obtidos pois houve precipitação de proteínas do homogeneizado de CEW2 nessas condições.

A faixa de atividade onde não houve precipitação do homogeneizado que vai entre os pHs 6.0 a 8.0 (**Figura 18**), mostrou que o ótimo de atividade proteolítica ocorre em pH 7 com um pequeno “ombro” em pH 7,6.

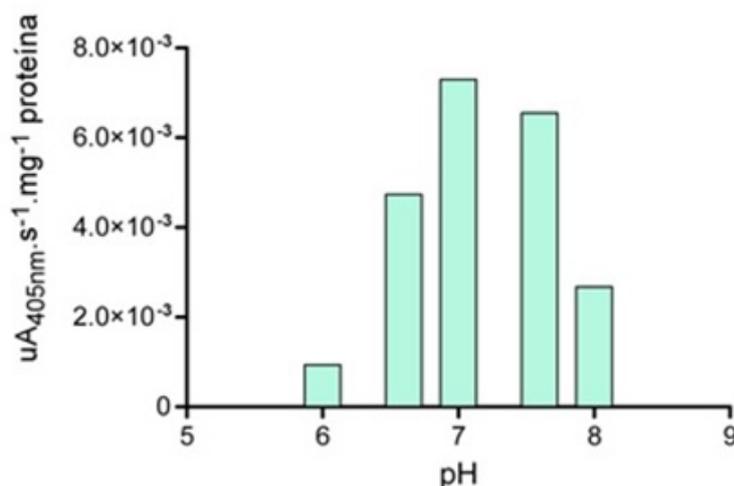


Figura 18. pH ótimo de atividade sobre L-Leucina-p-nitroanilida– Atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 (2,34 μg proteína/ μL) incubado em diferentes pH em tampão universal Citrato-fosfato por duas horas a 37 °C.

Testamos alguns inibidores específicos para aminopeptidases descritos na literatura para confirmar a presença desta enzima no homogeneizado de CEW2. As concentrações escolhidas foram baseadas na quantidade máxima utilizada para a inibição da enzima purificada (v. **Anexo I**).

Observamos um efeito inibitório da atividade da enzima com dois inibidores esperados para aminopeptidase. Bestatina, um inibidor para leucil-/cisteinil-aminopeptidases, mostrou uma inibição de 58% da atividade (**Tabela 7**). PHEN um quelante de cátions metálicos inibiu 65% da atividade. Também notamos que alguns inibidores de protease como E-64, inibidor de cisteína proteases e PMSF inibidor de serina protease apresentaram um efeito de ativação da atividade enzimática presente no extrato total.

Tabela 7. Efeito dos inibidores de proteases na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 sobre L-Leucina-p-nitroanilida

Inibidores	Atividade Residual (%)
Bestatina 100 μM	48,28
Bestatina 250 μM	42,07
E-64 10 μM	122,41
E-64 50 μM	116,09
Leupeptina 20 μM	70,69
Leupeptina 50 μM	97,70
PMSF 1 mM	111,49
PMSF 5 mM	121,26
PHEN 1 mM	42,07
PHEN 10 mM	34,66

Bestatina e PHEN foram os dois inibidores selecionados que melhor inibiram a atividade enzimática presente no extrato total de CEW2.

Testamos os possíveis efeitos de alguns cátions metálicos sobre a hidrólise de LPA pela enzima presente no extrato total de CEW2. Os cátions metálicos foram adicionados à mistura de reação contendo tampão Tris 50 mM pH 7.6 e a leitura das atividades enzimáticas mostradas na **Tabela 8** foram feitas por duas horas a 37 °C.

Tabela 8. Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 sobre L-leucina p-nitroanilida para aminopeptidase.

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
CuSO ₄	20,21	16,82
CoCl ₂	28,02	32,50
MnCl ₂	33,65	42,60
MnSO ₄	41,51	44,84
CaCl ₂	39,27	42,60
MgCl ₂	39,27	44,84
MgSO ₄	61,46	58,33
ZnSO ₄	0	0
ZnCl ₂	0	0

Observamos que todos os cátions metálicos utilizados nas reações causaram algum efeito inibitório na atividade enzimática. Tanto o Sulfato de Zinco quanto o Cloreto de Zinco causaram uma inibição de 100% da atividade enzimática nas duas molaridades utilizadas nos testes. A menor porcentagem de inibição foi observada na reação contendo sulfato de magnésio em ambas as molaridades utilizadas nas reações ficaram em torno dos 40% de inibição.

Testamos a estabilidade da enzima presente no extrato total quando incubado em diferentes temperaturas 20 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C por 1 hora antes de ser adicionado a reação contendo Tris 50 mM pH 8,0 e LPA. As leituras mostradas na **Tabela 9** foram feitas por duas horas a 37 °C.

Observamos que os extratos incubados tanto a 20 °C quanto a 30 °C se mostraram estáveis na reação e apresentaram a mesma atividade enzimática. O extrato incubado a 40°C mostrou uma redução de 60% da atividade enzimática e o extrato incubado a 50 °C não mostrou nenhuma atividade enzimática.

Tabela 9- Estabilidade da atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 sobre L-Leu-p-nitroanilida (LPA).

Temperatura	$\text{uA}_{405\text{nm}} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
20 °C	$2,15 \times 10^{-3}$
30 °C	$2,15 \times 10^{-3}$
40 °C	$8,61 \times 10^{-4}$
50 °C	0

O homogeneizado foi incubado por 1h em diferentes temperaturas antes de ser realizado o ensaio.

4.3.2.4 Elastase

4.3.2.4.1 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida

N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida é um substrato desenvolvido para detectar atividade enzimática considerada como Elastase.

Incubamos o substrato com o homogeneizado de CEW2. A reação ocorreu a 37 °C por 2h em tampão HEPES pH 7,6 e a leitura foi realizada em espectrofotômetro e quantificado a 405 nm. A reação foi terminada pela adição de etanol. Observamos um alto sinal de hidrólise (**Figura 19.**) pelo homogeneizado de CEW2.

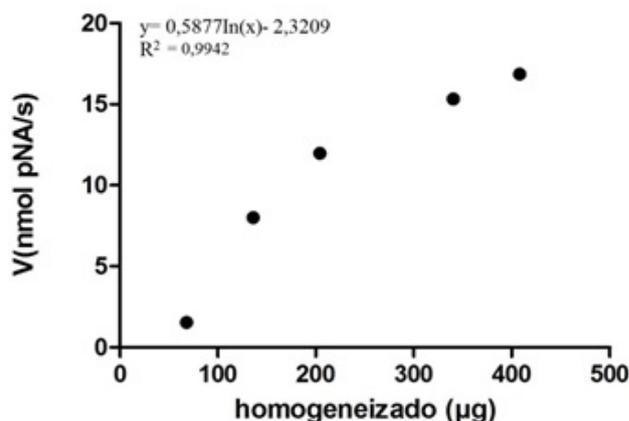


Figura 19. Análise da atividade enzimática sobre *N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida*. Curva de enzima. O produto (p-nitroanilina, pNA) foi quantificado a 405 nm, como descrito em Material e Métodos.

Incubamos em vários pHs diferentes em tampão citrato-fosfato, como descrito em Material e Métodos. O homogeneizado de CEW2 também apresentou precipitação

de proteínas entre pHs 3,0 e 5,0 e por isso não foi possível medir se houve atividade proteolítica nesta faixa. Nos pHs em que não houve precipitação (5,6 a 8,0) podemos observar (**Figura 20**) que pH 7,0 é o pH ideal para a reação de hidrólise desse substrato.

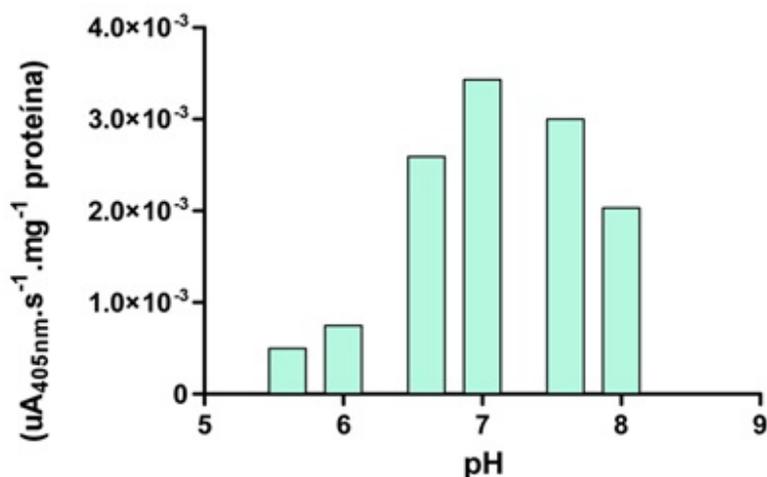


Figura 20. Curva de pH sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida.

Os ensaios de temperatura feitos para esse substrato são mostrados na **Tabela 10**. Conseguimos observar uma atividade proteolítica baixa na reação incubada a 27 °C e na reação incubada a 37 °C podemos observar o triplo de atividade da reação e nenhuma atividade hidrolítica é observada na reação incubada a 45 °C.

Tabela 10- Hidrólise em diferentes temperaturas da enzima de CEW2 sobre o substrato para elastase Suc-AAPL-pNA

Temperatura	uA _{405nm} .S ⁻¹ .g ⁻¹
27 °C	2,99x10 ⁻⁵
37 °C	7,32x10 ⁻⁵
45 °C	0

Depois de testar concentrações de substrato entre 150 e 1000 μM concluímos que a melhor concentração é de 300 μM (**Figura 21**).

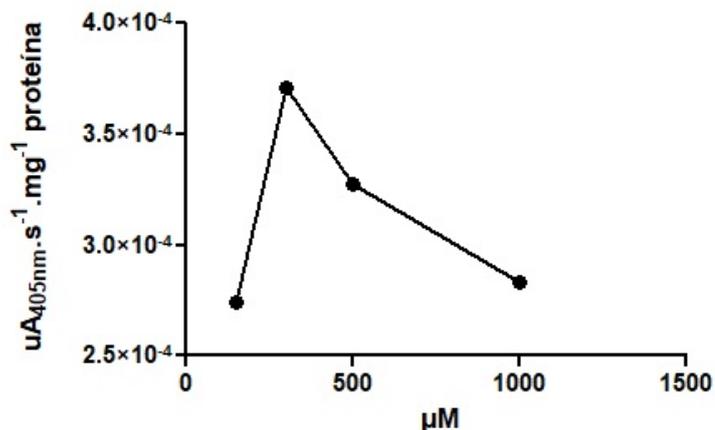


Figura 21. Hidrólise do substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida por homogeneizado de CEW2 em diferentes concentrações de substrato.

Testamos os possíveis efeitos dos cátions metálicos na reação contendo a enzima presente no extrato total de CEW2 que hidrolisa o substrato de elastase Suc-AAPL-pNA.

Observamos que todos os cátions metálicos utilizados nos ensaios inibiram a atividade hidrolítica da enzima. A menor inibição observada foi da reação contendo Cloreto de Zinco, onde a concentração de 0,5 mM inibiu cerca de 7,8% da atividade enzimática. A maior inibição da hidrólise do substrato observada nos ensaios foi a que continha 1 mM de Sulfato de magnésio inibindo 75% da atividade hidrolítica.

Tabela 11- Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 no substrato Suc-AAPL-pNA para Elastase

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
CuSO ₄	79,54	52,42
CoCl ₂	88,58	81,35
MnCl ₂	77,73	37,96
MnSO ₄	72,34	50,62
CaCl ₂	83,15	65,08
MgCl ₂	74,12	70,50

Cátion	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
MgSO ₄	79,54	74,69
ZnSO ₄	84,97	72,31
ZnCL ₂	92,2	81,35

Testamos alguns inibidores específicos e não específicos descritos na literatura para confirmar se haveria alguma inibição da atividade hidrolítica sobre Suc-AAPL-pNA. As concentrações escolhidas foram com base na quantidade máxima encontrada na literatura utilizada para a inibição da enzima purificada.

