

LUCIANA PEREIRA XAVIER

**PURIFICAÇÃO PARCIAL, PROPRIEDADES E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA
DE PROTEASES TRIPSINA-LIKE DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA
SOJA, *Anticarsia gemmatilis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

X3p
2006

Xavier, Luciana Pereira, 1975-

Purificação parcial, propriedades e caracterização cinética de proteases tripisina-*like* do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* / Luciana Pereira Xavier.

– Viçosa : UFV, 2006.

xvii, 108f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 88-108.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Cinética enzimática.
3. *Anticarsia gemmatalis*. 4. Interação inseto-planta.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.76

LUCIANA PEREIRA XAVIER

**PURIFICAÇÃO PARCIAL, PROPRIEDADES E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA
DE PROTEÁSES TRIPSINA-LIKE DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DA
SOJA, *Anticarsia gemmatalis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2006.

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Matos Santoro
(Co-Orientador)

Profª Célia Alencar de Moraes

Dr. Thiago Rennó dos Mares-Guia

Profª Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

A toda a minha família, amparo incondicional e intenso nos momentos mais importantes e difíceis destes últimos quatro anos. Em especial ao meu pai Marcos Xavier, que torceu e acreditou que os meus sonhos se concretizariam... A todos os meus amados que estão na Terra e aos que estão no espaço.

“Não há entrada já aberta para a ciência e só aqueles que não temem a fadiga de galgar suas escarpas abruptas é que têm a chance de chegar a seus cimos luminosos.”

Karl Marx, Londres, 18 de março de 1872.

AGRADECIMENTOS

Sou grata:

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do Curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV), pela cessão do espaço onde se realizou grande parte deste trabalho de tese.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela disponibilidade das dependências para realização da segunda parte deste trabalho de tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Estudo.

À Professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, amizade, paciência e confiança transmitida em todos os momentos.

A Professor Marcelo Matos Santoro, meu primeiro mestre de Bioquímica, por ter me ensinado a amar e respeitar esta ciência, pela amizade, pela orientação, pelo apoio e pelo acolhimento em seu laboratório durante a execução de parte desta tese.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela amizade, pela paciência nos meus infindáveis questionamentos e por ter-me apresentado a Fisiologia dos Insetos, pela qual me apaixonei.

Ao Departamento de Microbiologia ICB-UFMG e à Professora Regina Nardi, pela amizade e pelo apoio nos experimentos da tese.

Ao Professor Carlos Bloch Júnior e ao Sr. Jorge Taquita, pelo suporte técnico e pela realização dos experimentos com o MALDI-TOF (CENARGEN – EMBRAPA, Brasília) e ao Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, pelo suporte e auxílio nos ensaios com o ESI-TOF.

Ao Agenor Valadares, pelo incentivo constante, pela compreensão e tolerância nos momentos difíceis, pela paciência e auxílio durante o período de realização do trabalho de tese e, principalmente, pelo amor e carinho de todas as horas.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos da UFV Fabrício, Anderson, Eduardo, Franciny e Liliane; e aos Professores Marcelo Bemquerer, e Ronaldo Nagen e aos meus colegas Ademar, Alexandre, André, Daniel, Jamil, Janete, Kádima, Malu, Marco Antônio, Marcos Aurélio e Thiago, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas da UFMG.

Ao secretário de Pós-Graduação Eduardo Pereira Monteiro, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da UFV, de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG; e da Pós-Graduação em Entomologia da UFV, pelo incentivo e companheirismo.

Aos meus amigos Waldney Martins, Izaltina Jardim, William Borges, Damião Tavares, Edgar Piekarski e Jacqueline Viana, por terem sofrido comigo e me incentivado nas horas mais difíceis da minha vida e, por, mesmo de longe, terem me apoiado e, ainda continuarem me apoiando.

À minha irmã Flavia Xavier e à minha mãe Rosaura Xavier, pela presença permanente, pelas noites maldormidas e pelo incentivo sobre-humano a todo o momento.

BIOGRAFIA

LUCIANA PEREIRA XAVIER, filha de Marcos Xavier e Rosaura Lúcia Pereira Xavier, nasceu em 21 de abril de 1975, na cidade de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais.

Em 10 de setembro de 1999, bacharelou-se em Ciências Biológicas, com ênfase em Bioquímica e Imunologia, pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte.

Em 18 de janeiro de 2001, graduou-se no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Em março de 2001, ingressou-se no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, diplomando-se em 06 de agosto de 2002, com o título de *Magister Scientiae*.

Em setembro de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, submetendo-se à defesa de tese em 31 de agosto de 2006.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Interação planta-inseto	4
2.2. Resistência de insetos a patógenos	8
2.3. As serino proteases (EC 3.4.21.4)	9
2.3.1. <i>Tripsinas</i> (EC 3.4.21.4)	12
2.4. Importância do estudo de insetos-praga para a agricultura brasileira	18
3. OBJETIVOS	21
PARTE I	
Caracterização de Isoformas Aniônicas de <i>Tripsina-like</i> do Intestino Médio da Lagarta da Soja, <i>Anticarsia gemmatalis</i>	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. METODOLOGIA	26
2.1. Insetos	26

2.1.1. Criação da lagarta da soja	26
2.1.2. Preparo da dieta artificial	27
2.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio	27
2.3. Ensaio de estabilidade	28
2.4. Testes de purificação	28
2.4.1. Cromatografia de gel-filtração	28
2.4.2. Cromatografia de troca iônica	28
2.4.3. Cromatografia de afinidade	29
2.5. Atividade enzimática	29
2.6. Determinação da concentração de proteína	30
2.7. Ensaio antimicrobiano	30
2.8. SDS-PAGE	30
2.9. Análise em zimograma	30
3. RESULTADOS	32
3.1. Ensaio de estabilidade	32
3.2. Calibração da coluna de gel-filtração Superose 12 HR 10/30	32
3.3. Testes de purificação	35
3.3.1. Gel-filtração e diálise	35
3.3.2. Purificação de FI	35
3.3.2.1. Gel-filtração, afinidade e troca iônica	35
3.3.3. Purificação de FII	35
3.3.3.1. Gel-filtração e afinidade	35
3.4. SDS-PAGE e zimograma	40
3.5. Ensaio de atividade antimicrobiana	52
4. DISCUSSÃO	44
4.1. Ensaio de estabilidade	44
4.2. Purificação	45
4.3. SDS-PAGE e zimograma	48
4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana	50
5. CONCLUSÃO	52

PARTE II	
Purificação e Caracterização de Proteases Tripsina-like Catiônicas Obtidas do Intestino Médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>, Lagarta da Soja	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. METODOLOGIA	58
2.1. Insetos	58
2.1.1. Criação da lagarta da soja	58
2.1.2. Preparo da dieta artificial	59
2.2. Obtenção do extrato do intestino médio	59
2.3. Purificação	60
2.4. Determinação da concentração de proteína	61
2.5. Atividade enzimática	61
2.6. SDS-PAGE, teste de glicosilação e análise em zimograma	61
2.7. Determinação da constante cinética	62
2.8. Análise das amostras com PMSF em cromatografia de fase reversa	62
2.9. Espectrometria de massa	63
3. RESULTADOS	65
3.1. Purificação	65
3.2. SDS-PAGE, zimograma e teste de glicosilação	70
3.3. Determinação da constante cinética	76
3.4. Análise em fase reversa das amostras com PMSF	78
3.5. Espectrometria de massa	78
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

LISTA DE QUADROS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
Quadro 1 - Propriedades das enzimas tripsina- <i>like</i> obtidas do intestino médio de Lepidoptera	15
Quadro 2 - Comparação dos resíduos divergentes de isoformas de tripsina de Lepidoptera e tripsina bovina	17
PARTE I	
Quadro 1 - Purificação parcial de tripsina- <i>like</i> provenientes de FI e FII	39
Quadro 2 - Ensaio antimicrobiano	43
PARTE II	
Quadro 1 - Purificação de tripsina- <i>like</i> catiônica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	69
Quadro 2 - Caracterização cinética de proteases tripsina- <i>like</i> de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO DE LITERATURA	
Figura 1 - Interação inseto-planta	6
Figura 2 - Organização do clip domínio de proteases de Artrópodes	10
Figura 3 - Nomenclatura de Scheter & Berger para a ligação de um substrato a uma enzima	13
Figura 4 - Índice de perdas até a pré-colheita da soja	19
PARTE I	
Figura 1 - Estabilidade da atividade amidásica de enzimas tripsina-like presentes no extrato enzimático durante o armazenamento	33
Figura 2 - Curva para calibração de coluna Superose 12 HR 10/30	34
Figura 3 - Cromatografia de gel-filtração	36
Figura 4 - Cromatografia de afinidade de FI (A) e FII (B)	37
Figura 5 - Cromatografia de troca iônica	38
Figura 6 - SDS-PAGE das proteases parcialmente purificadas de <i>A. gemmatalis</i>	41
Figura 7 - Zimograma das proteases parcialmente purificadas de <i>A. gemmatalis</i>	42
PARTE II	
Figura 1 - Cromatografia de afinidade	66
Figura 2 - Cromatografia de troca iônica	67
Figura 3 - Cromatografia de fase reversa	68
Figura 4 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina-like parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade de <i>A. gemmatalis</i>	71

