

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Expressão da trealase intestinal de *Spodoptera frugiperda* e efeito de β -glicosídeos naturais em trealases de insetos

Maria Cicera Pereira da Silva

Tese de Doutorado

Orientadora: Clélia Ferreira

SÃO PAULO
2006

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Maria Cicera Pereira da
S586ex Expressão da trealase intestinal de *Spodoptera frugiperda* e
efeito de β -glicosídeos naturais em trealases de insetos / Maria
Cicera Pereira da Silva. -- São Paulo, 2006.
118p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Ferreira, Clélia

I. Expressão gênica 2. Enzimologia I. T. II. Ferreira,
Clélia, orientador

574.88 CDD

“Expressão da trealase intestinal de *Spodoptera frugiperda* e efeito de β -glicosídeos naturais em trealases de insetos”

MARIA CICERA PEREIRA DA SILVA

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

Aprovado(a) por:



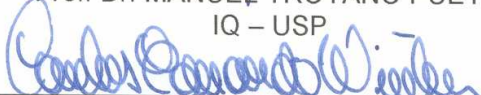
Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
(Orientadora e Presidente)



Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCÓVIA
IQ – USP



Prof. Dr. MANUEL TROYANO PUEYO
IQ – USP



Prof. Dr. CARLOS EDUARDO WINTER
ICB - USP



Prof. Dr. IVARNE LUÍS DOS SANTOS TERSARIOL
UMC

SÃO PAULO
09 DE MAIO 2006

*Aos meus pais pelo carinho e ao meu marido Edmilson pela atenção,
carinho e paciência.*

AGRADECIMENTOS

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

À Dra. Clélia Ferreira pela orientação, sempre tão cuidadosa, e pela tão valiosa amizade durante o meu mestrado.

Ao Dr. Walter Terra pelas discussões e amizade.

Aos colegas de laboratório: Alexandra Frealdo Dumont, André C. Pimentel, Augusto C. Crivellari, Daniela Beton, Èrica Moreira, Fábio Kendi Tamaki, Fernando Ariel Genta, Ivan Bragatto, João Vasconcellos de Almeida, Lucas Guerra, Marcelo Padilha, Thaís Duarte Bifano.

Aos colegas: Dra. Adriana Rios Lopes, Dr. Alcides Batista Júnior, Érica Hotz de Almeida, Dr. Alexandre H. P. Ferreira, Dr. Plínio Tadeu Cristofolletti, Dr. Sandro Roberto Marana.

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

Às minhas queridas amigas Hell, Lia, Cakes, Amandita e Fernanda pelos e-mails e jantares. À minha amiga Xan por me levar ao banco, shopping, etc.

À FAPESP pela bolsa concedida.

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

RESUMO

A trealase solúvel foi purificada a partir do intestino de *S. frugiperda*. Os pKas dos grupos catalíticos determinados por inativação química são similares aos pKas determinados por análise cinética, indicando que a enzima tem um grupo carboxila que atua como um nucleófilo e um grupo guanidina que atua como doador de prótons.

Dietil pirocarbonato não afeta a enzima, exceto na presença de M α Glu (inibidor competitivo). A modificação com DPC diminui a atividade enzimática da trealase e muda o valor do pKa do resíduo de Arg, indicando que o resíduo de His modula o pKa do doador de prótons.

Trealase tem dois subsítios para a ligação de glicose e baseado na proteção por M α Glu durante a modificação química é possível inferir que o subsítio que liga M α Glu contém o grupo carboxila, e o outro subsítio possui o resíduo de Arg que atua como grupo catalítico e o resíduo de His.

Usando diferentes estratégias nós obtivemos uma seqüência parcial do cDNA que aparentemente codifica para trealase (denominada trealase 1) e clonamos e expressamos a enzima denominada trealase 2. A trealase 2 foi expressa em B121 DE3 e purificada, sendo que suas propriedades são similares a enzima solúvel. O cDNA da trealase 1 provavelmente codifica para a trealase de membrana encontrada no intestino de *S. frugiperda*.

A trealase 2 tem 587 aminoácidos, um pepitideo sinal com 23 aminoácidos e seis possíveis sítios para glicosilação. A enzima apresenta alta identidade e similaridade (61% e 76%, respectivamente) com a trealase digestiva de *B. mori*.

Foi determinada a atividade de trealase presente na carcaça, Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, intestino e hemolinfa de *Tenebrio molitor*, *Musca domestica*, *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* na presença e na ausência de β -glicosídeos tóxicos produzidos por plantas. Os glicosídeos usados foram amigdalina, prunasina, florizina e o aglicone mandelonitrila. E a atividade das trealases de *T. molitor* e *S. frugiperda* foi determinada também na presença de esculina. Prunasina é o melhor inibidor das trealases de *T. molitor*, já para as trealases (ligadas a membrana) de *D. saccharalis* o melhor inibidor é florizina e esculina é o melhor inibidor das trealases de *S. frugiperda*.

Nós alimentamos *S. frugiperda* com uma dieta contendo 0,1% de esculina e sua presença nos tecidos foi detectada por fluorescência. Esculina foi encontrada no corpo gorduroso, Túbulos de Malpighi e hemolinfa e não foi encontrada na carcaça. A maior quantidade de esculina foi registrada na hemolinfa (0,2 mM) e as larvas alimentadas com uma dieta contendo esculina são 40% menor que as larvas alimentadas numa dieta controle. A inibição das trealases pode ser um dos fatores que leva a diminuição de peso das larvas experimentais.

As larvas de *S. frugiperda* criadas numa dieta com 0,1% de amigdalina apresenta em alguns tecidos um aumento na atividade específica de trealase o que não é observado quando as larvas são alimentadas com uma dieta com 0,1% de esculina. O aumento na atividade específica de trealase pode ser uma das razões pela qual o desenvolvimento de *S. frugiperda* não é afetado pela amigdalina presente na dieta.

ABSTRACT

A soluble trehalase was purified from *Spodoptera frugiperda* midgut. The pKas of the catalitical groups determined by chemical inactivation agrees with the ones determined by kinetical analysis, indicating that the enzyme has a carboxyl group that acts as a nucleophile and a guanidine group that is the proton donor.

Diethyl pyrocarbonate (DPC) does not affect to the enzyme, except in the presence of M α Glu (a competitive inhibitor). DPC modification decreases trehalase activity and changes the pKa value of the catalytical Arg residue, indicating that pKa of the proton donor His residue modulates.

Trehalase has two subsites for glucose binding and based on the protection by M α Glu against chemical modification it is possible to infer that the subsite that binds M α Glu contains the catalytic carboxyl, whereas the other has the catalytical Arg residue and the His residue.

Using different strategies we succeeded in obtaining a partial sequence of a cDNA that apparently codes for trehalase (called trehalase 1) and in molecular cloning and expressing the enzyme named trehalase 2. Trehalase 2, expressed in B121 DE3 cells was purified and its properties are similar to the soluble enzyme. Trehalase 1 cDNA probably codes for a membrane-bound trehalase found in *S. frugiperda* midgut.

Trehalase 2 has 587 amino acids, a signal peptide with 23 amino acids and six possible sites for glycosilation. The enzyme present higher identity and similarity (61% and 76%, respectively) to digestive trehalase of *Bombyx mori*.

Trehalase from body wall, Malpighian tubules, fat body, midgut and haemolymph from *Tenebrio molitor*, *Musca domestica*, *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis* were assayed with and without the presence of toxic glucosides produced by plants. The glucosides used were amygdalin, prunasin, phlorizin and the aglycone mandelonitrile. In addition, *T. molitor* and *S. frugiperda* trehalases were assayed with esculin. Prunasin is the best inhibitor in *T. molitor* and *M. domestica*, phlorizin in *D. saccharalis* (only membrane-bound activity) and esculin in *S. frugiperda*.

We fed *S. frugiperda* with a diet containing 0.1 % esculin and followed its fate by fluorescence. Esculin is recovered from fat body, Malpighian tubules and haemolymph. No esculin was found in body wall. The majority of esculin was recovered in haemolymph (0.2 mM) and larvae fed on esculin-containing diet weigh 40 % less than control ones. Trehalase inhibition by esculin may account for at least part of the observed decrease in larval weight.

S. frugiperda larvae reared in 0.1% amygdalin-containing diet present higher trehalase activities in several tissues than the larvae reared in 0.1% esculin-containing diet. Higher trehalase activity should be the reason why *S. frugiperda* development is affected by esculin, but is not impaired by amygdalin present in the diet.

ABREVIATURAS

DEPC	Piromcarbonato de etila
DTT	1,4 - ditiotretitol
DNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
EDC	1-etil-3-(Dimetilamino-propil) Carbodiimida
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	Fast protein liquid chromatography
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
LB	meio de cultura de Luria-Bertani
K_i	Constante de inibição
K_m	Constante de Michaelis
k_{obs}	Constante de segunda ordem
Mops	Ácido Morfolinopropanosulfônico
mU	Miliunidades
MU β gli	Metilumbiferil-beta-glicosídeo
PTC	Fenil tio ureia
rpm	Rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TDT	Terminal deoxinucleotídeo transferase
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina

TGO	Tris glicose oxidase
Tris	(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade maxima
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3indol beta D-galactopiranosídeo

INDICE

1.Introdução.....	1
1.1.Considerações gerais.....	1
1.2. O tubo digestivo dos insetos.....	3
1.3. Trealose.....	5
1.4. Trealase.....	6
1.5. Inibidores de trealases:.....	9
1.6. O sitio ativo das trealase:.....	10
1.7 Localização e papel das trealases intestinais de insetos.....	12
1.8. Estrutura molecular das trealases.....	14
1.9. β -glicosídeos de origem vegetal.....	15
1.10 <i>Spodoptera frugiperda</i>	16
1.11 Objetivos desse trabalho.....	17
2. Materiais e Métodos.....	18
2.1 Material biológico.....	18
2.1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
2.1.2 <i>Diatrea saccharalis</i>	19
2.1.3 <i>Tenebrio molitor</i>	19
2.1.4 <i>Musca domestica</i>	19
2.2. Preparação das frações solúveis e de membrana do epitélio do ventrículo.....	19
2.3. Preparação das frações de diferentes órgãos.....	20
2.3.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	20
2.3.2 <i>Tenebrio molitor</i>	21

2.3.3 <i>Musca domestica</i>	22
2.3.4 <i>Diatrea saccharalis</i>	23
2.4 Inibição de trealase por glicosídeos ou aglicones.....	24
2.5. Efeito de amigdalina e esculina presentes na dieta.....	24
2.6. Determinação da absorção de esculina:.....	25
2.7. Ensaio enzimáticos.....	26
2.8. Determinação de proteína.....	26
2.9. Purificação da trealase solúvel do epitélio do ventrículo de <i>S. frugiperda</i>	27
2.10. Purificação da trealase de membrana do epitélio do ventrículo de <i>S. frugiperda</i> ...	27
2.10.1. Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna superose 12 usando sistema	27
2.11. Experimentos de modificação química.....	28
2.12. Determinação de pK _a por modificação química.....	29
2.13. Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida (PAGE)	30
2.14. Meios de cultura para o crescimento de bactéria e tampões usados nas técnicas de biologia molecular.....	30
2.15. Extração de RNA total de intestino médio.....	31
2.16. Síntese da fita de cDNA.....	32
2.17. Purificação do cDNA.....	32
2.18. Reação com TDT.....	33
2.19. Biblioteca de cDNA do intestino de <i>S. frugiperda</i>	33
2.20. Reação em cadeia com DNA polimerase em termociclador (PCR)	34
2.21. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	34
2.22. Ligação dos fragmentos de DNA a plasmídios vetores.....	35
2.23. Preparo de bactérias competentes para transformação por choque térmico.....	36
2.24. Transformação de bactérias por choque térmico e seleção dos clones transformantes.....	36

2.25. Preparação de plasmídios a partir de cultura de bactérias.....	38
2.26. Reação de seqüenciamento de DNA.....	39
2.27. Comparação de seqüências em banco de dados e alinhamento múltiplo de seqüências.....	40
2.28. clonagem da trealase 2 em vetor de expressão.....	40
2.29. Expressão da trealase 2 recombinante.....	41
2.30. Avaliação da solubilidade da trealase 2 recombinante.....	42
2.31. Purificação da trealase 2 recombinante.....	42
2.32. Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	43
3. Resultados.....	44
3.1. O sítio ativo da trealase solúvel.....	44
3.2. Seqüenciamento e clonagem dos cDNAs codificantes das trealases intestinais de <i>S. frugiperda</i>	47
3.3. Expressão e purificação da trealase 2.....	67
3.4. Purificação da Trealase ligada à membrana do intestino médio de <i>S.frugiperda</i>	70
3.5. comparação da trealase recombinante e das duas trealases encontradas no animal.....	79
3.6. Efeito de β -glicosídeos tóxicos em diferentes trealases.....	83
3.6.1. Inibição “in vitro”.....	83
3.6.2. Efeito de esculina e amigdalina presentes na dieta de <i>S. frugiperda</i>	89
3.6.3. efeito da presença de esculina na dieta de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	92

4. Discussão.....	98
4.1. O sítio ativo da trealase intestinal solúvel.....	98
4.2. As trealases intestinais de <i>S. frugiperda</i>	98
4.3. Efeito dos β -glicosídeos de plantas em insetos.....	106
5. Referências Bibliográficas.....	110

Índice de Figuras:

Figura 1.....	24
Figura 2:.....	24
Figura 3.....	25
Figura 4.....	25
Figura 5.....	45
Figura 6.....	46
Figura 7.....	48
Figura 8:.....	49
Figura 9.....	51
Figura 10.....	52
Figura 11.....	53
Figura 12.....	55
Figura 13:.....	56
Figura 14.....	57
Figura 15:.....	59
Figura 16.....	60
Figura 17.....	61
Figura 18:.....	62
Figura 19.....	64
Figura 20.....	68
Figura 21.....	69

Figura 22.....	71
Figura 23.....	73
Figura 24.....	75
Figura 25.....	76
Figura 26.....	77
Figura 27.....	79
Figura 28.....	80
Figura 29.....	82
Figura 30.....	90
Figura 31.....	93
Figura 32.....	96
Figura 33.....	99
Figura 34.....	101
Figura 35.....	103

Índice de tabelas:

Tabela I.....	65
Tabela II.....	66
Tabela III.....	72
Tabela IV.....	81
Tabela V.....	84
Tabela VI.....	85
Tabela VII.....	86
Tabela VIII.....	87
Tabela IX.....	88
Tabela X.....	91
Tabela XI.....	94
Tabela XII.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS:

A importância dos insetos tem sido ressaltada há muito tempo, sob vários aspectos. Entretanto, ninguém reuniu dados tão contundentes e impressionantes como Grimaldi e Engel, no início do capítulo “Diversity and evolution” do seu livro ‘Evolution of the insects’ (2005). Abaixo serão relacionados e comentados alguns dados mencionados no livro.

Os insetos, junto com outros artrópodos, foram os primeiros animais a ocupar o ambiente terrestre e o fato de terem adquirido asas propiciou grande dispersão. Eles invadiram todos os nichos ecológicos, exceto a zona bentônica.

Na terra, eles sem dúvida reinam. Há quase um milhão de espécies de insetos e estima-se que o número real chegue a cinco milhões, o que atinge uma diversidade nunca vista em qualquer outro tipo de organismo.

Cerca de 85% das 250.000 espécies de angiospermas são polinizadas por insetos, principalmente por abelhas. Por outro lado, o impacto dos insetos como herbívoros eclipsa o de todos os outros animais. Há cerca de 400.000 espécies de insetos herbívoros e estima-se que cada espécie de planta tenha pelo menos uma espécie de inseto que dela se alimenta. Mesmo nas savanas africanas, repleta de mamíferos ungulados, insetos das ordens

Orthoptera, Coleoptera, Lepidoptera e Isoptera consomem mais celulose que todos os mamíferos herbívoros juntos.

como vetores de doenças pandêmicas os insetos já mataram mais seres humanos do que qualquer outro animal eucarioto. Dezenas de milhões de pessoas morreram ao longo dos tempos como resultado de seis doenças das quais insetos são vetores: febre tifóide, doença de chagas, doença do sono, malária, febre amarela e a peste.

Devido aos danos causados pelos insetos, muitos sonham com uma vida sem eles, mas isso seria completamente impossível. Enquanto a vida continuaria inafetada se todos os vertebrados fossem removidos, a vida terrestre certamente colapsaria se fossem retiradas as abelhas, as formigas e os cupins.

Conforme já mencionado, o papel das abelhas é na polinização e sem elas a maioria das angiospermas morreria.

Os cupins e as formigas têm papel muito importante no consumo de restos vegetais e em revolver o solo, com a conseqüente remineralização desse. Para mencionar um exemplo, os cupins perfazem 10% de toda a biomassa animal nos trópicos e estima-se que, nessa região, eles consomem de 50% a 100% da madeira morta nas florestas, além de ervas mortas, húmus, fungos e fezes de herbívoros.

É interessante ressaltar que com toda essa diversidade apresentada pelos insetos, não é de admirar que exista, entre muitos deles grandes diferenças fisiológicas e bioquímicas. Essas são muito maiores do que as observadas, por exemplo, entre diferentes mamíferos.

Cerca de 80% das espécies de insetos estão restritos a apenas 4 ordens: Coleoptera (besouros), Hymenoptera (abelhas e vespas) e Diptera (moscas e mosquitos) e Lepidoptera

(mariposas e borboletas). Todos os animais utilizados nessa tese pertencem a essas ordens sendo que a maior parte dela concentrou-se no estudo de enzimas de *S. frugiperda*, que é um Lepidoptera

1.2. O TUBO DIGESTIVO DOS INSETOS:

O tubo digestivo dos insetos é a maior e mais desprotegida interface entre o inseto e o meio ambiente. Devido a isso, ele é um excelente alvo para estratégias de controle dos insetos. Essas só podem ser criadas se conhecermos sua fisiologia e a bioquímica de seus componentes.

O intestino dos insetos pode ser dividido em três partes intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Fig. 1).

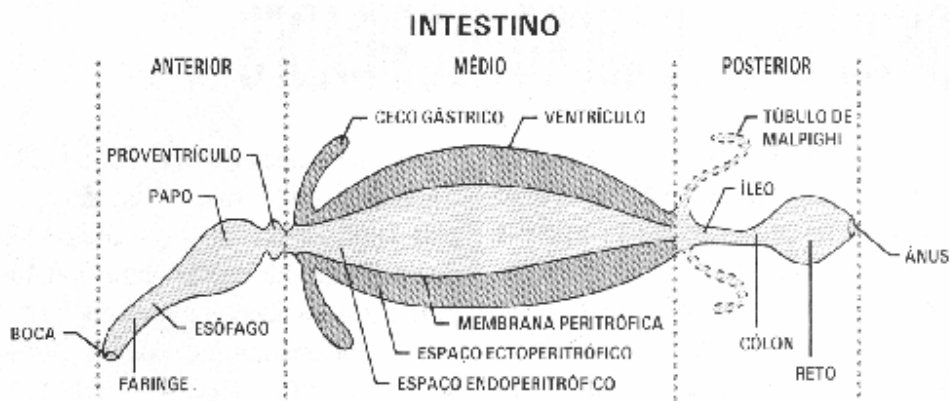


Figura 1: Esquema geral do intestino de insetos.

O intestino anterior inicia-se na boca e inclui a cavidade bucal (aonde chega a secreção da glândula salivar), a faringe, o esôfago e o papo. O papo é apenas um órgão de armazenamento em muitos insetos e em outros serve como um sítio para a digestão. Em

alguns insetos o proventrículo é um órgão triturador, já em outros serve como uma válvula que controla a entrada de alimento no intestino médio.

O intestino médio é o principal centro de digestão, em muitos insetos ele é constituído somente por um tubo simples denominado de ventrículo e em outros insetos ele possui cecos na porção anterior. O intestino médio da maioria dos insetos é recoberto por uma estrutura quitinosa a membrana peritrófica, qual separa o lúmen em dois compartimentos o espaço endoperitrófico (onde se encontra o alimento) e o espaço ectoperitrófico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio do ventrículo).

A região do esfíncter separa o intestino médio do intestino posterior, nesta região encontram-se os túbulos de Malpighi, os quais são órgãos excretórios. O intestino posterior inclui o íleo e o reto, os quais estão envolvidos na absorção de água e íons. Em muitos insetos o intestino posterior se resume a um tubo estreito e em outros insetos pode ser modificado em câmaras de fermentação abrigando microorganismos que auxiliam na digestão de celulose.

O epitélio que reveste o intestino médio é formado por uma camada simples de células de diferentes tipos. As células mais abundantes são as colunares, as quais podem apresentar diversas formas (Ribeiro et al., 1990) e estão envolvidas na absorção e secreção de água, na secreção de enzimas, absorção de nutrientes e na digestão através das enzimas ligadas às membranas microvilares. Na região basal do epitélio são encontradas células regenerativas.

Em Lepidoptera são encontradas células calciformes, as quais excretam íons de potássio que são absorvidos das folhas ingeridas pelas larvas, elas também auxiliam as

células colunares, da região anterior do intestino, na absorção de água e auxiliam as células colunares, da região posterior do intestino, na secreção de água (Terra & Ferreira, 2005).

1.3. TREALOSE:

Trealose é um dissacarídeo não redutor, o qual possui três isômeros α - α trealose, α - β trealose e β - β trealose. Unicamente α - α trealose é encontrada em materiais biológicos (Fig.2).

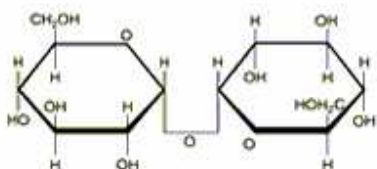


Figura 2: Fórmula estrutural da trealose. Segundo <http://www.cargil.com/sfi/>.

Trealose é usada para preservar células e tecidos durante o congelamento. Acredita-se que trealose se liga as proteínas e as membranas através de suas hidroxilas mantendo a estrutura nativa. Outra hipótese é que a trealose formaria uma matriz inerte que impediria a cristalização. Devido a esta propriedade trealose é encontrada em grande quantidade em animais que sobrevivem a baixas temperaturas ou passam por longos períodos de dissecção (Richards et al., 2002).

Trealose é essencial ao metabolismo de nemátodos, fungos e insetos sendo sua principal função fornecer energia. Nos nemátoides trealose é encontrada em todos os tecidos, estando em maior concentração nos órgãos reprodutores, músculo e hemolinfa, sendo o principal

açúcar circulante (Behm, 1997). Em fungos trealose é estocada durante os períodos de não proliferação, sendo mobilizado durante a germinação (Theveleim, 1984).

Mais recentemente verificou-se que plantas não sujeitas a dessecação também possuem trealose, numa concentração menor do que a observada naqueles vegetais. O fato de, em vegetais, a trealose ser sintetizada e simultaneamente degradada levou a suposição de um possível papel regulatório. Em alguns casos mostrou-se que aumento na expressão de trealase 6-fosfato sintase causaria alterações morfológicas ou da velocidade da fotossíntese (Wingler, 2002).

Em insetos, como em nematódas, trealose é o principal açúcar circulante. Trealose é sintetizada no corpo gorduroso, órgão que nos insetos desempenha a função de fígado e tecido adiposo. A síntese de trealose é estimulada por neuropeptídeos liberados pela corpora cardíaca. Para promover a síntese de trealose os neuropeptídeos inibem a glicólise e ativam a hidrólise do glicogênio para a produção de glicose, a qual será usada para sintetizar trealose (Becker et al., 1996).

1.4. TREALASE:

A síntese de trealose é catalisada por duas enzimas: a trealose 6- fosfato sintase, e trealose 6-fosfato fosfatase. A primeira catalisa a reação de síntese de trealose 6- fosfato a partir de glicose 6-fosfato e UDP-glicose. Nem atividade de trealose 6-fosfato sintase e nem nenhum gene que a codifique foi encontrado em mamíferos. A trealose 6-fosfato fosfatase, a qual catalisa a reação que produz trealose a partir de trealose-6-fosfato, não foi

encontrada em mamíferos, nematódas ou insetos, acredita-se que a reação possa ser catalisada por uma das fosfatases com especificidade ampla presentes no organismo. A enzima que catalisa a hidrólise de trealose a duas moléculas de glicose é denominada trealase e atividade de trealase tem sido encontrada em insetos, fungos, nematódas e mamíferos (Fig.3), (Pellerone, 2003).

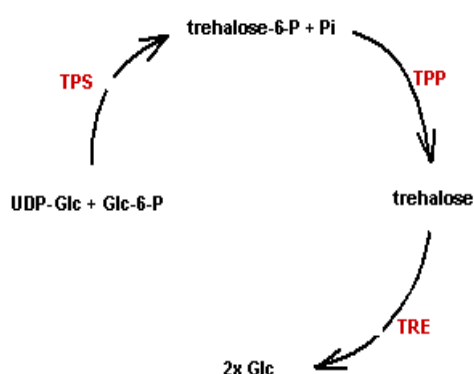


Figura 3: Esquema do metabolismo de trealose. UDP-Glc: uridina difosfato glicose, Glc-6-P, glicose 6-fosfato, TPS: trealose 6- fosfato sintase, TPP: trealose 6-fosfato fosfatase, TRE: trealase.

A atividade de trealase tem sido demonstrada em vários tecidos de um grande número de nematódas, contudo nenhuma trealase de nematódas foi purificada ou teve suas propriedades estudadas a fundo (Behm, 1997).