Utilizamos os inibidores II (MeOSuc-AAPA-CMK) e III (MeOSuc-AAPV-CMK) de elastase (POWERS et al., 1977; NAVIA et al., 1989) que são específicos para a elastase de neutrófilo. Notamos visualmente que havia atividade por causa da liberação da p-nitroanilina, porém não conseguimos dosar essa atividade, pois ela estava abaixo do nível de detecção do equipamento. Assim, consideramos que nessas concentrações utilizadas a atividade foi completamente inibida.

Observamos que elastatinal inibidor irreversível e específico para elastase na concentração de 500 µM inibiu em 56% a atividade da enzima. Outros dois inibidores E-64 e PHEN inespecíficos para esta enzima apresentaram inibição de metade da atividade proteolítica com 500 µM de concentração. Dos inibidores testados o único que inibiu atividade proteolítica da enzima em 100% foi o PCMB inibidor de cisteína proteases na concentração de 100 µM.

Tabela 12-Efeito dos inibidores de protease no homogeneizado de CEW2 em Suc-AAPL-pNA.

Inibidores	Atividade Residual (%)
Inibidor II	0
Inibidor III	0
Elastatinal 100 µM	83
Elastatinal 500 µM	44
E-64 100 µM	72

Inibidores	Atividade Residual (%)
E-64 500 μ M	39
PMSF 100 μ M	94
PMSF 500 μ M	89
PMSF 1 mM	67
PCMB 100 μ M	0
APMSF 100 μ M	72
APMSF 500 μ M	67
EDTA 1 mM	94
EDTA 5 mM	83
EGTA 1 mM	72
EGTA 5 mM	67
PHEN 100 μ M	61
PHEN 500 μ M	50

4.3.2.4.2 N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

Este é outro substrato seletivo para Elastase. O ensaio para testar se haveria atividade hidrolítica sobre este substrato foi feito como descrito em Material e Métodos. Este substrato apresentou hidrólise pelo homogeneizado de CEW2 como mostra o gráfico da **Figura 22**. A incubação ocorreu a 37 °C por 2h em tampão HEPES pH 7,6. A leitura foi realizada em espectrofotômetro após a reação ser terminada pela adição de etanol.

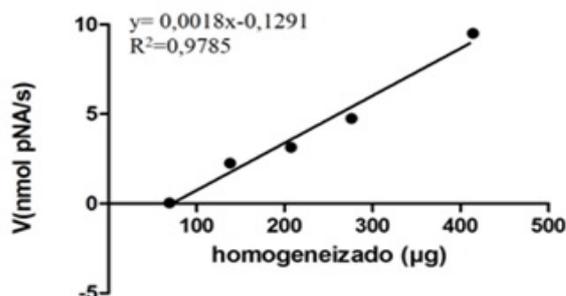


Figura 22. Atividade enzimática sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida. Curva de enzima. O produto (p-nitroanilina, pNA) foi quantificado em 405 nm, como descrito em Material e Métodos

Também testamos a atividade enzimática em pHs de 6,0 a 8,0 em tampão citrato-fosfato. O resultado do experimento (**Figura 23**) mostrou que acima de pH 7,0 a atividade sobre este substrato praticamente não se altera.

Outros experimentos utilizando tampões diferentes nos mesmos pHs mostraram o mesmo perfil de atividade, possivelmente indicando a presença de diferentes enzimas com pHs ótimos diferentes ou uma enzima com grande amplitude de atividade em pHs alcalinos.

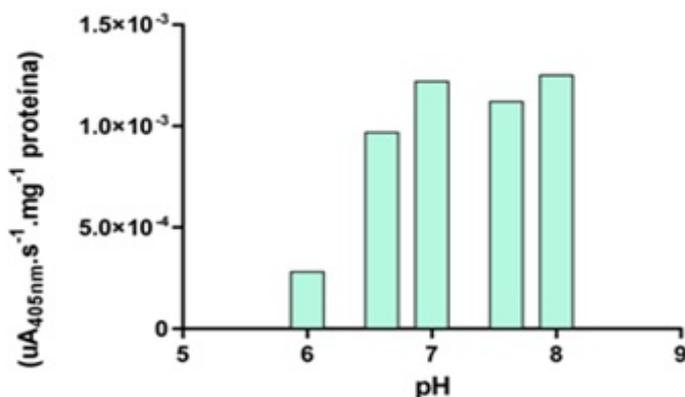


Figura 23. Curva de pH sobre N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida A incubação dos diferentes pHs ocorreu a 37 °C por 2h em tampão citrato-fosfato como descrito em Material e Métodos.

Nos testes de atividade enzimática em temperaturas diferentes não notamos atividade a 25 °C e a 45 °C. A partir de 27 °C (**Tabela 13**) começamos a ver uma baixa atividade enzimática. A 37 °C foi observada a maior velocidade de hidrólise do substrato.

Tabela 13- Hidrólise de N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

Temperatura	uA _{405nm} .S ⁻¹ .g ⁻¹
25 °C	0
27 °C	1,66x10 ⁻⁵
37 °C	8,63x10 ⁻⁴
45 °C	0

Hidrólise do substrato de elastase pelo homogeneizado de CEW2 em diferentes temperaturas.

A curva de substrato foi obtida como descrito em Material e Métodos com as concentrações entre 150 μM e 1.500 μM de Suc-AAPF-pNA (Figura 24). A concentração em que observamos a maior velocidade de hidrólise do substrato de Suc-AAPF-pNA é de 500 μM , a partir desta concentração a atividade enzimática começa a diminuir.

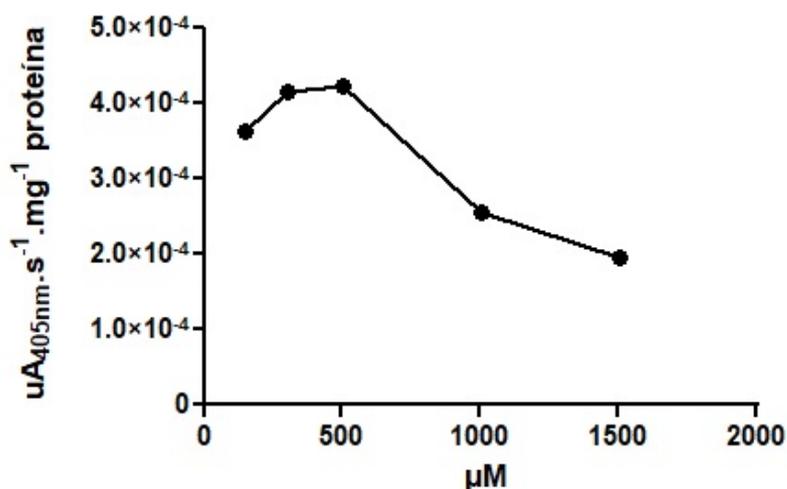


Figura 24- Curva de substrato- Hidrólise do substrato de elastase N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida pelo homogeneizado de CEW2 em diferentes pH.

Analizamos os efeitos inibitórios dos cátions metálicos no substrato Suc-AAPF-pNA para elastase. Observamos que houve inibição por todos os cátions metálicos utilizados nos ensaios (Tabela 14). Dos cátions metálicos selecionados para os ensaios sulfato de cobre, sulfato de zinco e cloreto de zinco inibiram totalmente a atividade hidrolítica da enzima nas duas concentrações testadas. Apenas sulfato de magnésio na concentração de 0,5 mM não apresentou inibição da hidrólise do substrato.

Tabela 14- Efeito dos cátions metálicos na atividade da elastase presente no extrato total de CEW2 no substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida.

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
CuSO ₄	0	0
CoCl ₂	12,90	15,05

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
MnCl ₂	95,7	73,12
MnSO ₄	91,40	86,02
CaCl ₂	94,62	83,17
MgCl ₂	75,27	78,5
MgSO ₄	100	67,74
ZnSO ₄	0	0
ZnCl ₂	0	0

Testamos alguns inibidores de proteases específicos para elastase. Utilizamos inibidor II e III (ver ítem anterior) e elastatinal para os experimentos nas concentrações 100 μ M e 500 μ M. Os inibidores II e III apresentaram o mesmo comportamento visto na atividade sobre o outro substrato de elastase descrito acima (Suc-AAPL-pNA). Observamos que houve uma atividade hidrolítica do substrato por conta da liberação de pNA colorimétrico amarelo, porém a atividade não foi alta o suficiente para ser detectada pelo equipamento. Consideramos que houve inibição completa da atividade.

Observamos que elastatinal nas duas concentrações não mostrou muita diferença na porcentagem de inibição. Elastatinal 100 μ M inibiu 50% da atividade enzimática no substrato Suc-AAPF-pNA enquanto a concentração maior de 500 μ M inibiu 60% da atividade hidrolítica da enzima.

PCMB foi o inibidor não específico com melhor porcentagem de inibição, na concentração de 500 μ M, ele inibiu 70% da atividade proteolítica da enzima no substrato. APMSF, EDTA e EGTA apresentaram a menor porcentagem de inibição e em algumas concentrações mostraram uma ativação da atividade enzimática.

Outros três inibidores não específicos para elastase utilizados neste ensaio mostraram uma inibição de parte da atividade proteolítica da enzima. PHEN um inibidor de metaloprotease apresentou uma porcentagem de inibição de 40% na concentração de 500 μ M, PMSF um inibidor de Serina proteínase na concentração de 1 mM inibiu 60% da atividade proteolítica e E-64 um inibidor de Cisteína peptidase inibiu 50% da atividade proteolítica da enzima em 50 μ M de concentração.

Tabela 15-Efeito dos inibidores de protease na atividade da elastase presente no extrato total de CEW2 no substrato Suc-AAPF-pNA

Inibidores	Atividade Residual (%)
Inibidor II	0
Inibidor III	0
Elastatinal 100 μ M	50
Elastatinal 500 μ M	40
E-64 100 μ M	60
E-64 500 μ M	50
PMSF 100 μ M	90
PMSF 500 μ M	80
PMSF 1 mM	40
PCMB 100 μ M	60
PCMB 500 μ M	30
APMSF 100 μ M	130
APMSF 500 μ M	80
EDTA 1 mM	70
EDTA 5 mM	110
EGTA 1 mM	100
EGTA 5 mM	110
PHEN 100 μ M	70
PHEN 500 μ M	60

4.3.2.4.3 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida

O substrato *N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida* é seletivo para serina proteases do tipo Elastase. Incubamos a 37 °C o substrato com o homogeneizado de CEW2 em tampão Tris 100 mM pH 8.0 e não observamos nenhuma atividade proteolítica nessas condições.

Repetimos o experimento substituindo apenas o tampão anterior por HEPES 100 mM pH 7,6 e adicionando cloreto de cálcio 50 mM. Após subtrairmos os brancos observamos um sinal proteolítico mostrado na **Figura 25**.

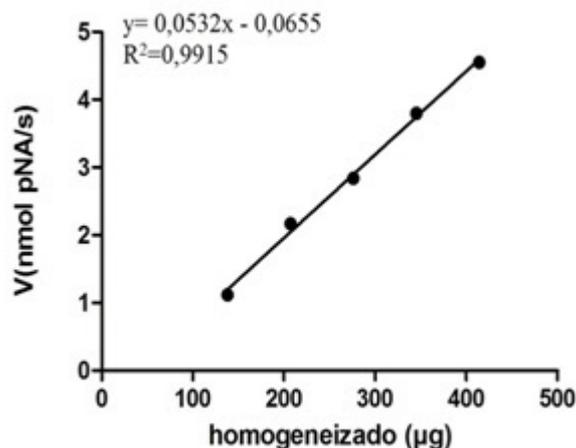


Figura 25. Atividade proteolítica no substrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida - Curva enzimática da atividade proteolítica do homogeneizado de CEW2. A reação ocorreu a 37 °C por 2h em tampão HEPES 100 mM pH 7.6 e Cloreto de Cálcio 50 mM. O produto (pNA) foi quantificado a 405 nm em espectrofotometro.

Nos testes para determinar a concentração ideal de substrato, utilizamos concentrações entre 150 e 1500 µM. Escolhemos a concentração de maior atividade de hidrolítica do substrato que foi a de 1000 µM para todos os ensaios (**Figura 26**). Não conseguimos definir o pH ideal, pois em nenhum outro tampão utilizado além de HEPES conseguimos atividade possível de ser medida.