Figura 5 - Zimograma das proteases tripsina- <i>like</i> parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade de <i>A. gemmatalis</i>	72
Figura 6 - Coloração PAS do SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina- <i>like</i> parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade	73
Figura 7 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina- <i>like</i> parcialmente purificadas por cromatografia de troca catiônica	74
Figura 8 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina- <i>like</i> purificadas por cromatografia de fase reversa	75
Figura 9: Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases tripsina- <i>like</i> do intestino médio de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	77
Figura 10: Análise por espectrometria de massa em ESI-TOF de alíquota da amostra do pico 1 obtido em cromatografia de fase reversa	79
Figura 11: Análise por espectrometria de massa em ESI-TOF de alíquota da amostra do pico 3 obtido em cromatografia de fase reversa	80
Figura 12: Análise por espectrometria de massa em MALDI-TOF de alíquota da amostra do pico 3 obtido em cromatografia de fase reversa	81
Figura 13: Espectrograma de massa obtido em ESI-TOF representativo para as amostras dos picos 2, 4, 5 e 6 obtidos em cromatografia de fase reversa	82

ABREVIATURAS

BSA – albumina soro bovina

L-BApNA – N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilida

BHI – “brain-heart infusion”

BPTI – inibidor de tripsina de pancreas bovino

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

ESI-TOF – espectrômetro de massa com fonte de ionização *electrospray* com analisador por tempo de voo

FPLC – equipamento de cromatografia líquida de baixa pressão

HPLC – equipamento de cromatografia líquida de alta “performance”

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorido

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

kDa – kilodalton

K_{M app} – constante de Michaelis-Menten aparente

MALDI-TOF – espectrômetro de massa com fonte de ionização por desorção a *laser* com auxílio de matriz sólida e analisador por tempo de voo

TLCK – tosil-L-Lys-clorometil cetona

TPCK – tosil-L-Phe-clorometil cetona

Tris – tris (hidroximetil) amino metano

V_{max app} – velocidade máxima aparente

RESUMO

XAVIER, Luciana Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2006.
Purificação parcial, propriedades e caracterização cinética de proteases tripsina-like do intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e Marcelo Matos Santoro.

A identificação e caracterização de proteases do intestino médio de insetos são de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento de cultivares resistentes às pragas agrícolas. Neste trabalho, foram realizados diferentes processos de purificação para proteases tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis*, bem como a caracterização dessas proteases. Duas frações foram isoladas durante um dos processos de gel-filtração, a fração FI (aniônica), com atividade amidásica (substrato: L-BApNA) parcialmente purificada por troca iônica (coluna Mono-Q HR 5/5) e afinidade (coluna de *p*-aminobenzamidina) apresentou em SDS-PAGE bandas com massas moleculares de 17,1 kDa a 65,4 kDa; a massa molecular de 17,1k Da provavelmente seja produto de hidrólise e a massa molecular de 65,4 kDa produto de agregação; a fração FII (aniônica) também parcialmente purificada por troca aniônica e afinidade exibiu duas bandas de 33,5 kDa e 31,3 kDa. Ensaio antimicrobiano realizado contra *S. aureus* e *E. coli* indicou resultado negativo para o extrato enzimático e para amostra parcialmente purificada de FII. Em ensaio com *L. monocystogenes* e *E. faecalis*, o resultado foi positivo para o extrato enzimático e negativo para a amostra parcialmente purificada de FII. Em um segundo processo de purificação, uma serino protease tripsina-like catiônica com massa molecular de 30 kDa (SDS-PAGE) foi purificada do intestino médio de *A. gemmatalis* pela combinação de cromatografia de afinidade (coluna de *p*-aminobenzamidina), cromatografia de troca catiônica (coluna Mono-S HR 5/5), em sistema de FPLC e cromatografia de fase reversa (coluna de C-18), em sistema de HPLC. A amostra catiônica parcialmente purificada por afinidade apresentou em SDS-PAGE, bandas com massas

moleculares de 24,8 kDa, 26,3 kDa, 30 kDa, 33,4 kDa. A análise com PMSF, TLCK e TPCK, em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina, indicou que as enzimas são serino proteases tripsina-*like*. Em teste de glicosilação, verificou-se que as proteases de 24,8 kDa e de 26,3 kDa são glicosiladas. A atividade específica encontrada foi de $13,2 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ e o fator de purificação, de 123,4 vezes. Na determinação cinética, o valor de $K_{M \text{ app}}$ encontrado para as tripsinas-*like* catiônicas após cromatografia de troca iônica foi de 0,46 mM. Em análise por espectrometria de massa do material purificado em cromatografia de fase reversa em HPLC, detectaram-se as massas de 1.750,8 Da (ESI-TOF), 7.997,23 Da (MALDI-TOF) e 23.324,74 Da (ESI-TOF), sugerindo a degradação deste material durante o processamento.

ABSTRACT

XAVIER, Luciana Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2006. **Partial purification, properties and kinetics characterization of midgut trypsin-like proteases from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes and Marcelo Matos Santoro.

The identification and characterization of proteases from the insect midgut are of great importance for research and development pest resistant cultivars of crop species. Different processes of trypsin-like proteases purification from midgut *A. gemmatalis* and characterization of these proteases were carried out in this work. Two fractions were isolated during one of the gel-filtration processes, fraction FI (anionic), with amidasic activity (substrate: L-BApNA) partially purified by ion-exchange (Mono-Q HR 5/5 column) and affinity (*p*-aminebenzamidine column) showed in SDS-PAGE bands with molecular weight of 17.1 kDa and 65.4 kDa; the molecular weight of 17.1 kDa is probably hydrolysis product and the molecular weight of 65.4 kDa aggregation product. The fraction FII (anionic) also partially purified by anionic exchange and affinity presented two bands of 33.5 kDa and 31.3 kDa. Antimicrobial assay carried out against *S. aureus* and *E. coli* showed negative result for the enzymatic extract and for a partially purified sample of FII. In assay with *L. monocystogenes* and *E. faecalis*, the result was positive for the enzymatic extract and negative for a partially purified sample of FII. In a second purification process, a cationic trypsin-like serine protease with molecular weight of 30 kDa (SDS-PAGE) was purified from midgut *A. gemmatalis* by combining affinity chromatography (*p*-aminebenzamidine column), cation-exchange chromatography (Mono-S HR 5/5 column), in FPLC system and reverse-phase chromatography (C-18 column), in HPLC system. The cationic sample partially purified by affinity showed in SDS-PAGE, bands with molecular weight of 24.8 kDa, 26.3 kDa, 30 kDa, and 33.4 kDa. The analysis with PMSF, TLCK, and TPCK, in SDS-PAGE co-polymerized

with gelatin, indicated that the enzymes are trypsin-like serine protease. Glycosylation assay, in SDS-PAGE, showed positive results for bands of 24.8 kDa and 26.3 kDa. The specific activity found was $13.2 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ and the purification factor, 123.4 times. In the kinetic determination, the value of $K_{M \text{ app}}$ found for the cationic trypsin-like after ion-exchange chromatography was 0.46 mM. Mass spectrometry analysis of the material purified by HPLC reverse phase chromatography, afforded the mass of 1750.8 Da (ESI-TOF), 7997.23 Da (MALDI-TOF) and 23324.74 Da (ESI-TOF), suggesting degradation of this material during processing.

1. INTRODUÇÃO

Em 500 milhões de anos os insetos tornaram-se a maior classe entre os animais e a mais diversificada, colonizando quase todos os nichos ecológicos da Terra, à exceção dos pólos e do fundo do mar. Nesse período, os insetos estiveram em constante contato com plantas, parasitas e patógenos. Esta relação com microrganismos e plantas contribuiu para o sucesso evolutivo da classe, pois propiciou que os insetos desenvolvessem mecanismos de defesa específicos contra a ação dos microrganismos invasores e contra a reação de defesa das plantas predadas (BULET et al., 1999; NATION, 2002; DIMARQ & HUNNEYBALL, 2003).

O escape das ações negativas impostas pelos mecanismos de defesa das plantas, como os inibidores de proteases e de α -amilase, enzimas (mirosinases, peroxidases, lipoxigenases, etc.), proteínas como lectinas e arcelinas, entre outras (FELTON & GATEHOUSE, 1996; KOIWA, et al., 1997; STOTZ et al., 1999; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002), é realizado através de diferentes estratégias de contradefesa que se baseiam na ativação de genes específicos, ou no aumento do nível de consumo, indução da alteração do conjunto de enzimas digestivas, ou expressão de proteases com a sensibilidade aos inibidores de proteases diferenciada e, ou, indução da expressão de proteases específicas que clivam inibidores (JONGSMA & BOLTER, 1997; MICHAUD, 1997; BRITO et al., 2001; OPPERT et al., 2005). O estudo bioquímico e fisiológico do processo da digestão, das enzimas envolvidas nesse processo, principalmente as serino proteases, tornou-se um ponto-chave para o estudo e desenvolvimento de mecanismos de resistência a insetos em cultivares de grande interesse econômico.