As trealases de fungo são classificadas como neutras quando possuem pH ótimo entre 6,0 e 7,5, ou ácidas quando possuem o pH ótimo entre 3,5 e 5,5. Não há evidências que

demonstrem que as trealases ácidas sejam reguladas por fosforilação. Já as trealases neutras são ativadas devido a fosforilação por uma proteína quinase dependente de AMPc (Theveleim, 1984). As trealases neutras estão localizados no citossol tendo K_m entre 4,4 e 80 mM, enquanto as trealases ácidas estão localizadas no vacúolo ou são secretadas e tem um K_m relativamente baixo entre 1,4 e 4,7 mM (Behm, 1997).

Como já foi dito anteriormente, em insetos trealose é o principal açúcar circulante tendo como principal função fornecer energia. A concentração de trealose na hemolinfa dos insetos é usualmente 10 a 20 vezes maior que a de glicose no sangue dos mamíferos (Becker et al., 1996). Como com a clivagem de trealose pode se produzir duas moléculas de glicose, o estoque de açúcar presente na hemolinfa é grande. Uma vez que a produção de glicose a partir de trealose é obtida pela ação da trealase, essa enzima é essencial ao metabolismo dos insetos, sendo encontrada em praticamente todos os seus órgãos e na hemolinfa (Bounias et al., 1993). A trealase pode ocorrer ligada às membranas mitocondriais ou microsossomais nos músculos e no intestino médio é encontrada solúvel ou ligada a fração de membrana (Terra & Ferreira, 2005).

Trealases parcialmente ou completamente purificadas do intestino de insetos tem pH ótimo entre 4,8 e 6,0; K_m entre 0,33 e 1,1 mM; pI em torno de 4,6 e massa molecular entre 60 e 138 kDa (Terra e Ferreira, 2005).

Na hemolinfa de *Periplaneta americana* (Orthoptera) e *Bombyx mori* (Lepidoptera) foi encontrado um inibidor protéico da trealase. (Hiraoka et al., 1995). Já a trealase presente no corpo gorduroso de insetos (que é um órgão que desempenha as funções de fígado e tecido adiposo) é ativada diretamente por um peptídeo semelhante à insulina que pode ser isolado de corpo gorduroso ou cérebro de insetos (Bounias et al., 1993).

Em mamíferos a trealase é encontrada no intestino e nos rins. A trealase digestiva, que ocorre ligada às membrana microvilares dos enterócitos, só é importante quando grande quantidade de trealose é ingerida (Van Beers et al., 1995). Por isso mesmo, deficiência dessa enzima raramente é diagnosticada e pode ser maior do que a estimada. O fato de trealose estar sendo usada como aditivo na preparação de alimentos secos (Murray et al., 2000), pode fazer com que muitas pessoas que antes não ingeriam esse açúcar passem a fazê-lo, tornando a trealase intestinal de humanos importante na digestão, e um maior alvo de estudos. A trealase presente nas microvilosidades das células epiteliais do túbulo renal não tem um papel claro, uma vez que o sangue não apresenta trealose (Van Beers et al., 1995). RNAm de trealase foi também detectado no pâncreas e foi descrito um aumento na trealase urinária em certos problemas renais. Assim propõe-se que ela poderia ser usada como diagnóstico desses problemas. Essa enzima também se eleva em pacientes com diabetes (Ishihara et. al., 1997).

É de se estranhar que a trealase, sendo uma enzima importante para o metabolismo de tantos grupos de organismos tenha sido tão pouco estudada. Provavelmente isso ocorreu por ela não ter importância nos mamíferos.

1.5. INIBIDORES DE TREALASES:

A aplicação de inibidores de trealases em insetos tem demonstrado a importância da trealase para o seu metabolismo.

Quando treazolina, inibidor competitivo de trealase, é aplicado em *Locusta migratória* numa dose de $36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ leva a morte de 50% dos insetos em menos de 24 horas. A inibição da trealase leva ao aumento da concentração de trealose e a diminuição da concentração de glicose hemolinfática. Acredita-se que o inseto morre devido a hipoglicemia que levaria a falência do sistema nervoso (Wegener et al., 2003).

Quando suidatrestina, um inibidor de trealase, é injetado em altas doses em *Spodoptera littoralis* causa aumento da mortalidade e afeta o crescimento do inseto (Knuesel et al., 1998). Já validoxyamina A, também um inibidor de trealase, apresenta o mesmo efeito com doses menores quando aplicado em *Bombyx mori* (Kono et al., 1993), *Mamestra brassicae* e *Spodoptera litura* (Kono et al., 1994a). Em *Periplaneta americana* validoxylamina A impede o vôo, indicando que a trealase presente nos músculos também é inibida (Kono et al., 1994b).

1.6. O SÍTIO ATIVO DAS TREALASE:

Como as trealases não têm repetições de seqüências, provavelmente elas contêm somente um sítio ativo. Pouco se conhece sobre o sítio ativo das trealases de qualquer fonte e não se sabe quais os aminoácidos envolvidos em catálise. Trealases são invertases, ou seja, catalisam a hidrólise de trealose com a inversão do carbono anomérico (Fig. 4). O mecanismo de catálise proposto tem sido a catálise ácido-base feita por duas carboxilas, da mesma forma que ocorre em outras glicosidases (Asano et al., 1996)

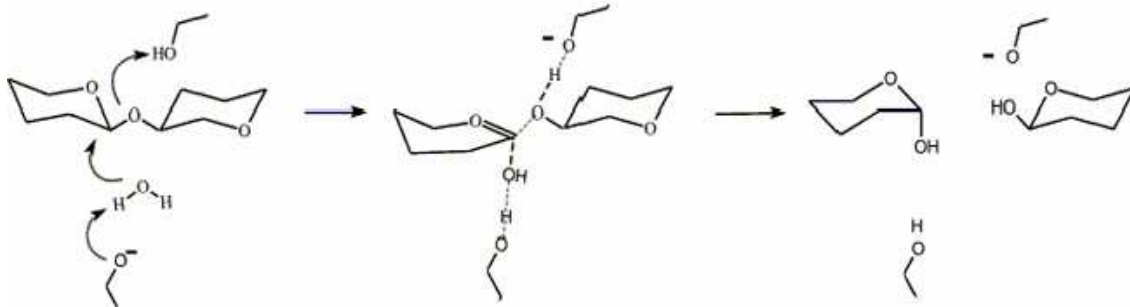


Figura 4: Mecanismo pelo qual trealases hidrolisam trealose. Segundo <http://www.cm.utexas.Edu/robertus/>.

Nakano e Sacktor (1994) e Chen e colaboradores (1987) postulam que tanto a trealase renal de coelho quanto a trealase renal de rato tem o sítio ativo formado por dois subsítios. A trealase renal de coelho é inibida por florizina, β -glicosídeo produzido por plantas e seu aglicone floretina.

Estudos com a trealase solúvel do intestino de *R. americana* indicaram dois grupos no sítio ativo que os autores suspeitam ser carboxilas. Os pKas determinados através de modificação química para estes dois grupos são de 5,3 e 8,8 já os pKas obtidos por métodos cinéticos são 5,0 e 7,7. Portanto, a carboxila que tem o pKa determinado por modificação química (5,3) similar ao pKa determinado por métodos cinéticos (5,0) provavelmente está envolvida em catalise. Os autores acreditam que o outro grupo carboxila provavelmente não está envolvido em catalise já que há uma grande diferença entre o pKa determinado por modificação química (7,7) e o pKa obtido por métodos cinéticos (8,8), e porque não havia

proteção da modificação química pela presença do substrato (Terra et al., 1978, 1979a). Os autores acreditam que este grupo carboxila deve estar próximo ao sítio ativo e que participe da catálise interagindo com um outro aminoácido, talvez His (Terra et al, 1979a). Uma indicação que His possa participar da ação das trealases é a ocorrência de inativação da enzima por DEPC encontrada na trealase de *Lymantria díspar* (Valaitis & Bowers, 1993) e de *A. mellifera* (Lee et al., 2001).

Lee e colaboradores (2001) determinaram que os pKas dos grupos envolvidos em catalise na trealase de *A. mellifera* são 5,3 e 8,5 e, através da entalpia de ionização dos grupos e seu comportamento frente alteração na constante dielétrica do meio, eles concluem que os grupos catalíticos provavelmente são carboxilas.

Resultados obtidos anteriormente com a trealase solúvel presente no intestino médio de *S. frugiperda* (Silva, 2004), mostraram por modificação química a presença de um carboxilato e de um resíduo de arginina. Os pKas obtidos por modificação química do grupo carboxila e do resíduo de arginina são similares aos pKas determinados para os grupos envolvidos em catálise usando métodos cinéticos.

Em todas as glicosidases em que os grupos envolvidos em catálise foram determinados, nunca sugeriu-se a presença de arginina, sendo que na maioria dos casos ocorrem dois grupos carboxila (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Entretanto, utilizando a enzima solúvel presente no intestino médio da larva do coleoptera *T. molitor*, o mesmo tipo de resultados foram encontrados (Gomez, Marana, Terra e Ferreira, manuscrito em preparação), ou seja, a modificação de um resíduo de arginina leva a inativação da enzima e o pKa desse grupo modificado tem o mesmo valor que o obtido para o doador de prótons usando métodos cinéticos. Para nos certificarmos da presença desse grupo também na enzima de *R. americana*,

utilizamos a fração solúvel do tubo digestivo (que contém uma só trealase) e verificamos que a enzima perde atividade após modificação com fenilglioal (resultados não mostrados).

1.7 LOCALIZAÇÃO E PAPEL DAS TREALASES INTESTINAIS DE INSETOS:

Na maior parte dos insetos a trealase é solúvel, mas em alguns predominam enzimas ligadas à membrana, como nos Diptera *Trichosia pubescens* e *Musca domestica*, onde elas são encontradas como enzimas integrantes das microvilosidades (Espinoza-Fuentes et al., 1984 e 1987). No Lepidoptera *Erinnyis ello*, a trealase é restrita às células e não aparece no lúmen intestinal, mas ela não é uma proteína integrante de membrana, encontrando-se adsorvida ao glicocálix das células intestinais (Santos et al., 1986).

Em outro Lepidoptera, *Bombyx mori* a atividade sobre trealose foi descrita na fração solúvel e particulada. Azuma & Yamashita (1985) encontram a trealase particulada em frações microssomais e postularam que a enzima estaria ligada a membrana baso-lateral dos enterócitos, uma vez que incubando o tecido com trealose marcada no lado hemolinfático obtinha glicose radioativa no interior das células. Recentemente, Mitsumasu et al. (2005) utilizaram anticorpos contra a trealase solúvel e particulada desse mesmo inseto e encontraram a trealase solúvel na cavidade das células caliciformes e a de membrana na musculatura visceral.

As trealase solúveis são encontradas tanto no espaço ectoperitrófico, como em *T. molitor* (Terra et al., 1985) como no espaço endoperitrófico como em *R. americana* (Terra et al., 1979b).

Algumas trealases solúveis tiveram suas propriedades estudadas, enquanto nada se conhece sobre as trealases ligadas a membrana.

O papel da trealase intestinal solúvel ou presente nas microvilosidades é controverso. Há muito tempo foi proposto que a função dessa enzima seria quebrar em duas moléculas de glicose a trealose que se difundiria da hemolinfa. A glicose assim formada seria novamente levada a hemolinfa a favor de gradiente (Wyatt, 1967) A trealase intestinal de *R. americana* é solúvel e está presente no espaço ectoperitrófico (Terra et al., 1979b). Terra & Ferreira (1981), submetem a jejum e realimentaram larvas de *Rhynchosciara americana*, fazendo medidas da atividade de várias enzimas digestivas, tais como amilase, tripsina, aminopeptidase e trealase. As enzimas digestivas diminuem ao longo do jejum e sua atividade aumenta novamente quando as larvas são realimentadas. O mesmo comportamento é observado para a trealase, o que não seria de se esperar caso seu papel fosse o de impedir a difusão da trealose da hemolinfa para o lúmen intestinal. Os autores determinaram a quantidade de trealose na hemolinfa, e verificaram que ela era constante, indicando que o nível de difusão seria o mesmo. Esses resultados indicam que a trealase seria uma enzima verdadeiramente digestiva. Entretanto, a hipótese aventada por Wyatt ainda aparece bastante em trabalhos sobre trealases.

1.8. ESTRUTURA MOLECULAR DAS TREALASES:

As glicosídeo hidrolases podem ser divididas em famílias baseado na similaridade entre as seqüências (Henrissat, 1991). Como o dobramento de uma proteína é mais conservado que sua seqüência, dentro de uma família as proteínas possuem estrutura terciária e mecanismo de catálise semelhantes (Henrissat & Bairoch 1993). As famílias com

estruturas semelhantes foram posteriormente agrupadas em clãs (Henrissat & Romeu, 1995). Atualmente as glicosídeo hidrolases são agrupadas em 104 famílias e 14 clãs (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

Trealases se encontram na família 37 e na família 65. A família 37 só possui trealases e não há nenhum componente dessa família em que a estrutura tridimensional ou os grupos envolvidos em catálise tenham sido determinados. A família 65, possui apenas cinco trealases, e além delas, maltose fosforilase, kojiobiose fosforilase e trealose fosforilase. Para esta família o doador de prótons é um glutamato e o nucleófilo um fosfato. Os grupos catalíticos foram encontrados através da cristalização da maltose fosforilase de *Lactobacillus brevis*. A estrutura encontrada nos membros desta família consiste de um domínio sanduíche β na região N-terminal, um barril $(\alpha/\alpha)_6$ como domínio catalítico, e um domínio de folhas β na região C-terminal (Egloff et al., 2001).

As trealases de insetos até então seqüenciadas são: a trealase digestiva e a trealase da glândula acessória do macho de *T. molitor* (Coleoptera); a trealase da glândula de veneno de *Pimpla hipochondriaca* (Himnoptera); a trealase solúvel e a trealase de membrana do intestino de *B. mori* e a trealase do ovário de *B. mori* (Lepidoptera). Todas as trealases de insetos seqüenciadas até o momento fazem parte da família 37.

Com o advento dos projetos para o sequenciamento do genoma de alguns insetos é possível também encontrar ORFs que teoricamente codificam trealases em *Apis mellífera*, *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*, e as ORFs encontradas até o momento também produziriam enzimas pertencentes a família 37.

A única trealase recombinante expressa até o momento é a trealase renal humana (Ishihara, 1997), a qual foi expressa em bactéria e não foi usada em estudos posteriores.

1.9. β -GLICOSÍDEOS DE ORIGEM VEGETAL:

A maioria dos insetos fitófagos bem sucedidos só apareceram após a evolução das angiospermas. Devido ao fato dos insetos e plantas terem co-evoluído por pelo menos 150 milhões de anos e pelo fato dos insetos apresentarem alta taxa reprodutiva e curto ciclo de vida, algumas relações bem estreitas entre insetos e vegetais se desenvolveram.

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

Entre os compostos tóxicos produzidos pelas plantas estão os β -glicosídeos tóxicos que podem ser fenólicos, cianogênicos ou de outro tipo. Essas substâncias podem estar presentes em concentrações que variam de 0,5 a 1% do peso seco do órgão vegetal que o sintetiza (Spencer, 1988). Os glicosídeos cianogênicos são muito abundantes, sendo produzidos por mais de 2.500 espécies de plantas (Zagrobelny et al., 2004).

Os glicosídeos tóxicos possuem um monossacarídeo (chamado de glicone),

geralmente uma glicose, ou um dissacarídeo, ligado a uma porção que não é um carboidrato. Toda a parte da molécula além do monossacarídeo presente na porção não redutora do glicosídeo é chamada de aglicone. O aglicone é bastante variável, mas geralmente é uma região com estrutura carbônica complexa e hidrofóbica (ver Spencer, 1998). Após a ação de uma β -glicosidase, uma glicose é removida e o aglicone é liberado. Assim como a estrutura molecular dos aglicones é variada também é variada a estrutura das cetonas ou aldeídos formados após a liberação do cianeto do aglicone de β -glicosídeos cianogênicos. Isso levou Spencer (1998) a sugerir que cetonas derivadas dos aglicones podem auxiliar a defesa das plantas em adição ao cianeto. Essa hipótese é reforçada pelo fato de observar-se que muitos insetos toleram quantidades moderadas de cianeto desintoxicando-se com a enzima rodanase (Zagrobelny et al., 2004).

Embora vários estudos tenham sido feitos sobre os efeitos dos glicosídeos de plantas nos insetos e sobre o modo pelo qual os insetos reagem a esses compostos, o conhecimento sobre o assunto ainda é limitado e pouquíssimas generalizações podem ser feitas. Isso talvez se deva a grande diversidade de glicosídeos encontrada nos vegetais, assim como a grande diversidade de insetos existentes. Quanto maior for o conhecimento nessa área, mais formas de combate aos insetos podem ser desenvolvidas.

1.10 SPODOPTERA FRUGIPERDA:

O principal organismo estudado aqui é a larva do Lepidoptera *Spodoptera frugiperda*. Ela é conhecida como a lagarta do cartucho do milho (folhas novas, ainda

enroladas no centro da planta), ou largata militar. As lagartas recém emergidas alimentam-se das folhas mais novas do milho. Atacam todas as folhas centrais, destruindo as completamente (Gallo et al., 1988).

No Brasil, ela é a principal praga do milho, e causa prejuízo significativo na cultura de algodão (www.biocontrole.com.br). Entretanto, ela também pode atacar alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata doce, cana de açúcar, hortaliças, soja e trigo (Pashley, 1988).

1.11 OBJETIVOS DESSE TRABALHO:

Nosso laboratório tem como um dos objetivos gerais, estudar trealases intestinais de insetos. Esse estudo pretende abordar caracterização cinética, expressão heteróloga, determinação de grupos envolvidos em catálise através de mutação sitio dirigida e marcação com reagentes químicos (seguido de seqüenciamento da proteína), cristalização e obtenção da estrutura tridimensional.

Essa tese tem como objetivo clonar os cDNAs e expressar pelo menos uma trealase intestinal de *S. frugiperda*, concluir a caracterização da trealase intestinal solúvel presente nesse animal e verificar o papel dos β -glicosídeos produzidos por plantas em trealases e no crescimento de insetos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

2.1.1. *SPODOPTERA FRUGIPERDA*:

Larvas da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram criadas de acordo com o método de Parra (1986). As larvas eram acondicionadas individualmente em tubos de vidro com uma dieta à base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), germen de trigo, levedo e ágar e mantidas sob um fotoregime natural (verão 14L:10E; inverno 10L:14E) a 25°C. Para as larvas criadas com amigdalina ou esculina foi adicionada a dieta citada a cima 0,1 % do β -glicosídeo correspondente. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel 10%. Para os experimentos foram utilizadas larvas do quinto instar de ambos os sexos com o intestino repleto de alimento.

2.1.2. *DIATRAEA SACCHARALIS*:

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

As larvas de *Diatraea saccharalis* são criadas em dieta artificial à base de gérmen de trigo, farelo de soja, sacarose, sais de Wesson, Nipargin, ácido ascórbico, cloreto de colina, formol 0,03%, vita gold, antibióticos tetrex ou tetraciclina, solução vitamínica, agar e água destilada (Parra & Mihsfeldt, 1992). Foram utilizados insetos do último estágio larval que apresentava o tubo digestivo repleto de alimento. Para as larvas criadas na presença de esculina, foi adicionada a dieta citada a cima 0,1 % de esculina.

2.1.3. *TENEBRIO MOLITOR*:

Uma cultura do besouro da farinha *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) é mantida em laboratório em farelo de trigo sob condições naturais de luz a uma temperatura média de 25°C e umidade relativa de 70-75 %. Foram utilizadas larvas com desenvolvimento próximo ao último estágio larval e com o intestino médio repleto de alimento.

2.1.4. *MUSCA DOMESTICA*:

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

2.2. PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E DE MEMBRANA DO EPITÉLIO

DO VENTRÍCULO:

As larvas de *S. frugiperda* foram imobilizadas em gelo, e dissecadas em NaCl 125 mM. O epitélio do ventrículo das larvas de *S. frugiperda*, após remoção da membrana peritrófica com o conteúdo, foi extensivamente lavado com salina e a seguir homogeneizado com água bidestilada em Potter-Elvehjem (10 movimentos por pistilo). O homogeneizado foi então congelado e descongelado três vezes, sendo que, numa destas vezes ele permaneceu congelado por 24 horas. Após tal procedimento, o homogeneizado foi centrifugado a 20.000g durante 30 minutos e numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o estudo da forma solúvel da trealase, enquanto o precipitado foi novamente homogeneizado em água bidestilada e utilizado no estudo da trealase ligada à membrana.

2.3. PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DE DIFERENTES ÓRGÃOS:

2.3.1 SPODOPTERA FRUGIPERDA

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados 3 lotes com 10 animais em cada lote.

Para coletar a hemolinfa procedeu-se da maneira descrita a seguir: foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a seguir a hemolinfa foi coletada e foi adicionado PTC para ficar numa concentração de 5 mM, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante coletado. Depois, as larvas foram dissecadas em NaCl 125 mM, e foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente, homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e

descongelados três vezes sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4^oC durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000g durante 10 minutos a 4^oC; o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.3.2. *TENEBRIO MOLITOR*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados três lotes de animais com 10 animais em cada lote.

Larvas de *Tenebrio molitor* foram imobilizadas em gelo, foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a seguir a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma suspensão 10 mM de PTC, a hemolinfa foi centrifugada a 9.000g a 4^oC durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado

As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 343 mM gelada, e foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi e epitélio do ventrículo foram separadamente homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes, sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.000g a 4^oC durante trinta

minutos, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso e a carcaça passaram pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante do corpo gorduroso foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura, enquanto a carcaça foi homogeneizada em água bidestilada com homogenizador Omni-mixer, com 6 pulsos de 30 segundos cada, com 5.000 rpm, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.3.3. *MUSCA DOMESTICA*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados 3 lotes de animais com 10 animais em cada lote.

As larvas de *Musca domestica* são lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e imobilizadas em gelo. A seguir foi realizado um pequeno corte para que a hemolinfa extravasasse, a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma suspensão de 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 150 mM gelada. Foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente, homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três

vezes, sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 25.000g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.3.4. *DIATRAEA SACCHARALIS*:

Para realizar os experimentos de inibição das trealases por substâncias tóxicas produzidas pelas plantas foram usados três lotes de animais com 20 animais em cada lote.

As larvas de *Diatraea saccharalis* são lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e imobilizadas em gelo, a seguir foi realizado um pequeno corte no corpo do animal para que a hemolinfa extravasasse, a hemolinfa foi coletada e foi adicionado um volume de uma suspensão de 10 mM de PTC, a hemolinfa foi então centrifugada a 9.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi então coletado.

As larvas foram dissecadas sob estereomicroscópio em solução de NaCl 125 mM gelada. Sendo que, foram retirados os seguintes órgãos: Túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, carcaça, epitélio do ventrículo e membrana peritrófica juntamente com seu conteúdo. Os túbulos de Malpighi, carcaça e epitélio do ventrículo foram, separadamente homogeneizados com água bidestilada em Potter-Elvehjem, congelados e descongelados três vezes sendo que uma delas teve duração de 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a

20.000 g a 4°C durante trinta minutos, o sobrenadante foi então coletado enquanto o precipitado foi reomogeneizado em água bidestilada. O corpo gorduroso passou pelo mesmo processo, contudo o sobrenadante foi filtrado em lã de vidro para retirar o excesso de gordura.

A membrana peritrófica mais o conteúdo luminal foram homogeneizados em água, centrifugados a 9.000 g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado enquanto o precipitado foi descartado.

2.4 INIBIÇÃO DE TREALASE POR GLICOSÍDEOS OU AGLICONES:

Amostras de tecidos foram incubadas com trealose, com um dos β -glicosídeos, ou com trealose mais cada um dos β -glucosídeos. A glicose produzida nos ensaios com β -glicosídeos foi descontada da quantidade de glicose produzida nos ensaios com trealose mais o mesmo glicosídeo. Esse procedimento é necessário porque β -glicosidases presentes nesses tecidos podem hidrolisar os β -glicosídeos gerando glicose, o que mascararia o resultado da inibição da trealase.

2.5. EFEITO DE AMIGDALINA E ESCULINA PRESENTES NA DIETA:

Para esses experimentos foram usados três lotes com 10 animais em cada, os quais foram alimentados com uma dieta controle. E 3 lotes com 10 animais em cada, os quais foram alimentados com uma dieta com 0,1 % de amigdalina.

Nos experimentos com esculina foram usados seis lotes com 8 animais em cada, três foram alimentados com uma dieta controle e três lotes foram alimentados com uma dieta contendo 0,1 % de esculina (3mM).

As frações dos diferentes órgãos de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* alimentadas com glicosídeo foram preparadas como descrito nos itens 2.3.1 e 2.3.4, respectivamente.

Todas as amostras foram utilizadas para determinação de trealase.

Nos experimentos com esculina, antes dos tecidos serem congelados e descongelados por três vezes e centrifugados, a quantidade de esculina presente em cada um deles foi detectada por fluorescência. Para isso, utilizou-se um comprimento de onda de excitação de 366 nm e detectou-se a emissão em 432 nm.

A possível existência de substâncias endógenas fluorescentes nesse comprimento de onda foi verificado e, quando detectada, ela foi subtraída dos valores experimentais.