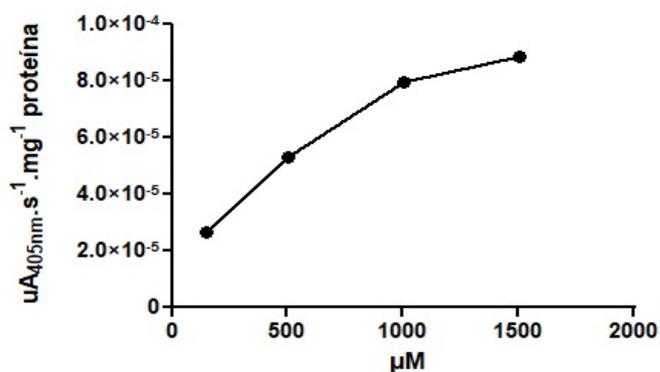


Figura 26. Curva de Substrato- N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida. As reações ocorreram a 37 °C por 2h em tampão HEPES 100 mM pH 7.6 e Cloreto de Cálcio 50 mM.

As incubações em diferentes temperaturas (**Tabela 16**) mostraram que a atividade proteolítica acontece melhor a 37 °C do que em temperaturas mais baixas.

Tabela 16. Temperatura ideal de hidrólise de N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida

Temperatura	$\mu A_{405nm} \cdot s^{-1} \cdot g^{-1}$
25 °C	$2,22 \times 10^{-5}$
27 °C	$2,77 \times 10^{-5}$
37 °C	$5,54 \times 10^{-4}$

Substrato incubado com homogeneizado de CEW2 em diferentes temperaturas e a atividade enzimática obtida do produto lido em um comprimento de onda de 405 nm para cada temperatura.

Fizemos alguns ensaios com cátions metálicos para sabermos se eles possuíam algum efeito inibitório ou de ativação dessa possível elastase presente no extrato total de *Panagrolaimus* sp. CEW2 no substrato Suc-AAA-pNA. Os cátions metálicos foram adicionados à reação contendo tampão HEPES 100 mM (com 200 μ M $CaCl_2$) a leitura das atividades enzimáticas mostradas na **Tabela 16** foram feitas por duas horas a 37 °C.

Tabela 17-Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática no substrato Suc-AAA-pNA

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
$CuSO_4$	250	450
$CoCl_2$	225	300
$MnCl_2$	183	241
$MnSO_4$	175	241,67
$CaCl_2$	166,67	185
$MgCl_2$	175	168

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
MgSO ₄	167	170,68
ZnSO ₄	341,67	375
ZnCl ₂	283,33	408,33

Em geral todos os cátions ativaram a enzima, diferente do que foi observado para os outros substratos de elastase. Os ensaios feitos com ZnSO₄, ZnCl₂ e CuSO₄ triplicaram a atividade presente no extrato total de CEW2.

Podemos observar que todos os cátions utilizados nos ensaios tiveram um efeito de ativação da atividade, diferente do observado para todos os outros substratos de elastase mostrados anteriormente em que todos os cátions metálicos inibiam a atividade enzimática.

Tanto o cloreto de zinco quanto o sulfato de zinco em ambas as concentrações mostraram a maior taxa de ativação enzimática na reação, intensificando até três vezes mais a atividade de hidrólise do substrato quando comparado a reação que não continha nenhum cátion metálico. Sulfato de magnésio, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio apresentaram a menor taxa de ativação da hidrólise enzimática na reação.

4.3.2.5 *Catepsina*

4.3.2.5.1 N-Benzoil- Phe-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina (Z-FR-AMC)

Z-FR-AMC é um substrato para a determinação fluorimétrica de catepsina B, Catepsina L, Catepsina K, Catepsina S e Papaína. Incubamos o homogeneizado de CEW2 com o substrato como descrito em Material e Métodos. Observamos sinal proteolítico quando incubado com o homogeneizado de CEW2 (**Tabela 18**). Então selecionamos para os ensaios concentrações de proteína sempre acima de 0,845 µg.

Tabela 18-Atividade enzimática sobre Z-FR-AMC.

μg de Proteína	Unidades Arbitrárias de Fluorescência
6,9	$8,79 \times 10^5$
0,845	$1,52 \times 10^5$
0,423	0

Hidrólise do substrato pela enzima presente no extrato total de CEW2. A leitura foi feita com excitação no comprimento de onda de 360 nm e emissão de 450 nm, como descrito em Material e Métodos.

Testamos a concentração de substrato ideal para que ocorra uma boa hidrólise do substrato pela enzima entre $10 \mu\text{M}$ e $60 \mu\text{M}$ de substrato. A reação foi feita em tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e a incubação a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Observamos que houve um aumento da atividade hidrolítica com as concentrações de substrato de $30 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ chegando no máximo da hidrólise em $40 \mu\text{M}$ e diminuindo a atividade hidrolítica em $60 \mu\text{M}$ como mostrado na **Figura 27**.

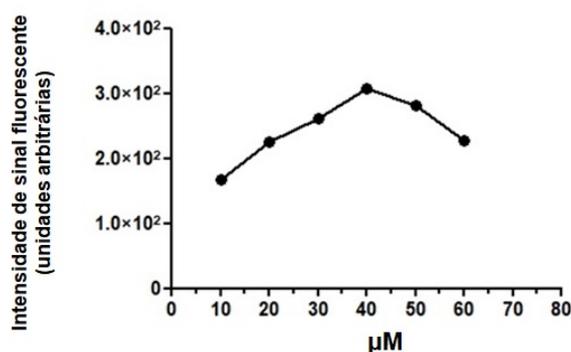


Figura 27. Curva de Substrato- Z- Phe-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina. As reações ocorreram a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1h em tampão citrato de sódio 100 mM pH 5.

Para definir o pH ideal de funcionamento da atividade sobre este substrato Catepsina fizemos uma curva de atividade com pHs entre 3,0 e 8,0 em tampão citrato-fosfato (**Figura 28**). Observamos que nesse substrato não houve precipitação nos pHs mais ácidos como ocorreu anteriormente em outros substratos testados, provavelmente

por utilizarmos uma quantidade menor de proteína do homogeneizado para os ensaios. O pH ótimo de hidrólise sobre Z-FR-AMC é 4,6.

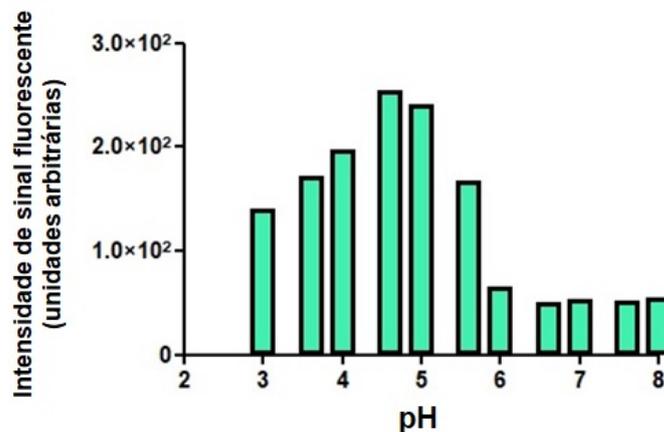


Figura 28- pH ótimo de Z-FR-AMC– Atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 incubado em diferentes pH em tampão universal citrato-fosfato por uma hora a 37 °C.

Os testes de temperatura para esse substrato são mostrados na **Tabela 19**. Optamos por fazer os ensaios a 37 °C, pois se mostrou mais estável nas leituras das atividades proteolíticas.

Tabela 19. Hidrólise de Z-FR-AMC diferentes temperaturas

Temperatura	Unidades Arbitrárias de Fluorescência
25 °C	1,18x10 ⁻¹
37 °C	1,71x10 ⁻²
45 °C	7,88x10 ⁻¹

Substrato incubado com homogeneizado de CEW2 em diferentes temperaturas e a atividade enzimática obtida para cada temperatura.

Testamos os efeitos de alguns cátions metálicos com possíveis efeitos inibitórios ou de ativação para esta enzima presente no extrato total de CEW2. Os cátions metálicos foram adicionados a reação contendo tampão citrato-fosfato 100 mM

e a leitura das atividades enzimáticas mostradas na **Tabela 20** foram feitas por uma hora a 37 °C.

Tabela 20. Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática presente do homogeneizado de CEW2 sobre o substrato Z-FR-AMC para Catepsina.

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
CuSO ₄	5,35	3,7
CoCl ₂	91,33	72,15
MnCl ₂	91,49	80,02
MnSO ₄	91,43	88,67
CaCl ₂	97,54	84,2
MgCl ₂	95,08	83,19
MgSO ₄	90,64	82,04
ZnSO ₄	29,73	20,09
ZnCl ₂	45,29	30,57

Todos os cátions metálicos utilizados nas reações causaram efeitos inibitórios da enzima. O sulfato de cobre nas duas concentrações utilizadas nos ensaios mostrou uma porcentagem de inibição em torno dos 95%. O cloreto de cálcio apresentou a menor porcentagem de inibição da atividade com 0.5 mM inibindo 2,5%.

Como este substrato não é um substrato específico apenas para um tipo de catepsina e em algumas vezes na literatura é encontrado o seu uso para caracterizações de enzimas tipo papainas selecionamos inibidores para diferentes classes de proteases para o ensaio mostrado na **Tabela 21**.

Tabela 21-Efeito dos inibidores de protease na atividade sobre Z-FR-AMC.

Inibidores	Atividade Residual (%)
Antipaina 100 µM	7,28
Antipaina 500 µM	0

Inibidores	Atividade Residual (%)
Antipaina 1 mM	0
Quimostatina 100 μ M	19,25
Quimostatina 500 μ M	0
Quimostatina 1 mM	0
E-64 10 μ M	54,76
E-64 100 μ M	0
E-64 500 μ M	0
PHEN 10 μ M	54,52
PHEN 100 μ M	48,83
PHEN 500 μ M	5,49
Leupeptina 10 μ M	0
Leupeptina 50 μ M	0
Leupeptina 100 μ M	0
CA-074 10 μ M	17,77
CA-074 50 μ M	16,05
CA-074 100 μ M	15,21
Pepstatina 10 μ M	57,19
Pepstatina 50 μ M	52,96
Pepstatina 100 μ M	45,70

Os inibidores que mostram uma de inibição total da atividade enzimática foram Antipaina, Quimostatina, E-64 e Leupeptina inibidores para Serina e Cisteína protease. A menor porcentagem de inibição observada foi observada no ensaio em que a incubação foi feita com Pepstatina um inibidor para proteases aspárticas.

4.3.2.5.2 N-Benzoil-Arg-Arg-7-amido-4-cloridrato de metilcumarina (Z-RR-AMC)

Z-RR-AMC é um substrato seletivo para a determinação fluorimetricade atividade tipo catepsina B. Incubamos o homogeneizado de CEW2 com o substrato como descrito em Material e Métodos. Observamos que houve bom sinal proteolítico

com a menor concentração de proteína, com base nesses teste utilizamos para todos os ensaios esta concentração mínima de 0,845 μ g (Tabela 22).

Tabela 22. Atividade enzimática sobre Z-RR-AMC

μ g de Proteína	Unidades Arbitrárias de Fluorescência
6,9	$1,70 \times 10^5$
0,845	$1,72 \times 10^5$
0,423	$4,16 \times 10^3$

Hidrólise do substrato pela enzima presente no extrato total de CEW2.

Testamos a concentração ideal de substrato para que ocorra a hidrólise do substrato pela enzima entre 5 μ M e 50 μ M de Z-RR-AMC. A reação foi feita em tampão citrato de sódio 100 mM pH 5,0 e a incubação a 37 °C. A melhor hidrólise do substrato pela proteína foi observado na reação que continha 35 μ M de substrato. A partir de 30 μ M a hidrólise do substrato diminui. Então selecionamos uma concentração do substrato de 35 μ M para todos os ensaios (Figura 29).