Em defesa da infecção por patógenos, os insetos possuem primeiramente como estratégia uma barreira física, como a cutícula, que impede a ocorrência de infecções; quando essa barreira é vencida, há indução de um complexo de reações de respostas imune-humoral inata e imune celular em tecidos e na hemocele. Os insetos sintetizam um repertório de

peptídeos antimicrobianos, que são liberados rapidamente na hemolinfa e que também são encontrados em células do intestino, que permitem a eliminação rápida dos microrganismos invasores. Cerca de 50% dos peptídeos antimicrobianos estudados e caracterizados, presentes na literatura, são de invertebrados e predominantemente entre os insetos (LEHRER & GANZ, 1999; BULET et al., 1999; IMLER & HOFFMANN, 2000; DIMOPOULOS et al., 2001; NAITZA & LIGOXYGAKIS, 2004).

As proteases, principalmente as serino proteases, atuam tanto na digestão quanto na resposta à defesa de plantas, bem como na resposta imune dos insetos, na sinalização e amplificação de sinal, na ativação de cascatas, na indução de peptídeos antimicrobianos, na atividade antimicrobiana e na ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (NAKAJIMA et al., 1997; GORMAN et al., 2000 e 2000a; MA & KANOST, 2000; GORMAN & PASKEWITZ, 2001).

As serino proteases digestivas diferem-se das que atuam na resposta imune em sua estrutura, sendo a principal característica uma região amino-terminal que contém um domínio funcional adicional presente nas que atuam na resposta imune; com seis cisteínas conservadas, esse domínio possivelmente esteja envolvido na regulação da atividade enzimática. Apesar da sua função não estar totalmente elucidada, sabe-se que é ativo em interações proteína-proteína e proteína-matriz extracelular, esse domínio também possui similaridades com defensinas de invertebrados, o que indica uma possível ação antimicrobiana (JIANG & KANOST, 2000).

Em trabalhos anteriores, focalizaram-se nossos estudos nas serino proteases digestivas, com atividade tripsina-like, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Nesses trabalhos encontramos tripsinas-like de membrana (XAVIER et al., 2005) e solúveis (OLIVEIRA et al., 2005). Estas proteases foram avaliadas e caracterizadas quanto à especificidade de substrato, cinética enzimática e inibição da atividade enzimática. As proteases solúveis foram parcialmente purificadas, e a metodologia utilizada levou a separação parcial de três proteases com massa molecular acima de 60kDa, determinadas por SDS-PAGE e zimograma, possivelmente resultantes de agregação de monômeros das tripsinas-like.

No presente trabalho, o foco foi a purificação de enzimas tripsinas-like que atendessem às expectativas quanto à manutenção da atividade enzimática e aumento da atividade específica durante os passos utilizados no processo de purificação. Assim, purificaram-se tripsinas-like solúveis aniônicas e catiônicas utilizando cromatografias de gel-filtração, troca aniônica, afinidade para a separação das aniônicas e troca catiônica, afinidade, fase reversa para as catiônicas, metodologias diferenciadas do realizado no trabalho de OLIVEIRA et al.,

2005, onde apenas se utilizou cromatografia de afinidade em coluna de aprotinina-agarose na purificação de tripsinas-*like*.

Sabendo que a resistência de insetos a patógenos certamente contribuiu para sua proliferação e diversidade e que existem serino proteases envolvidas em repostas imunes e em atividade antimicrobiana, testaram-se o extrato enzimático e as proteases parcialmente purificadas por afinidade quanto à existência ou não de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse à saúde humana.

Para melhor apresentação deste trabalho, o dividimos em duas partes: PARTE I – “Caracterização de Isoformas Aniônicas de Tripsina-*like* do Intestino Médio da Lagarta da Soja, *Anticarsia gemmatalis*” e PARTE II – “Purificação e Caracterização de Proteases Tripsina-*like* Catiônicas Obtidas do Intestino Médio de *Anticarsia gemmatalis*, Lagarta da Soja”.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interação inseto-planta

As plantas possuem estratégias de resistência ao ataque de insetos. Essa resistência está baseada em vários mecanismos de defesa que incluem inibidores de proteases e de α -amilase, enzimas (mirosinases, peroxidases, lipoxigenases etc.), proteínas como lectinas e arcelinas, entre outras (FELTON & GATEHOUSE, 1996; KOIWA et al., 1997; STOTZ et al., 1999; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002) (Figura 1).

A ingestão de inibidores da planta, pelo inseto, leva a inibição de enzimas proteolíticas, conseqüentemente interferindo na biodisponibilidade de aminoácidos para a biossíntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (BROADWAY & DUFFEY, 1986; BROADWAY, 1995; TERRA & FERREIRA, 1994). Entretanto, os insetos apresentam diversos mecanismos de defesa contra os inibidores produzidos pelas plantas.

Broadway (1995), em experimentos com larvas *Lymantria dispar* (Lepidoptera) e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera), demonstrou a adaptação desses insetos a inibidores de tripsinas adicionados em dieta. Paulillo et al. (2000), também em estudos com *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) sujeita à ingestão crônica de inibidores semipurificados de soja, observaram que não houve redução significativa no crescimento e desenvolvimento da larva. Esses autores relataram que o inseto foi fisiologicamente capaz de se adaptar à dieta de inibidores de proteases, alterando o *pool* de enzimas proteolíticas complementares do intestino médio, já que houve produção de uma nova serino protease tripsina-like, a qual foi expressa quatro vezes mais do que a quimotripsina. Brito et al. (2001), analisando proteases do intestino médio de larvas de *Heliothis virescens* (Lepidoptera) alimentadas com dieta

artificial sem inibidor e folhas de tabaco, também relataram que a resistência aos inibidores de proteases, observada na população, é resultado da expressão de novas moléculas de tripsina.

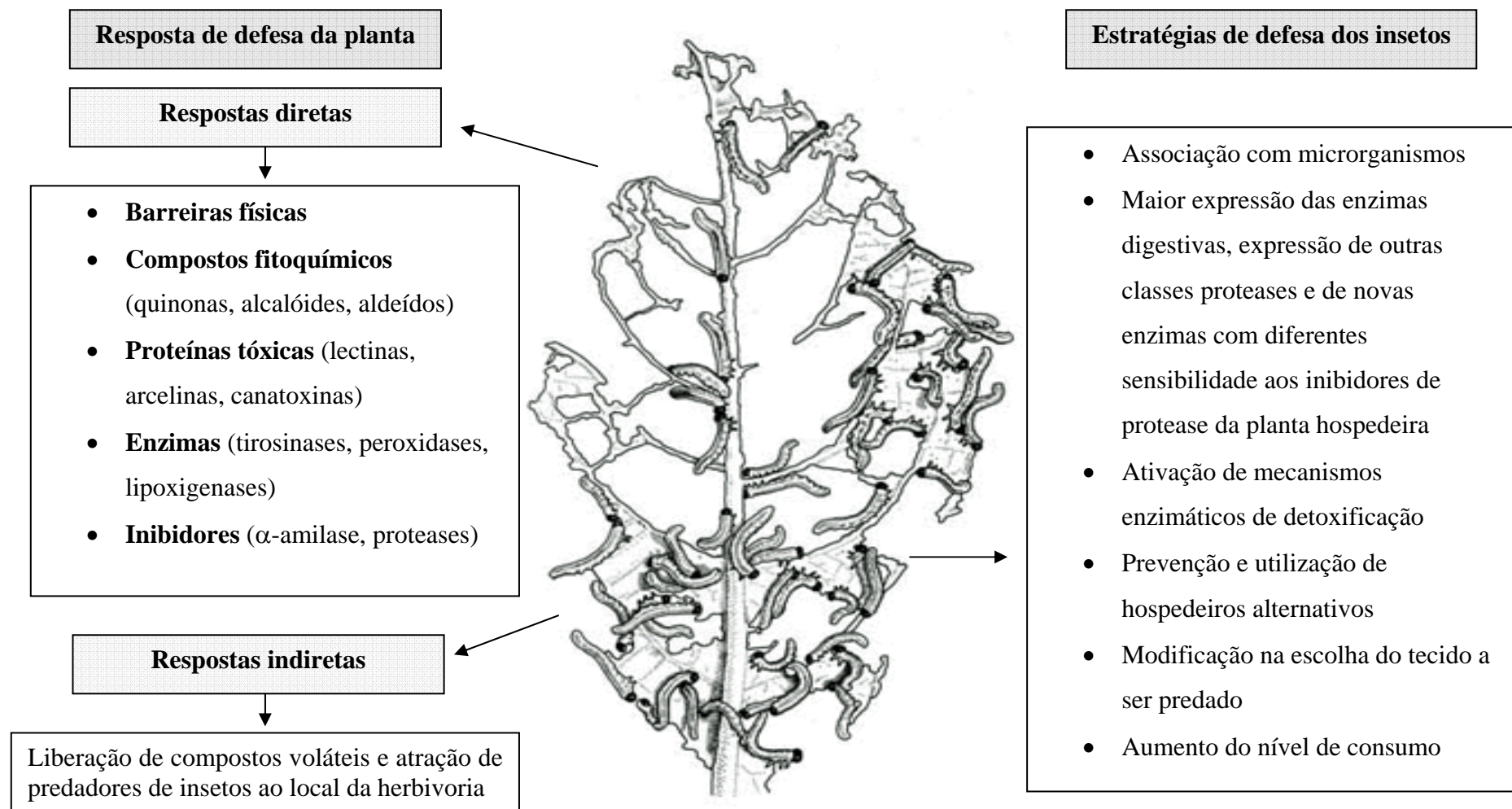


Figura 1 - Interação inseto-planta. Respostas de defesa da planta à herbivoria e estratégias de defesa dos insetos.