2.6. DETERMINAÇÃO DA ABSORÇÃO DE ESCULINA:

A absorção de esculina pode ser seguida porque ela é fluorescente, mas seus produtos de hidrolise não são. Para estudar absorção de esculina, larvas foram crescidas em dietas contendo 0,1% de esculina. Os animais foram dissecados como descrito anteriormente, os tecidos coletados e homogeneizados. Esculina fluorescente foi detectada em um espectro fluorímetro Hitachi (F-2000) com um comprimento de onda de excitação de 366 nm e a emissão a 432 nm. Larvas controle foram usadas para descontar fluorescência endógena. Três grupos de larvas foram usadas nas determinações.

Para calcular a quantidade de esculina presente no conteúdo do ventrículo, nós usamos o peso médio da membrana peritrófica mais o conteúdo e consideramos que esculina corresponderia a 0,1% desse peso, porque essa é a concentração de esculina na dieta. Alternativamente, nós medimos a fluorescência presente numa massa da dieta contendo esculina igual a massa da membrana peritrófica mais conteúdo.

2.7. ENSAIOS ENZIMÁTICOS:

A detecção da atividade enzimática foi realizada incubando-se a mistura da reação em banho-maria termostático (30°C) por diferentes períodos de tempo. Controles sem enzima (brancos de substrato) e controles sem substrato (brancos de enzima) foram incubados do mesmo modo que os experimentais, ensaios foram realizados na velocidade inicial da reação enzimática.

A atividade enzimática sobre trealose, amigdalina (glicose β -1,6 glicose β mandelonitrila), prunasina (glicose β -mandelonitrila), florizina (glicose β -floreína) e esculina (glicose β -esculetina) foi determinada medindo a liberação de glicose de acordo com Dahlqvist (1968). Exceto quando indicado, os ensaios foram feitos em tampão citrato fosfato 25 mM pH 6,0 contendo 7 mM de trealose, ou 0,5 mM de amigdalina, prunasina, mandelonitrila e esculina ou 0,05 mM de florizina. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que hidroliza 1 μ mol de substrato por minuto.

2.8. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA:

A determinação da concentração de proteína presente na amostra foi feita utilizando o método descrito por Smith et al. (1985) e modificado por Morton & Evans (1992), usando uma curva padrão de albumina sérica bovina; ou o descrito por Bradford (1976) usando uma curva padrão de albumina de ovo.

2.9. PURIFICAÇÃO DA TREALASE SOLÚVEL DO EPITÉLIO DO VENTRÍCULO DE *S. FRUGIPERDA*:

A trealase solúvel foi purificada após submeter a fração solúvel do epitélio do intestino médio, sequencialmente, a cromatografia de troca iônica em coluna High Q; cromatografia hidrofóbica em coluna Econo-Pac methyl HIC, cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isopropyl. A descrição detalhada desses procedimentos estão em Silva et al. (2004), exceto pela troca de tampão trietanolamina por imidazol.

2.10. PURIFICAÇÃO DA TREALASE DE MEMBRANA DO EPITÉLIO DO VENTRÍCULO DE *S. FRUGIPERDA*:

A fração de membrana foi obtida como descrito no item 3.2, a seguir ela foi reomogeneizada e a amostra foi centrifugada a 20.000x g durante 30 minutos à 4°C.A

amostra foi então purificada como descrito para a trealase solúvel do intestino de *S. frugiperda*, com exceção de que as frações que constituíam o pico de atividade eluído, da cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl, foram reunidas e aplicadas numa cromatografia em filtração em gel, como descrito abaixo.

2.10.1. CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA EM COLUNA SUPEROSE 12 USANDO SISTEMA FPLC:

As frações que constituíam o pico de atividade sobre trealose eluído da cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isopropyl foram reunidas e a seguir concentradas em “Microcon Centrifugal Filter Devices YM-10” (Millipore) segundo as recomendações do fabricante.

As proteínas foram eluídas da coluna com tampão imidazol 20 mM pH 7,5 com 11,92 mM de MnCl₂. A cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 ml/min e foram coletadas frações de 400 µl. Os tampões foram preparados com água MilliQ e desareados.

2.11. EXPERIMENTOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA:

A enzima foi dialisada contra tampão Temed 100 mM, pH 6,0 e 11,92 mM de MnCl₂ durante três horas. A seguir a amostra foi incubada com EDC 6 mM, Glicina etil éster 40

mM e Temed 100 mM a 30°C. A reação de modificação foi interrompida em diferentes tempos com tampão citrato 1,0 M pH 6,0.

Outra fração da amostra dialisada foi incubada a 30°C com DEPC numa concentração final de 3 mM e a reação de modificação foi interrompida em diferentes tempos com histidina 6 mM.

A trealase foi dialisada com Mops 100 mM pH 8,0 durante 3 horas; a seguir a enzima foi incubada a 30°C com fenilglioxal numa concentração de 12,5 mM e a reação foi interrompida em diferentes tempos com citrato 1,0 M pH 6,0.

As reações de modificação foram repetidas na presença de trealose na concentração igual a 10 K_m. As reações de modificação foram repetidas também na presença de metil- α -glicopiranosídeo (inibidor competitivo da enzima) numa concentração igual a 2 K_i.

A seguir, as amostras submetidas à modificação por EDC, DEPC e fenilglioxal (na presença e na ausência de trealose e metil- α -glicopiranosídeo) foram utilizadas para determinar a atividade enzimática remanescente.

2.12. DETERMINAÇÃO DE pK_a POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA:

Para verificar o pK_a dos grupos modificados por fenilglioxal ou EDC, foram realizadas modificações em diferentes pHs. O pK_a foi calculado usando a equação abaixo, com k'_{obs}, k''_{obs} e pK_a estimado pelo programa Enziffiter.

$$k_{obs} = \frac{k'_{obs}}{1 + K_a/[H^+]} + \frac{k''_{obs}}{1 + [H^+]/K_a}$$

onde k_{obs} é a constante de segunda ordem observada, K'_{obs} é a constante de segunda ordem aparente para a modificação da espécie protonada e k''_{obs} é a constante de segunda ordem aparente para a modificação da espécie desprotonada.

Para determinar a influência do pH na inativação por fenilglioxal foi utilizado tampão MOPS 400 mM (pH 7-8) e tampão borato 400 mM (pH 8-9). Os k_{obs} foram calculados a partir da porção linear da curva obtida a partir do plote Log da atividade enzimática remanescente versus tempo. A enzima é estável em todos os pHs.

2.13. ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE):

Amostras previamente secas em um concentrador a vácuo foram ressuspensas em tampão de amostra contendo Tris HCl 60 mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); EDTA 0,5 mM; β -mercaptoenol 0,36 mM, glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,005 % (p/v). Sendo que, tanto o gel quanto o tampão de corrida não possuíam SDS.

Os géis de poliacrilamida 12 % ou 7,5 % foram preparados segundo Laemmli (1970). A separação eletroforética foi feita em voltagem constante.

O gel foi lavado quatro vezes por 15 minutos com tampão citrato fosfato 20 mM pH 6,0. A seguir, o gel então coberto por um papel de filtro embebido em 10 mM de Metil-umbeliferil beta-D-glicosídeo dissolvido no tampão citado acima, e permaneceu durante 1 minuto a 30°C, as bandas foram então visualizadas no transiluminador de luz UV (312 nm).

2.14. MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DE BACTÉRIA E TAMPÕES USADOS NAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR:

Os meios de cultura para o crescimento de células e os tampões utilizados nas técnicas de biologia molecular foram preparados como descrito por Sambrook et al. (1989).

2.15. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE INTESTINO MÉDIO:

Para a extração de RNA total das células do intestino médio de *S.frugiperda*. dois animais foram dissecados e os epitélios do intestino médio separados e lavados em salina (NaCl 2 %) preparada em H₂O-DEPC. Esse cuidado foi tomado com o intuito de evitar a ação de RNases. Durante a dissecação o material era estocado em tubos de microcentrífuga mergulhados em banho de gelo-seco em etanol e, ao final, estocados a -80 °C.

Os epitélios foram então homogeneizados em Potter-Elvehjem em 1,0 ml de Tryzol (Gibco). O homogeneizado obtido foi transferido para um ependorf autoclavado e permaneceu por 5 min a temperatura ambiente com o objetivo de permitir a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. A amostra foi então centrifugada (12.000x g; 10 min; 4 °C), o sobrenadante foi coletado e foi adicionado a ele 0,2 ml de clorofórmio. O tubo foi agitado

vigorosamente e deixado na bancada a temperatura ambiente por 3 minutos. A seguir, ele foi centrifugado (12.000x g; 15 min; 4⁰C) para a separação de duas fases: uma inferior vermelha (orgânica) e outra superior e incolor (aquosa) onde se encontra o RNA total. A fase aquosa foi coletada e a ela adicionado 0,25 ml de isopropanol e 0,25 ml da solução de precipitação (1,2 M NaCl e 0,8 M de citrato trissódico dissolvidos em água DEPC). Este material foi deixado a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, centrifugado (12.000x g; 10 min; 4⁰C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75 % (v/v). Foi adicionado 1 ml de etanol 75% a amostra foi centrifugada (12.000x g; 15 min; 4⁰C) o sobrenadante foi removido, e a lavagem foi repetida mais uma vez. Em seguida este material foi seco sob fluxo de ar em uma capela e, finalmente, o RNA total dissolvido em 100 µl de H₂O-DEPC. O grau de pureza e a quantidade de RNA da amostra era avaliada através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.16. SÍNTESE DA FITA DE cDNA:

Para sintetizar a primeira fita de cDNA a partir do RNAm purificado foi usado o Kit “SuperScrip First strand synthesis system for RT” (Invitrogen).

Foi utilizado 5 µg do RNA total, e este foi misturado a 10 mM de dNTP mix e 0,5 µg de oligo (dT). A seguir a amostra foi incubada a 75⁰C por 10 minutos e foi adicionado a amostra 10X Rtbuffer, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT e 1 unidade de RNaseOUT (inibidor recombinante de RNase). A seguir a amostra foi incubada a 42⁰C por 2 min, foram adicionadas 50 unidades de Super Script II RT (transcriptase reversa) e a amostra foi

incubada novamente a 42°C por 90 minutos, para que a enzima transcrevesse o RNAm a DNA. Para finalizar a reação a amostra foi incubada a 70°C por 15 minutos, e a seguir foi adicionado 1 unidade de RNaseH (para destruir o RNAm) e a amostra foi incubada por 20 minutos a 37°C.

2.17. PURIFICAÇÃO DO cDNA:

Antes de proceder a amplificação do DNA alvo a amostra foi purificada através do PCR Purification Kit (250) (Quiagen). À amostra foi adicionada 5x tampão de ligação. A mistura foi colocada numa mini-coluna de troca iônica, centrifugada por vinte segundos, para lavar a coluna foi adicionado 750 µl de tampão de lavagem e a coluna foi centrifugada por vinte segundos, a operação de lavagem foi repetida . Para eluir o cDNA foi adicionada a coluna água MilliQ pH 7,0 e a coluna foi centrifugada por 30 segundos.

2.18. REAÇÃO COM TDT:

Para adicionar uma cauda de poliA na extremidade 5' do cDNA foi adicionado a 25 µl de cDNA buffer para TDT, 0,2 mM de dATP e 10 unidades de TDT. A amostra foi incubada durante 1 minuto a 37°C e a seguir removida imediatamente para o gelo. A amostra foi novamente purificada, como descrita a cima. A seguir foi realizado PCR para amplificar o DNA alvo.

2.19. BIBLIOTECA DE cDNA DO INTESTINO DE *S. FRUGIPERDA*:

Para construir a biblioteca de cDNA o RNA total foi extraído do epitélio do intestino da larva de *S. frugiperda* e enviado a Stratagene. O RNA foi dividido em duas amostras iguais e usado para a síntese de cDNA, a qual foi realizada utilizando-se o iniciador poli T e um iniciador aleatório. Esta estratégia foi usada para aumentar a probabilidade de ambas extremidades 5' e 3' do cDNA estarem representadas. Finalmente, os dois conjuntos de cDNA foram misturados (1:1) e inseridos não direcionalmente no vetor λ ZAP II. O título da biblioteca é $1,2 \times 10^{10}$ pfu/ml (Marana, 2001).

2.20. REAÇÃO EM CADEIA COM DNA POLIMERASE EM TERMOCICLADOR (PCR):

Para as reações de PCR utilizamos a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), em reações de 50 µl contendo oligonucleotídeos 2 µM, dNTPs 0,2 mM (para cada nucleotídeo), Tampão da Taq platinum DNA polimerase, MgCl₂ 1,5 mM e DNA molde em concentração variável. As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer) com desnaturação inicial por 2 minutos (RT-PCR) ou 10 minutos quando a amostra era a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda*. Em seguida eram realizados mais 30 ciclos como descrito a seguir: 30 segundos a 94 °C, para a desnaturação da dupla fita do DNA; 45 segundos em uma temperatura de associação dos iniciadores (escolhida de acordo com os iniciadores usados) e finalmente, 2 minutos a 72 °C para alongamento da fita

complementar de DNA. Para o cálculo da temperatura de pareamento dos iniciadores foi utilizada a seguinte equação: $T_1(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{A}+\text{T}) + 4(\text{G}+\text{C})$.

2.21. ELETROFORE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Para analisar os fragmentos de DNA derivados da amplificação com PCR foram feitas eletroforeses em gel de agarose. Os géis foram preparados na concentração final de 1 % (p/v) de agarose em tampão TAE (Tris-Acetato 8 mM, EDTA 0,4 mM, pH 8,5) e as amostras de DNA eram resolvidas em uma diferença de potencial de 80-100 V.

Ao material a ser separado por eletroforese foi adicionado um tampão de amostra (0,1 volumes da amostra) contendo azul de bromofenol. Este último era usado para monitorar a migração da amostra e determinar o encerramento da eletroforese. Após a eletroforese, o DNA era evidenciado utilizando-se brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado em transiluminador de luz UV (312 nm). Os fragmentos de DNA foram recuperados diretamente dos géis de agarose usando um protocolo de extração do Kit Gel extraction kit (250) (Qiagen), o qual baseia-se na dissolução da agarose em um tampão de alta força iônica e ligação do DNA a uma resina de troca iônica.

2.22. LIGAÇÃO DO FRAGMENTOS DE DNA A PLASMÍDIOS VETORES:

Para a clonagem de fragmentos de DNA obtidos de ampliações por PCR, utilizando o Kit de Ligação “pGEM-T Easy vector Sistem” (Promega). Foi usada uma

mistura de reação que consistia de 1 unidade de T4 DNA ligase, tampão apropriado, plasmídeo (pGEM-T) e o produto de PCR (purificado do gel de agarose); o plasmídeo e o produto de PCR foram usados numa concentração de 1:3. Essa mistura foi incubada por 16h a 4⁰C. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias competentes.

Para inserir fragmentos de DNA ao vetor pET-28a, tanto o inserto quanto o vetor foram digeridos com *Bam*HI e *Ned*I, purificados do gel de agarose e a seguir foram misturados numa proporção de seis volumes de inserto para um volume de vetor sendo adicionado uma unidade de T4 DNA ligase (Gibco) e tampão apropriado.

A amostra foi incubada a 16°C por 16 horas e a seguir usada para transformar bactérias competentes.

2.25. PREPARO DE BACTERIAS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO:

Uma colônia isolada da *Escherichia coli* da linhagem XL1-blue MRF^r foi crescida em meio LB-liquido durante 16h, a 37⁰C e sob agitação de 250 rpm. Em seguida 400 ml de LB liquido eram inoculados com 4 ml desta cultura inicial e mantidos nas mesmas condições anteriores de crescimento até que se atingisse uma DO₆₀₀ = 0,5. As células eram então transferidas para tubos de centrífuga previamente resfriados e mantidas no gelo por 10 minutos. Em seguida eram sedimentadas por centrifugação (1.600x g; 5 min; 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células era ressuscitado em 40 ml de solução previamente autoclavada de CaCl₂ 0,1 M. As células permaneciam no gelo por

pelo menos uma hora. Esse material era novamente precipitado por centrifugação (1.000x g; 5 min; 4°C), as células eram ressuspensas em 1 ml de solução de CaCl₂, era adicionado glicerol numa concentração final de 15%, as células eram alíquotadas e mantidas a -80 °C. Estas alíquotas continham as células prontas para a transformação.

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo de bactérias competentes de *E. coli* da linhagem BL21 DE3, as quais foram usadas para a expressão da trealase 2.

2.26. TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS POR CHOQUE TERMICO E SELEÇÃO DOS CLONES TRANSFORMANTES:

As bactérias da linhagem XL1-blue MRF' de *Escherichia coli*, previamente preparada como descrito no item 2.25, foram transformadas com uma construção que consistia de um produto de PCR ligado ao vetor pGEM-T (item 3.19) como descrito a baixo.

O volume total do meio de reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor (item 2.22) era adicionado a 100 µl/ml de células competentes e mantido em gelo por 30 min. Em seguida as células eram submetidas a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e retornavam ao gelo por mais 2 minutos. Adicionava-se então 0,5 ml de LB-liquído e as células eram mantidas a 37°C por 1h para a recuperação e expressão do gene de resistência a ampicilina (presente no plasmídeo “pGEM-T Easy vector” usado na transformação). Em seguida, as células eram plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml) e IPTG/Xgal (eram adicionados 40 µl de IPTG 100 mM e 40 µl Xgal 50 mg/ml às placas LB-

ágar de 100 mm que eram espalhados com uma alça de Drigalski sobre a superfície da placa) e mantidas a 37⁰C durante 16 h. As bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o inserto cresciam nestas placas originando colônias brancas.

Para a transformação das células da linhagem BL21 DE3 de *E. coli* com a construção pET-28a-tre2 o volume total do meio de reação de ligação dos fragmentos ao plasmídeo vetor era adicionado a 100 µl/ml de células competentes e mantido em gelo por 30 min. Em seguida as células eram submetidas a um choque térmico a 42⁰C por 45 segundos e retornavam ao gelo por mais 2 minutos. Adicionava-se então 0,5 ml de LB-líquido e as células eram mantidas a 37⁰C por 1h. As células eram plaqueadas em LB-ágar contendo kanamicina (20 µg/ml) para selecionar as colônias com inserto.

2.27. PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIOS A PARTIR DE CULTURA DE BACTÉRIAS:

Os plasmídios foram preparados a partir de 3 ml de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, usando o protocolo “Wizard Miniprep” (Promega). As bactérias eram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 10 mM e RNase A 100 µg/ml. Em seguida, realizava-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1 % (p/v) e a solução neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 1,32 M, pH 4,8. Esta mistura era centrifugada (10.000x g; 5 min; temperatura ambiente) e o sobrenadante aplicado em uma mini-coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna era lavada com tampão acetato 80 mM,

EDTA 40 μ M e etanol 55 % (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente, o plasmídeo era eluído da coluna com água MilliQ. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

Para a preparação de plasmídios em larga escala, utilizou-se 100 ml de cultura de bactérias, crescidas em meio líquido, usando o Kit “Plasmid Midi Kit” (Quiagen). As bactérias eram precipitadas por centrifugação 6.000x g por 15 minutos à 4°C e sedimentadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 10 mM e RNase A 100 μ g/ml. Em seguida, realizava-se uma lise alcalina usando uma solução de NaOH 0,2 M e SDS 1 % (p/v). A solução era então neutralizada pela adição de uma solução de acetato de potássio 3,0 M, pH 5,5. Esta mistura era incubada no gelo por 20 minutos e centrifugada (20.000x g; 30 min; 4°C), o sobrenadante era recentrifugado e aplicado em uma coluna contendo uma resina de troca iônica. A coluna era lavada com uma mistura de tampão MOPS 50 mM, pH 7,0; NaCl 1,0 M e isopropanol 15 % (v/v) para a retirada do material contaminante. Finalmente, o plasmídeo era eluído da coluna com uma mistura de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 1,25 M e isopropanol 15 % (v/v). O plasmídeo era então precipitado com a adição de isopropanol seguida de centrifugação (15.000x g; 30 min; 4°C). O sedimento foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado (10.000x g; 30 min; 4°C). Após a centrifugação o precipitado secou por 10 minutos a temperatura ambiente e a seguir foi dissolvido em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo EDTA 1 mM. O rendimento e a pureza da amostra de plasmídeo eram avaliados através de determinação da absorbância a 260 nm e 280 nm.

2.28. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA:

Para o seqüenciamento de DNA foi utilizado o procedimento que se baseia no método de interrupção da reação de polimerização do DNA com o uso de didesoxiribonucleotídeos (Sanger et al., 1977). A reação de seqüenciamento foi realizada usando 100 µg de DNA molde, 3 µl de iniciador na concentração de 3.3 pmol/µl, 2 µl de Big Dye, 3 µl de Save Money, completando com água para um volume de 15 µl. As reações foram realizadas em um termociclador em um método de 35 ciclos que consistia de incubações seqüenciais de: 45 segundos a 96⁰C; 30 segundos a 50⁰C; 4 minutos a 60⁰C. Ao final, o DNA foi precipitado com etanol de acordo com a orientação do fabricante, e ressuspenso em tampão para a aplicação no seqüenciador automático.

2.29. COMPARAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS EM BANCO DE DADOS:

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos obtidas neste trabalho foram comparadas com outras seqüências de trealase depositadas em bancos de dados. Para isso foi feita uma consulta ao “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). onde foi utilizado o programa de alinhamento de seqüências blastX quando era analisada a seqüência de nucleotídeos e o programa blastP quando a seqüência analisada era de aminoácidos. (Altschul et al., 1990).

2.30. CLONAGEM DA TREALASE 2 EM VETOR DE EXPRESSÃO:

Os produtos de PCR, obtidos como descrito no item 3.17 foram ligados no vetor pGEM-T, que faz parte do pGEM-T easy vector Kit (Promega) utilizando-se as recomendações do fabricante. A ligação foi utilizada para a transformação de XL1 blue seguida de seleção com kanamicina 20µg/ml.

Os insertos dessas construções foram excisados pela digestão com *Bam*HI e *Ned*I e clonados no vetor de expressão pET-28a previamente linearizado com *Bam*HI e *Ned*I. A clonagem no vetor pET-28a está em fase na porção aminoterminal com uma seqüência do vetor que codifica seis resíduos de histidina. As construções obtidas foram usadas para transformar as bactérias *E. coli* da linhagem XL1 blue, os plasmídios foram isolados a partir de algumas colônias e submetidos a digestão com *Bam*HI e *Ned*I para verificação do sucesso da clonagem. Foram selecionados clones para a preparação do plasmidio em maior escala e transformação de bactérias visando a expressão da proteína recombinante.

2.31. EXPRESSÃO DA TREALASE 2 RECOMBINANTE:

Para expressão da trealase 2 recombinante foi utilizada a cepa BL21 DE3. Após a transformação (item 2.26), um clone foi pré-inoculado em 3ml de meio LB contendo 20 µg/ml de kanamicina e crescido a 37°C por uma noite a 225 rpm. Em seguida 2ml do pré-inoculo foi diluído em 50 ml de LB contendo antibiótico nas mesmas proporções, sendo

incubada a 37°C. Quando a cultura atingiu DO_{600nm}=0,6, uma alíquota de 1 ml foi retirada (cultura não induzida), submetida á centrifugação a 7.700 xg por cinco minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactérias ressuspense em 50 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE (Tris 50 mM, pH 6,8; DTT 25 mM; glicerol 10% (v/v); SDS 1 % (p/V) e azul de bromofenol 0,025 (p/v)) e fervido durante cinco minutos.

Em seguida, IPTG (isopropil β-D-tiogalactosídeo) foi adicionado a cultura para a concentração final de 1 mM e alíquotas de suspensão bacteriana (cultura induzida) foram retirados em intervalos de 1 hora durante 4 horas (incubação a 37°C). As amostras coletadas da cultura induzida (1,0 ml) foram processadas como descrito acima, exceto que o sedimento de bactérias foi ressuspense em 100 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras das culturas não induzido e induzida foram armazenadas a -20°C até sua utilização.

Em alguns experimentos a indução com IPTG foi realizada em diferentes temperaturas, 20, 25 e 37°C. As induções a 37°C e 25°C foram realizadas como citado acima. Já quando a indução foi realizada a 20°C, após a indução com 1mM de IPTG a cultura foi incubada durante 16 horas a 20°C e 225 rpm.

2.32. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA TREALASE 2 RECOMBINANTE:

Após indução da expressão da trealase 2 com IPTG 1 mM em diferentes temperaturas (20, 25 e 37°C), o sedimento bacteriano correspondente a 50 ml de cultura foi

coletado e ressuspenso em 3 ml de tampão de lise (Imidazol pH 7,0 100 mM). A suspensão foi submetida à sonicação com 3 pulsos de 15 segundos cada, posição três com intervalos de incubação por 1 minuto em gelo entre cada pulso. O lisado foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e o sedimento ressuspenso em 3 ml de tampão de lise. Alíquotas do sobrenadante e do sedimento foram analisados em SDS-PAGE como descrito no item anterior.

2.33. PURIFICAÇÃO DA TREALASE 2 RECOMBINANTE:

O sobrenadante obtido no item 2.32 foi diluído cinco vezes em NaCl 150 mM e aplicado numa cromatografia de afinidade usando a coluna HisTrap FF 1 ml em sistema de baixa pressão. A coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 contendo NaCl 0,5 M e imidazol 20 mM para retirar as proteínas que não interagiram com a coluna, e as proteínas que permaneceram retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 20 a 500 mM de Imidazol.