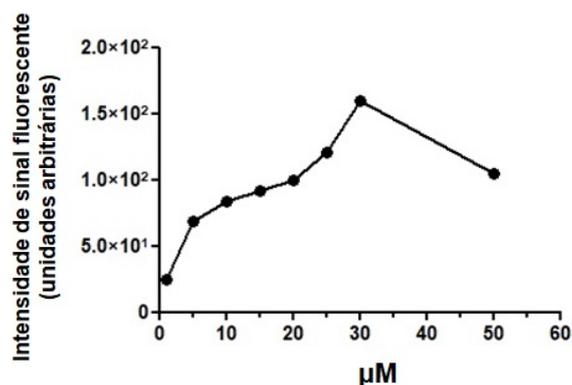


Figura 29. Curva de substrato Z-RR-AMC– Atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 incubado em diferentes concentrações de substrato.

Para definir o pH ideal incubamos a reação em pHs com valores entre 3,0 e 6,6, em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,5. Observamos que neste substrato não houve precipitação nos pHs mais ácidos. A faixa de atividade que mostrou o pH ótimo de

hidrólise desta enzima em Z-RR-AMC ocorreu entre os pHs 5 e 5,5 mostrado na **Figura 30**.

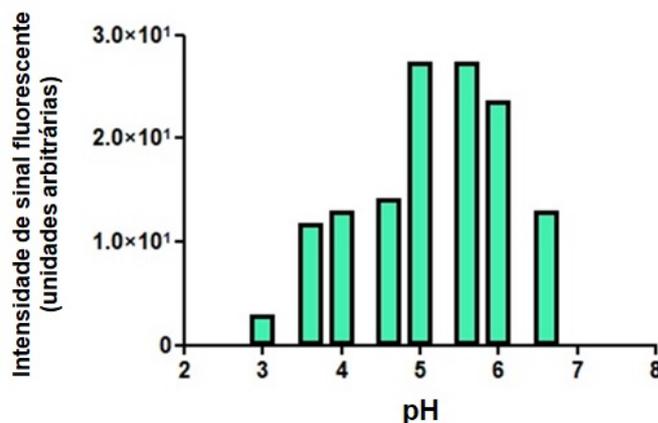


Figura 30. Curva de pH no Z-RR-AMC– Atividade hidrolítica do homogeneizado de CEW2 incubado com diferentes pH.

Os ensaios de temperatura para esse substrato são mostrados na **Tabela 23**. Observamos que não houve diferença de atividade hidrolítica da enzima entre reações realizadas a 25 °C ou 37 °C. Optamos por fazer todos os ensaios a 37 °C.

Tabela 23. Hidrólise de Z-RR-AMC em três diferentes temperaturas

Temperatura	Unidades Arbitrárias de Fluorescência
25 °C	1,47x10 ⁻²
37 °C	1,48x10 ⁻²
45 °C	7,88x10 ⁻¹

Testamos alguns inibidores encontrados na literatura para cisteíno proteases sobre Z-RR-AMC. O ensaio foi feito em tampão cítrato de sódio 100 mM pH 5,0 e a leitura feita por 1 hora a 37 °C. Antipaina, Quimostatina e Leupeptina mostraram uma inibição de 100% em todas as concentrações utilizadas nos ensaios. E-64 apenas inibiu 100% na concentração mais elevada de 500 µM. As menores porcentagens de inibição foram observadas nas reações com os inibidores PHEN e CA-074 (**Tabela 24**).

Tabela 24-Efeito dos inibidores de protease no homogeneizado de CEW2 em Z-RR-AMC.

Inibidores	Atividade Residual (%)
Antipaina 100 μM	0
Antipaina 500 μM	0
Antipaina 1 mM	0
Quimostatina 100 μM	0
Quimostatina 500 μM	0
Quimostatina 1 mM	0
E-64 10 μM	64,28
E-64 100 μM	51,91
E-64 500 μM	0
PHEN 10 μM	80,66
PHEN 100 μM	71,25
PHEN 500 μM	55,95
Leupeptina 10 μM	0
Leupeptina 50 μM	0
Leupeptina 100 μM	0
CA-074 10 μM	94,56
CA-074 50 μM	76,05
CA-074 100 μM	68,9
Pepstatina 10 μM	66,72
Pepstatina 50 μM	38,23
Pepstatina 100 μM	29,01

Testamos os efeitos dos cátions metálicos no ensaio com o substrato Z-RR-AMC específico para catepsina B. Observamos que os efeitos inibitórios da reação contendo cátions metálicos foram poucos e que em alguns casos houve uma pequena ativação na atividade hidrolítica da enzima.

Dos cátions metálicos selecionados para os ensaios apenas o cloreto de cobalto mostrou inibição total da atividade enzimática nas duas concentrações utilizadas. cloreto e sulfato de manganês e cloreto de cálcio apresentaram uma pequena ativação na atividade da enzima em ambas às concentrações utilizadas nos ensaios (**Tabela 25**).

Tabela 25- Efeito dos cátions metálicos na atividade enzimática do homogeneizado de CEW2 no substrato Z-RR-AMC para catepsina

Cátion Metálico	Atividade Residual (%)	
	0,5 mM	1 mM
CuSO₄	89,61	75,9
CoCl₂	0	0
MnCl₂	103,58	105,39
MnSO₄	102,52	105,5
CaCl₂	105,58	110,85
MgCl₂	81,51	80,05
MgSO₄	97,43	92,03
ZnSO₄	85,74	63,11
ZnCl₂	86,13	81,33

4.3.2.6 *Quimotripsina*

4.3.2.6.1 SUPHEPA (N-Succinyl –L-Phenylalanine- p-nitroanilide).

SUPHEPA é um substrato seletivo para enzimas do tipo quimotripsinas. Fizemos diversas tentativas variando as condições de pH de 6,0 a 9,0 em que a reação foi feita, aumentamos e diminuimos a concentração do substrato e testamos a incubação em duas temperaturas diferentes 27 °C e 37 °C.

Mesmo variando as condições, esse substrato não apresentou sinal de hidrólise acima dos brancos de enzima e substrato. Então concluímos que não há atividade tipo quimotripsinas em CEW2.

4.4 Tentativas de purificação das atividades enzimáticas encontradas no extrato total de CEW2.

4.4.1 Fracionamento por sulfato de amônio

Primeiro começamos com o fracionamento por sulfato de amônio do extrato total que foi obtido como descrito em Material e Método. Utilizamos várias porcentagens de saturação para concentrar as proteínas antes da purificação por cromatografia líquida. Observamos que a melhor porcentagem foi de 60% de saturação de sulfato de amônio onde encontramos a maior concentração das proteases presente no extrato total de CEW2 (**Tabela 26**).

Tabela 26- Fracionamento das atividades presentes no homogeneizado de *Panagrolaimus* sp. CEW2 por Sulfato de amônio. Atividade total foi feita com o substrato para aminopeptidase (LAP).

Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)*	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)
Homogeneizado	4,12	67,98	$8,28 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^{-3}$
0-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	2,85	14,25	$4,27 \times 10^{-2}$	$3,00 \times 10^{-3}$

U = velocidade em A405nm/s

O precipitado final foi coletado por centrifugação 10.000 rpm, 30 minutos a 4 °C e dissolvido em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.0. Por conter uma concentração muito alta de sulfato de amônio ainda presente na amostra optamos por dialisar antes de aplicar em uma coluna de troca iônica. Observamos que a amostra durante a diálise apresentou um pouco de precipitação e após a diálise a amostra não apresentava atividade hidrolítica em nenhum dos substratos testados, exceto o substrato de LPA L-Leu-pNA, que usamos para os ensaios subsequentes.

Adicionamos alguns cátions metálicos à amostra, como cloreto de zinco, Cálcio, Magnésio e Manganês na concentração de 1 mM como co-fatores para ativar a enzima. Observamos que a incubação feita com cloreto de zinco aumentava a precipitação da amostra e não mostrou nenhum sinal de ativação. O ensaio feito com cloreto de manganês apresentou oxidação e mudou a cor da amostra atrapalhando leitura dos substratos que são colorimétricos. Cloreto de cálcio não apresentou nenhum

tipo de ativação da enzima. O ensaio feito com cloreto de manganês foi o único que ativou a hidrólise do substrato de LPA (**Figura 31**).

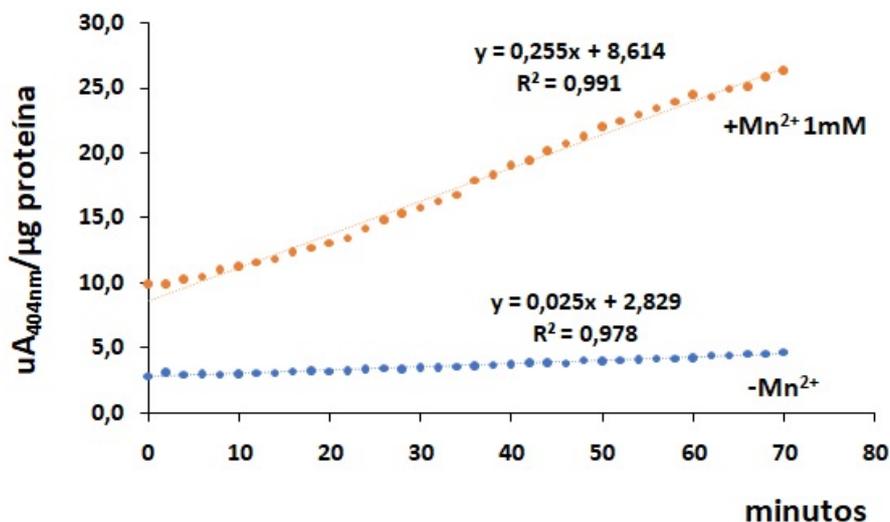


Figura 31- Curva de tempo da hidrólise de L-Leu-pNA pelo dialisado após precipitação com sulfato de amônio.

4.4.2 Cromatografia de Troca- iônica aniônica

A amostra depois de dialisada e reativada com Cloreto de manganês foi aplicada a uma coluna de troca-iônica aniônica Resource Q. A amostra foi eluída por um gradiente de tampão Tris-NaCl 50 mM até 1 M. O perfil cromatográfico gerado mostrou um pico maior seguido por vários picos menores (**Figura 32**).

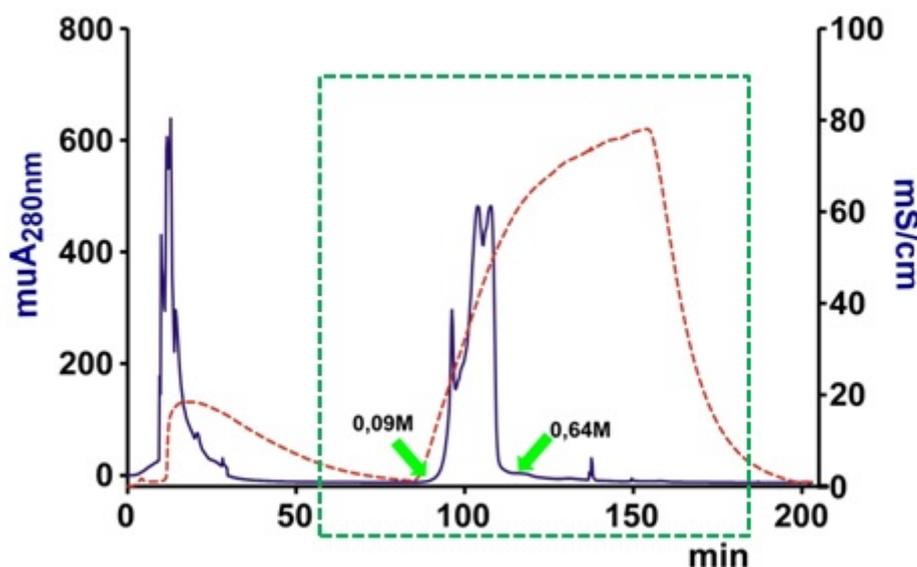


Figura 32. Cromatografia de troca iônica da amostra do homogeneizado de CEW2 concentrada por sulfato de amônio. Foram coletadas frações de 0,5mL a um fluxo de 0,5 mL/min, numa coluna Resource-Q (GE Life Sciences). O Perfil de absorvância a 280nm das proteínas eluídas por um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M em Tris-HCl pH 8,0. As setas em verde delimitam o pico em que encontramos atividades enzimática contra L-Leu-pNA..