Esses e outros trabalhos descritos na literatura (JONGSMA & BOLTER, 1997; BOWN et al., 1997; GIRARD et al., 1998; SILVA-FILHO & FALCO, 2000, PATANKAR et al., 2001; CHOUGULE et al., 2005) apontaram que os insetos são capazes de escapar dos efeitos negativos dos inibidores de serino proteases, principalmente pela alteração do conjunto de enzimas proteolíticas em resposta à ingestão de inibidores de proteases. Essa hipótese é suportada pela grande quantidade de genes diferentes em um indivíduo que codificam para serino proteases diferenciadas encontradas em: *Anopheles gambiae* (Diptera) (GORMAN et al., 2000); *Locusta migratoria* (Lepidoptera) (LAM et al., 2000); *Glossina morsitans morsitans* (Diptera) (YAN et al., 2001); *Anopheles darlingi* (Diptera) (DE ALMEIDA et al., 2003); *Phlebotomus papasi* (Diptera) (RAMALHO-ORTIGÃO et al., 2003), *Drosophila melanogaster* (Diptera) (ROSS et al., 2003) e *Anthonomus grandis* (Coleoptera) (OLIVEIRA-NETO et al., 2004).

Inibidores de α -amilase ocorrem em muitas espécies de plantas, sendo abundantes em cereais e legumes, como parte natural do mecanismo de defesa. Os inibidores de α -amilase podem ser reconhecidos como substratos por enzimas de alguns herbívoros e ser hidrolisados, portanto esses inibidores não são efetivos contra todos os insetos. Em *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera), as proteases do seu intestino médio são capazes de hidrolisar a subunidade β do inibidor por proteólise limitada e a clivagem é específica e irreversível, impedindo o inibidor de exercer a sua função (MICHAUD, 1997; SILVA et al., 2001; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Compostos fitoquímicos utilizados pelas plantas como defesa interferem também na disponibilidade de aminoácidos, afetando a digestibilidade das proteínas por alquilá-las. Agentes alquilantes incluem as quinonas, alcalóides pirrolidizina, aldeídos insaturados e saponinas, entre outros. As saponinas podem complexar tanto com esteróis quanto com proteínas, inibindo a atividade de proteases do intestino médio (FELTON & GATEHOUSE, 1996). *Platyphora boucardi* (Heteroptera) está adaptado a se alimentar de espécies que contêm alcalóides pirrolidizina do tipo licopsamina, não sofrendo perdas na biodisponibilidade de aminoácidos no organismo. Esse inseto seqüestra o alcalóide e o concentra para posteriormente ser utilizado como secreção exócrina de defesa, juntamente com saponinas que também podem ser acumuladas. Além disso, *P. boucardi* pode processar os alcalóides triésteres semelhantes à parsonina, como encontrado nas plantas, transformando-os em alcalóides monoésteres do tipo licopsamina, os quais serão acumulados e secretados como defesa do inseto (HARTMANN et al., 2003).

Canatoxina, uma proteína com ação neurotóxica, possui papel na defesa de plantas. Entretanto, somente é letal para os insetos que possuem digestão baseada nas enzimas catepsinas B e D (Coleoptera). Em insetos cuja digestão se baseia em tripsinas (Lepidoptera, Ortoptera, Diptera), não se observa mortalidade (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). As catepsinas B e D hidrolisam a canatoxina em peptídeos entomotóxicos, portanto o próprio mecanismo de digestão favorece a adaptação de alguns insetos para se alimentarem das espécies vegetais que possuem essa toxina.

Transgenes de origens bacteriana, animal ou vegetal podem ser introduzidos em plantas com o intuito de aumentar o nível de resistência a insetos de um cultivar. Os genes engenheirados inseridos e expressos em plantas transgênicas codificam para inibidores de proteases, inibidores de α -amilase, lectinas, quitinases e peroxidases e possuem como alvo principal para defesa Coleopteras, Lepidopteras e Ortopteras (SCHULER et al., 1998).

2.2. Resistência de insetos a patógenos

Em defesa à infecção por patógenos, os insetos possuem primeiramente como estratégia uma barreira física, como a cutícula, que impede a ocorrência de infecções, quando esta barreira é vencida há indução de um complexo de reações de respostas imune humoral inata e imune celular em tecidos e na hemocele. As defesas humorais incluem peptídeos antimicrobianos, cascatas de coagulação e melanização. As defesas celulares são respostas mediadas pelos hemócitos como fagocitose e encapsulamento (HOFFMANN, 1995; HOFFMANN et al., 1996; LAVINE & STRAND, 2002).

Os insetos são particularmente resistentes a microrganismos. O seu sistema de defesa responde com várias reações inatas: sob injúria, uma imediata cascata proteolítica leva a coagulação e melanização localizada, este último processo envolvendo moléculas citotóxicas (intermediários reativos do oxigênio); a fagocitose de bactérias e o encapsulamento de grandes parasitas; a síntese induzida pelo corpo gorduroso de uma bateria de peptídeos antimicrobianos que são secretados na hemolinfa agindo sinergicamente para eliminar os microrganismos invasores (BULET et al., 1999; LAVINE & STRAND, 2002). Os insetos sintetizam um repertório de peptídeos antimicrobianos, que são liberados rapidamente na hemolinfa e que também são encontrados em células do intestino, que permitem a eliminação rápida dos microrganismos invasores (LAMBERTY et al., 1999; LEHRER & GANZ, 1999;

IMLER & HOFFMANN, 2000; DIMOPOULOS et al., 2001; NAITZA & LIGOXYGAKIS, 2004).

As serino proteases regulam várias respostas de defesa em invertebrados, incluindo a coagulação da hemolinfa, síntese de peptídeos antimicrobianos e melanização. Esses processos requerem a presença dessas proteases na hemolinfa, onde elas podem rapidamente ativar a resposta imune em reação à detecção de um patógeno. Em *A. gambiae*, Gorman e Paskewitz (2001) identificaram cinco serino proteases com essas funções. Uma delas, a Sp22D, apresenta domínios com potencial de ligação a patógenos e é expressa em três tipos celulares que possuem função imune: epitélio do intestino médio, corpo gorduroso e hemócitos.

A esclerotização da cutícula, a cicatrização de feridas e defesas imunológicas são processos fisiológicos que tem a participação de enzimas fenoloxidasas. Estas enzimas se encontram como pro-enzimas e são ativadas proteoliticamente por serino proteases em resposta a infecção por bactérias, fungos, imunolectinas, parasitóides e injúrias em tecidos (ASHIDA & DOHEK, 1980; MA & KANOST, 2000; ASANO & ASHIDA, 2001; YU et al., 2003).

Outra função possível para as serino proteases é a atividade antibacteriana direta, como foi observado em uma serino protease de 26 kDa de *Sarcophaga peregrina* (Diptera). Com atividade antimicrobiana sobre várias bactérias, essa protease interagiria com os fosfolípidios da membrana bacteriana (NAKAJIMA et al., 1997; TSUJI et al., 1998).

2.3. As serino proteases (EC 3.4.21)

As serino proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina. As proteases, principalmente as serino proteases participam de vários processos fisiológicos nos insetos, incluindo a digestão e a resposta à defesa de plantas, bem como na resposta imune dos insetos; na sinalização e amplificação de sinal; na ativação de cascatas; na indução de peptídeos antimicrobianos; na atividade antimicrobiana e na ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (NAKAJIMA et al., 1997; GORMAN et al., 2000 e 2000a; MA & KANOST, 2000; GORMAN & PASKEWITZ, 2001; LEVY et al., 2004).

As serino proteases dos insetos que atuam na resposta imune se diferem das digestivas em sua estrutura. A principal característica que as difere é uma região amino-terminal que

contém um domínio funcional adicional presente nas que atuam na resposta imune, com seis cisteínas conservadas (Figura 2). Esse domínio possivelmente esteja envolvido em cascatas de regulação de sua expressão. Apesar de a sua função não estar totalmente elucidada, sabe-se que é ativo em interações e reconhecimento entre proteína-proteína e proteína-matriz extracelular, podendo atuar como co-fator de atividade enzimática e como inibidor da protease em que está ligado; esse domínio também possui similaridades com defensinas de invertebrados, o que indica uma possível ação antimicrobiana. O clip domínio dissocia-se da protease ocasionalmente durante os processos de purificação, indicando que esse domínio pode estar separado do domínio catalítico *in vivo* (JIANG & KANOST, 2000).