Nesta cromatografia foi utilizado um fluxo de 1,0 ml/min e foram coletadas frações de 1,0 ml que serviram como material para ensaios enzimáticos.

2.34. ELETROFORESE EM PLACA DE GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE):

Amostras previamente secas em um concentrador a vácuo foram ressuspensas em tampão de amostra contendo Tris HCl 60 mM pH 6,8; SDS 2,5% (p/v); β -mercaptoetanol 0,36 mM; EDTA 0,5 mM; glicerol 10 % (v/v) e azul de bromofenol 0,005 % (p/v). Antes da aplicação no gel as amostras eram fervidas.

Os géis de poliacrilamida 12 % e SDS 0,1 % foram preparados segundo Laemmli (1970). A separação eletroforética foi feita em voltagem constante. As proteínas foram visualizadas por coloração com prata (Blum et al., 1987) ou por Comassie Blue (Colligan et al, 1995).

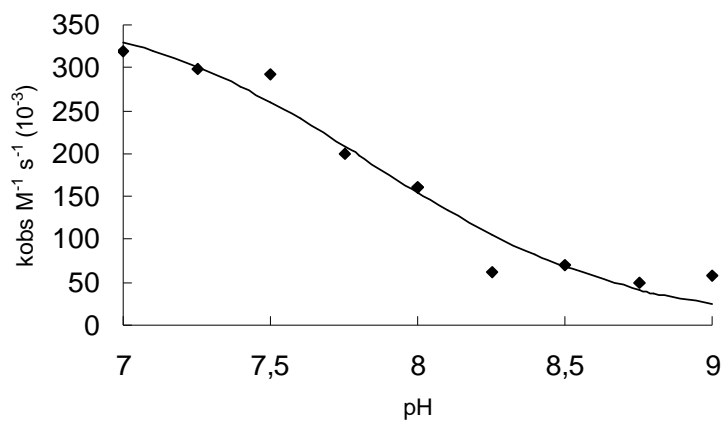
3. RESULTADOS

3.1. O SÍTIO ATIVO DA TREALASE SOLÚVEL:

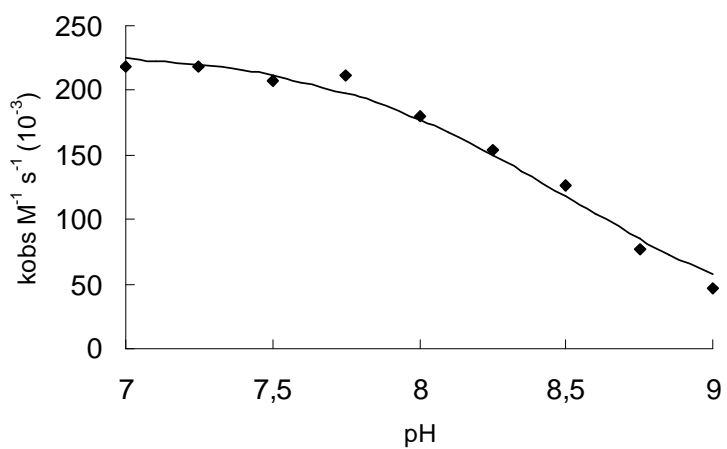
Com o intuito de terminar a caracterização da trealase solúvel de *S. frugiperda*, alguns experimentos foram realizados para verificar o papel do resíduo de His detectado no sítio ativo e o efeito do inibidor metil- α -glicopiranosídeo na exposição do grupo carboxila e do resíduo de arginina catalítico.

A enzima modificada por DEPC, que reage com o resíduo de His retém 50% de sua atividade. Comparação do K_m apresentado por essa enzima ($0,45 \pm 0,04$ mM) com o da enzima não modificada ($0,47 \pm 0,04$ mM) mostrou que ele não se altera. Entretanto o k_{cat} , determinado no pH ótimo, diminui duas vezes. Nós determinamos o pK do resíduo de Arg na enzima normal e na modificada por DEPC (Fig. 5) e verificamos que ele muda de 7,9 na normal para 8,5 na modificada. Quando se compara as curvas do efeito de pH na atividade dessas enzimas (Fig. 6), observamos um deslocamento dos valores da região alcalina para pHs mais elevados. Esses resultados indicam que o papel do resíduo de His presente no sítio ativo é modular o pKa do grupo doador de prótons, provavelmente um resíduo de arginina.

O mesmo tipo de resultado é observado quando se estuda a trealase solúvel presente no tubo digestivo da larva do coleoptera *T. molitor* (Gómez, Marana, Terra & Ferreira, manuscrito em preparação).



A



B

Figura 5:

A: Efeito do pH na inativação da trealase por fenilgloxal.

B: Efeito do pH na inativação da trealase previamente modificada por DEPC, por fenilgloxal. As constantes de segunda ordem (k_{obs}) foram calculadas a partir das constantes de primeira ordem da modificação por fenilgloxal.

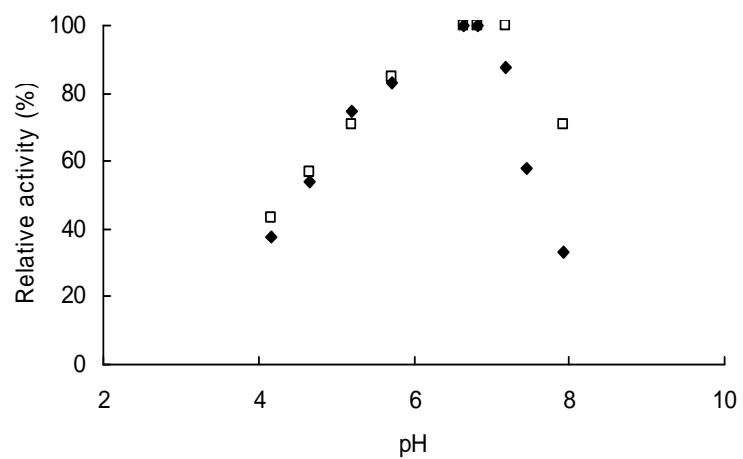


Figura 6: Determinação do pH ótimo da enzima não modificada (◆) e da enzima modificada (□) por DEPC. O experimento foi realizado a 30°C e foi utilizado tampão citrato fosfato 100 mM (pH 5,0 - 7,0) e tampão fosfato 100 mM (pH 7,0 - 8,0).

Uma vez que a ligação de metil- α -glicopiranosídeo ao sítio ativo da enzima expõe o resíduo de histidina, nós realizamos modificações químicas com fenilglioxal e EDC na presença do glucosídeo para verificar se havia algum efeito na reatividade do resíduo de Arg ou do grupo carboxila catalítico. Quando a enzima foi modificada com EDC (modifica resíduos de carboxila) na presença de metil- α -glicopiranosídeo houve a proteção completa da modificação, o que não ocorre quando a enzima é modificada com EDC na presença de 10 K_m de trealose (Fig. 7). Quando a enzima foi modificada por fenilglioxal na presença metil- α -glicopiranosídeo o k_{obs} aumentou de 0,15 para 0,2 $M^{-1}s^{-1}$ (Fig. 8).

3.2. SEQÜENCIAMENTO E CLONAGEM DOS cDNAs CODIFICANTES DAS TREALASES INTESTINAIS DE *S. FRUGIPERDA*:

Duas seqüências codificantes de trealases foram encontradas utilizando material preparado a partir do intestino médio de *S. Frugiperda*.

Inicialmente, foi extraído RNA total do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*. A partir do RNA total foi transcrita a fita de cDNA usando um iniciador que alinha com a cauda de poli A do RNAm. Foi realizado um PCR usando como amostra o cDNA sintetizado e iniciadores criados a partir de seqüências conservadas de trealases de insetos, um dos iniciadores foi construído para amplificar a região que codifica a porção N-terminal da proteína (PC1: 5'-GAGTTTTACTACTGGGATTC-3') e outro foi construído para amplificar a região que codifica a porção C-terminal da proteína (PC2: 5'-CATTGTACTTCCAAACAT-3'). O produto do PCR foi analisado

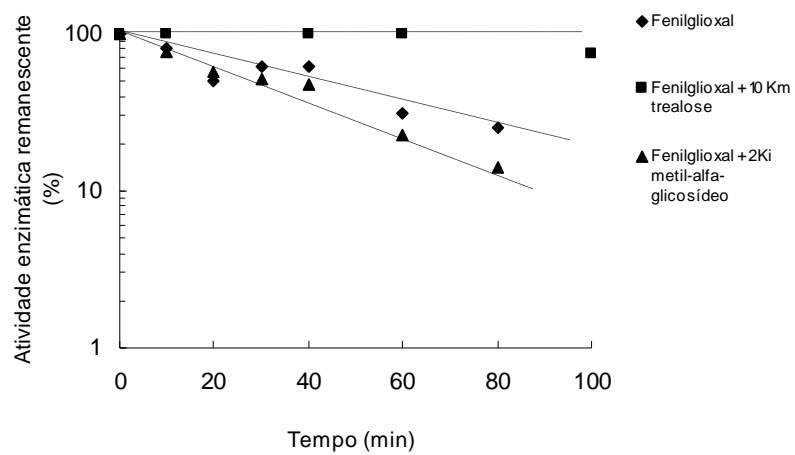


Figura 8: Modificação da trealase por fenilgloxiol a 30°C. O experimento foi realizado na ausência (◆) e presença (■) de trealose numa concentração igual a 10 K_m e na presença de (▲) metil- α -glicosídeo numa concentração igual a 2 K_i .

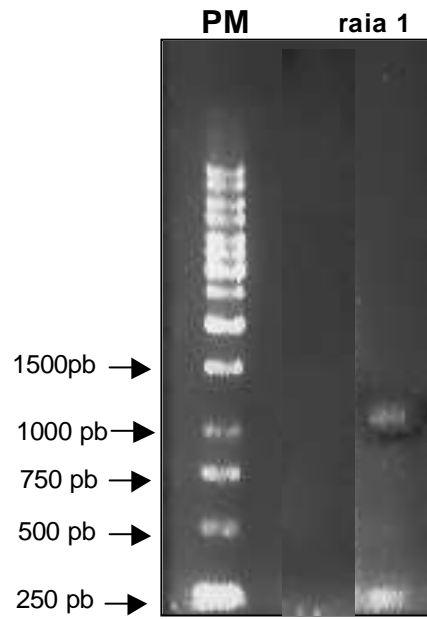


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR. PM: padrões de peso molecular; raia 1: produto de PCR gerado a partir do cDNA de *S. frugiperda*. Para o PCR foram utilizado dois primers construídos a partir de seqüências conservadas de trealases (PC1, PC2).

em gel de agarose 1% e foi obtida uma única banda de 1.000 pb (Fig.9). A amostra foi então extraída do gel e inserida no plasmídio pGEM-T. Bactérias competentes (XL1 blue) foram transformadas com plasmídio e os plasmídios foram isolados a partir de 3 ml de cultura de bactérias crescidas em meio líquido, usando o “Kit wizard miniprep”. O plasmídio foi digerido com *EcoRI* e através do gel de agarose foi verificado que o plasmídio continha um inserto de 1.000 pb. O inserto foi seqüenciado e através do programa blastX foi verificado que a seqüência obtida tinha alta similaridade e identidade com trealases, essa seqüência foi denominada de trealase 1.

Foram criados iniciadores específicos a partir da seqüência encontrada: o iniciador Tre1.1: 5’GATGAGAAGTCCCACCCTGA 3’ (o qual foi criado para amplificar a porção que codifica a região N-terminal da proteína) e o iniciador Tre1.2: 5’CACATCCACACCTTGGACAG3’ (o qual foi criado para amplificar a porção que codifica a região C-terminal da proteína)

Esses iniciadores foram utilizados em PCRs feitos como descrito anteriormente mas não conseguimos amplificar nenhuma seqüência. Devido a isso, esses mesmos iniciadores foram utilizados, juntamente com os iniciadores T3 e T7 para realizar o PCR tendo como amostra a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* (Fig. 10). Com a visualização dos produtos de PCR através do gel de agarose 1% foi possível verificar que tanto usando o iniciador Tre 1.2 com o iniciador T3 ou com o iniciador T7 obteve-se uma única banda de DNA (Fig. 11), as amostras foram extraídas do gel, o material foi inserido em plasmídios, bactérias foram transformadas e os insertos isolados e seqüenciados como descrito a cima. Nenhum dos clones seqüenciados possuía como inserto a porção que codifica a região N-

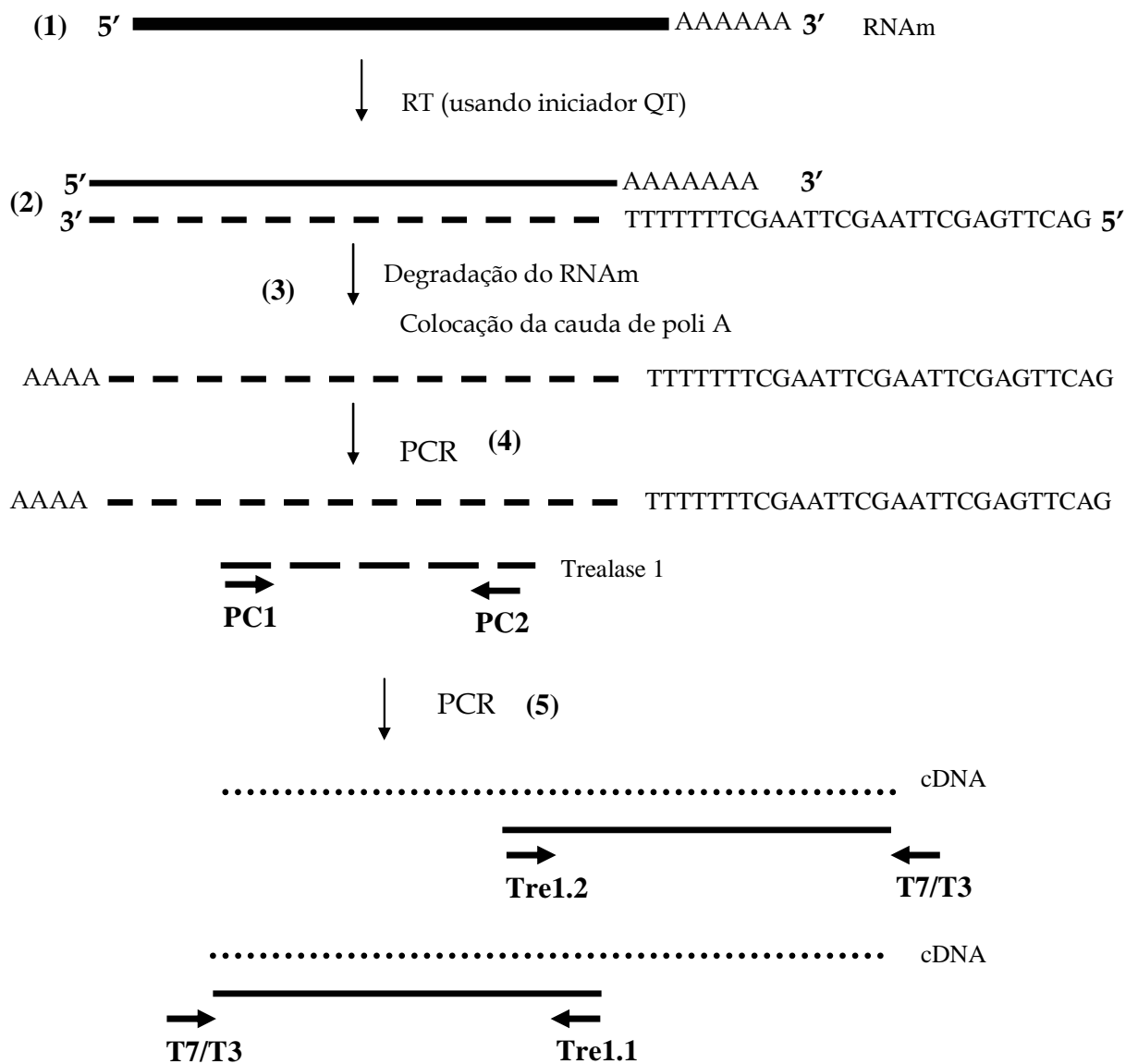


Figura 10: Representação esquemática da clonagem do cDNA correspondente a trealase.

- (1) RNAm do epitélio do intestino das larvas de *S. frugiperda*.
- (2) O RNA foi utilizado como molde para a síntese da fita de DNA complementar.
- (3) A este cDNA foi adicionado uma cauda de poli A na extremidade 3'.
- (4) Amplificação por PCR do fragmento que corresponde a trealase 1.
- (5) PCR usando iniciadores específicos criados a partir da sequência da trealase 1 e tendo como amostra a biblioteca do intestino de *S. frugiperda*.

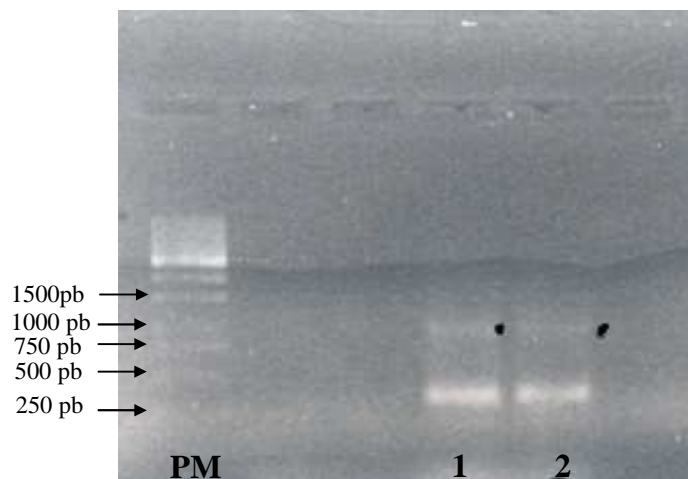


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizados com a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* raia: 1, iniciador Tre1.1 e T3; 2, iniciador Tre1.1 e T7. PM, padrão de peso molecular.

terminal da trealase 1. Já usando o iniciador Tre 1.1 com o iniciador T3 ou com o iniciador T7 visualizou-se no gel de agarose somente uma banda com cerca de 1.000 pb (Fig.12), as bandas foram extraídas do gel, foram realizados os procedimentos descritos acima e um dos clones seqüenciados possuía como inserto a porção que codifica a região C-terminal da trealase 1.

A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos correspondente a trealase 1 está mostrada na figura 13. Nós ainda não obtivemos a seqüência completa da proteína, mas pode-se verificar que a proteína possui uma seqüência hidrofóbica na região C-terminal e também um sítio Omega que pode indicar uma inserção na membrana através de uma âncora de GPI (foi utilizado o programa GPI-SOM). A Tre1 possui ainda três sítios para N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr).

Na tentativa de completar a seqüência da Tre1, os iniciadores PC1 e PC2, desenhados baseando-se em seqüências consenso de trealases de inseto e que já haviam sido utilizados anteriormente, foram utilizados juntamente com os iniciadores T3 e T7 (quais alinham com a seqüência do braço do fago) e a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda*. A análise dos produtos das reações em gel de agarose 1% mostrou que somente quando utilizou-se o iniciador PC2 e o iniciador T3, houve amplificação da seqüências de nucleotídeos (Fig. 14).

O cDNA com cerca de 1.100 pb foi extraído do gel, clonado no vetor pGEM-T, usando bactérias XL1blue para a produção da construção em larga escala, o plasmídeo foi purificado e seqüenciado. A seqüência foi comparada a outras depositadas no banco de dados utilizando-se o programa blastX. A seqüência tem alta similaridade com trealases, e como era diferente da seqüência já obtida foi denominada trealase 2.

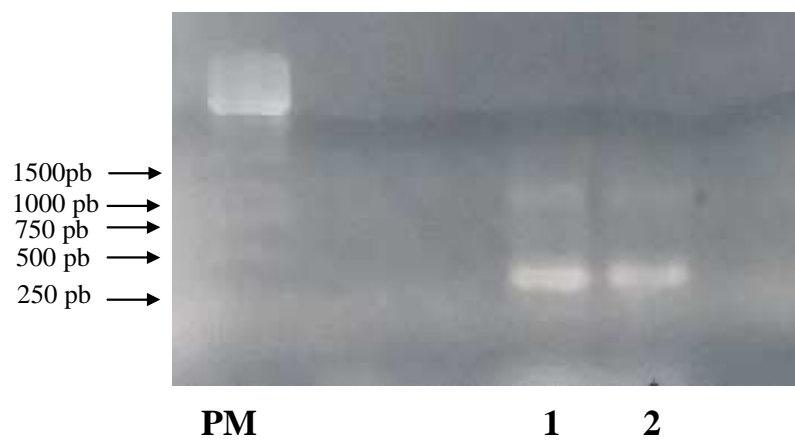


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizados com a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* raia: 1, iniciador Tre1.2 e T3; 2, iniciador Tre1.2 e T7. PM, padrão de peso molecular.


```

1   atgagggccaccgcccggggcatggctccaacttcatggacatcgctcgagaggatcggc
1   M R A T A R G M V S N F M D I V E R I G
61  ttcattcccaacggaggcaggatatactatgctatgagatcacagcctcccctcctaatt
21  F I P N G G R I Y Y A M R S Q P P L L I
121 cccatggtgaaactaattctggatgacatggatgacatcgagttcctgagacaacacatc
41  P M V K L I L D D M D D I E F L R Q H I
181 cacaccttggacagagagtagtactggatgaccaaccacactattgaagtcaacct
61  H T L D R E Y D Y W M T N H T I E V N H
241 aatgggcatagatacactttagcgggtactacgaccagtcacaaggaccccggtcgtgag
81  N G H R Y T L A R Y Y D Q S Q G P R P E
301 agttacaaggaagacggttgatgctcgccagacatttcgacacaaatgacaagaaggaaga
101 S Y K E D V D V A R H F D T N D K K E E
361 ttgtatgctgaattgaaagccgcggtgagtcagggtgggacttctcatccagacggttc
121 L Y A E L K A A A E S G W D F S S R R F
421 attctcaatggcaccacaaggaacctaacgaacctgaaaacccgggtccatcatcccg
141 I L N G T N K G N L T N L K T R S I I P
481 gtcgacctgaacgccatcatgctggtggaacgccagctgctgctgctgactttcacaccaga
161 V D L N A I M R W N A Q L L R D F H T R
541 ctcggaacgctgacaaggcagaataactatagaaacgctgcatgccaggtttatggatgct
181 L G N V D K A E Y Y R N V H A R F M D A
601 attgaacaggtgctctggcatgaagacgtgggtgctgctggctggactacagtctggaatct
201 I E Q V L W H E D V G V W L D Y S L E S
661 ggcagacgctcgggattacttctacccatctaacgtgctcgccgctctgggagctgcttac
221 G R R R D Y F Y P S N V S P L W A V C Y
721 gaccaagcgaggaaggattactacgtgaaccgctcgttaattatttgaataaagttaa
241 D Q A R K D Y Y V N R V V N Y L N K V K
781 gtagacatattcgacggcggaataaccgactacattcgagcactcgggagcagtgaggac
261 V D I F D G G I P T T F E H S G E Q W D
841 tatccgaacgctggccccgctgacgtacatcgtggtgatgggctggccaatacgggg
281 Y P N A W P P L Q Y I V V M G L A N T G
921 cagcctgaggccgctgagactggccagcgagatcgccaccaagtgggtccggtccaacttc
301 Q P E A V R L A S E I A T K W V R S N F
981 gaggtttggaagcagaagactgctatgcttgagaagtacgacgcgacaatcttcggcggt
321 E V W K Q K T A M L E K Y D A T I F G G
1041 ctcggcggtggtggcgagatgctcgtacaaactggcttcggatggaccaatgggtgcata
341 L G G G G E Y V V Q T G F G W T N G V I
1121 atggcaatgctgaaccgatggggagacacgattacttcagcggacgagttcgggacgggc
361 M A M L N R W G D T I T S A D E F G T G
1181 gtggcgcgactcgggctggtgtacggggcgcagtcgagcgcagcggggtcgtacg
381 V A A D S G A V Y G A H V G A S G V A T
1241 accattcttgcgtattggcttcttggctgcccgggactcttggattaatgtag
401 T I L V V L A S L A A G T L G L M *

```

Figura 13: Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzidos a partir do cDNA que codifica a trealase 1. O asterisco indica o nucleotídeo que codifica o stop codón, (____) potenciais sítios de N-glicosilação e a região hidrofóbica se encontra em negrito, na caixa o possível omega sítio para âncora de GPI, e as sequências de nucleotídeos usadas para criar os primers estão em negrito.

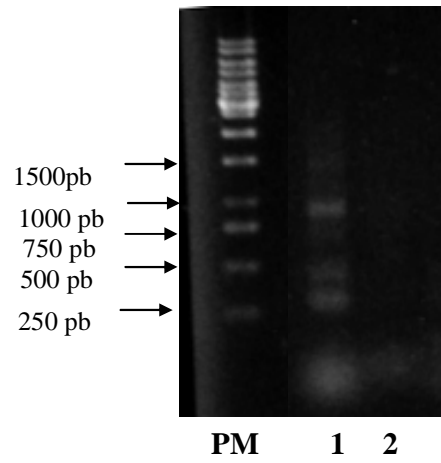


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizados com a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* raias: 1, iniciador PC2 e T3; 2, iniciador PC2 e T7. PM, padrão de peso molecular.