As frações retiradas dos picos foram dessalinizadas por filtração em centrífuga (Microcon-30kDa, Millipore), ressuspensas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.0 para as amostras testadas nos substratos de aminopeptidase e elastase. Testes em tampão Citrato-fosfato 20 mM foram realizados com substratos para catepsina.

Observamos que havia atividade hidrolítica nas frações espalhadas ao longo do primeiro pico maior sobre o substrato para aminopeptidase (L-leu-pNA), pois havia liberação da p-NA, porém a atividade não era suficiente para se medir a velocidade da reação.

Não notamos atividade em nenhum dos substratos para catepsina e nem nos substratos para elastase.

Fizemos outros testes em que o extrato era aplicado diretamente na coluna de troca- iônica aniônica sem a precipitação e concentração com o sulfato de amônio, obtivemos o mesmo perfil cromatográfico mostrado na **Figura 32** e não conseguimos dosar a atividades das enzimas.

4.4.3 Cromatografia de Exclusão

Tentamos separar as proteases encontradas no extrato total de *Panagrolaimus* sp. CEW2 por tamanho através de cromatografia de exclusão. Testamos três tipos de colunas, Superdex 75, Superdex 200 e Superdex 300. Todas elas foram calibradas

utilizando padrões de proteínas com pesos moleculares conhecidos (Quimotripsinogênio A- 25,000; Ovoalbumina- 43,000; Albumina- 67,000; Aldolase- 158,000; Catalase- 232,000; Ferretina- 440,000; Tiroglobulina- 669,000 e Azul de Dextrana 2000) e utilizamos tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 150 mM pH 7,5 para realização corrida.

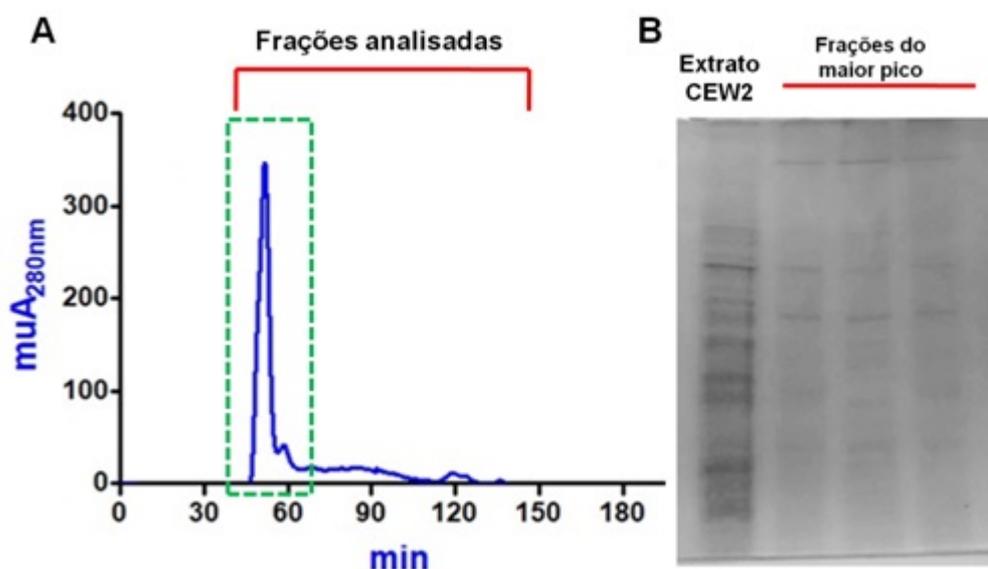


Figura 33- Cromatografia de Exclusão do homogeneizado de CEW2. Foram coletadas frações de 0,5 mL a um fluxo de 1 mL/min, numa coluna Superdex 200 (GE Life Sciences). **(A)** O perfil de absorvância a 280 nm das proteínas em tampão Fosfato 50 mM NaCl 0.15 mM, pH 7,2. O quadrado pontilhado em verde indica o pico em que encontramos atividades enzimáticas da aminopeptidase e de uma elastase. **(B)** Aliquotas retiradas das frações do pico maior que foram submetidas a SDS-PAGE (T=10%).

Os três tipos de colunas cromatográficas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico um pico único de maior absorvância, seguido por um arraste e um pico menor no final da corrida. Escolhemos a coluna S-200, pois mostrou uma melhor resolução dos picos.

Testamos o perfil cromatográfico para os três tipos de enzimas presentes no extrato total de CEW2 e encontramos atividade enzimática para a aminopeptidase (LAP) e para um substrato de elastase (AAPF-pNa) no pico de maior absorvância mostrado na **Figura 33. A**.

Juntamos as frações obtidas na cromatografia de Gel-filtração pertencentes ao pico maior onde encontramos as atividades enzimáticas e submetemos a uma coluna de Troca-iônica aniônica (**Figura 34**). Obtivemos ao longo do perfil um pico de maior

absorção onde encontramos a atividade da aminopeptidase e elastase juntas e tivemos o mesmo problema de estabilidade nos ensaios enzimáticos, sabíamos que havia liberação da p-NA colorimétrico amarelo, porém não conseguimos medir a velocidade da reação.

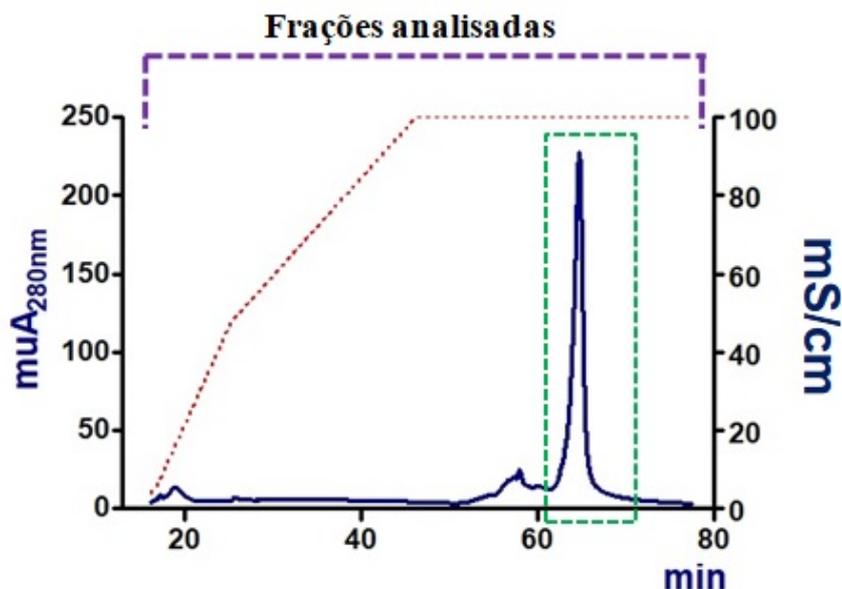


Figura 34. Cromatografia de troca iônica aniônica. As frações que apresentavam atividade enzimática retiradas da coluna de Gel-filtrações foram reunidas e submetidas a troca iônica. Foram coletadas frações de 0,5mL a um fluxo de 0,5 mL/min, numa coluna Resource-Q (GE Life Sciences). O Perfil de absorvância a 280 nm das proteínas eluídas por um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M em Tris-HCl pH 8,0. À esquerda do gráfico é mostrada a escala de valores de absorvância em miliunidades. À direita do gráfico é mostrada a escala de valores de condutividade em mS (mili Siemens)/cm.

Tentamos outros tipos de colunas como uma coluna de Troca-iônica catiônica (Resource-S) e uma coluna hidrofóbica (HiTrapPhenyl FF) em ambas as amostras aplicadas não adsorveram à coluna.

5. Discussão.

5.1 **Desenvolvimento da cultura em massa de *Panagrolaimus sp.* CEW2.**

Desenvolvemos um protocolo para o crescimento em massa de CEW2, pois encontrávamos dificuldades em obter uma grande quantidade de material para os experimentos de purificação das atividades proteolíticas encontradas no extrato total de CEW2. Os métodos utilizados para crescimento em massa em outras espécies de vida livre como *C. elegans* e *O. tipulae* não foram adequados para *Panagrolaimus* CEW2.

Acreditamos que o método descrito para vermes hermafroditas (*C. elegans* e *O. tipulae*) não funcionou, pois ele é feito em agitador orbital a 200 rpm. CEW2 é um verme dióico (possui machos e fêmeas) e a alta rotação impossibilitava a cópula dos nematoides no meio de cultura, não permitindo a reprodução.

Utilizamos como base algumas informações encontradas na literatura sobre nematoides entomopatogênicos crescidos em massa utilizando sacos de polipropileno com esponjas embebidas em suspensão de bactérias em meio líquido (BEDDING, 1983). Optamos por uma esponja de poliuretano porosa para obtermos uma melhor oxigenação e para que o meio líquido contendo as bactérias pudessem chegar por capilaridade até os vermes que estivessem entremeados na esponja. O poliuretano é inerte e pode ser autoclavado a 120 °C para esterilização prévia ao inóculo de bactérias e vermes.

Depois de ajustar todos os parâmetros da cultura semi-sólida, conseguimos obter uma maior massa de vermes em menor tempo. Quando utilizávamos a cultura em placas de Petri demorávamos cerca de 6 meses para obter amostras suficientes para os ensaios enzimáticos e de purificação. Esse tempo diminuiu para 3-4 meses e possibilitou os testes com o extrato total e várias tentativas de purificação das enzimas.

5.2 **Cultura de *Panagrolaimus sp.* CEW 2 em lisado de hemácias.**

Encontramos em CEW2 algumas atividades mostradas na literatura que participam da cascata proteolítica responsável pela degradação da hemoglobina no intestino de nematoides parasitas que se alimentam de sangue como *A. caninum* e *H. contortus* (WILLIAMSON, et al., 2003). Resolvemos testar se CEW2 conseguiria se alimentar de hemácias como o fazem nematoides parasitas.

Há apenas uma descrição na literatura mostrando que um nematoide de vida livre, *C. elegans*, pode se alimentar hemácias inteiras (CHAUHAN e PRITCHARD, 2018). *C. elegans* possui uma aspartil protease com 71% de similaridade de sequência

com a encontrada em *N. americanus* (CHAUHAN e PRITCHARD, 2018). As aspartil proteases estão descritas como uma das primeiras proteases a agirem na cascata da degradação da hemoglobina em nematoides parasitas (**Figura 35.A**), sugerindo assim que *C. elegans* seria capaz de se alimentar de sangue.