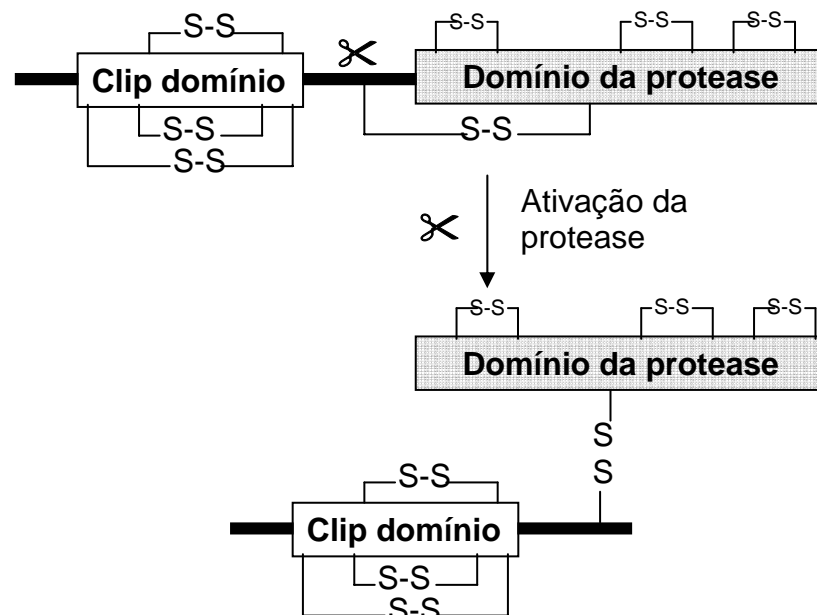


Figura 2 - Organização do clip domínio de proteases de artrópodes. As proteases contêm um clip domínio amino-terminal (em alguns casos dois, em tandem), seguido por uma região de ligação, de comprimento variável, e na região carboxi-terminal, o domínio típico de serino proteases. Uma ponte de sulfeto conecta a região de ligação ao domínio da protease. Quando o zimogênio é ativado por proteólise específica no amino-terminal do domínio protease, o clip domínio e domínio protease permanecem ligados covalentemente (JIANG & KANOST, 2000).

Baseado em similaridades estruturais, as serino proteases de eucariotos e procariotos são agrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns: o clã A (SA), que agrupa famílias que possuem origem comum com a quimotripsina; o clã B (SB) com a subtilisina; o clã C (SC) com a carboxipeptidase; o clã E (SE) com a peptidase A D-Ala-D-Ala de *Escherichia coli*; o clã F (SF) com o repressor Lex A; e o clã G (SG) que agrupa as serino proteases ATP dependentes (RAWLINGS & BARRET, 1993; RAO et al., 1998 RAWLINGS et al., 2006).

A função catalítica das serino proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (Ser reativa, His e Asp), e o grau e o tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo, contribuindo para uma atividade catalítica otimizada (PERONA & CRAIK, 1995; CARTER & WELLS, 1998).

As serino proteases geralmente atuam em uma reação de dois passos, em que um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Essa acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediário pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupo hidroxila da Ser do sítio ativo sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base, leva à formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do Asp e da His em um intermediário acilenzima, uma base imidazólica e uma amina. Esse mecanismo implica um estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK et al., 1987; DODSON & WLODAWER, 1998).

A relação entre a velocidade de acilação e a deacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a deacilação e, em um substrato éster, essa velocidade pode ser uma a três vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa de acilação é lenta e a de deacilação, rápida, enquanto na atividade esterásica a etapa de acilação é rápida e a de deacilação, lenta, sendo a etapa lenta o passo limitante da hidrólise (INAGAMI, 1972; FASTREZ & FERSHT, 1973).

2.3.1. *Tripsinas (EC 3.4.21.4)*

Toda serino protease tripsina-*like* possui preferência por substratos com resíduo básico em P₁, Lys ou Arg. Isso é principalmente causado pela presença de um Asp 189 carregado negativamente no fundo do bolso S₁ (numeração usada no quimotripsinogênio). A arquitetura do sítio S₁ entre essas proteases é altamente conservada. Uma diferença marcante é encontrada na posição 190, a qual pode ser uma Ser ou Ala, e serve como ponto de identificação para subfamílias (SICHLERA et al., 2002). A nomenclatura para os resíduos de aminoácidos do substrato é P_n, ... , P₂, P₁, P₁', P₂', ... , P_n', em que P₁-P₁' denota a ligação hidrolisada. S_n, ... , S₂, S₁, S₁', S₂', ... , S_n' denota o subsítios de ligação correspondentes da enzima (Figura 3) (SCHECTER & BERGER, 1967).

As tripsinas de todos os insetos possuem especificidade primária semelhante; com exceção de Lepidopteras, essas proteases hidrolisam mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P₁ (LOPES et al., 2004 e 2006). Tripsinas de Lepidoptera possuem maior especificidade por substratos que contenham Lys do que para substratos que contenham Arg. Os inibidores de proteases produzidos pelas plantas apresentam uma região chamada de sítio reativo, o qual interage com a sua enzima-alvo. A ligação do sítio reativo ocorre no sítio ativo da enzima. O alinhamento das seqüências de vários inibidores de proteases de plantas indicou que os sítios reativos da maioria desses inibidores possuem um resíduo de Lys na posição P₁ (LOPES et al., 2004). A presença de uma Lys na posição P₁ no sítio reativo é uma estratégia de sobrevivência, pois esses inibidores atuam inibindo as tripsinas da maioria dos insetos que hidrolisam preferencialmente Arg nessa posição.

As tripsinas são inibidas irreversivelmente por TLCK, o qual age alquilando o resíduo de His da tríade catalítica. A atividade digestiva de enzimas tripsinas-*like* é encontrada na maioria das espécies de insetos, e sua especificidade mostra-se similar às tripsinas de vertebrados, além de possuírem diferentes especificidades diante dos inibidores de proteases (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA et al., 1996).

Similaridades entre as tripsinas de insetos e bovina aparentemente estão relacionadas com o mecanismo catalítico e com a inibição por inibidores típicos de tripsina. Entretanto, a comparação entre tripsinas de pâncreas bovino e tripsina de inseto tem apontado diferenças nos valores de pH ótimo e massa molecular (PURCELL et al., 1992) e em sua sensibilidade a inibidores de proteases de plantas (CHRISTELLER & SHAW, 1989).

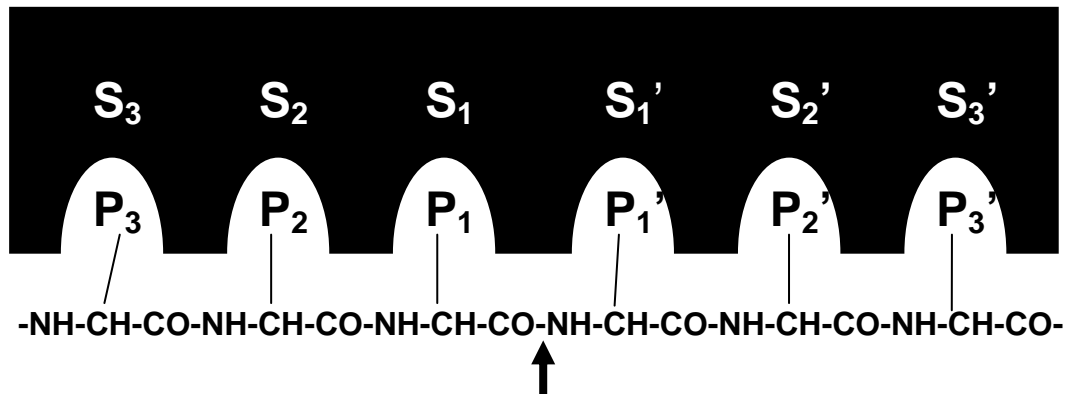


Figura 3 - Nomenclatura de Schechter & Berger para a ligação de um substrato a uma enzima. A protease é representada pela área escura. P₁ ... P₁' são as cadeias laterais dos seis aminoácidos apresentados, e S₁ ... S₁' são os subsítios correspondentes na protease. A seta indica o local da hidrólise (SCHECTER & BERGER, 1967).

Enzimas tripsina-*like* do intestino médio de insetos têm sido encontradas, estudadas e caracterizadas em várias espécies de Lepidoptera (Quadro 1). Várias outras espécies de insetos também têm sido alvos desses estudos, como: Coleoptera (ZHU & BAKER, 1999), Auchenorrhyncha (FOISSAC et al., 2002), Blattodea (ELPIDINA et al., 2001; MARANA et al., 2002), Diptera (GORMAM & PAKIEWITZ, 2001; MUHARSINI et al., 2001) e Blattodea (LOPES & TERRA, 2003), dentre outros. A maioria das tripsinas de insetos possui entre 20-30 kDa (TERRA & FERREIRA, 1994). Entretanto, tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como o apresentado por Wagner et al. (2002) em estudos com proteases tripsina-*like* de *Melolontha melolontha* (Coleoptera) com massas moleculares de 56 e 63 kDa e por Ahmad et al. (1980) em estudos com tripsinas com massa de 53 kDa de *Spodoptera litura* (Lepidoptera). Tripsinas com menor massa molecular também são relatadas na literatura, como a tripsina do epitélio de *Bombix Mori* (Lepidoptera), de 13 kDa descrita por Eguchi e Kuriyama (1985) e a tripsina do intestino médio de *Heliothis virescens* (Lepidoptera), de 17 kDa descrita por Brito et al. (2001).