A mesma estratégia usada para clonar a trealase 1 foi usada para clonar a trealase 2 (Fig. 15) e assim foram criados iniciadores específicos a partir da sequência encontrada, o iniciador Tre 2.1 (5'AAAATGGCATGGAAGTTTGC 3', o qual foi criado para amplificar a porção que codifica a região N-terminal da proteína) e o iniciador Tre 2.2 (5'GATGAAGAACGTCGCACAGA 3', o qual foi criado para amplificar a porção que codifica a região C-terminal da proteína) foram usados juntamente com os iniciadores T3 e T7 para realizar os PCRs tendo como amostra a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda*. Com a visualização dos produtos de PCR através do gel de agarose 1% foi possível verificar que tanto usando o iniciador Tre 2.1 com o iniciador T3 ou com o iniciador T7 obteve-se duas bandas de DNA, uma das bandas tem 750pb e outra com aproximadamente 1.300 pb (Fig. 16). As bandas foram extraídas do gel, foram realizados os procedimentos descritos acima e um dos clones seqüenciados possuía como inserto a porção que completa a região N-terminal da trealase 2. Já usando o iniciador Tre 2.2 com o iniciador T3 ou com o iniciador T7 visualizou-se no gel de agarose somente uma banda com cerca de 1.000 pb (Fig. 17), as bandas foram extraídas do gel, foram realizados os procedimentos descritos acima e um dos clones seqüenciados possuía como inserto a porção que completa a região C-terminal da trealase 2.

A trealase 2 possui 587 aminoácidos, um peptídeo sinal com 23 aminoácidos e seu peso calculado a partir da sequência é 62.040 Da. Não foi encontrado sinal para âncora GPI ou região transmembrana, portanto a trealase 2 provavelmente é solúvel. A sequência possui ainda seis sítios para N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser/Thr) (Fig. 18).

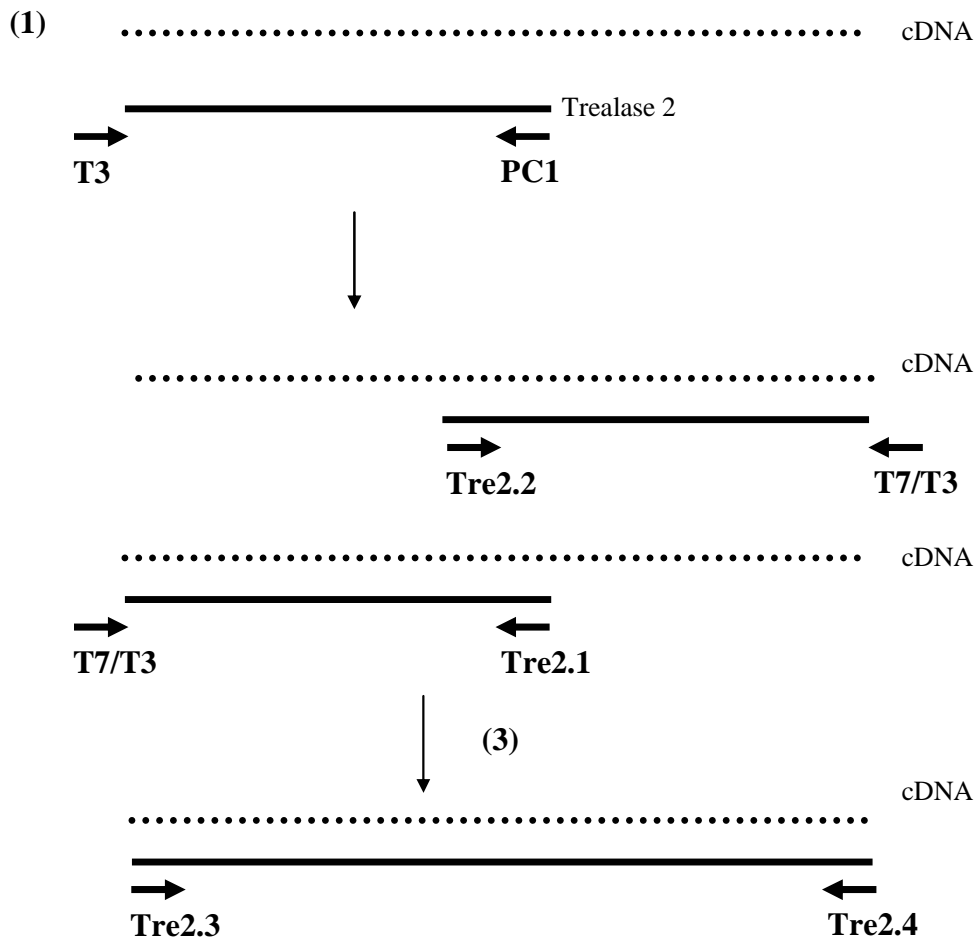


Figura 15: Representação esquemática da clonagem do cDNA correspondente a trealase 2.

- (1) PCR usando o iniciador PC1 criado a partir de seqüências conservadas de trealase, tendo como amostra a biblioteca do intestino de *S. frugiperda*.
- (2) PCR usando iniciadores específicos criados a partir da seqüência da trealase 2 e tendo como amostra a biblioteca do intestino de *S. frugiperda*.
- (3) PCR usando iniciadores específicos criados a partir da seqüência da trealase 2 e tendo como amostra a biblioteca do intestino de *S. frugiperda*, visando a clonagem da seqüência completa da trealase 2.

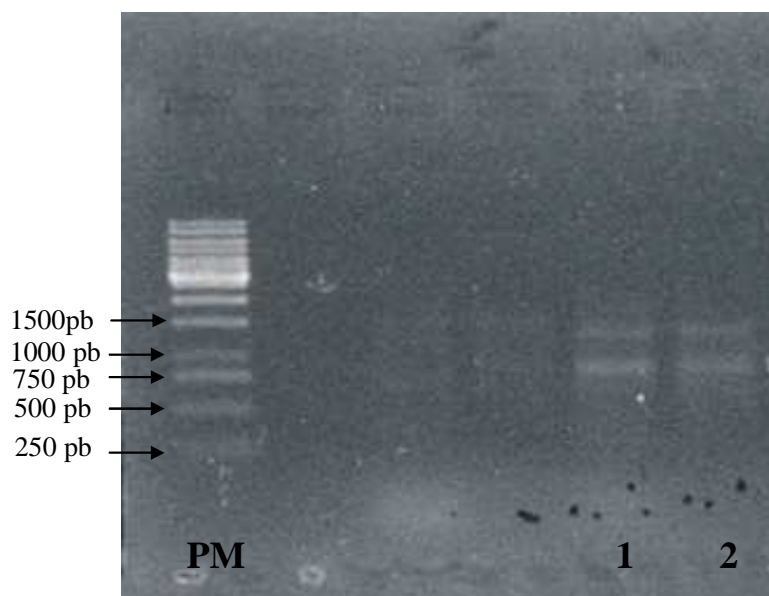


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizados com a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* raias: 1, iniciador Tre2.1 e T3; 2, iniciador Tre2.1 e T7. PM, padrão de peso molecular.

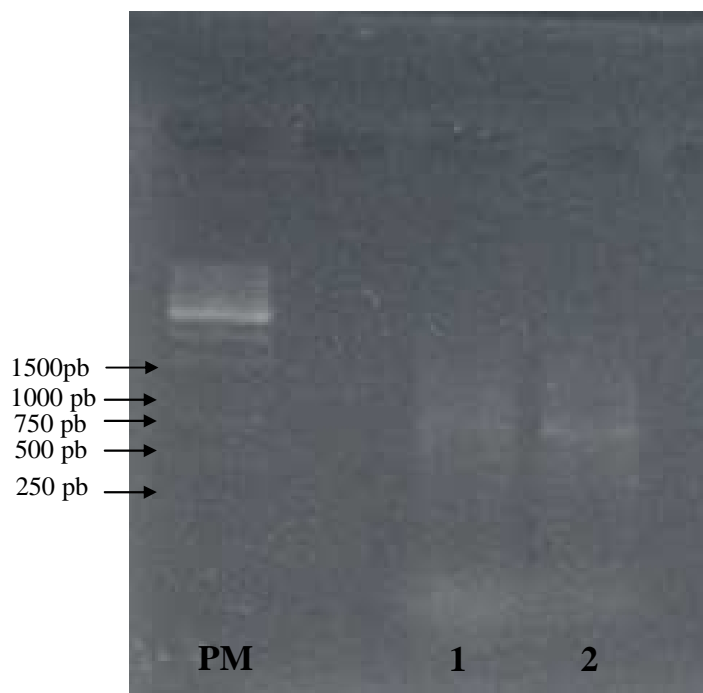


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR realizados com a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda* raia: 1, iniciador Tre2.2 e T3; 2, iniciador Tre2.2 e T7. PM, padrão de peso molecular.

```

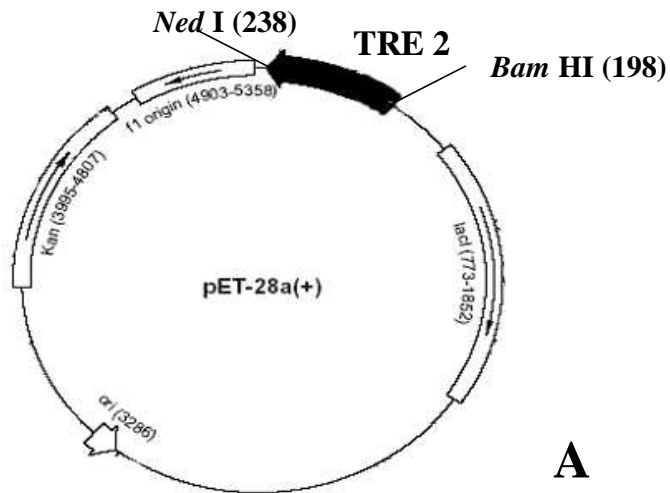
1   atgggtgctcttttgaagatgctgggaattcctgattctcctgggtggcggtggcgctg
1   M V S F C K M R E F L I L L V A V V A L
61  gccgggtgctgccgctctgccccacttgcagtaagcccgtctactgagagcgaactc
21  A G A V A A L R P T C S K P V Y C E S E L
121 ctccatcagtcctcaaatggccagactcttcaacgactctaaaaccttcgctcgacctcaa
41  L H R V Q M A R L F (N D S) K T F V D L Q
181 atgaattacgatcaaaaccaaacattacgtgattttgaaacattactaaatgatagcaac
61  M N Y D Q (N Q T) L R D F E T L L (N D T) N
241 caagaccctcaagagaacaattgagagaatttggtagacaatacttctcagatgaaggt
81  Q D P S R E Q L R E F V D K Y F S D E G
301 gaactcgaagagtgactccaccggatttcagtaatgatcctaaattcatatataactata
101 E L E E W T P P D F S N D P K F I Y T I
361 aaagataaagccttaagagagttcgcataaaaacatcaacgatatttggccactccttggc
121 K D K A L R E F A K N I N D I W P L L A
421 cgaagagcctcaagatgaggtgattcaaacctgatcgttatagtttggcctcattacc
141 R K V K D E V I Q N P D R Y S L V P I T
481 cagcattcatcattcctggagcggtttacggagatctattactgggatacttctgg
161 H G F I I P G G R F T E I Y Y W D T F W
541 attatcgaaggtctcctgataagtggaatgcaagaaaccgctaaaggaattatgaaat
181 I I E G L L I S G M Q E T A K G I I E N
601 ctgatagagctttgaaatttgggtcacattccaatggtagcagatggtattatcaa
201 L I E L L N L F G H I P (N G S) R W Y Y Q
661 gaacgtagtcaaccgcaatgctgacagctatggttgctactactaccaatacactaac
221 E R S Q P P M L T A M V A T Y Y Q Y T (N)
721 gacacggagttcctgaaaaacaatatcgcatatttagaaaaggaaatggacttctggttg
241 (D T) E F L K N N I A Y L E K E M D F W L
781 gatgaaagatcagtgctgtgctgaaaaagaaggtagtagccacaaactgctcagatacttt
261 D E R S V S V E K E G S S H K L L R Y F
841 gctctcagctcaggtccaagacctgaatcgtattatgaagattacgaaaacgcagtagat
281 A L S S G P R P E S Y E D Y E N A V D
901 ttcgatgaaagacgtcgacagacttctatgctgatattaagagtgacagtgagaggtg
301 F D E E R R T D F Y V D I K S A A E S G
961 tgggacttctcgacgcgatggttcgctcagcaatgatggcagcaacaacggaaactttaaga
321 W D F S T R W F V S N D G S N (N G T) L R
1021 gacattcacaccagatcgtcgtccctgctgatttgaacgccatatttggccggtgctctc
341 D I H T R Y V V P A D L N A I F A G A L
1081 cagaacgttgcaaaacttccatgccattttgatgaaccctcgtaaagccgccagatggc
361 Q N V A N F H A I L M N P R K A A T Y G
1241 caattagcccaacagtgagagatgccattcaggccattttgtggaatgaggaagatgga
381 Q L A Q Q W R D A I Q A I L W N E E D G
1301 atgtggatgattatgatatcagagacaagttacatcgcaaatatttctactcgtctaac
401 M W Y D Y D I R D K L H R K Y F Y S S N
1361 gtctccccactgtggcaacatgctggttgatcccaatatagtgaaagcaaatggggacaga
421 V S P L W Q H A V D P N I V K A N G D R
1421 attctgaacagttcctaagcaatcggcggtttagacttccctggcggagtgccacatcc
441 I L N S L K Q S G G L D F P G G V P T S
1481 ctcatcaggagtgagagcagtgaggacttccctaacgtatggccaccagaagtgagatt
461 L I R S G E Q W D F P N V W P P E V S I
1541 gtagttaacgcattgaaaacattggaacgcctgaggcagtgctgctggcctttgaaact
481 V V N A I E N I G T P E A S V L A F E T
1601 gcacaaacgtttgttaggtcttgcactggggcttccaagaatacaaacagatggttgag
501 A Q T F V R S C H W G F Q E Y K Q M F E
1661 aaatgatgacagagaatcctggcaagttcggagaggtggcgaatacaccgtgcagttt
521 K Y D A E N P G K F G G G E Y T V Q F
1721 ggttccggatggagcaacgggtgcagggttagagtttatgaagaaatagggagaaggttgg
541 G F G W S N G A G L E F M K K Y G E G L
1781 actgcagacgactcctaatgacttaggtaccactactactgtatctccctccgacaacggc
561 T A D D S N D L G T T T T V S P S D N G
1841 gatccttcgaacaataaccgcatga
581 D P S N N T A *

```

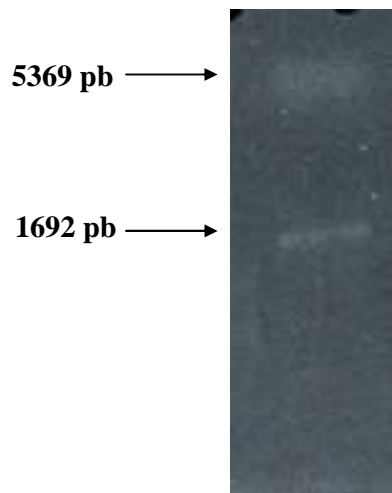
Figura 18: Sequência de nucleotídeos e sequência de aminoácidos deduzidos a partir do cDNA que codifica a trealase intestinal de *S. frugiperda*. O asterisco indica o nucleotídeo que codifica para o stop codón, (____) sequências de nucleotídeos usadas para criar os primers, potenciais sítios de N-glicosilação se encontra na caixa e o peptídeo sinal se encontra em negrito.

Uma vez obtida a seqüência completa da trealase 2 iniciou-se a sua clonagem utilizando os iniciadores Tre2.3 (5' TCATGCGGTATTGTTTCGAAGG 3') e Tre2.4 (5' GCCGCTCTGCGCCCCACTTGC 3'), que foram desenhados a partir das porções codificantes das regiões N-terminal e C-terminal da proteína. Eles foram utilizados em um PCR tendo como amostra a biblioteca de cDNA do intestino de *S. frugiperda*. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1% este foi extraído do gel, inserido no vetor pGEM-T, a construção foi produzida em larga escala, purificada e seqüenciada como descrito anteriormente.

Foram então criados iniciadores sintéticos com sítio para *Ned1* (Tre2.5, 5' CGCGGATCCTCATGCGGTATTGTTTCGAAGG 3') e *BamHI* (Tre2.6, 5' CGCCATATGGCCGCTCTGCGCCCCACTTGC 3'), os quais foram usados em um PCR tendo como amostra o clone completo da trealase 2. O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1% este foi extraído do gel, clonado no vetor pGEM-T através do Kit pGEM-T easy vector (Promega). A construção foi usada para transformar XL1 blue e assim propagar o plasmídeo com o inserto. A construção foi então digerida com *NedI* e *BamHI* e subclonada no vetor pET-28a, o qual foi previamente digerido com *NedI* e *BamHI*. A construção gerada foi dado o nome de pET-28a-Tre2 e seu esquema está apresentado na figura 19. A clonagem neste vetor está em fase com uma seqüência do vetor que codifica seis resíduos de histidina. Portanto, a trealase recombinante terá em seu N-terminal uma cauda de seis resíduos de histidina, a qual facilitará sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.



A



B

Figura 19:

(A) Esquema da construção pET-28a-Tre2, que consiste do plasmídeo pET-28a com a trealase 2 inserida.
 (B) Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão da construção pET-28a-Tre2 com as enzimas de restrição *NedI* e *BamHI*. PM: peso molecular, raia 1, produto da digestão.

4.3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA TREALASE 2:

A construção pET-28a-Tre2 foi usada para transformar a cepa BL21 DE3, o nível de expressão foi avaliado após indução com IPTG 1mM a 37°C por quatro horas. Verificamos que a trealase foi expressa com sucesso, sendo que a proteína recombinante que foi induzida corresponde a um polipeptídeo que migra com massa molecular de 62 kDa em SDS-PAGE (Fig. 20). Para verificar a solubilidade da proteína recombinante a expressão foi induzida em diferentes temperaturas (20, 25 e 37°C). A indução a 25°C e 37°C foi realizada durante cinco horas, enquanto a indução a 20°C foi realizada durante 16 horas. As células foram lisadas e o sobrenadante e o sedimento foram analisados em SDS-PAGE. A maior quantidade de proteína recombinante se encontra no sedimento, havendo também proteína recombinante na fração solúvel (Fig. 21). Para verificar se a trealase se encontrava ativa foi realizado ensaio enzimático com a fração solúvel das bactérias induzidas em diferentes temperaturas, sendo que quando a indução é realizada a 20, 25 e 37°C a atividade enzimática é respectivamente 3.905, 506 e 209 mU/ml.

A trealase recombinante possui em seu N-terminal uma cauda com seis resíduos de histidina, que tem afinidade por níquel. Por isso a trealase 2 recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade usando uma coluna de níquel sefarose.

As amostras recolhidas da cromatografia foram ensaiadas, o perfil de atividade enzimática mostrou a existência de um único pico de atividade enzimática, o qual foi recolhido e aplicado em SDS-PAGE, no qual foi possível verificar uma única banda de

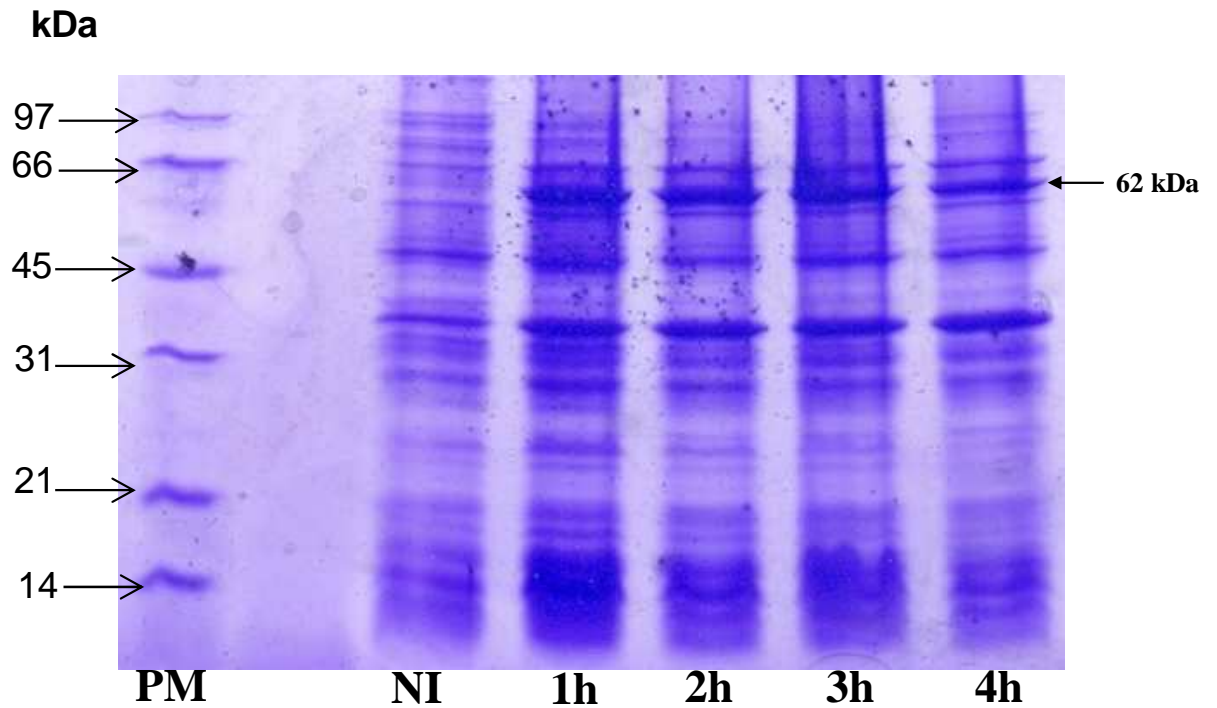


Figura 20: Eletroforese do lisado de bactérias, contendo a construção pET-28A-Tre2, após a indução da trealase 2 recombinante com 1 mM de IPTG a 37°C. As amostras foram retiradas com o intervalo de 1 hora e aplicadas em SDS-PAGE 12%. PM: peso molecular, NI: não induzido, 1h,2h, 3h,4h: indução por uma, duas, três e quatro horas respectivamente.

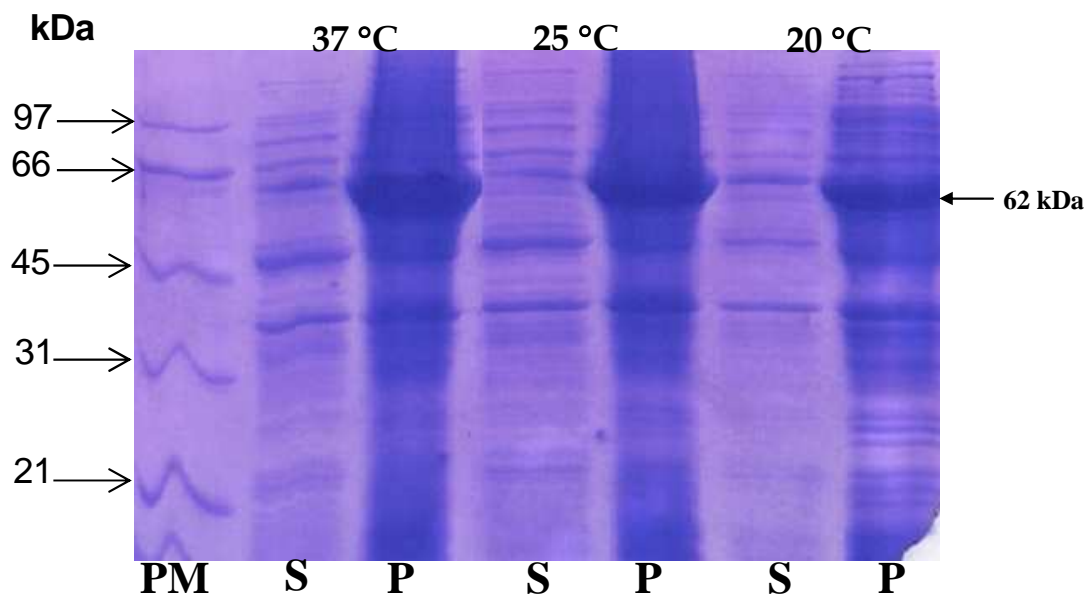


Figura 21: Eletroforese da fração solúvel (S) e da fração particulada (P) de bactérias contendo a construção pET-28A-Tre2 induzidas com 1 mM de IPTG 25 e 37°C, durante cinco horas e a 20°C durante 16 horas. As bactérias foram lisadas e o precipitado (P) e o sobrenadante (S) foram aplicados em SDS-PAGE 12%. PM: peso molecular.

proteína (Fig. 22). A recuperação e o enriquecimento da atividade da trealase durante a purificação são mostrados na tabela I.

Uma vez que a quantidade de atividade na proteína purificada dobra, provavelmente há um inibidor no lisado de bactérias, que separa-se da trealase após a passagem do material pela coluna. É estranho o fato da atividade específica diminuir após a purificação, embora a atividade total dobre. Talvez algum fator esteja interferindo no método utilizado para a determinação de proteínas no lisado de bactérias. Não há motivo para por em dúvida a atividade específica detectada para a enzima pura, porque ela corresponde a trealase solúvel, (como será comentado a seguir) e essa atividade específica é a mesma obtida quando se purifica a proteína a partir do animal (ver Silva et al.,2005).