Fizemos a cultura exatamente como mostrada no artigo de Chauhan e Pritchard (2018), utilizando CEW2 e *C. elegans* como controle. Observamos que ambos os nematoides não se alimentavam das hemácias inteiras. As hemácias são maiores que o diâmetro da boca de CEW2 (**Figura 35. B**) não permitindo que eles se alimentem de células intactas. Diferente do observado neste artigo, todos os vermes presentes na cultura morreram em 3 dias. Refizemos as culturas com hemácias lisadas e apenas CEW2 se alimentou e se desenvolveu de ovo a adulto. Observamos também no intestino de CEW2 durante a alimentação com hemácias lisadas o aparecimento do que acreditamos sejam cristais de hemozoína observados em outros organismos como *Plasmodium* spp (BREN et al., 2015). Os nematoides que continham esses precipitados escuros no intestino puderam ser facilmente isolados por passagem num campo magnético estático, mas com baixa eficiência pois nem todos os nematoides na cultura apresentavam a mesma quantidade de precipitado

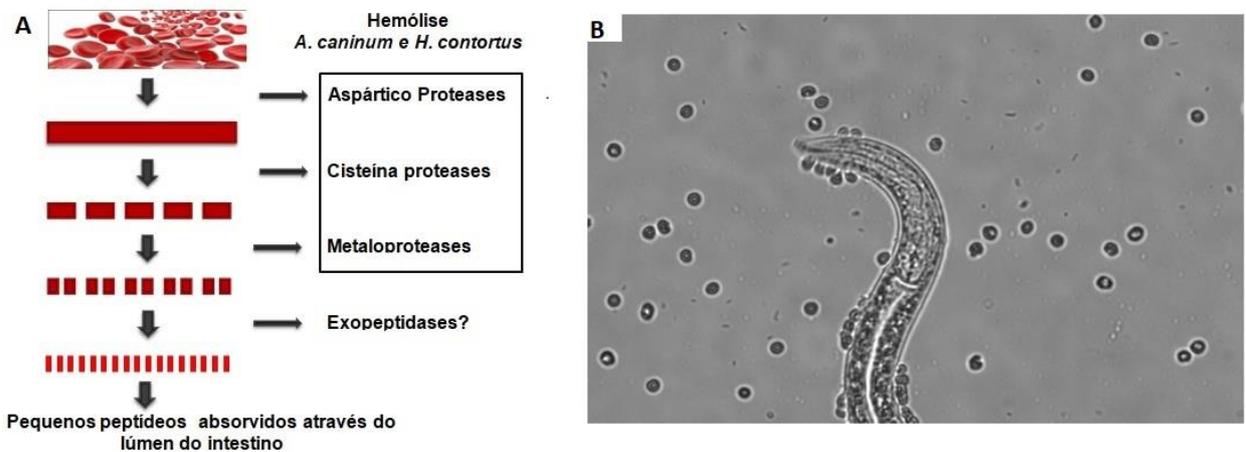


Figura 35- Cascata proteolítica da degradação de hemoglobina (modif. de WILLIAMSON, 2011) (A) e CEW2 em cultura de hemácias não lisadas (B).

Acreditamos que CEW2 possui níveis de atividades proteolíticas muito maiores do que nematoides rhabditídeos, sugerindo que o processo de digestão em Panagrolaimomorpha é diferente daquele observado nos Rhabditomorpha. Talvez por isso *C. elegans* não tenha sobrevivido à cultura de hemácias enquanto CEW2 continuou seu desenvolvimento. Porém, ainda há poucas informações sobre como

ocorre à digestão em nematoides de vida livre e quais enzimas então envolvidas neste processo.

5.3 Atividades Proteolíticas

Nenhuma das proteínas responsáveis pelas atividades analisadas nesta tese foi devidamente purificada e caracterizada. Assim, iremos restringir nossa discussão somente às propriedades enzimáticas detectadas com substratos específicos para determinadas classes de enzimas proteolíticas.

Detectamos cinco atividades proteolíticas distintas em CEW2. Duas atividades em substratos proteicos (Caseína e BSA) e três em substratos sintéticos seletivos para Leucina-aminopeptidase, Elastase e Catepsina. Algumas dessas atividades possuem uma possível função descrita em outros nematoides de vida livre. Como não pudemos purificar as enzimas responsáveis pelas cinco atividades analisadas, pode ser que algumas delas clivem mais de um dos substratos utilizados.

5.3.1 Substratos proteicos

Por serem substratos sem especificidades não temos como inferir qual é o tipo de protease que possui atividade proteolítica sobre eles. Podemos apenas determinar alguns fatores como ótimos de pH e temperatura. Tanto as atividades de hidrólise em BSA quanto em caseína apresentaram atividade a 37 °C e em pH básico.

Sabemos que Catepsinas D descritas em Ancilostomídeos apresentam capacidade de hidrolisar soro albumina humana e de cães. Essas proteases são expressas na fase larval infecciosa e em adultos, tendo um importante papel na digestão e nutrição desses nematoides (WILLIAMSON et al., 2002).

No extrato total de *C. elegans* também foi identificada uma Catepsina D com propriedade hidrolítica sobre caseína e pH ótimo entre 4,5 e 5,0, mas seu papel em nematoides de vida livre ainda não foi definido (SARKIS et. al, 1988).

5.3.2 Substratos sintéticos

5.3.2.1 *Tripsina e Quimotripsina*

Os primeiros testes com substratos sintéticos específicos que fizemos foram para proteases do tipo tripsina e quimotripsina. São duas enzimas descritas em vários nematoides parasitas como sendo enzimas digestivas presente em abundância e facilmente encontradas no intestino (ROGERS, 1941). Esperávamos que serina proteases com essas características estivessem presentes em *Panagrolaimus* sp.

CEW2, pois, como já dissemos, esse nematoide possui proteases muito mais ativas que as encontradas em vermes de vida livre como *C. elegans* e *O. tipulae*, quando detectado por zimografia (COELHO, 2015).

Apenas um artigo mostrou a presença destas classes de enzimas no nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus* (MILLER e JENKINS, 1968) e não encontramos a descrição enzimática de serina proteases tipo tripsina e quimotripsina em nenhum outro nematoide de vida livre.

Nenhum dos testes feitos com o homogeneizado de CEW2 nestes dois substratos mostraram atividade, mesmo variando a concentração de proteína ou mudando alguns parâmetros da reação como temperatura e pH. Portanto, CEW2 não possui atividades substanciais tipo Tripsina e Quimotripsina.

5.3.2.2 Aminopeptidase

Leucina aminopeptidase é uma enzima presente em vários processos e fases do desenvolvimento dos nematoides. Encontrada também em *C. elegans* foi descrita como uma possível enzima digestiva, além de participar do processamento de neuropeptídios e colágeno (JOSHUA, 2001).

Comparamos os resultados obtidos neste trabalho com aminopeptidases isoladas de *C. elegans* (infra-ordem Rhabditomorpha) e *Panagrellus redivivus* (infra-ordem Panagrolaimomorpha) dois nematoides de vida livre (MASLER, 2002).

As aminopeptidases isoladas de *Panagrellus redivivus* e *C. elegans* mostraram atividades em pHs alcalinos como observado para a atividade de CEW2. Não conseguimos observar em CEW2 se havia alguma atividade enzimática em pHs mais ácidos. Todos os testes de pH feitos com diferentes tampões entre 3,0 a 5,5, mostram precipitação de proteínas do homogeneizado de CEW2 durante a reação, impossibilitando medidas quantitativas de atividade. A temperatura ótima de funcionamento da enzima de *P. redivivus* foi 10 °C menor que o observado na atividade do extrato total de CEW2 que apresenta dados consistentes a 37 °C.

Tabela 27. Resumo das atividades da aminopeptidase de *Panagrolaimus* CEW2

L-Leucina-pNA

Temperatura	37 °C	Cátion Metálico*	
Concentração	500 µM	CuSO ₄ 1 mM	16,82
pH	7	CoCl ₂ 1 mM	32,5
Inibidores *		MnCl ₂ 1 mM	42,6
Bestatina 250 µM	42,07	MnSO ₄ 1 mM	44,86
E-64 50 µM	116,09	CaCl ₂ 1 mM	42,6
Leupeptina 50 µM	97,7	MgCl ₂ 1 mM	44,84
PMSF 5 mM	121,26	MgSO ₄ 1 mM	58,33
PHEN 10 mM	34,66	ZnSO ₄ 1 mM	0
		ZnCl ₂ 1 mM	0

***% de atividade residual**

A aminopeptidase de *P. redivivus* é ativada por cátions metálicos (MASLER, 2002). No caso de *Panagrolaimus* sp. CEW2 observamos que cátions metálicos inibiam a hidrólise do substrato sintético L-Leu-pNA. Quando incubado tanto com cloreto quanto sulfato de zinco, notava-se a precipitação de proteínas do extrato de CEW2 e inibição total da atividade enzimática. Acreditamos que a precipitação e inativação causa dos pelo zinco não deveria acontecer, pois há moléculas de zinco associadas com a estrutura das aminopeptidases. A atividade detectada em CEW2, assim como as aminopeptidases de *C. elegans* e *P. redivivus*, foi inibida por amastatina, bestatina e fenantrolina, porém em concentrações bem menores do que as usadas nos ensaios em CEW2. Esses dados sugerem que atividade medida com Leu-pNA em CEW2 pode ser devida a uma esterase inespecífica e não a uma aminopeptidase como esperado pelos dados de literatura. Somente a purificação da enzima ou a expressão de uma enzima recombinante de CEW2 poderá resolver esse impasse.

5.3.2.3 Elastase

Em nematoides de vida livre não encontramos informações sobre o papel das elastases durante o seu desenvolvimento. Nossos dados mostraram uma evidente

presença desse tipo de atividade em CEW2 e acreditamos que por ser capaz de digerir elastina esteja envolvida na muda de cutícula entre as fases larvais (BRITTON, 2013). Sugerimos ainda a hipótese de que ela talvez participe na reorganização estrutural que ocorre na cutícula durante o processo de resistência a congelamento e dessecação. A seguir comparamos as diferenças observadas entre as atividades três substratos específicos para elastase e informações sobre outros organismos.

Tabela 28- Resumo das atividades das Elastase de CEW2

<i>Suc-AAPL-pNa</i>		<i>Suc-AAPF-pNA</i>		<i>Suc-AAA-pNA</i>	
Temperatura	37 °C	Temperatura	37 °C	Temperatura	37 °C
Concentração	300 µM	Concentração	500 µM	Concentração	1000 µM
pH	7	pH	7 e 8	pH	7,6
Inibidores *		Inibidores *		Cátion Metálico*	
Inibidor II	0	Inibidor II	0	CuSO ₄ 1 mM	450
Inibidor III	0	Inibidor III	0	CoCl ₂ 1 mM	30
PCMB 100 µM	0	Elastatinal 500 µM	40	MnCl ₂ 1 mM	241
Elastatinal 500 µM	44	PCMB 100 µM	30	MnSO ₄ 1 mM	242
E-64 500 µM	39	PMSF 1 mM	40	CaCl ₂ 1mM	185
Cátion Metálico*		Cátion Metálico*		MgCl ₂ 1 mM	168
CuSO ₄ 1 mM	52,42	CuSO ₄ 1 mM	0	MgSO ₄ 1 mM	170
CoCl ₂ 1 mM	81,35	CoCl ₂ 1 mM	15,02	ZnSO ₄ 1 mM	375
MnCl ₂ 1 mM	37,96	MnSO ₄ 1 mM	86,02	ZnCl ₂ 1 mM	408
CaCl ₂ 1 mM	65,08	CaCl ₂ 1 mM	83,17		
MgSO ₄ 1 mM	70,50	MgSO ₄ 1 mM	67,75		
ZnSO ₄ 1 mM	72,31	ZnSO ₄ 1 mM	0		

*% residual de atividade

Está descrita na literatura uma metaloelastase de macrófago de camundongo que mostra um comportamento semelhante ao observado com a atividade detectada nos extratos de CEW2 sobre Suc-AAA-pNA (JENG et. al, 1995). O estímulo da atividade enzimática ocorria na presença de Cálcio e Zinco, semelhante ao comportamento observado em nossos testes. Este comportamento também foi observado em elastase

isolada de cercarias de *Schistosoma mansoni* (McKERROW et al., 1985). Não detectamos nenhuma atividade do extrato de CEW2 sobre Suc-AAA-pNA sem a presença de cálcio. Todos os cátions metálicos adicionados aos ensaios apresentaram ativação da hidrólise enzimática, inclusive sulfato de cobre o que é o inverso do observado com a elastase pancreática (LEWIS et al., 1956). Na literatura só há um caso de ativação de protease por cobre, a pro-ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) 12 (LOECHEL e WEWER, 2001). As atividades enzimáticas observadas sobre os substratos Suc-AAPL-pNA e Suc-AAPF-pNA ocorriam mesmo na ausência dos cátions, inclusive cálcio.

JENG et. al. (1995) mostraram que estas metaloelastases não eram afetadas pela presença de magnésio, manganês e cobalto na reação. Os cátions metálicos que utilizamos em nossos ensaios com os substratos Suc-AAPF-pNA e Suc-AAPL-pNA mostraram inibição de pelo menos uma parte da atividade enzimática e em alguns casos, como nas incubações feitas com Zinco, Cobre e Cobalto a inibição total do funcionamento da atividade sobre Suc-AAPF-pNA.