Em poucos trabalhos, tripsinas ativas, com mais de uma isoforma, têm sido purificadas de extratos de intestino de Lepidoptera (MARCHETTI et al., 1998; NOVILLO et al., 1999; VOLPICELLA et al., 2003; DÍAS-MENDOZA et al., 2005). A dificuldade de purificar grande

quantidade das tripsinas digestivas de inseto e de expressar essas enzimas recombinantes ativas em sistemas heterólogos ou em cultura de células de insetos retarda maiores discussões sobre a estrutura dessa protease. A única serino protease de inseto realmente cristalizada é uma quimotripsina de *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) que foi purificada diretamente de extratos do inseto e cristalizada (BOTOS et al., 2000). A determinação dessa estrutura indicou que a quimotripsina da “formiga lava-pés” e as serino proteases de insetos em geral, por inferência, são similares no *scaffold* e domínio estrutural; e as diferenças incluem o mecanismo de ativação e resíduos de aminoácidos, principalmente da região S₄-S₄’, o que pode resultar em especificidades diferentes (BOTOS et al, 2000; LOPES et al., 2006).

De acordo com a literatura, as tripsinas de insetos não sofrem influência em sua atividade trípica devido a íons cálcio. Ahmad et al. (1980), caracterizando as serino proteases de *S. litura*; Johnston et al. (1991), em estudos com serino proteases de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera); Lemos e Terra (1992), avaliando tripsinas-like, solúveis e de membrana, de *Musca domestica* (Diptera); e Lee e Anstee (1995), analisando o efeito de íons sobre tripsina de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera), verificaram que as tripsinas encontradas nesses insetos não são estabilizadas ou ativadas por íons cálcio.

Em vertebrados, o íon cálcio impede a agregação de moléculas da enzima, protegendo-a da autólise e desnaturação por calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (SIPOS & MERKEL, 1968 e 1970). A autólise de tripsinas de inseto difere tipicamente do que ocorre com as tripsinas de mamíferos. A estabilização das tripsinas de mamíferos depende de o cálcio ligar-se ao motivo de ligação em sua estrutura; esse motivo não está presente nas seqüências das tripsinas de insetos. Os sítios autocatalíticos em tripsinas de mamíferos (Lys 61-Ser 62, Arg 117-Val 118 e Lys 145-Ser 146) não estão conservados nas tripsinas de insetos, que podem possuir outros sítios de clivagem autocatalíticos (VARALLYAY et al., 1998; LOPES et al., 2006). Contudo, Wagner et al. (2002) (*M. melolontha*), Oliveira et al. (2005) (*A. gemmatalis*) e Xavier et al. (2005) (*A. gemmatalis*) verificaram que as tripsinas dos insetos estudados sofreram queda na atividade trípica sobre o substrato BApNA na presença de EDTA, resultado que levou os autores a sugerirem que o cálcio talvez possa estar, de alguma forma, agindo nas enzimas desses insetos.

Quadro 1 - Propriedades das enzimas tripsina-*like* obtidas do intestino médio de Lepidoptera

Espécie	Estágio	Grau de purificação	MM (Da)	Substrato	pHo	Referências
<i>Helicoverpa armigera</i>	Larval	Parcial	24.000	L-BApNA	9,5	Johnston et al., 1991
<i>Spodoptera litura</i>	Larval	Homogenato	—	L-BApNA	10,5	McManus & Burgess, 1995
<i>Spodoptera littoralis</i>	Larval	Parcial	24.000	L-BApNA	8,0	
				L-TAME	9,5	Lee & Anstee, 1995
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Larval	Completa	24.650	L-BApNA	10,0	Bernardi et al., 1996
<i>Spodoptera littoralis</i>	Larval	Parcial	(PI) 24.359	L-BApNA	10,0-11,0	
			(PII) 24.448	L-BApNA	10,0-11,0	Marchetti et al., 1998
<i>Sesamia nonagrioides</i>	Larval	Completa	(Try I) 27.000	L-BApNA	9,0-11,0	
			(Try II) 24.000	L-BApNA	8,5-11,0	Novillo et al., 1999
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larval	Homogenato	—	L-BApNA	8,5-10,0	Paulillo et al., 2000
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Larval	Parcial (solúveis)	66.000, 71.000 e	L-BApNA	8,5	
			91.000	L-TAME	8,5	Oliveira et al., 2005
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Larval	Homogenato	—	L-BApNA	8,0	
		(de membrana)		L-TAME	8,0	Xavier et al., 2005

pHo: pH ótimo.

A primeira forma precursora de tripsina foi detectada por imunolocalização no intestino médio de *A. aegypti* por Graf et al. (1986). A obtenção de cDNAs para tripsinogênios-like é bem descrita para vários insetos: *Rhyzopherta dominica* (Coleoptera) (ZHU & BAKER, 1999); *A. aegypti* (KALHOK et al., 1993); *Drosophila erecta* (Diptera) (WANG et al., 1995); *D. melanogaster* (PAULULAT, 1996); *A. gambiae* (MÜLLER et al., 1993); *Stomoxys calcitrans* (Diptera) (MOFFAT & LEHANE, 1990); *Manduca sexta* (Lepidoptera) (PETERSON et al., 1994); *Lygus lineolaris* (Hemiptera) (ZHENG et al., 2002).

Moffat e Lehane (1990), Moffat et al. (1995) e Jordão et al. (1996) descreveram que a tripsina de *S. calcitrans* é estocada como preproenzima no tecido da zona opaca (de onde são secretadas) do intestino médio do inseto. Lehane et al. (1998) identificaram peptídeos sinal de 16 e 17 aminoácidos e peptídeos de ativação de 10 e 15 aminoácidos, respectivamente, nas seqüências desses zimogênios. O sítio de ativação da enzima foi identificado entre Arg e Ile, também evidenciado que a própria tripsina é responsável pela ativação da pro-enzima no lúmen do intestino médio.

Zhu e Baker (1999), em estudos com cDNA de *R. dominica*, descreveram três tripsinogênios-like: *RdoT1*, *RdoT2* e *RdoT3*. As seqüências N-terminal das proteínas correspondentes preditas possuem os resíduos IVGG⁶²⁻⁶⁵ conservados (característico para serino protease em insetos). As enzimas maduras preditas possuem 23,1, 28 e 23,8 kDa, todas possuindo a tríade catalítica conservada (His 109, Asp 256, Ser 257), três pares de resíduos de cisteína envolvidos na formação de três pontes de sulfeto (característico de serino proteases de invertebrados) e três resíduos (Asp 251, Gly 274, Gly 284), que definem o bolso de ligação ao substrato. O Asp nessa posição, no bolso de ligação, define a especificidade de tripsinas de vertebrados e invertebrados, por estabilizar resíduos de Lys ou Arg, que estão no sítio de clivagem do substrato, através de interação iônica (HEDSTROM et al., 1992).

Dados disponíveis sobre tripsinas-like em Lepidoptera indicam a presença de uma diversificada família de genes codificantes para essas enzimas. Seqüências de DNA ou cDNA de tripsinas ou tripsinas-like expressas no intestino médio de larvas de Lepidopteras tem sido relatadas em várias espécies: *Plodia interpunctella* (ZHU et al., 2000), *Choristoneura fumiferana* (WANG et al., 1995), *Helicoverpa armigera* (GATEHOUSE et al., 1997; MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000), *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001), *Scirpophaga incertulas* (MAZUMDAR-LEIGHTON et al., 2000), *Bombix mori* (SASAKI et al., 1993), *Sesamia nonagrioides* (DÍAS-MENDOZA et al., 2005) e *Ostrinia nubilalis* (LI et al., 2005), entre outras.

Lopes et al. (2004), analisando 109 seqüências de tripsinas-*like* de insetos de diferentes ordens, registradas no “Genbank” em 2003, demonstraram que a maioria das tripsinas tende a se agrupar de acordo com a relação filogenética baseada na morfologia dos insetos. Dentre as seqüências de Lepidópteras, existem três braços principais, os braços I e III são formados por tripsinas, que estão ausentes ou são reguladas negativamente na presença de inibidor; as tripsinas encontradas no braço II são principalmente tripsinas sensíveis, enzimas superexpressas ou expressas apenas na presença de inibidor. Análise filogenética de seqüências de DNA de tripsinas-*like* de *Sesamia nonagrioides* e outros Lepidoptera (DÍAS-MENDOZA et al., 2005) revelaram existência de três tipos de tripsinas (Tipo-I, Tipo-II e Tipo III), descritas também por Lopes et al. (2004). Os autores compararam os resíduos de aminoácidos divergentes dessas isoformas e da tripsina bovina (Quadro 2). Apesar da diversidade de seqüências de DNA encontradas, somente foi possível purificar as quatro maiores tripsinas da larva alimentada com dieta sem inibidores.

Quadro 2 - Comparação dos resíduos divergentes de isoformas de tripsina de Lepidoptera e tripsina bovina

Tripsina Bovina	Tripsinas de Lepidoptera			Observação
	I	II	III	
Gly43	Ala	Gly	Gly	Contato com o <i>loop</i> da Ser195
Gly44	Ala	Gly	Gly	Contato com o <i>loop</i> da Ser195
Ile 73	Arg	Ala	Ala	Possível implicação na interação de tripsinas tipo I com E-64
Ile138	His/Tyr	Ala	Thr	Adjacente ao subsítio S ₁
Tyr184	Ile	Trp	Ile	Domínio de ativação
Tyr186	Glu	-/Glu	Glu	<i>Loop</i> 1
Lys188	Lys	Arg	Lys	Subsítio S ₁ , domínio de ativação
Ser190	Ala	Gln	Ala	Subsítio S ₁ , determinante de especificidade secundário
Val213	Val	Cys	Val	Próximo ao sítio de ligação ao substrato
Ser217	His/Arg	n.c.	Phe	Subsítio S ₁ , domínio de ativação
Tyr228	Ser	Asn	Asn	Determinante de especificidade secundário

n.c.: resíduos não conservados; - : *gap*. Quadro baseado em Días-Mendoza et al., 2005.