4.4. PURIFICAÇÃO DA TREALASE LIGADA À MEMBRANA DO INTESTINO MÉDIO DE *S.FRUGIPERDA*:

Nós desejávamos comparar as trealases solúvel e de membrana com a enzima clonada e expressa. Uma vez que a trealase solúvel já tinha uma marcha definida de purificação, elaboramos uma para purificar a enzima ligada a membrana.

As frações de membrana obtidas como descrito em materiais e métodos foram reomogenizadas e centrifugadas durante 30 minutos à 4°C, 20.000g. Com este procedimento foi possível solubilizar 65% da trealase ligada à membrana.

A fim de purificar a trealase ligada à membrana do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda* foi realizada uma cromatografia de troca iônica em coluna HighQ usando sistema FPLC, na qual o perfil de atividade enzimática (Fig. 23) apresentou um único pico

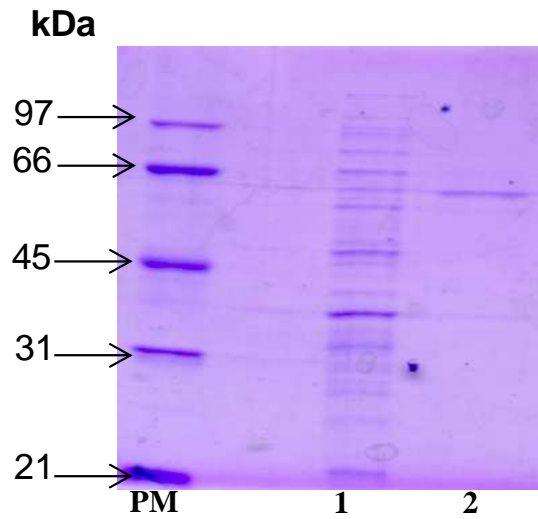


Figura 22:

SDS-PAGE 12% das frações eluídas da cromatografia de afinidade His Trap FF com um gradiente de 20 a 500 mM de imidazol (raia 2) e do sobrenadante do lisado de bactérias, as quais contem a construção pET-28a-Tre2 (raia 1). PM: peso molecular.

	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
Sobrenadante do lisado de bactérias	203	100
Eluído após His Trap FF	155	200

Tabela I: Purificação da trealase recombinante de *S. frugiperda*

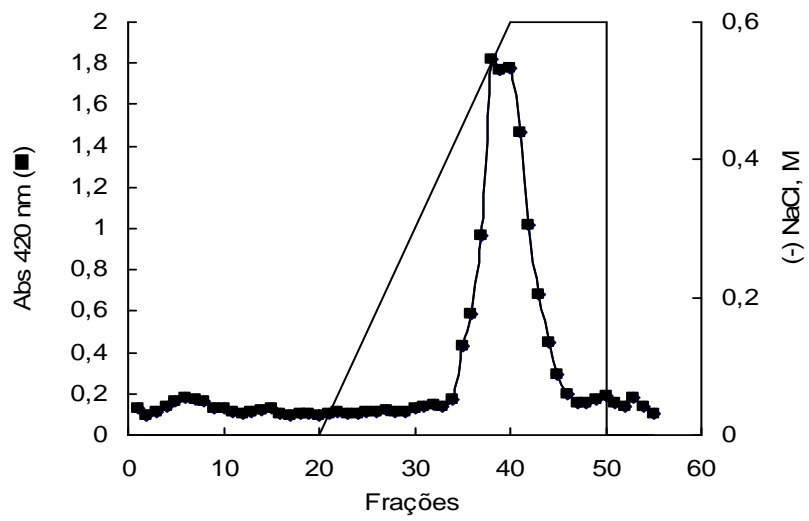


Figura 23: Cromatografia de troca iônica em coluna HighQ (Sistema Econo-System), da fração solúvel do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda*. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão Imidazol 20 mM pH 7,0; 11,92 mM de $MnCl_2$, e para eluir as proteínas que ficaram retidas na coluna foi realizado um gradiente de NaCl de 0 a 0,6 M no mesmo tampão.

de atividade. As frações mais ativas (frações de 37-42) foram então reunidas, o material foi diluído duas vezes em tampão Imidazol 40 mM pH 7,0 contendo 11,92 mM de MnCl_2 e 3,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a seguir centrifugado a 8.000x g durante 15 minutos à 4°C.

O sobrenadante foi recolhido e aplicado numa cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Econo-Pac Methyl (sistema FPLC), na qual o perfil de atividade enzimática (Fig. 24) apresentou novamente um único pico de atividade de trealase.

As frações mais ativas eluídas da coluna EconoPac methyl (frações de 16 a 20) foram reunidas e aplicadas numa cromatografia em coluna FastDesalting para que o sal fosse retirado e a amostra pudesse ser aplicada numa cromatografia de troca iônica. Assim, a amostra foi aplicada numa cromatografia em coluna MonoQ (Sistema FPLC), na qual o perfil enzimático (Fig. 25) demonstrou que havia sido eluído apenas um pico de atividade enzimática.

As frações que constituíam o pico de atividade enzimática eluído da coluna MonoQ (Frações de 44 a 51) foram reunidas, o material foi diluído duas vezes em tampão imidazol 40 mM pH 7,0 contendo 11,92 mM de MnCl_2 e 3,4 M de NH_3SO_4 e centrifugado a 8.000x g por 15 minutos a 4°C. A seguir a amostra foi aplicada numa cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (Sistema FPLC), na qual observou-se que um único pico de atividade de trealase foi eluído (Fig. 26).

As frações que constituíam o pico de atividade enzimática eluído da coluna Resource Isomethyl (Frações de 44 a 51) foram reunidas, o material foi concentrado em filtro centriplus seguindo as recomendações do fabricante. A seguir, a amostra foi aplicada numa cromatografia de filtração em gel em coluna Superose 12 (Sistema FPLC), na qual observou-se que um único pico de atividade de trealase foi eluído (Fig. 27).

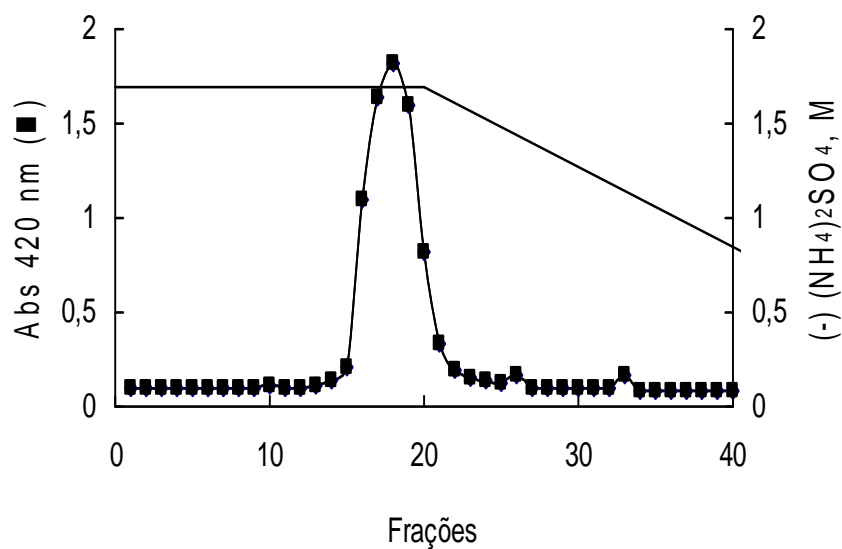


Figura 24: Cromatografia hidrofóbica em coluna Econo-pac Methyl das frações mais ativas reunidas após cromatografia de troca iônica. As frações de 37 a 42 (Fig. 23) foram reunidas, diluídas duas vezes em tampão imidazol 40 mM pH 7,0; 3,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 11,92 mM de MnCl_2 , centrifugadas a 8.000g a 4°C durante 15 minutos e o sobrenadante aplicado na coluna Econo-pac Methyl. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão imidazol 20 mM pH 7,0 e 11,92 mM de MnCl_2 . As proteínas retidas na coluna foram eluídas através de um gradiente de 1,7 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no mesmo tampão.

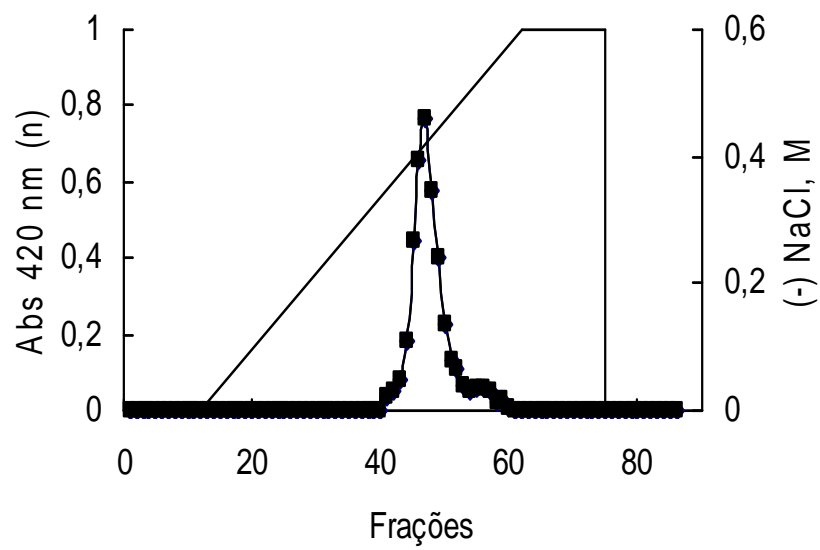


Figura 25: Cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Sistema FPLC), na qual foi aplicado as frações de 16 a 20, eluídas da cromatografia de interação hidrofóbica (Fig. 24). Na cromatografia foi utilizado Tampão imidazol 20 mM pH 7,0 e 11,92 mM de $MnCl_2$ e as proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 0,6 M de NaCl no mesmo tampão.

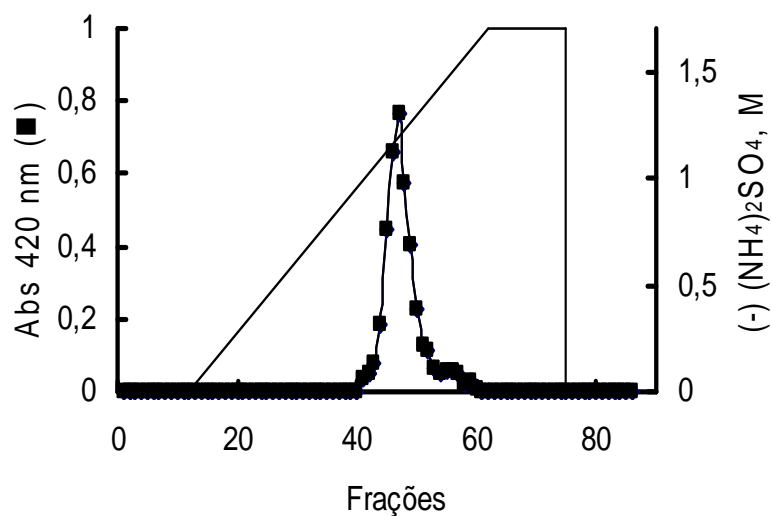


Figura 26: Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (Sistema FPLC), na qual foram aplicadas as frações mais ativas sobre trealose reunidas após eluição da cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Fig.3, frações de 44 a 51). Antes da aplicação o material foi diluído duas vezes em tampão imidazol 40 mM pH 7,0; 3,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 11,92 mM de MnCl_2 . A amostra foi centrifugada a 8.000 g, 4°C durante 15 minutos, e o sobrenadante foi aplicado na coluna. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão imidazol 20 mM pH 7,0 e 11,92 mM de MnCl_2 , para eluir as proteínas que ficaram retidas na coluna foi realizado um gradiente de 1,7 M a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no mesmo tampão.

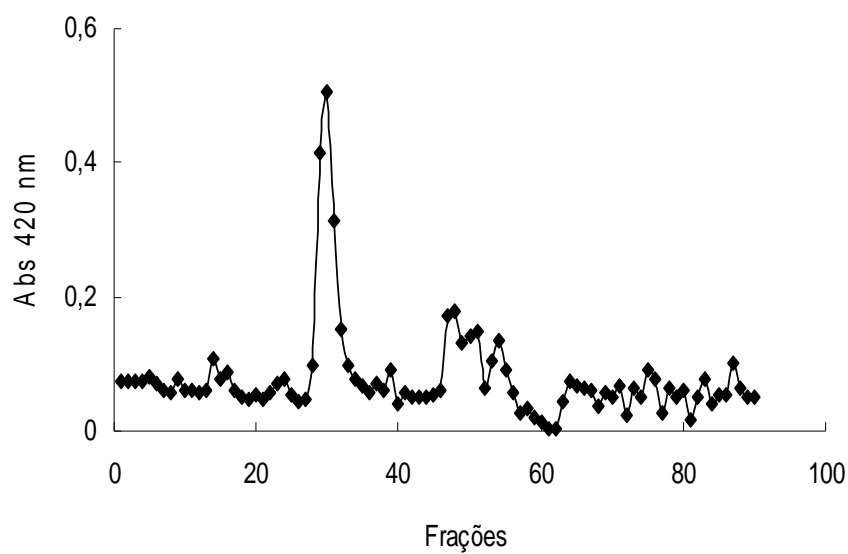


Figura 27: Cromatografia de filtração em gel em coluna superose 12 (Sistema FPLC), na qual foram aplicadas as frações mais ativas sobre trealose reunidas após eluição da cromatografia de Interação hidrofóbica em coluna Resource Isomethyl (Fig. 26). Antes da aplicação o material foi concentrado em membrana centriplus (Millipore) conforme as recomendações do fabricante. Para realizar a cromatografia foi utilizado tampão Imidazol 20 mM pH7,0 e 11,92 mM de $MnCl_2$.

A fim de verificar se a forma solúvel de trealase havia sido purificada foi realizado um SDS-PAGE, onde foram aplicadas as frações de 34 a 36, as quais foram eluídas da cromatografia de filtração em gel em coluna superose 12 (sistema FPLC). No SDS-PAGE (Fig. 28) observou-se apenas uma banda de proteína em todas as frações com massa molecular de 67.000 Da, indicando que a trealase ligada a membrana das células do epitélio do ventrículo de *S. frugiperda* foi purificada. A recuperação e o enriquecimento da atividade da trealase durante a purificação são mostrados na tabela II.

4.5. COMPARAÇÃO DA TREALASE RECOMBINANTE E DAS DUAS TREALASES ENCONTRADAS NO ANIMAL:

Foi determinado o Km para as enzimas encontrado-se os valores de $0,5 \pm 0,05$ mM para a enzima recombinante e $0,47 \pm 0,04$ mM e $1,62 \pm 0,25$ mM, respectivamente para as enzimas solúvel e de membrana purificadas a partir do animal.

Comparação do comportamento das trealases após inativação térmica a 50°C , mostrou que nessas condições a trealase solúvel selvagem e a recombinante não tem sua atividade afetada enquanto a trealase ligada a membrana diminui sua atividade em 50% (Fig. 29).

Os resultados indicam que a enzima clonada e expressa corresponde a trealase solúvel, já caracterizada (Silva et al., 2004). O rendimento da proteína expressa (10 mg a partir de 500 ml de meio de cultura) torna viável sua utilização em experimentos que visam a natureza dos grupos envolvidos em catálise e cristalização para desvendar sua estrutura tridimensional.

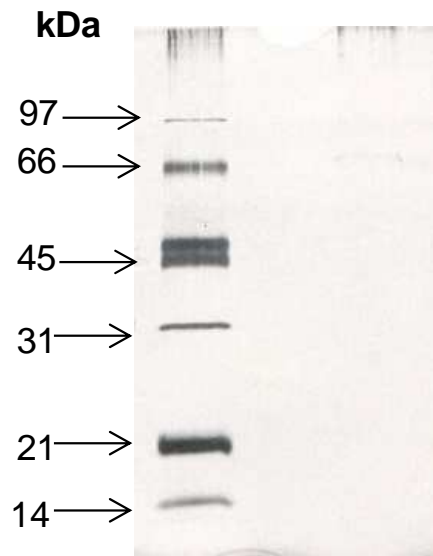


Figura 28: SDS-PAGE das frações de 29 a 31 eluídas da cromatografia de filtração em gel em coluna superose 12 (Sistema FPLC).

	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)
Material inicial	1	100
High-Q	5	100
Econo-Pac Methyl	7	100
MonoQ	10	20
Resource Isomethyl	10	10
Superose 12	10	8

Tabela II: Purificação da trealase ligada a membrana do intestino médio de *S. frugiperda*

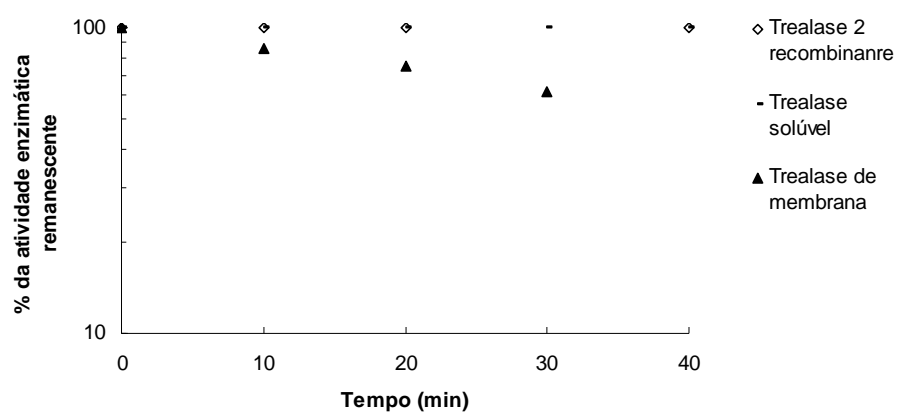


Figura 29: Inativação Térmica a 50°C.

4.6. Efeito de β -glicosídeos tóxicos em diferentes trealases:

4.6.1. INIBIÇÃO “IN VITRO”:

Resultados preliminares mostraram que a trealase de vários tecidos de insetos diferentes são inibidas por glicosídeos tóxicos produzidos por plantas.

Nós iniciamos esse estudo, primeiramente ensaiando a atividade de trealase em vários tecidos de insetos para verificar quais trealases são as mais abundantes (Tab. III).

O efeito dos glicosídeos amigdalina, prunasina e florizina e do aglicone mandelonitrila foi verificado na atividade da trealase presente em diferentes tecidos de *T. molitor* (Coleoptera), *Musca domestica* (Díptera) e *S. frugiperda* e *Diatraea saccharalis* (ambos Lepidoptera). O glicosídeo esculina foi usado para verificar a inibição das trealases dos diferentes tecidos apenas em *T. molitor* e *S. frugiperda* (Tab. IV–VII). Os erros grandes encontrados em algumas determinações são devido a perdas na dissecação.

A extensão da inibição causada por uma substância pode ser diferente se compararmos as trealases de diferentes tecidos. Isso pode ser devido a existência de diferentes enzimas ou a presença de outras substâncias que afetem a interação enzima inibidor.

Levando-se em consideração os tecidos que possuem as maiores atividades trealásicas, prunasina é o melhor inibidor das trealases de *T. molitor* e *M. domestica*, enquanto florizina é o melhor inibidor para as trealases ligadas a membrana de *D. saccharalis* e esculina é o melhor inibidor das trealases de *S. frugiperda*.

Tabela III: Atividade de trealase (mU/an) encontrada em diferentes partes do corpo.

Inseto	Carçaça		Corpo gorduroso		Tubúlos de Malpighi		Epitélio do Ventrículo		Conteúdo do ventrículo	Hemolinfa
	S	M	S	M	S	M	S	M		
<i>T. molitor</i>	10±1	1,3±0,2	6±1	5,0±0,5	0,6±0,1	0,20±0,05	0,4±0,5	2,0±0,2	32±10	0,4±0,1
<i>M. domestica</i>	0	0,3±0,1	0,10±0,06	0,20±0,05	0,10±0,02	0,10±0,04	1,0±0,1	2,0±0,5	0,3±0,1	0,20±0,08
<i>S. frugiperda</i>	97±7	12,0±0,9	93±2	40±10	10±2	10±3	900±100	600±100	220±3	20±8
<i>D. saccharalis</i>	6±1	9±2	0	0	5,0±0,5	4,0±0,2	18±3	4,5±0,7	6±1	0

Os valores são média ± desvio padrão da média, baseados nas determinações em três diferentes preparações obtidas de 10 animais cada (*T. molitor*, *M. domestica* e *S. frugiperda*) ou 20 animais cada (*D. saccharalis*). S=fração solúvel, M=fração de membrana.

Tabela IV: Atividade remanescente de trealase (%)depois da incubação “in vitro” de diferentes tecido de *T. molitor* com diferentes substâncias produzidas plantas.

Substância	Carcaça		Corpo Gorduroso		Túbulos de Malpighi		Epitélio do Ventrículo		Conteúdo do ventrículo	Hemolinfa
	S	M	S	M	S	M	S	M		
Florizina	40±20	NC	60±30	44±9	93±6	NC	80±10	NC	40±10	30±10
Amigdalina	26±3	0	103±5	60±20	40±10	56±8	40±10	0	80±10	15 ±2
Prunasina	80±10	0	100±10	60±20	30±10	91±1	40±10	0	0	20±10
Mandelonitrila	50±10	100±10	100±10	40±10	40±10	22±1	0	100±10	30±10	0
Esculina	100±10	0	0	100±20	40±10	0	23±3	28±4	88±4	0

Os valores são média ± desvio padrão da média, baseados nas determinações em três diferentes preparações obtidas de 10 animais cada. S=fração solúvel, M=fração de membrana, NC: atividade não conhecida devido a precipitação da floretina.

Tabela V: Atividade remanescente de trealase (%) depois da incubação de diferentes tecido de *S. frugiperda* “in vitro” com diferentes substâncias produzidas plantas.

Substância	Carcaça		Corpo Gorduroso		Túbulos de Malpighi		Epitélio do Ventrículo		Conteúdo do ventrículo	Hemolinfa
	S	M	S	M	S	M	S	M		
Florizina	115±5	100±10	60±10	NC	100±5	100±5	80±10	40±3	100±20	30±20
Amigdalina	50±10	29±3	100±10	0	30±3	50±10	80±20	0	80±6	20±5
Prunasina	60±10	24±4	80±10	100±20	68±4	60±10	70±20	0	80±8	22±9
Mandelonitrila	100±20	0	80±20	40±10	70±10	60±9	80±20	0	100±3	0
Esculina	29±8	100±10	0	100±5	100±10	0	3±1	100±20	100±20	0

Os valores são média ± desvio padrão da média, baseados nas determinações em três diferentes preparações obtidas de 10 animais cada. S=fração solúvel, M=fração de membrana, NC: atividade não conhecida devido a precipitação da floretina.

Tabela VI: Atividade remanescente de trealase (%) depois da incubação de diferentes tecido de *M. domestica* “in vitro” com diferentes substâncias produzidas plantas.

Substância	Carçaça		Corpo Gorduroso		Túbulos de Malpighi		Epitélio do Ventrículo		Conteúdo do ventrículo	Hemolinfa
	S	M	S	M	S	M	S	M		
Florizina	NA	NC	100±0	100±10	110±30	70±10	70±20	ND	100±10	NC
Amigdalina	NA	110±10	71±6	0	22±7	40±5	100±20	ND	80±20	0
Prunasina	NA	110±10	92±8	100±20	64±5	50±10	27±9	ND	90±10	70±20
Mandelonitrila	NA	100±0	0	100±20	130±20	29±5	100±10	ND	100±5	0

Os valores são média ± desvio padrão da média, baseados nas determinações em três diferentes preparações obtidas de 10 animais cada. S=fração solúvel, M=fração de membrana, NC: atividade não conhecida devido a precipitação da floretina. ND: não foi realizada determinação. NA= o tecido não possui atividade de trealase.

Tabela VII: Atividade remanescente de trealase (%) depois da incubação de diferentes tecido de *D. saccharalis* “in vitro” com diferentes substâncias produzidas plantas.

Substância	Carcaça		Corpo Gorduroso		Túbulos de Malpighi		Epitélio do Ventrículo
	S	M	S	M	S	M	
Florizina	120±20	NC	120±10	37±0	100±20	41±3	100±10
Amigdalina	80±20	40±10	60±10	100±10	100±10	100±10	80±20
Prunasina	74±7	90±9	100±0	100±20	100±2	105±6	90±10
Mandelonitrila	60±30	80±20	100±20	100±9	90±10	100±10	90±10

Os valores são média ± desvio padrão da média, baseados nas determinações em três diferentes preparações obtidas de 20 animais cada. S=fração solúvel, M=fração de membrana, NC: atividade não conhecida devido a precipitação da floretina.

4.6.2. EFEITO DE ESCULINA E AMIGDALINA PRESENTES NA DIETA DE *S.*

FRUGIPERDA:

Larvas de *S. frugiperda* foram criadas em dietas contendo 0,1% de esculina ou de amigdalina.