Não conseguimos fazer os ensaios com os inibidores no substrato Suc-AAA-pNA, por motivos técnicos. Sem a presença de cálcio não havia atividade enzimática e quando acrescentávamos cálcio, ocorriam precipitações que atrapalhavam a dosagem da atividade enzimática na presença dos inibidores. Não encontramos na literatura nada que pudesse explicar este fato. Mesmo mudando as concentrações de inibidores ou de cálcio não conseguimos realizar os ensaios com inibidores.

Consideramos que a atividade enzimática sobre os substratos Suc-AAPL-pNA e Suc-AAPF-pNA estava inibida até valores de 40% de atividade residual.

Ambos os substratos mostram inibição total quando incubados com os inibidores II e III de elastase e inibição parcial por Elastatinal. Os três são potentes inibidores irreversíveis e o inibidor II age na enzima através dos resíduos catalíticos His57 e Ser195 nas elastases de neutrófilos humano (NAVIA et. al, 1989). Todos eles são específicos para elastase do tipo serina protease.

Não podemos afirmar qual tipo de elastases encontramos presentes no extrato total de *Panagrolaimus* sp. CEW2. Porém, através dos poucos dados encontrados na literatura comparados com os dados obtidos nos nossos ensaios podemos sugerir que CEW2 possui dois tipos diferentes de elastase, ambas ativadas por cálcio, uma inibida por CuSO₄ e outra ativada por CuSO₄.

5.3.2.4 *Catepsina*

Identificamos em CEW2 duas atividades tipo catepsina. Enzimas dessa classe em nematoides são descritas como digestivas e estão presentes no tubo digestivo de diversas espécies. Neste grupo de enzimas existe uma grande variação entre as espécies de nematoides em relação a vários fatores como afinidade de substrato, temperatura e pH ótimos definidas pelos diferentes hábitos alimentares encontrados nestes vermes (REHMAN e JASMER, 1999).

Tabela 29- Resumo das atividades tipo catepsina**Z-FR-AMC**

Temperatura	37 °C
Concentração	35 µM
pH	4-5
Inibidores *	
Antipaina 500 µM	0
Quimostatina 500 µM	0
E-64 100 µM	0
PHEN 500 µM	5,49
Leupeptina 10 µM	0
CA-074 100 µM	15,21
Pepstatina 100 µM	45,70
Cátion Metálico*	
CuSO ₄ 1 mM	3,7
CoCl ₂ 1 mM	72,15
MnCl ₂ 1 mM	80,02
MnSO ₄ 1 mM	88,67
CaCl ₂ 1 mM	84,2
MgCl ₂ 1 mM	83,19
MgSO ₄ 1 mM	82,04
ZnSO ₄ 1 mM	20,09
ZnCl ₂ 1 mM	30,57

Z-RR-AMC

Temperatura	37 °C
Concentração	40 µM
pH	4-5
Inibidores*	
Antipaina 100 µM	0
Quimostatina 100 µM	0
E-64 500 µM	0
PHEN 500 µM	55,95
Leupeptina 10 µM	0
CA-074 100 µM	68,9
Pepstatina 100 µM	29,01
Cátion Metálico*	
CuSO ₄ 1 mM	75,9
CoCl ₂ 1 mM	0
MnCl ₂ 1 mM	105,39
MnSO ₄ 1 mM	105,5
CaCl ₂ 1 mM	110,85
MgCl ₂ 1 mM	80,65
MgSO ₄ 1 mM	92,03
ZnSO ₄ 1 mM	63,11
ZnCl ₂ 1 mM	81,33

*% de atividade residual

Comparamos as atividades tipo catepsina de CEW2 com dados de um nematoide parasita de peixes, *Hysterothylacium aduncum* (MALAGÓN et al, 2010). As atividades peptidásicas encontradas neste verme foram detectadas com os

mesmos substratos utilizados nos ensaios das atividades presentes em CEW2. O substrato Z-FR-AMC é inespecífico e tem uma grande sensibilidade a vários tipos de cisteína proteases, já o substrato Z-RR-AMC é específico para catepsina B.

Os dados encontrados para Z-FR-AMC em *H. aduncum* mostraram a identificação de uma catepsina L com funcionamento parecido com a atividade observada em CEW2 em relação ao pH ótimo e a inibição por inibidores de cisteína protease, como E-64 que inibiu totalmente as duas atividades presentes em CEW2. O efeito de cátions divalentes sobre as atividades tipo catepsina B medidas com os dois substratos utilizados são semelhantes, com exceção de cobalto e cobre. A atividade sobre Z-FR-AMC é inibida por cobre e não é afetada por cobalto. Já a atividade sobre Z-RR-AMC é inibida por cobalto, mas não é afetada pela presença de cobre.

Como esperado para uma catepsina B, as atividades detectadas com ambos os substratos mostrados na **Tabela 29** não foram inibidas por pepstatina, um inibidor específico de catepsina D.

O substrato Z-RR-AMC para catepsina B em *H. aduncum* mostrou comportamento diferente do observado em CEW2, tendo atividades em pHs mais alcalinos enquanto que em CEW2 o pH ótimo fica em torno de 4,5.

5.4 Tentativas de purificação das atividades enzimáticas encontradas no extrato total de CEW2.

Tentamos diversas formas de purificação das proteases do extrato total de CEW2 por cromatografia líquida. Utilizamos vários tipos de colunas de exclusão, troca iônica, aniônica e fase-reversa. Nas separações por exclusão e troca iônica sempre observávamos o mesmo perfil de separação independente da coluna utilizada. A amostra se concentrava em um único pico com todas as atividades presentes no extrato total seguido por picos bem menores onde não observávamos atividades. Nas colunas de fase reversa e aniônica não havia adsorção das proteínas pela matriz da coluna.

Acreditamos que vários fatores como a perda física da atividade, o efeito de alguns sais utilizados nos tampões, a diminuição de co-fatores muitas vezes presentes no extrato antes de qualquer tipo de fracionamento, possam também ter comprometido o isolamento das enzimas.

Outra hipótese é a agregação das proteínas do extrato (feito em baixa força iônica) e perda da função causada pelo congelamento dos nematoides observados em

diversas proteínas (HOYLE et al., 1977; ROSE et al, 1984). Sabemos que os vermes do gênero *Panagrolaimus* sobrevivem a diversas condições extremas como o congelamento, sofrendo mudanças no metabolismo, nas conformações das proteínas etc. O funcionamento desses mecanismos de sobrevivência ainda é pouco conhecido. Acreditamos que essa capacidade de resistência também interferiu de alguma maneira na purificação das proteases. Talvez as proteínas de vermes extremófilos sejam altamente glicosiladas como ocorre com as proteínas de arqueias extremófilas KARCHER et al., 1993).

Mucinas podem estar envolvidas também no possível processo de agregação de proteínas em CEW2. Mucinas são glicoproteínas que podem sofrer agregação (BANSIL et al., 1995) e envolver outras proteínas solúveis nesses agregados (SENAPATI et al., 2010). Mucinas foram detectas no produto de secreção-excreção de *Toxocara canis* (LOUKAS et al., 2000). De qualquer maneira, glicoproteínas, como a vitelogenina de *Oscheius tipulae*, podem sofrer agregação quando congeladas e descongeladas muitas vezes (WINTER, comunicação pessoal).

Tentamos mudar a forma de obter o extrato total para utilizar nos fracionamentos das proteases através de sonicação do nematoide sem precisar congelar. Essa técnica não mostrou resultados, pois os vermes não rompiam. Além de não conseguirmos massa suficiente para a extração.

Tentamos mudar diversos parâmetros de centrifugação, extração com solventes orgânicos e inorgânicos, adaptamos alguns protocolos antigos para purificação de aminopeptidases e catepsinas, porém não tivemos resultados. Acreditamos que mesmo conseguindo obter um aumento na massa das amostras ainda não foi o suficiente para detectarmos a presença das atividades durante a purificação.

6. Referências.

Referências

- ALMENARA DP, DE MOURA JP, SCARABOTTO CP, ZINGALI RB, WINTER CE. The molecular and structural characterization of two vitellogenins from the free-living nematode *Oscheius tipulae*. **Plos One**, v. 8, e53460, 2013.
- ALTUN ZF, HALL DH. Alimentary system, intestine. In **WormAtlas**, doi:10.3908/wormatlas.1.4. 2009.
- BANSIL R, STANLEY E, LAMONT JT. Mucin Biophysics. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57 p. 635-657, 1995.
- BARRETT AJ, RAWLINGS ND, WOESSNER JF. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Academic Press, London. 1998.
- BEDDING R.A. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Ann. Appl. Biol.**, v. 104 p. 117-120, 1984.
- BLAXTER M, KOUTSOVOULOS, G. The evolution of parasitism in Nematoda. **Parasitology**, v. 10, p. 1-14, 2014.
- BREN KL, EIXENBERG R, GRAY HB. Discovery of the magnetic behavior of hemoglobin: a beginning of bioinorganic chemistry. **PNAS**, v.112: p.13123-13127, 2015.
- BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, p. 71-94. 1974
- BREWER JM, PESCE AJ, ASHWORTH RB. Experimental Techniques in Biochemistry - **Prentice-Hall, INC London** - p. 325, 1974.
- BRITTON C. Proteases of nematodes: from free-living to parasite. In: Kennedy MW, Harnett W (eds.) **Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology**. CABI Publishing. p. 354-374, 2013
- BÜRGLIN TR, LOBOS E, BLAXTER ML. *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. **International Journal for Parasitology**. v.28, p. 395-411, 1998.
- BURNELL AM, TUNNACLIFFE A. Gene induction and desiccation stress in nematodes- In: PERRY RN, WHARTON DA. (eds.) **Molecular and physiological basis of nematode survival**. Wallingford, UK: CAB International. p. 126-156. 2011
- C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**. v. 282 p. 2012-2018, 1998.
- CHAUDHARI SN, KIPREOS ET. Increased mitochondrial fusion allows the survival of older animals in diverse *C. elegans* longevity pathways. **Nature Communications** v.8, Article number: 182, 2017.
- CHAUHAN VM, ORSI G, BROWN A, PRITCHARD DI, JONATHAN W, AYLOTT JW. Mapping the Pharyngeal and Intestinal pH of *Caenorhabditis elegans* and Real-Time Luminal pH Oscillations Using Extended Dynamic Range pH-Sensitive Nanosensors. **ACS Nano**. v. 6, p.5577-5587, 2013.
- COELHO CC. (2015) **Caracterização preliminar dos hábitos extremófilos, vitelinas e proteases de Panagrolaimus sp. CEW2, um nematoide de vida livre isolado da Região Amazônica**. Dissertação de Mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 87pp

- COUPAR IM. Opioid action of the intestine: the importance of the intestinal mucosa. **Life Science**. v.41, p. 917–925, 1987.
- DE LEY PA. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. in: ed. The *C. elegans* Research Community, **WormBook**, DOI:10.1895/wormbook.1.41.1, 2006.
- DICHTEL-DANJOY ML, FÉLIX MA. The two steps of vulval induction in *Oscheius tipulae* CEW1 recruit common regulators including a MEK kinase. **Developmental Biology**. v. 265, p. 113 – 126, 2004.
- ELLIS RE, LIN S-Y. The evolutionary origins and consequences of self-fertility in nematodes. **F1000Prime Rep**.p. 6:62, 2014
- FUCHS AG. Neue an Borken-und Rüsselkäfer gebundene Nematoden, halbparasitische und Wohnungseinmieter. Freilebende Nematoden aus Moos und Walderde in Borken-und Rüsselkäfergängen. **Zoologische Jahrbücher**. v. 59, p. 505-646, 1930.
- GOYAL K, TUNNACLIFFE A, WALTON LJ. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 151-157, 2005.
- HASHMI S, BRITTON C, LIU J, GUILIANO DB, OKSOV Y, LUSTIGMAN S. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 3477-3486, 2002.
- HOTEZ PJ, CAPELLO M, HAWDON J, BECKERS C, SAKANARI JA. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p. 918-926, 1994.
- HOYLE DH, REYNOLDS JA, HILL R L. Purification, Composition, Molecular Weight, and Subunit Structure of Ovine Submaxillary Mucin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 252, p. 3791-3798, 1977.
- IUBMB. **Enzyme Nomenclature - Hydrolases**. 2015 Disponível em: [<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>]
- JENG AY, WONG M, DUELFER T, SHAPIRO SD, KRAMER RA, HU S. Mouse macrophage metalloelastase expressed in bacteria absolutely requires zinc for activity. **J. Biochem**. v. 117, p. 216-221, 1995.
- JORGENSEN EM, MANGO SE. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p 356-369, 2002.
- JOSHUA GW. Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 113, p. 223-232, 2001.
- KAMATH RS, FRASER AG, DONG Y, POULIN G, DURBIN R, GOTTA M, KANAPIN A, LE BOT N, MORENO S, SOHRMANN M, WELCHMAN DP, ZIPPERLEN P, AHRINGER J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. **Nature**, v. 421, p. 231–237, 2003.
- KANZAKI N, KIONTKE K, TANAKA R, HIROOKA Y, SCHWARZ A, MÜLLER-REICHERT T, CHAUDHURI J, PIRES-DASILVA A. Description of two three-gendered nematode species in the new genus *Auanema* (Rhabditina) that are models for reproductive mode evolution. **Scien. Rep**, v. 7, Article number: 11135, 2017.