2.4. Importância do estudo de insetos-praga para a agricultura brasileira

Na agricultura mundial, as grandes perdas sofridas são devidas em parte ao ataque de insetos e à ação de patógenos (fungos, bactérias e vírus), sendo 37% da produção mundial perdida pela ação de pragas ou por doenças, e 13% desse percentual são devidos ao ataque por insetos (GATEHOUSE et al., 1992).

As perdas do plantio até a pré-colheita na agricultura podem ser provocadas por adversidades abióticas (ordem climática), bióticas (incidência de doenças e pragas nas lavouras) e por questões de ordem econômica (aviltamento dos preços dos produtos no momento da colheita; com relação ao plantio de soja a perda foi devida à escolha de sementes inadequadas para a região).

No Brasil, nos anos de 1996 a 2002, por conta das perdas do plantio até a pré-colheita de arroz, feijão, milho, soja e trigo, o Brasil deixou de colher cerca de 28 milhões de toneladas de grãos. O maior índice dessas perdas (7,61%) aconteceu no ano de 2000, e o País deixou de colher 6.672.845 toneladas. O milho foi a cultura que mais contribuiu para tal desempenho negativo, com perdas inferidas do plantio até a pré-colheita da ordem de 4,1 milhões de toneladas, o que correspondeu a 61% do total perdido (IBGE, 2004).

As safras de soja de 1999 e 2000 foram as mais afetadas, tendo perdas em nível nacional de 3,89 e 3,99%, respectivamente. Em 1999, a safra gaúcha apresentou perdas de 95% no total das perdas em nível nacional. Em 2002, as perdas de soja somaram pouco menos de um milhão de toneladas (Figura 4) (IBGE, 2004).

A soja é um dos principais produtos da pauta de exportações brasileiras. Em 2002, o País exportou aproximadamente 15,6 milhões de toneladas de soja em grão, 12,5 milhões de farelo de soja e 1,7 milhão de óleo bruto. Os principais compradores do grão brasileiro são a Holanda (1.140.425 mil/t), a China (585.553 mil/t), a Alemanha (557.163 mil/t) e a Espanha (371.146 mil/t). O maior estado produtor brasileiro é o Mato Grosso, seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul. Com área semelhante à do Paraná, o produtor gaúcho ainda tem baixa produtividade, em média 2.200 kg por hectare, totalizando uma produção de cerca de sete milhões de toneladas (IBGE, 2004).

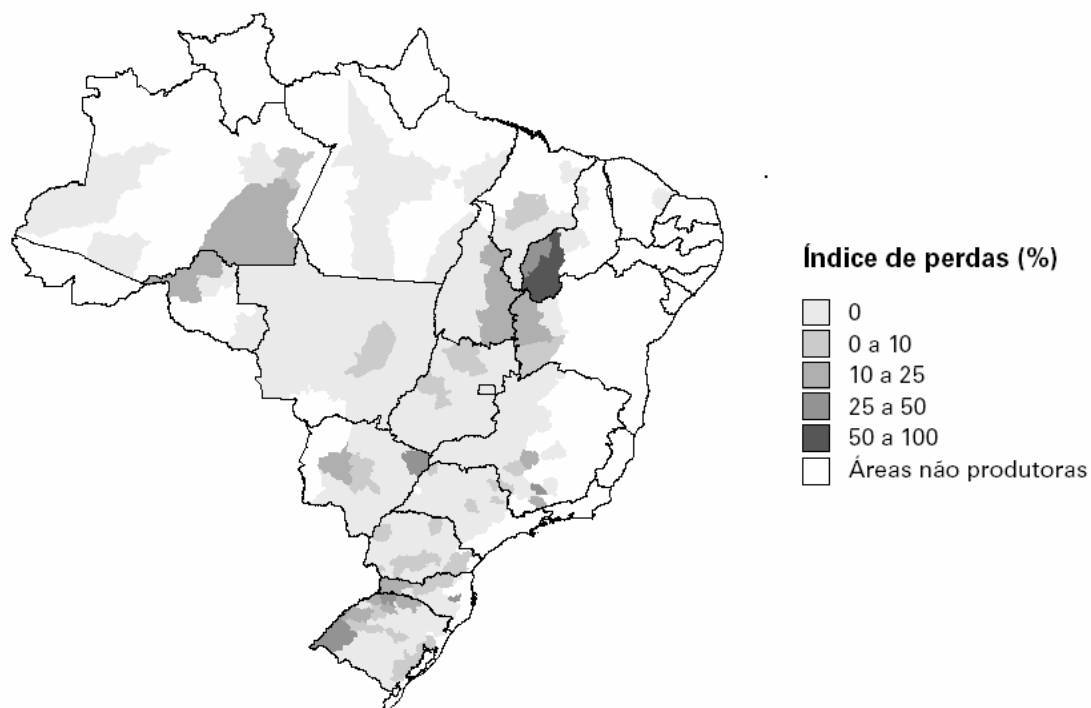


Figura 4 - Índice de perdas até pré-colheita da soja. Índice apresentado por microrregiões do Brasil em 2002. (IBGE, 2004).

A lagarta da soja, *A. gemmatilis*, é uma das principais pragas que atacam a soja (*Glycine max*) no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. Ataca as lavouras a partir de novembro, nas regiões setentrionais, e a partir de janeiro, no extremo sul do País. Sua capacidade de consumo aumenta com o desenvolvimento fisiológico. Nos últimos instares, um indivíduo pode consumir até 100 cm² de folhas. Além da *A. gemmatilis* a soja possui mais três pragas principais (percevejos), seis pragas secundárias (brocas) e outros gêneros de percevejos e coleópteros, além de doenças causadas por várias espécies de fungos, bactérias, vírus e nematóides (EMBRAPA-CNPSO, 1995).

Na tentativa de controlar o ataque de insetos aos cultivares, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos. O intestino, particularmente o intestino médio, é reconhecido como um ponto potencial de ataque no controle de populações de insetos e, ou, controle na transmissão de doenças (TERRA et al., 1996; FRANCO et al., 1999). Portanto, o conhecimento da fisiologia e bioquímica da digestão e dos sistemas de

defesa dos insetos é um pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de controle eficazes que atuem via intestino.

Na busca do desenvolvimento de um controle biológico eficiente das pragas que afetam a soja, deve-se ampliar o conhecimento sobre a fisiologia e bioquímica dos insetos que a atacam. Nesse contexto, neste trabalho estudaram-se as tripsinas-*like* digestivas de *Anticarsia gemmatalis*, a lagarta da soja. Essas proteases foram isoladas do intestino médio da larva do inseto e caracterizadas quanto à presença de glicosilação e de atividade antimicrobiana, sendo que apenas tripsina-*like* catiônica foi purificada e analisada em SDS-PAGE e por espectrometria de massa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo geral desenvolver estudos bioquímicos com tripsinas-*like* do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

3.2. Objetivo específico

1. Definição de protocolos de purificação para as tripsinas-*like* de *A. gemmatalis*.
2. Caracterização quanto à atividade antimicrobiana do extrato enzimático e das proteases tripsina-*like* parcialmente purificadas.
3. Caracterização cinética de tripsinas-*like* purificadas do intestino médio.

PARTE I

Caracterização de Isoformas Aniônicas de Tripsina-*like* do Intestino Médio da
Lagarta da Soja, *Anticarsia gemmatalis*

1. INTRODUÇÃO

Em 500 milhões de anos, os insetos se tornaram a maior classe entre os animais e a mais diversificada, colonizaram quase todos os nichos ecológicos da Terra, excetuando-se os pólos e o fundo do mar. Nesse período, estiveram em constante contato com plantas, parasitas e patógenos. Essa relação com microrganismos e plantas contribuiu para o sucesso evolutivo da classe Insecta, pois propiciou que os insetos desenvolvessem mecanismos de defesa específicos contra a ação dos microrganismos invasores e contra a resposta de defesa das plantas predadas (BULET et al., 1999; NATION, 2002; DIMARQ et al., 2003).