A presença de amigdalina 0,1% nas dietas de *S. frugiperda* não afeta seus parâmetros de crescimento (Ferreira et al.,1997). Quando essas larvas foram crescidas em dieta contendo 0,1% de esculina seu tamanho é menor que o dos insetos criados uma dieta controle. Dezoito dias após a eclosão as larvas experimentais são três vezes menores que as larvas controle (Fig. 30). As pupas fêmeas experimentais pesam 192 ± 15 mg, enquanto as pupas fêmeas controle 252 ± 15 mg. Entretanto, o peso das pupas macho controle (248 ± 10 mg) é o mesmo das pupas macho experimentais (242 ± 13 mg).

Fluorescência foi usada para determinar a quantidade de esculina em diferentes tecidos das larvas que se alimentaram de dieta contendo esses glicosídeos. Os resultados estão apresentados na tabela VIII. A quantidade de esculina presente no conteúdo do ventrículo foi estimada pela concentração de esculina presente na dieta e a massa do conteúdo, (resultando no valor de 220nmol) ou diretamente medindo a fluorescência de massa de dieta igual aquela do conteúdo do ventrículo (85 nmol). Os dois valores são inferiores ao determinado diretamente no conteúdo do ventrículo (740 nmol). Esses resultados podem ser explicados pela pequena absorção do glicosídeo intacto devido a circulação endo-ectoperitrófica de fluídos que ocorre no interior do intestino médio (Ferreira e Terra, 1994, 2005).

S. frugiperda crescendo em dieta controle ou contendo amigdalina, não hidrolisa esculina (limite de detecção 0,25 mU/an). Por outro lado, uma atividade de $1,5\pm 0,8$ mU/an é detectada no intestino médio de larvas que foram alimentadas em dieta

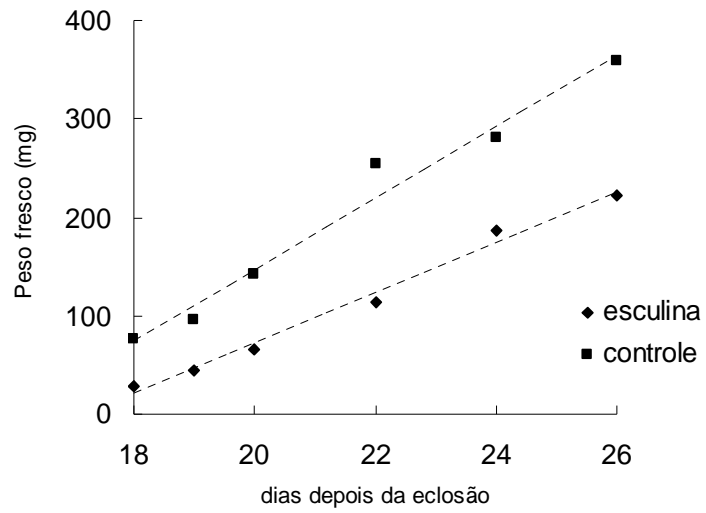


Figura 30: Peso da larva de *S. frugiperda* criada numa dieta controle e numa dieta contendo 0,1 % de esculina. Foram usados de 30 a 40 animais em cada determinação.

Tecidos	Esculina (nmoles/an)
Corpo gorduroso	4
Túbulos de Malpigh	4
Epitélio do ventrículo	6,5
Hemolinfa	18
Conteúdo do ventrículo	740
Carça	0

Tabela VIII: Distribuição de esculina nos diferentes tecidos de *S. frugiperda* criados numa dieta com 0,1 % de esculina.

contendo esculina. Essa atividade provavelmente é devido a uma nova β -glicosidase que aparece somente nas larvas crescidas em esculina (Fig. 31).

A atividade de trealase aumenta em muitos tecidos das larvas de *S. frugiperda* criadas em uma dieta contendo esculina (Tab. IX) ou amigdalina (Tab. X). Exceto em alguns casos, o aumento observado nos tecidos das larvas alimentada em dietas contendo amigdalina é maior que o observado na larva alimentada com dieta contendo esculina.

4.6.3. EFEITO DA PRESENÇA DE ESCULINA NA DIETA DE LARVAS DE *DIATRAEA SACCHARALIS*

Nós já tínhamos verificado anteriormente, que embora *S. frugiperda* e *D. saccharalis* pertençam a mesma ordem, eles respondem de modo diferente a presença de amigdalina na dieta (Ferreira et al., 1997).

D. saccharalis foi alimentada com uma dieta contendo 0,1% de esculina, contudo esculina não afeta o desenvolvimento de *D. saccharalis*, sendo assim as larvas experimentais tem peso similar aos animais controles (Fig. 32) e tanto as pupas fêmeas quanto os machos experimentais tem peso igual ao controle (controle: fêmeas, 180 ± 30 , machos 110 ± 15 ; experimental: fêmeas, 200 ± 30 mg, machos 120 ± 20 mg). Quando estes insetos foram dissecados e os tecidos retirados e homogenizados como descrito em materiais e métodos e foi medida a fluorescência, foi encontrada esculina apenas no conteúdo do ventrículo, enquanto nada foi encontrado nos demais tecidos.

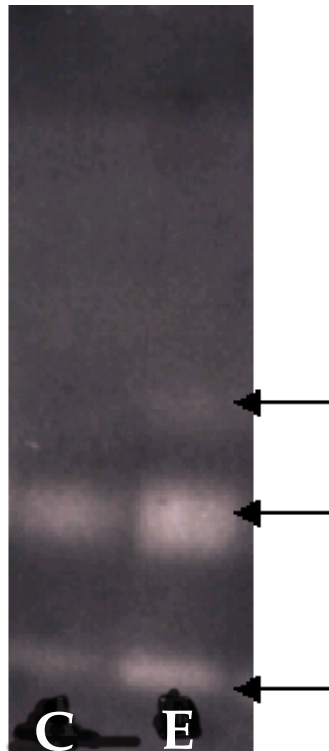


Figura 31: PAGE para evidenciar atividade sobre MU β gli no ventrículo de larvas controle e alimentadas com β -glicosídeos. As amostras foram aplicadas em géis 7,5 % e a corrida realizada com uma voltagem de 100 V. O gel foi lavado quatro vezes por 15 minutos com tampão citrato fosfato 20 mM pH 6,0, O ensaio para evidenciar atividade sobre MU β gli foi realizado como descrito em material e métodos. C= controle, E= esculina.

Porção do corpo	% Atividade enzimática
Fração solúvel da carcaça	100 ± 30
Fração de membrana da carcaça	60 ± 10
Fração solúvel do corpo gorduroso	50 ± 30
Fração de membrana do corpo gorduroso	400 ± 200
Fração solúvel dos Túbulos de Malpighi	180 ± 70
Fração de membrana dos Túbulos de Malpighi	80 ± 20
Fração solúvel do epitélio do ventrículo	100 ± 20
Fração de membrana do epitélio do ventrículo	90 ± 5
Conteúdo do ventrículo	150 ± 20
Hemolinfa	130 ± 40

Tabela IX: Atividade de trealase em diferentes órgãos da larva de *S. frugiperda* crescida em dietas contendo 0,1% de esculina

Os valores são porcentagem da atividade de trealase encontrada nas larvas criadas em dieta artificial sem esculina. Os dados são médias (e desvio padrão da média) de determinações realizadas com três amostras diferentes, cada uma contendo oito animais.

Porção do corpo	% de atividade enzimática
Fração solúvel da carcaça	80 ± 30
Fração de membrana da carcaça	190 ± 30
Fração solúvel do corpo gorduroso	200 ± 100
Fração de membrana do corpo gorduroso	600 ± 300
Fração solúvel dos Túbulos de Malpighi	1200 ± 300
Fração de membrana dos Túbulos de Malpighi	1800 ± 300
Fração solúvel do epitélio do ventrículo	40 ± 20
Fração de membrana do epitélio do ventrículo	250 ± 10
Conteúdo do ventrículo	220 ± 40
Hemolinfa	200 ± 80

Tabela X: Atividade de trealase em diferentes órgãos da larva de *S. frugiperda* crescida em dietas contendo 0,1% de Amigdalina.

Os valores são porcentagem da atividade de trealase encontrada nas larvas criadas em dieta artificial sem amigdalina. Os dados são médias (e desvio padrão da média) de determinações realizadas com três amostras diferentes, cada uma contendo dez animais.

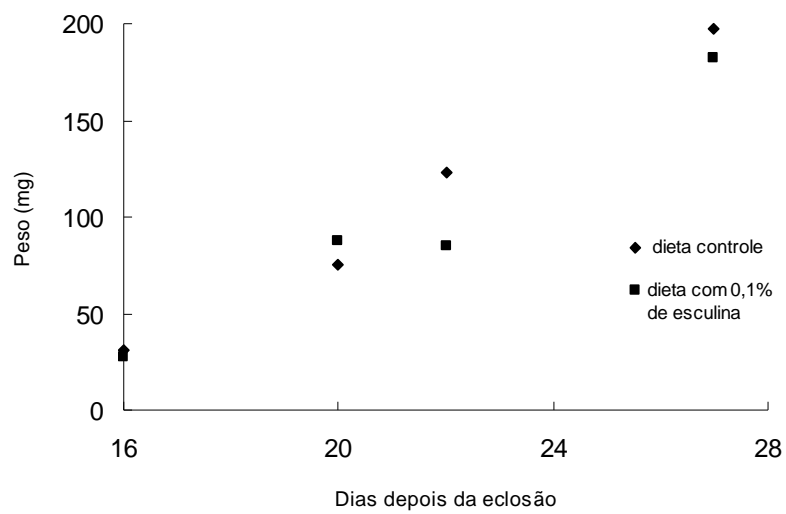


Figura 32: Peso da larva de *D. saccharalis* criada numa dieta controle e numa dieta contendo 0,1 % de esclina. Foram usados de 30 a 40 animais em cada determinação.

Ao contrario de *S. frugiperda*, *D. saccharalis* criada em dieta normal possui em seu intestino enzimas capazes de clivar esculina (1,1 mU/an), e mesmo quando alimentada com esculina não há aumento dessa atividade.

Aparentemente não foi encontrada esculina em nenhum local além do conteúdo do ventrículo devido a digestão do glicosídeo.

5. DISCUSSÃO

5.1. O SÍTIO ATIVO DA TREALASE INTESTINAL SOLÚVEL:

A partir dos dados obtidos aqui mais as evidências anteriores que mostram que os resíduos catalíticos presentes na enzima solúvel são um carboxilato e um resíduo de Arg, pudemos montar o seguinte esquema para o sítio ativo da trealase solúvel de *S. frugiperda*:

Metil- α -glucopiranosídeo se ligaria no subsítio onde está o grupo carboxila, protegendo a enzima da modificação por EDC, quando esse sub-sítio é ocupado ocorre uma modificação conformacional na enzima, uma vez que há mais exposição dos resíduos de Arg e His. Esses estão no outro subsítio. O resíduo de histidina estaria próximo ao resíduo de arginina, uma vez que o resíduo de histidina está provavelmente modulando o pKa do resíduo de arginina (Fig. 33).

5.2. AS TREALASES INTESTINAIS DE *S. FRUGIPERDA*:

Quando a seqüência incompleta da trealase 1 foi submetida a um blastX com outras dessas proteínas já seqüenciadas, obteve-se a maior identidade e similaridade com a enzima de *Bombyx mori*, outro Lepidoptera. Se realmente essa enzima de *Bombyx mori* estiver localizada na musculatura do intestino médio (Mitsumasu et al., 2005), talvez o mesmo ocorra com essa trealase de *S. frugiperda*.

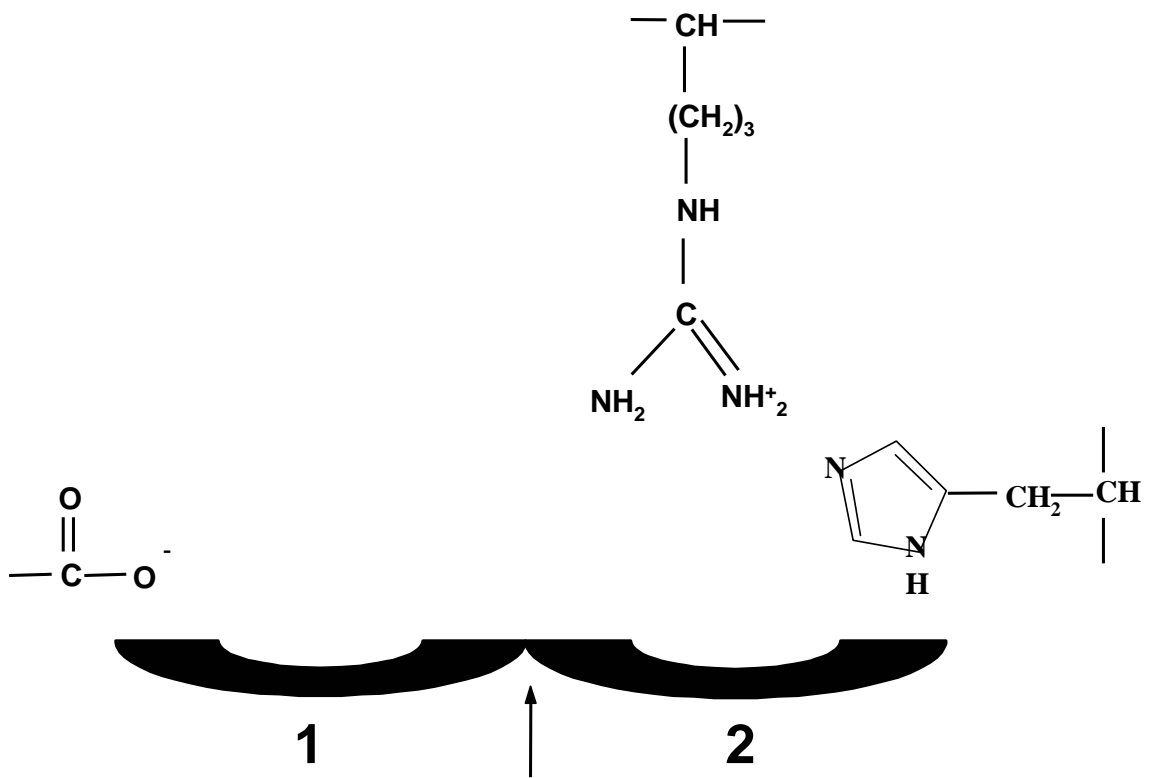


Figura 33: Esquema do sitio ativo da trealase solúvel.

A trealase solúvel de *S. frugiperda* (Tre 2) tem a maior similaridade e identidade com a enzima solúvel do tubo digestivo de *B. mori*. A seguir, ela assemelha-se mais a trealase digestiva de *T. molitor*.

A figura 34 apresenta o alinhamento da Tre 1 com outras trealases sabidamente associadas a membrana. A trealase 1 de *S. frugiperda* possui uma região hidrofóbica no e um sitio Omega na região C-terminal para âncora de GPI, do mesmo modo que a enzima humana (usando o programa GPI-SOM).

Na figura 35 está apresentado o alinhamento da Tre 2, que não possui região hidrofóbica para a inserção na membrana nem sinais para âncora de GPI. Sua seqüência foi alinhada com outras trealases solúveis de insetos.

Como já foi mencionado anteriormente as glicosil-hidrolases podem ser classificadas em famílias baseada na similaridade entre as seqüências. Como mencionado anteriormente, trealase estão na família 37 e na família 65. Tanto a trealase 1 quanto a trealase 2 de *S. frugiperda* fazem parte da família 37 das glicosil-hidrolases para a qual não se conhece nem os grupos catalíticos nem os grupos envolvido em catalise, nem a estrutura tridimensional de nenhum de seus membros. Desse modo não é possível tentarmos modelar a estrutura das enzimas seqüenciadas e tentar verificar

```

Humana      --MPGRTWELCLLLLLLGLG-----LGS-QEALPPPCESEIYCHGELLNQVQMAKL
A. Fransciana  -----MCAFLSFFVVFVFATTVSCRGLVLSERAKQLPPVCASEIYCHGTFLHTIQMAGL
trellaa      -----
bombyx      -----MFIVWLWVGFAMAASVVA---DRSKLPPACDSMIYCHGPLLNTVQMAGL
A. mellifera  MASSCSIRCGSRNILVNAAATFLALLVLRFCFANAEPSPCQSDVYCRGELLHTIQMASI
|           |           |           |           |           |
1-----10-----20-----30-----40-----50-----60

Humana      YQDDKQFVDMPLSIAPEQVLQTFTELSRDHNHSIPREQLQAFVHEHFQAKGQELQPWTPA
A. Fransciana  FRDSKTFVDKCLKINPEEVLASFVFLMNSTDQNPSSRDQLAAFINLHFEPGSEFEEDWPI
trellaa      -----
bombyx      YNDSKTFVDMKIKMSPNITLHFFYDMSRSDSNPTKADIQEFVNQNFDPGSEFEDWRPS
A. mellifera  YKDSKTFVDMKMKRPPDETLKSFREFMERHEQMPTRYQIERFVNDTFDPEGSEFEDWDPD
|           |           |           |           |           |
-----70-----80-----90-----100-----110-----120

Humana      DWKDSPQFLQKISDAKLRWAGQLHQLWKKLGKKMKPEVLSHPERFSLIYSEHPFIVPGG
A. Fransciana  DWHSNPSFLDGIRDNTLNKIWGNLSLHEAWTWLGRKIRDDVRINPQLYSMMYLPNPFIIIPGG
trellaa      -----
bombyx      DWKHNPGLAKIKDPLLHKWASALNDLWDLGRKMKEAVKESPDLYSIIYVEHPFIVPGG
A. mellifera  DWTFRPKFLSRILDDDLRNFASELNGIWKMLGRKMKDDVRVNEELYSIIYVPHVIVPGG
|           |           |           |           |           |
-----130-----140-----150-----160-----170-----180

Humana      RFVEFYWDSYWVMEGLLLSEMAETVKGMLQNFLLDLVKTYGHVPNGGRVYYLQRSQPPLL
A. Fransciana  RFRETYWDSYWI IKGLLISGMHETVKGMLLNFLLMVDITGLVPNGGRIIYEEKRSQPPLL
trellaa      -----
bombyx      RFREFYWDSYWI IKGLLSEMRRTAKGMVNNLLSIVDRYGFIPNGGRIIYLMRSQPPLL
A. mellifera  RFREFYWDSYWIVKGLLLSEMYTTVKGMLTNFVSLVDKIGFIPNGGRIIYTMRSQPML
|           |           |           |           |           |
*   * . : : : *   * : : *   * : : *   * : : *   * : : *
-----190-----200-----210-----220-----230-----240

Humana      TLMDCYLTHNTDFAFLQENIETLALFLDFWTKNRTVSVSLEGKNYLLNRYVVPYGGPRP
A. Fransciana  TPMVELYVNASGDIEFLKQNIHLLLEKEMDFWLQERTVNVDG----HRLIRYDVKVGGPRP
trellaa      IPMVKLILDDMDIEFLRQHIHTLDREYDYWMTNHTIEVNHNGHRYTLARYYDQSQGPRP
bombyx      IPMVQLMEDTDDLEYLREHIHTLDKEFDYWMTNHTIEVNHGKKLKAMMYMDSQGGPRP
A. mellifera  IPMVDEYLYKITHDYEWLENNLYLLEKEFDWMTNRTVEIEVDGVNYVLARYNEQSSGPRP
|           |           |           |           |           |
* : . : * : * : : * * * * : : : : : : : : : * * * *
-----250-----260-----270-----280-----290-----300

Humana      ESYSKDVELADTLPEGDRE-ALWAEKAGAESGWDFSSRWLIG-GPNPNSLSGIRTSKLV
A. Fransciana  ESYKEDIEAIHNPDLQAQLDFYMNIAAGAETGWDFSSRWYWN-GDIQTNLSHVTRDIL
trellaa      ESYKEDVDVARHFDNTDKKEELYAELKAAAESGWDFSSRFILNGTNKGNLTNLKTRSII
bombyx      ESYKEDVDCARHFDTTEKKEELYAELKAAAESGWDFSSRFILNGTNKGNLTNLKTRSII
A. mellifera  ESYKEDYLTQSFRNTNEEKDNYSELKTAAESGWDFSSRFILDGTNKGNTNLKTRYII
|           |           |           |           |           |
* * . : * : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
-----310-----320-----330-----340-----350-----360

Humana      PVDLNAFLCQAEELMSNFYSRLGNDSQATKYRILRSQRLAALNTVLWDEQTGAWFDYDLE
A. Fransciana  PVDLNSFIAWDFDIMSFEKQLGRDNASVVYSDLYSEWKTSINAILWDEAGSWFDYDSA
trellaa      PVDLNAIMRWNAQLLRDFHTRLGNVDKAEYRNVHARFMDAIEQVLWHEDVGVWLDYSLE
bombyx      PVDLNAILCWNAQLMMEYHTRLQNEEKASYRRIHDDFMEAIEELLWHEDVGVWLDYSLE
A. mellifera  PVDLNSIIRNAVLLAQYNQRMGNESKVAYYQKRAAEWKRAIQAVLWHDEVGAWLDYDIL
|           |           |           |           |           |
* * * * * : : : : : * : : * * : : * * * *
-----370-----380-----390-----400-----410-----420

```



```

T -----MIPFLLMVAFADTVLQVSAQ----SQPS---CDSKVYVCQGKLLHVVE
t.molitor -----CLSLRSRPTCACHSAE----VQPS---CDSLMYCQGNLLHTIQ
Pimpla MAKTTPMAKPSVGLLTLQVLVFCALTGSLASAGSIGHVTPRSDLCDSEVYVCQGELLKTIQ
tre2 -----MVSFCKMREFLILLVAVVALAGAAA----LRPT---CSKPVYCESELLHRVQ
B. -----MRLFLLLVLGTTVIA--DD----LPPT---CIRPVYCNSTLLHYVQ
      : : . * * :*: . **: ::
      | | | | |
      1-----10-----20-----30-----40-----50-----60

T MSRIFNDSKTFVELKMINDEQTTLENFDNFLRDTNHRKTRADLMKFVSDNFKQENEFESW
t.molitor MARIFNDSKTFVDMRMLNDEQTTLANFDKLMNDTDQNPSQDDIKKFFDDNFKEGDEFENW
Pimpla LGEVFKDGKTFVDHYQVNDPSVTVANFRKLMMAETGGKPNKDQLTQYVKENFAQENEVIDW
tre2 MARLFNDSKTFVDLQMNVDQNQTLRDFETLLNDTNQDPSREQLREFVDKYFSDEGELEEW
B. MARLYPDSKTFVDFQMRKDENATLSAQELLDRTNHNPTKEDLQEFVVDFFDETSELEEW
      :.:.: * .*****: * . *: * :: * . . . : : : : . * : . * . *
      | | | | |
      -----70-----80-----90-----100-----110-----120

T TPTDFTDNPTLLSRIEDKTIRQFAQDLVKIWP TLARKVKKEVLDYPEHYSLLPVDNGFII
t.molitor VPSDFTDTPKLLSRITDKSVREFAQDLVNIWPKLARKIKQEVLDSPELYTLLPVENGFII
Pimpla SPPDWQENPEFLQRVQDPVFRKWAKDLNDVWKIISRKVAPSVAEHPERHSIISVDNGFIV
tre2 TPPDFSNPKFIYTIKDKALREFAKNINDIWPLLARKVKDEVIQNPDRYSLVPITHGFII
B. KPDDHKENPPFLAKIRDEGFRFAKALNDIWPTLARRVKPSVLEKPEQSSLPMTHTGFIV
      * * : * :: : * .*****: : .:* :*: : : : : * : * : : : : : * : * : * : *
      | | | | |
      -----130-----140-----150-----160-----170-----180

T PGGRFTEFYWDSYWIIVEGLLLSDMHETVRGMLDNFLSIVEKYGFIPNGARVFYLNRSQP
t.molitor PGGRFREFYWDSYWI IKGLLLSDMHETVRGMLDNFLSIVDKYGFIPNGARIYYLNRSQP
Pimpla PGGRFQEFYWDSYWVMEGLLLTGKNTSRGILENFLSMVTRFGFIPNGRVRYYLMRSQP
tre2 PGGRFTEIYYWDTFWIIEGLLISGMQETAKGIIENLIELLNLFGHIPNGSRWYYQERSQP
B. PGGRFKEIYYWDAYWIIIEGLLITDMTETAKGMIENLIELLYKFGHIPNGSRWYYQERSQP
      ***** *:*****: : : : : * : * : : : : : : : : * : * : * : *
      | | | | |
      -----190-----200-----210-----220-----230-----240

T PLLTLMVSLYVSATNDMEWLAKNIRTIDTELRFWLNRLVDVVKDGIYVYKLAQYNSNSGS
t.molitor PLLNAMVSLYISATNDTAWLEKNIQILDRELRFWLDNKLVDVVKDDTTYRLAHY-----
Pimpla PLLIPMVDLYLTHGTGDMQFLRDNIGTLEKELGYFLSQKTVDVTKNGKTYKMARYIVSSNG
tre2 PMLTAMVATYYQYTNDTEFLKNNIAYLEKEMDFWLDERSVSVVEKEGSSHKLLRYFALSSG
B. PLLAAMVKLYYEKTKDIEFIRKYISALEKELEYWLDTHLIAFNKDDRVTLLRYYIIPSAG
      *:* ** * * * : : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
      | | | | |
      -----250-----260-----270-----280-----290-----300

T PRPESYYEDVTTASVFSDERDKAELYMDLKSAAESGWDFSSRWIVDEYGGTRGNLSALHT
t.molitor -----DAKDEQQLYMELKSGAESGWDFSSRWIIDQNGNSDANLTSLHT
Pimpla PRPESYREDYELAKNINDEAEKRRFYEDLKAAAESGWDFSSRWYISENG-TRGSLNIAT
tre2 PRPESYYEDYENAVDFDEERR-TDFYVDIKSAAESGWDFSTRWFVSNDSNNGTLRDIHT
B. PRPESYYEDYELAQLDKNTDPNDIYADLKSAAESGWDFSTRWFISESGDNSGNLTNLNT
      . : * : : : .*****: * * : : * . . * : *
      | | | | |
      -----310-----320-----330-----340-----350-----360