- KÄRCHER U, SCHRÖDER H, HASLINGER E, ALLMAIER G, SCHREINER R, WIELAND F, HASELBECK A, KÖNIG H. Primary structure of the heterosaccharide of the surface glycoprotein of *Methanothermus fervidus*. **J. Biol.Chem**, v. 268, p. 26821–26826, 1993.
- KIM SK. *C. elegans*: Mining the functional genomics landscape. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 681-689, 2001.
- KIRIENKO NV, MANI K, FAY DS. Cancer models in *C. elegans*. **Developmental Dynamics**, v. 239, p. 1413–1448, 2010.
- KOIWA H, SHADE RE, ZHU-SALZMAN K, D'URZO MP, MURDOCK LL, BRESAN RA, HASEGAWA PM. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **FEBS Letters**, v.471, p. 67-70, 2000.
- LEWIS S, DYAL L, HILBURN C, WEITZ, S, LIAU W, LAMUNYON C, DENVER D. Molecular evolution in *Panagrolaimus* nematodes: origins of parthenogenesis, hermaphroditism and the Antarctic species *P. davidi*. **BMC Evolutionary Biology**, v.9, p:26-40, 2009.
- LEWIS UJ, WILLIAMS DE, BRINK NG. Pancreatic elastase: purification, properties, and function. **J. Biol. Chem.**, v. 222, p. 705-720, 1956.
- LOECHEL F, WEWER UM Activation of ADAM 12 protease by copper. **FEBS Lett.**, v. 506, p. 65-68, 2001.
- LOUKAS A, HINTZ M, LINDER D, MULLIN NP, PARKINSON J, TETTEH KKA, MAIZELS RM. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 39600-39607, 2000.
- LOUKAS A.; BETHONY JM; WILLIAMSON AL. Vaccination of dogs with a recombinant cysteine protease from the intestine of canine hookworms diminishes the fecundity and growth of worms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p.1952-1961, 2004.
- LOUVET-VALLÉE S, KOLOTUEV I, PODBILEWICZ B, FÉLIX MA. Control of vulval competence and centering in the nematode *Oscheius* sp.1 CEW1. **Genetics**, v. 163, p. 133-146, 2002.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAEDA I, KOHARA Y, YAMAMOTO M, SUGIMOTO A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. **Current Biology**, v. 11, p. 171–176, 2001.
- MALAGÓN AD, MANUEL D-LB, ROCÍO BA, FRANCISCO JA. Cathepsin B- and L-like cysteine protease activities during the *in vitro* development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), a worldwide fish parasite. **Parasitology International**, v. 59, p. 89–92, 2010.
- MASLER EP. Aminopeptidases in *Caenorhabditis elegans* and *Panagrellus redivivus*: detection using peptide and non-peptide substrates **Journal of Helminthology**, v.76, p. 45-52, 2002.

- McGILL LM, SHANNON AJ, PISANI D, FÉLIX MA, RAMLØV H, DIX I, WHARTON DA, BURNELL AM. Anhydrobiosis and freezing-tolerance: adaptations that facilitate the establishment of *Panagrolaimus* nematodes in polar habitats. **PLoS One**, v. 6, e0116084, 2015.
- McKERROW JH, BRINDLEY P, BROWN M, GAM AA, STAUNTON C, NEVA FA. *Strongyloides stercoralis*: identification of a protease that facilitates penetration of skin by the infective larvae. **Experimental Parasitology**, v.70, p. 134-143, 1990.
- McKERROW JH, CAFFREY C, KELLY B, LOKE P, SAJID M. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, v. 1, p. 497-536, 2006
- McKERROW JH, PINO-HEISS S, LINDQUIST R, WERB Z. Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, p. 3703-3707, 1985.
- MILLER CW, JENKINS WR. Proteolytic enzymes in certain free-living and plant-parasitic nematodes. **Nematologica**, v. 10, p. 480-488, 1964.
- MUSCHIOL D, TRAUNSPURGER W. Life cycle and calculation of the intrinsic rate of natural increase of two bacterivorous nematodes, *Panagrolaimus* sp. and *Poikilolaimus* sp. From chemoautotrophic Movile Cave, Romania. **Nematology**, v. 9, p. 271-284, 2007.
- NAVIA MA, MCKEEVER BM, SPRINGER JP, LIN T-Y, WILLIAMS HR, FLUDER EM, DORN CP, HOOGSTEEEN K. Structure of human neutrophil elastase in complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84 Å resolution. **PNAS**, v. 86, p. 7-11, 1989.
- NIGON VM, FÉLIX, MA. (2017) History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. (September, 07, 2017), **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.181.1.
- PAGANI M, RICCI C. Desiccation of *Panagrolaimus rigidus* (Nematoda): survival, reproduction and the influence on the internal clock. **Hydrobiologia**, v. 347, p. 1–13. 1997.
- PANCHBHAI SD, VARMA BK, REDDY CR. Presence of *Panagrolaimus* sp. (Nematoda: Panagrolaimidae) in seeds of pearl millet (*Pennisetum americanum*(L.) Leeke). **Nematologica**, v. 32, p.236-237, 1986.
- PISHCHANY G, SKAAR EP Taste for blood: hemoglobin as a nutrient source for pathogens. **PLoS Pathogens**, v.8, e1002535, 2012.
- POWERS JC, GUPTON F, HARLEY AD, NISHINO N, WHITLEY RJ. Specificity of porcine pancreatic elastase, human leukocyte elastase and cathepsin G. **BBActa**, v. 485, p.156-166, 1977.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **NucleicAcidsResearch**, v. 38, p 227–233, 2010.
- RAYMONDM R,WHARTON DA. The ability of the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* to survive intracellular freezing is dependent upon nutritional status. **Journal of Comparative Physiology B**, v.183, p. 181-188, 2013.
- REDMOND DL, KNOX DP, NEWLANDS G, SMITH W.D. Molecular cloning and characterization of a developmentally regulated putative metallopeptidase present

- in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, p.77–87, 1997.
- REDMOND DL, KNOX DP. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. **Vaccine**, v. 22, p. 4252–4261, 2004.
- REHMAN A, JASMER DP. Defined characteristics of cathepsin B-like proteins from nematodes: inferred functional diversity and phylogenetic relationships. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, p. 297-310, 1999.
- RHOADS ML, FETTERER RH, URBAN JF Jr. Release of hyaluronidase during *in vitro* development of *Ascaris suum* from the third to fourth larval stage. **Parasitology Research**, v. 87, p. 693-697, 2001.
- RHOADS ML, FETTERER RH. Extracellular matrix: A tool for defining the extracorporeal function of parasite proteases. **Parasitology Today**, v. 13, p.119-122, 1997.
- RIBAUT C, BERRY A, CHEVALLEY S, REYBIER K, MORLAIS I, PARZY D, NEPVEU F, BENOIT-VICAL F, VALENTIN A. Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. **Malaria J.**, v.7, Article number 45, 2008.
- ROGERS, W. Digestion in Parasitic Nematodes. III. The Digestion of Proteins. **Journal of Helminthology**, v. 19, p. 47-58, 1941.
- ROGERS, WP. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. **International Journal for Parasitology**, v.12, p. 495-502, 1982.
- ROSES MC, VOTERS WA, SAGELILL H, BROWNS CF, KAUFMANLI B. Effects of deglycosylation on the architecture of ovine submaxillary mucin glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 3167-3172, 1984.
- SANMAN LE, BOGYO M. Activity-based profiling of proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v, 83, p. 73-249, 2014.
- SANTAMOUR FS, MCARDLE AJ. Association of Nematodes with Dogwood Canker and stem malformations on Other Trees. **Journal of Environmental Horticulture**, vol. 5, p. 136-140, 1987.
- SATZINGER H. Theodor and Marcella Boveri: Chromosomes and cytoplasm in heredity and development. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 231-238, 2008.
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 2, p.368-79, 1987.
- SENAPATI S, DAS S, BATRA SK. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. **Trends in Biochem. Sci.**, v. 35, p. 236-245. 2010.
- SEYBOLD AC, WHARTON DA, THORNE MAS, MARSHALL CJ. Investigating trehalose synthesis genes after cold acclimation in the Antarctic nematode *Panagrolaimus* sp. DAW1. **Biol Open**. v. 6, p. 1953-1959, 2017
- SHANNON A, BROWNE J, BOYD J, FITZPATRICK D, BURNELL A. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2433-2445, 2005.

- SHATILOVICH AV, TCHESUNOV AV, NERETINA TV, GRABARNIK IP, GUBIN SV, VISHNIVETSKAYA TA, ONSTOTT TC, RIVKINA EM. Viable nematodes from late Pleistocene permafrost of the Kolyma river low land. **Doklady Biol. Sci.**, v. 480, p.100-102, 2018
- SIEW SM, RAY ST, PUTHUCHEARY SD. Enzymatic and molecular characterisation of leucine aminopeptidase of *Burkholderia pseudomallei*. **BMC Microbiology**, v. 13, Article number 110, 2013.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA, AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- SOMMER RJ, STREIT A. Comparative genetics and genomics in nematodes: Genome structure, development and life style. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 1-20, 2011.
- TANFORD C. **Physical chemistry of macromolecules**. Wiley, 1961
- TCHEREPANOVA IY, BHATTACHARYYA L, RUBIN CS, FREEDMAN, JH. Aspartic proteases from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Structural organization and developmental and cell-specific expression of *asp-1*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 26359-26369, 2000.
- THORNE MAS, SEYBOLD A, MARSHALL C, WHARTON, D. Molecular snapshot of an intracellular freezing event in an Antarctic nematode. **Cryobiology**, v. 75, p. 117-124, 2017.
- TURNER, A. J. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p. 723–727, 2003
- VAN DEN HOOGEN J, GEISEN S, ROUTH D. et al. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. **Nature**, v. 572, p 194–198, 2019.
- VOVLAS, N. et al. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on potato. **Plant pathology**, v. 54, p. 657-664, 2005
- WILLIAMSON AL, BRINDLEY PJ, ABBENANTE G, PROCIV P, BERRY C, GIRDWOOD K, PRITCHARD DI, FAIRLIE DP, HOTEZ PJ, DALTON JP LOUKAS A. Cleavage of hemoglobin by hookworm cathepsin D aspartic proteases and its potential contribution to host specificity. **FASEB Journal**, v. 16, p. 1458–1460, 2002.
- WILLIAMSON AL, BRINDLEY PJ, KNOX DP, HOTEZ PJ, LOUKAS A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 23- 417, 2003.
- WINTER CE. The yolk polypeptides of a free living Rhabditid nematode. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 103B, p. 189-196, 1992
- WOOD W. Introduction to *C. elegans* biology. In: WOOD, WB (ed.) **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. New York: Cold Spring Harbor, p. 243-335, 1988
- YEATES GW, BONGERS T, de GOEDE RGM, FRECKMAN DW, GEORGIEVA S. Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. **Journal of Nematology**, v.25, p. 315-331. 1993