```

```

T      RRIIPVDLNAFLCQAFQKLSEFYQTLGDYPNATFWSKLVKIWQHSIEMVHYNRDDGIWYD
t.molitor RRIIPVDLNSYLCQAFQKLSNFYVILGDYDNATFWDNQFNWVQKTIERVLYNHEDAIWYD
Pimpla   RNIIPVELNAFLQRNARMLAQFHHTTLGNPTKAKYKDIATSYQQAIDDVLWSESEGVWLD
tre2     RYVVPADLNAIFAGALQNVANFHAILMNPRAKATYQQLAQQRDAIQAILWNEEDGMWYD
B.       KNVIPVDLNAIFAGALQITANFQTILKNPRRAAHWGYMAEQWRSSIEQALWDEEDGVWHD
          : : * . : * * : : : * : : : * : : : * : : : * *
          |         |         |         |         |
          -----370-----380-----390-----400-----410-----420

T      WDNELSQHRRMFFPSNFAPLWSETFDSRNAEILGEMAAEYFITQNMMDYHGGIPTSLSHT
t.molitor WDNELGQHRKMFFPSNFAPLWAEAYDTMYAEDIGGRAAKYFKSQKIMDYEGGIPASLSRT
Pimpla   FDLRNSQHRNYFFPTNVAPLYTQSFDSKAQIYQRAAYLTRNGILDYMGGTPASLFPT
tre2     YDIRDKLHRKYFYSSNVSPWQHAVDPNIVKANGDRILNSLKQSGGLDFPGGVPTSLIRS
B.       YDILNKNP RRYFYTSNLAPLWMNAVEKPLLAKHGARVLEYLHESQALEYPPGGIPVSLINS
          : *      * . * : . : * : : * : : : * * * . * * :
          |         |         |         |         |
          -----430-----440-----450-----460-----470-----480

T      GEQWDYPNAWPPMQSIIIVMGLDKSGSYRAKQLARELARRVVKANLIGFRQTGEMFEKYNV
t.molitor GEQWDYPNAWPPPLQSIIVMGLAKSGNCEAIEIAQEFAQRWVKANQIGFNNTGEMFEKYDA
Pimpla   GEQWDL PNAWPPPLQSIIVQALRNSNEESA EKLAKELAIRWLRANHKGYSQSGQMFEKYDA
tre2     GEQWDFPNVWPPEVSIIVNAIENIGTPEASVLA FETAQT FVRSCHWGFQ EYKQMF EKYDA
B.       GEQWDFPNAWPPPEVSIIVTAIQNIGSEESSKLAKELAQVWVRACKSGFTEKKQMF EKYDA
          ***** * . * * * * * * * : : : : : * * * * : : : * : : : * * * * :
          |         |         |         |         |
          -----490-----500-----510-----520-----530-----540

T      EVPGQNGGGGEYVVQSGFGWTNGVVLEFINQF---FTT-----
t.molitor EVPGQYGGGGGEYVIQSGFGWTNGVVLEFIDRF---FTTSKKT SR-----
Pimpla   LNP GKFGGGGEYVVQEGFGWTNGVVYEF LNSY---PNATPDDNVHMNNN-----
tre2     ENP GKFGGGGEYTVQFGFGWSNGAGLEFMKKYGEGLTADDSNDLGT TTTVSPSDNGDPSN
B.       LNAGKYGGGGGEYTVQDGF GWSNGVVLEFLDRYGA VLTSVDSVDASENNGQSNKESETDSK
          . * : * * * * * . : * * * * * * * . * * : : :
          |         |         |         |         |
          -----550-----560-----570-----580-----590-----600

T      ----
t.molitor ----
Pimpla   ----
tre2     NTA-
B.       EK--
          |
          --603

```

Figura 35: Sequências de aminoácidos da trealase 2 em comparação a sequencia de outras trealases. As seqüências aqui listadas foram retiradas do GenBank™.: T: Trealase de *T. molitor* (D11338). Pimpla: *Pimpla hipocondríaca* (AJA59958). B.: Trealase de *B. mori* (D13763). Tre 2: Trealase intestinal de *S. frugiperda*. T.molitor.: Trealase digestiva de *T. Molitor*. *, : e . Indicam resíduos idênticos, altamente conservados e pouco conservados entre as seqüências, respectivamente. O alinhamento foi feito nas condições padrões do programa ClustalW. As seqüências consenso padrão para trealase estão em cinza.

quais são os aminoácidos catalíticos. Tanto na trealase solúvel de *S. frugiperda* como na trealase intestinal de *T. molitor* (Gomez, Marana, Terra e Ferreira, manuscrito em preparação), nossos dados indicam que o nucleófilo é uma carboxila como ocorre em todas as famílias de glicosil-hidrolases. Entretanto nossos resultados apontam para a presença de uma Arg como doador de prótons, o que nunca foi descrito anteriormente para esse tipo de enzima. É interessante ressaltar que as seqüências conservadas das trealases (Fig. 34 e 35) possuem, além de um resíduo de glutamato e um resíduo de aspartato, um resíduo de arginina. Esse será o primeiro alvo de mutação sitio dirigida para verificar a importância no papel da trealase.

A trealase cuja seqüência está completa denominada aqui de trealase 2, foi expressa em bactérias com sucesso, sendo que se obtém uma enzima com atividade específica semelhante aquela que se observa quando a enzima solúvel é purificada a partir do animal.

Comparação da enzima expressa com a solúvel e a ligada a membrana presentes no animal mostra que a trealase que está sendo expressa é a solúvel, como já era previsto pelo fato de sua seqüência não ter qualquer indicação de interação com a membrana.

A trealase particulada presente no intestino médio de *S. frugiperda* tem um comportamento não usual. Quando o tecido é homogeneizado, congelado e descongelado por três vezes (no intuito de liberar enzimas presas no glicocálix) e centrifugadas, recupera-se trealase na fração particulada (Silva, 2003). Entretanto, submetendo-se essa fração de membranas a tratamento com triton X-100, CHAPS, fosforilase D ou papaína, recupera-se praticamente a mesma quantidade de enzima no sobrenadante e não difere muito do que é recuperada quando se faz um controle

tratando a preparação de membranas nas mesmas condições na ausência de qualquer agente solubilizador (Silva, 2003). Provavelmente o que ocorre é, durante a incubação com tampão a trealase está sendo liberada da membrana por ação de uma enzima proteolítica endógena (caso ela seja inserida por a membrana por um peptídeo hidrofóbico) ou por uma fosfolipase endógena, caso ela seja ancorada por uma âncora de GPI.

5.3. EFEITO DOS β -GLICOSÍDEOS DE PLANTAS EM INSETOS:

Os insetos adaptados a consumir plantas contendo β -glicosídeos devem ter criado mecanismos para metabolizar, excretar ou até mesmo seqüestrar os β -glicosídeos e assim evitar os efeitos deletérios que estes podem causar (Mainguet et al., 2000). Como aglicones são usualmente mais tóxicos que os β -glicosídeos (Brattsten 1988, Yu 1989), muitos insetos evitam os efeitos deletérios provocados pelo aglicone diminuindo a atividade das enzimas capazes de clivar o β -glicosídeo (Lindroth, 1988; Ferreira et al., 1997; Mainguet et al., 2000).

Tanto quanto sabemos, os alvos finais dos aglicones, sem contar o cianeto foram relatados em dois casos. Um deles mostrou que derivados de aglicones podem alquilar o grupo imidazol da His catalítica de uma quimotripsina de inseto, que torna-se inativa (ver Terra e Ferreira, 2005). O outro é esse trabalho que mostra que vários β -glicosídeos inibem trealases de tecidos de diferentes insetos.

Algumas trealases não mais inibidas pelo aglicone mandelonitrila do que por seus glicosídeo prunasina. Isso ocorre mais com as trealases presentes no tubo digestivo do que em outros tecidos (Tabelas IV-VII). As trealase do intestino serem menos

inibidas pelos glicosídeos que pelo aglicone pode ser adaptativo, já que no intestino os glicosídeos podem não ser ou ser só parcialmente hidrolizados pelas enzimas presentes aí, e porque também alguns insetos diminuem a atividade de β -glicosidase após a ingestão de glicosídeos tóxicos

As trealases intestinais também podem não ter evoluído para evitar a inibição pelo aglicone porque trealose usualmente não é um componente importante da dieta. Por outro lado, a inibição de trealases dos órgãos internos seria danoso para o inseto, por que absorção dos aglicones pelo intestino deve ser mais fácil que a absorção do glicosídeo.

A primeira vez que verificou-se a inibição de trealases não intestinais de insetos por β -glicosídeos de plantas foram nas preliminares desse trabalho (Silva, 2003). É provável que a inibição dessas trealase por esculina seja pelo menos uma das causas dos efeitos deletérios que esse glicosídeo tem em *S. frugiperda*, aonde não somente o peso da larva mas também o peso da pupa fêmea diminui se o inseto é alimentado com dieta contendo esculina. O fato de somente o peso das pupas fêmeas e não dos machos ser afetado por dietas ruins também foi descrito por Leather (1998). Janarthan et al. (1994) mostraram uma correlação positiva entre o peso da larva de *B. mori* e a produção de ovos pelo adulto e Tisdale e Sappington (2001) encontraram uma correlação entre o peso da pupa de *Spodoptera exigua* e o tempo de fecundidade potencial. Levando em conta estes resultados é provável que uma dieta com esculina irá diminuir a ovoposição de *S. frugiperda*. Todos estes efeitos podem resultar da diminuição da oferta de glicose, causando mal funcionamento dos tecidos.

Para entender em que extensão os β -glicosídeos tóxicos, produzidos por plantas, afetam as trealases “in vivo”, deve-se verificar se os aglicones e/ou glicosídeos são

absorvidos pelo intestino e alcançam os demais tecidos. Para isto a distribuição de esculina nos diferentes tecidos da larva de *S. frugiperda* foi determinada após o inseto ser alimentado com dieta contendo esculina. Esculina é fluorescente enquanto seu aglicone não é.

Esculina foi encontrada em muitos órgãos internos, mostrando que pode ser absorvida sem digestão. A maior quantidade do composto foi encontrada na hemolinfa, aonde atingiu 0,2 mM. In vitro 0,5 mM de esculina é capaz de abolir completamente a atividade da trealase hemolinfática. A inibição da atividade de trealase da hemolinfa de *S. frugiperda* pode ser parcialmente a responsável pelo fato da larva alimentada com esculina ter 60% menos de massa corporal que as larvas controle. Alguns insetos estocam compostos tóxicos dos quais eles se alimentam e desse modo protegem-se do ataque de predadores (Francis et al., 2001; Mishida, 2002). Esse não parece ser o caso de *S. frugiperda*, pois esculina prejudica o seu crescimento.

Insetos certamente possuem mecanismos para reduzir a inibição das trealases. Um mecanismo pode ser a alta concentração de trealose, a qual chega a 100mM em lepidoptera (Thompson, 2003). Nestas condições a inibição causada pelos β -glicosídeos pode ser diminuída, pois muitos são inibidores competitivos das trealases (Silva, 2004). Outra estratégia usada pelos insetos pode ser aumentar a atividade de trealase, como sugerido pelos resultados obtidos com *S. frugiperda* criadas em dieta contendo esculina ou amigdalina. Larvas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta contendo 1% de amigdalina não apresenta mudanças nos seus parâmetros de crescimento (Ferreira et al., 1997) enquanto insetos alimentados numa dieta com 0,1% de esculina apresenta mudanças drásticas no seu peso. A atividade de trealase aumenta mais em animais alimentados com dieta contendo amigdalina do que em animais alimentados com

esculina. Este aumento na atividade de trealase é provavelmente causado pela síntese de novas moléculas de trealase em resposta um mecanismo de sinalização desconhecido. Isso seria semelhante ao que ocorre com tripsinas de insetos. Em resposta a ingestão de inibidores de tripsina, as tripsinas são expressas em maior quantidade (Bown et al., 1997) ou novas moléculas de tripsina resistente aos inibidores podem ser induzidas (Mazumdar-Leighton & Brodway, 2001).

Devido a variedade de β -glicosídeos tóxicos e a diversidade de espécies de insetos, os efeitos dos β -glicosídeos sobre os insetos e o modo como os insetos contornam os problemas causados pela ingestão dos β -glicosídeos pode mudar dependendo da espécie do inseto e do β -glicosídeo consumido. Aqui nós mostramos que um dos mecanismos usados pelo inseto para contornar a inibição da trealase é o aumento da atividade da enzima. Somente estudos mais profundos sobre esse assunto podem revelar todos os mecanismos dessa interação inseto-planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Asano N., Kato A., Matsui K. (1996). Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *Eur. J. Biochem.* 240, 692-698.
- Azuma M., Yamashita O. (1985). Cellular localization and proposed function of midgut trehalase in the silkworm larva, *Bombyx mori*. *Tissue and cell* 17, 539-551.
- Becker A., Schlöder P., Steele J. E., Wegener G. (1996). The regulation of trehalose metabolism. *Exper.* 52, 433-439.
- Bhem C. A. (1997). The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.* 27, 215-229.
- Blum H., Beier H., Gross H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electroph.* 8, 93-99.
- Bounias M., Bahjou A., Gordoux L., Moreau R. (1993). Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 31, 249-266.

- Bown D. P., Wilkinson H.S., Gatehouse J. (1997). Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 625-638.
- Bradford M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bratteten L. B. (1988). Enzymic adaptations in leaf-feeding insects to host-plant allelochemicals. *J. Chem. Ecol.* 14, 1919-1939.
- Chen C.C., Guo W.J.Y., Isselbacher K. J. (1987). Rat intestinal trehalase. *Biochem. J.* 274, 415-424.
- Cooligan J. E., Dunn B. M., Ploegh H. L., Speicher D. W., Wingfield P.T. (1995). *Current protocols in protein science*. New York: John Wiley & Sons.
- Dahlqvist A. (1968). Assay of intestinal disaccharidases. *Analyt. Biochem.* 22, 99-107.
- Egloff M.P., Uppenberg J., Haalck L., Van Tilbeurgh H. (2001). Crystal structure of maltose phosphorylase from *Lactobacillus brevis*: Unexpected evolutionary relationship with glucoamylases. *Struct.* 9, 689-697.
- Espinoza-fuentes F.P., Ferreira C., Terra W.R. (1984). Spatial organization of digestion in the larval and imaginal stages of the sciarid fly *Trichosia pubescens*. *Insect. Biochem.* 14, 631-368.
- Espinoza-fuentes F.P., Ferreira C., Terra W.R. (1987). Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 17, 809-817.

- Ferreira C., Parra J.R.P., Terra W.R. (1997). The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidase from *Spodoptera frugiperda* and *Diatrea saccharalis*. *Insect. Biochem. Physiol.* 119B, 219-225.
- Francis F., Lognay G., Wathelet J.P., Haubruge E. (2001). Effects of allelochemicals from first (Brassicaceae) and second (*Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*) trophic levels on *Adalia bipunctata*. *J. Chem. Ecol.* 27, 243-256.
- Gallo D., Nakano O., Neto S. S., Carvalho R. P. L., Batista G.C., Berti E. F., Parra J. R.P., Zucchi R. A., Alves S.B., Vendramim J. D. (1988). Manual de entomologia Agrícola. Editora agronômica Ceres. São Paulo.
- Gillot C. (1995). *Entomology* 2nd ed. Premium Press, New York.
- Grimaldi D., Engle M. S. (2005). *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, New York.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Henrissat B., Bairoch A. (1993). New families on the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781-788.
- Henrissat B., Romeu A. (1995) Families, superfamilies and subfamilies of glucosyl hydrolases. *Biochem. J.* 311, 309-316.
- Hiraoka T., Hayakawa Y., Downer R.G.H. (1995). Immunocytochemical localization of trehalase inhibitor in some insect species. *Cell Tissue Res.* 279, 465-468.

- Ishihara R., Taketani S. Sasai-Takedatsu M. Kino M. Tokunaga R., Kobayshi Y. (1997). Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene* 202, 69-74.
- Janarthannan S., Sathiamoorthi M., Rathinam K. M.S., Krishnan M. (1994). Photoperiod effect of on larval-pupal characteres, fat-body nucleic-acids and protein of silkworm, *Bombyx mori* L. *Insect Sci. Appl.* 15, 129-137.
- Kono Y., Takeda S., Kameda Y., Takahashi M., Matsushita K., Nishina M., Hori E. (1993). Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine-A, and its influence on the blood-sugar level in *Bombyx mori* (lepidoptera, bombycidae) .*Applied Entomol. Zool.* 28, 379-386.
- Kono Y., Takeda S., Kameda Y. (1994a). Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine-a, against *Mamestra brassicae* and *Spodoptera litura*. *J. Pest. Sci.* 19, 39-42.
- Kono Y., Takahashi M., Matsushita K., Nishina M., Kameda Y., Hori E. (1994b). Inhibition of flight in *Periplaneta americana* (linn) by a trehalase inhibitor, validoxylamine-a .*J. Insect Physiol.* 40, 455-461.
- Knuesel I, Murao S, Shin T, Amachi T, Kayser H., (1998). Comparative studies of suidatrestin, a specific inhibitor of trehalases. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 120, 639-46.

- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.
- Lee J., Tsuji M., Nakamura M., Nishimoto M., Okuyama M., Mori H., Kimura A., Matsui H., and Chiba S. (2001). Purification and identification of the essential ionizable groups of honeybee, *Apis mellifera* L., trehalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (12), 2657-2665.
- Leather, S. R., Beare, J. A., Cooke, R. C. A., Fellowes, M.D.E. (1998). Are differences in life history parameters of the pine beauty moth *Panolis flammea* modified by host plant quality gender?. *Entomol. Exp. Appl.*, 87,237-243.
- Lindroth R.L. (1988). Hydrolysis of phenolic glucosides by midgut β -glucosidases in *Papilio glaucus* subspecies. *Insect Biochem.* 18, 789-792.
- Mainguet A.M., Louveaux A., El Sayed G., Rollin P. (2000). Ability of a generalist insect, *Schistocerca gregaria*, to overcome thioglucoside defense in desert plants: tolerance or adaptation? *Entomol. Exp. Appl.* 94, 309-317
- Marana S.R., Terra W.R., Ferreira C. (2001). Purification and properties of a β -glucosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 30, 1139-1146.

- Mazumdar-Leighton S., Brodway R. M. (2001). Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 645-657.
- Mitsumasu K., Azuma M., Niimi T., Yamashita O., Yaginuma T. (2005). Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori* Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 14, 501-508.
- Morton R.E., Evans T. A. (1992). Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein-content analytical. *Biochem.* 204, 332-334.
- Murray J. A., Coupland K., Smith J.A., Ansel I.D., Long R.G. (2000). Intestinal trehalase activity in a UK population establishing a normal range and the effect of the disease. *Brit. J. Nutr.* 83, 241-245.
- Nishida R. (2002). Sequestration of defense substances from plants by Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 47, 57-92.
- Nakano M., Sacktor B. (1984). Renal Trealase: two subsites at the substrate-binding site. *Biochem. Biophys. Acta.* 791, 45-49.
- Pashley D. P. (1988). Current status of fall armyworm Host strains. *Florida Entomologist.* 71, 227-234.

- Parra J.R.P. (1986). Criação de insetos para estudos com patógenos. In Alvez SB (Ed.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Editora Monole. 348-373.
- Parra J.R.P., Mihsfeldt L.J. (1992). Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: Anderson T.E.; Leppla N.C. (Eds). Advances in insect rearing for research and pest management. Boulder, Co: Westview Press
- Pellerone F. I., Archer S.K. Bhem C.A., Grant W.N., Lacey M. J. & Sormeville A. C. (2003). Trehalose metabolism genes in *Caenorhabditis elegans* and filarial nematodes. *Int. J. Parasitol.* 33,1195-1206.
- Ribeiro A. F., Ferreira C., Terra W.R. (1990). Morphological basis of insect digestion. In Mellinger, J.(Ed). *Animal nutrition and transport processes*. Vol. I. Karger, Basel 96-105.
- Richardis A. B., Krakowka S., Dexter L.B., Schmid H., Wolterbeek A. P. M., Shigoyuki A., Kurimoto M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem. Toxicol.* 40, 871-898.
- Sanger F. Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning – A laboratory manual. 2 Ed., Sprig Harbor.
- Santos C. D., Ribeiro A. F., Terra W.R. (1986). Differential centrifugation, calcium precipitation, and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnys ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. Can. J. Zool., 64, 490-500.
- Silva M.C.P. (2003). Caracterização da trealase solúvel de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Química, Departamento de Bioquímica.
- Silva M.C.P., Terra W. R., Ferreira C. (2004). The role of carboxil, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from na insect larvae. Insect Biochem. Molec. Biol., 34, 1089-1099.
- Silva, M.C.P., Terra, W. R., Ferreira, C. (2006). Absortion of toxic β -glucosides produced by plants and their effect on trehalase of tissues from insects. Comp. Biochem. Physiol. 143, 367-373.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985). Measurements of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76-85.

- Spencer K.C. (1988). Chemical mediation of coevolution in the *Passilora-Heliconius* interaction. In: Spencer, K.C. (Ed.) Chemical mediation of coevolution. Academic Press, Inc, pp 167-240.
- Targa H. J. and Peres C. A. (1979). Radiation-induced dominant lethal mutations in oocytes of *Musca domestica*. *Mutation Res.* 63, 153-160.
- Terra W. R., Ferreira C., Bianchi A. G. (1978). Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochem. Biophys. Act.* 524, 131 - 141.
- Terra W. R., Terra I. C. M., Ferreira C., Bianchi A. G. (1979a). Carbodiimide-reactive carboxyl groups at the active site of an insect midgut trehalase. *Biochem. Biophys. Acta.* 571, 79-85.
- Terra W. R., Ferreira C., Bianchi A. G. (1979b). Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and Midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-494.
- Terra W. R., Ferreira C. (1981). The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: Digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara americana*. *J. Insect Physiol.* 27, 325-331.
- Terra W. R., Ferreira C., Bastos F. (1985). Phylogenetic considerations of insect digestion - disaccharidases and the spatial-organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* 4, 443-449

- Terra W.R., Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B,1-62.
- Terra W. R., Ferreira C. (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert L. I., Latrou K., Gill S. S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science. Biochemistry and Molecular biology*, vol4. Elsevier, Oxford, pp. 174-224.
- Tisdale R.A., Sappington T.W. (2001). Realized and potential fecundity, egg fertility, and longevity of laboratory-reared female beet armyworm (*Lepidoptera:Noctuidae*) under different adult diet regimes. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93, 415-419.
- Thevelein J. M. (1984). Regulation of trealose mobilization in fungi. *Microbiol. Revie.* 48 (1), 42-59.
- Thompson S.N., Suarez R.K. (2003). Metabolism. In *Encyclopedia of insects*, Ed. Resh, V.H. and Cardé, R.T., pp. 703-707, Academic Press, London.
- Van Beers E. H., Buller H.A., Grand R. J., Einerhand A. W. C., Dekker J. (1995). intestinal brush-border glycohydrolases - structure, function, and development. *Critical Revie. In Biochem. Mol. Biol.* 30, 197-262.
- Wingler A. (2002). The function of trealase biosynthesis in plants. *Phytochem.* 60, 437-440.

- Wyatt G.R. (1964). The biochemistry of sugars and polysaccharides in *Musca domestica* L. and *Calliphora erythrocephala* Meig. *J. Insect Physiol.* 10, 273-278.
- Wegener G., Tschiedel V., Schloder P., Ando O. (2003). The toxic and lethal effects of the trehalase inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *J. Exper. Biol.* 206, 1233-1240.
- Yu S.J. (1989). β -glucosidase in four phytophagous Lepidoptera. *Insect Biochem.* 19, 103-108.
- Zagrobelny M., Bak S., Rasmussen A. V. Jorgensen B., Naumann C. M., Moller B. L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochem.* 65, 293-306.

CURRICULUM VITAE

NOME: Maria Cicera Pereira da silva

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: São Paulo, 04 de Outubro de 1977

EDUCAÇÃO

EESG condessa Filomena Matarazzo – São Paulo, SP, 1993-1995.

Universidade de São Paulo/Instituto de Biociências – São Paulo, SP, 1997-2000.
Curso: Bacharelado em Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo/Instituto de Química – São Paulo, SP, 2001-2003.
Mestrado em Bioquímica.

OCUPAÇÃO

Bolsista de mestrado (FAPESP) – Universidade de São Paulo (2001-2003).

Bolsista de doutorado (FAPESP) – Universidade de São Paulo (2003-2006).

PUBLICAÇÕES

Silva, M.C.P., Terra, W. R., Ferreira, C. (2004). The role of carboxil, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalase purified from na insect larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34, 1089-1099.

Silva, M.C.P., Terra, W. R., Ferreira, C. (2006). Absortion of toxic β -glucosides produced by plants and their effect on trehalase of tissues from insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 367-373.