As plantas possuem estratégias de resistência ao ataque de insetos, a qual está baseada em vários mecanismos de defesa que incluem inibidores de proteases e de α -amilase, enzimas e proteínas como lectinas e arcelinas, entre outras (FELTON & GATEHOUSE, 1996; JONGSMA & BOLTER, 1997; KOIWA et al., 1997; STOTZ et al., 1999; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). A ingestão, pelo inseto, de inibidores da planta leva à inibição de enzimas proteolíticas, conseqüentemente interferindo na biodisponibilidade de aminoácidos para a biossíntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (BROADWAY & DUFFEY, 1986; TERRA & FERREIRA, 1994; BROADWAY, 1995; PILON et al., 2006). Entretanto, os insetos apresentam diversos mecanismos de defesa contra os inibidores produzidos pelas plantas através de estratégias que envolvem inclusive a alteração no conjunto de enzimas digestivas, a expressão de proteases com sensibilidade a inibidores de protease diferenciada ou a indução da expressão de proteases específicas que clivam os inibidores (JONGSMA & BOLTER, 1997; MICHAUD, 1997; BRITO et al., 2001; OPPERT et al., 2005). O estudo bioquímico e fisiológico do processo da digestão, principalmente das serino proteases envolvidas, tornou-se um ponto-chave para o estudo e desenvolvimento de mecanismos de resistência a insetos em cultivares de grande interesse econômico. Serino endopeptidases, particularmente tripsinas (EC 3.4.21.4) e quimotripsinas

(EC 3.4.21.1), atuam na digestão da maioria dos insetos, à exceção de alguns hemípteros (HOUSEMAN et al. 1985; COLEBATCH et al., 2001) e espécies de coleópteros (TERRA & FERREIRA, 1994; GIRARD et al., 1998; OPPERT et al., 2003), nos quais cisteína proteases e aspartil proteases são predominantes.

Com relação à infecção por patógenos, os insetos possuem primeiramente como defesa uma barreira física, a cutícula, que impede a ocorrência de infecções. Quando essa barreira é vencida, há indução de um complexo de reações de resposta imune humoral inata e imune celular em tecidos e na hemocele. As defesas humorais incluem peptídeos antimicrobianos, cascatas de coagulação e melanização. As defesas celulares são respostas mediadas pelos hemócitos, como fagocitose e encapsulamento (HOFFMANN, 1995; HOFFMANN et al., 1996; LAVINE & STRAND, 2002). Os insetos sintetizam um repertório de peptídeos antimicrobianos que são produzidos no corpo gorduroso, que também o são em células do intestino e liberados rapidamente na hemolinfa, permitindo a eliminação rápida dos microrganismos invasores. Cerca de 50% dos peptídeos antimicrobianos estudados e caracterizados, presentes na literatura, são de invertebrados e predominantemente entre os insetos (RUSSEL & DUNN, 1996; LEHRER & GANZ, 1999; BULET et al., 1999; IMLER & HOFFMANN, 2000; DIMOPOULOS et al., 2001; NAITZA & LIGOXYGAKIS, 2004).

As proteases, principalmente as serino proteases, atuam tanto na digestão e na resposta de defesa de plantas, quanto na resposta imune dos insetos, assim como na sinalização e amplificação de sinal, na ativação de cascatas de coagulação, na indução de peptídeos antimicrobianos, na atividade antimicrobiana e na ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (NAKAJIMA et al., 1997; GORMAN et al., 2000 e 2000a; MA & KANOST, 2000; GORMAN & PASKEWITZ, 2001).

As serino proteases de artrópodes que atuam na resposta imune se diferem das digestivas em sua estrutura. A principal característica que as difere é uma região amino-terminal que contém um domínio funcional adicional, com seis cisteínas conservadas. Este domínio possivelmente esteja envolvido na regulação, e, apesar de a sua função não estar totalmente elucidada, sabe-se que é ativo em interações proteína-proteína e proteína-matriz extracelular. Esse domínio também possui similaridades com defensinas de invertebrados, o que evidencia uma possível ação antimicrobiana (JIANG & KANOST, 2000).

Em trabalhos anteriores, focalizaram estudos nas serino proteases digestivas, com atividade tripsina-like, do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Nesses trabalhos, encontraram-se tripsinas-like de membrana (XAVIER et al.,

2005) e solúveis (OLIVEIRA et al., 2005), que foram avaliadas e caracterizadas quanto à especificidade de substrato, cinética enzimática e inibição da atividade enzimática.

Uma das estratégias de controle de pragas é baseada no uso de inibidores de proteases. Para isso, é necessário o conhecimento da estrutura do centro ativo das enzimas digestivas presentes no intestino do inseto-alvo, bem como as propriedades bioquímico-cinéticas das proteases produzidas e a sensibilidade a inibidores (PILON et al., 2006). De posse dessas informações, inibidores mais potentes ou que sejam especificamente direcionados contra as enzimas insensíveis produzidas pelos insetos podem vir a ser projetados, utilizando-se técnicas de análise proteômica (De LEO et al., 2001; VOLPICELLA et al., 2003).

Como no trabalho anterior foram verificadas três formas de proteases com massas de 66 kDa, 71 kDa e 91 kDa (OLIVEIRA *et al.*, 2005), neste estudo procuraram-se separar essas formas para se ter a possibilidade de, com a obtenção das enzimas purificadas, poder realizar estudos de mapeamento do centro ativo dessas enzimas. Esses estudos, em conjunto, visam esclarecer o processo envolvido no mecanismo de interação inseto-planta, para propor quais tipos de inibidores devem ser induzidos na resposta de defesa da planta, o que evitaria o uso de pesticidas. Esse conhecimento será de grande importância no médio prazo, nos programas de melhoramento genético de plantas que visem à criação de cultivares resistentes a insetos-praga. Também poderiam esclarecer que tipo de estrutura um potente inibidor sintético ou de origem protéica deve ter para ser eficiente no combate à *A. gemmatilis*.

No presente trabalho, desenvolveram-se modelos de purificação que atendessem às expectativas quanto à manutenção da atividade enzimática e ao aumento da atividade específica durante os passos utilizados no processo. Dessa forma, foi possível separar proteases tripsinas-*like* aniônicas e catiônicas. Na primeira parte do trabalho, as tripsinas-*like* aniônicas solúveis foram purificadas parcialmente, utilizando cromatografia de gel-filtração, troca aniônica e afinidade, metodologia diferenciada da empregada no trabalho realizado por Oliveira et al. (2005) em que apenas se usou a cromatografia de afinidade em coluna de aprotinina-agarose na purificação, não se obtendo a separação de isoformas dessa protease.

Sabendo que a resistência de insetos a patógenos certamente contribuiu para sua proliferação e diversidade e que existem serino proteases envolvidas em repostas imunes e em atividade antimicrobiana, também foram testadas o extrato enzimático do intestino médio e as proteases parcialmente purificadas, após a cromatografia de afinidade, quanto à existência ou não de atividade antimicrobiana contra microrganismos de interesse já testados em vários trabalhos citados na literatura.

2. METODOLOGIA

2.1. Insetos

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) foram cultivadas em laboratório, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil, sob temperatura (25 ± 5 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14h:10h – L/D) controlados.

2.1.1. Criação da lagarta da soja

A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas, e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 cm x 50 cm revestida internamente com folhas de papel-sulfite A4. Após quatro dias, os adultos emergiram e foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1.050 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície do papel que revestia internamente a gaiola. Essas folhas que revestiam internamente a gaiola foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500 mL) com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2cm, onde estava acoplada uma tela de filó. Esses copos foram, então, transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. Após dois ou três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando se iniciou a alimentação das larvas de *A.*

gemmatalis com dieta artificial baseada na metodologia de Hoffman-Campo et al. (1985), colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

2.1.2. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi composta de feijão (mulatinho), levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água, ingredientes que foram processados e misturados, nessa ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura era autoclavada por 1h, à pressão de 1,5 kgf/cm² e, em seguida, transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1 mg), pantoenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), água (1 L) até formar uma pasta homogênea, que era, então, transferida ainda quente para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta era resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a \pm 4 °C.

2.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio

Cem larvas de *A. gemmatalis* de 5º ínstar foram lavadas em água, entorpecidas em gelo para imobilização e posterior dissecação. Os intestinos médios foram dissecados na presença da solução de 125 mM NaCl a 4 °C, agrupados na proporção de um intestino por 200 µL de solução de 125 mM NaCl e mantidos a 4 °C, para posterior obtenção do extrato bruto. Cinco ciclos de congelamento em N_{2(líq)} alternados com ciclos de descongelamento em banho a 37 °C foram utilizados para o rompimento das células do epitélio intestinal, e a obtenção do extrato bruto, constituído do extravasamento celular do conteúdo do lúmen intestinal. Esse extrato bruto foi submetido a uma ultracentrifugação a 100.834 g por 1h10, a 4 °C, em ultracentrífuga Sorvall® ultra Pro80 e rotor T880, o sobrenadante obtido com aspecto límpido foi filtrado em filtros Millipore® com poros de 0,45 µm de diâmetro. O filtrado (27,5 mL), agora denominado “extrato enzimático”, foi alíquotado em frações de 1,5 mL e mantido a -20 °C, para análise posterior.

2.3. Ensaio de estabilidade

A estabilidade da atividade amidásica de proteases tripsina-*like* do extrato enzimático durante a armazenagem a -18 °C foi avaliada em um período de 180 dias. No dia inicial ou zero, o extrato enzimático foi aliqotado em frações de 500 µL, sendo em cada teste uma alíquota diferente foi descongelada e ensaiada apenas uma única vez, durante todo o período analisado.

2.4. Testes de purificação

2.4.1. Cromatografia de gel-filtração

A cromatografia de gel-filtração foi realizada em coluna Superose 12 HR10/30 (10 mm x 30 cm) (Pharmacia®), em sistema de FPLC (Pharmacia®), equilibrada com 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 e 0,1 M NaCl. Um fluxo de 0,5 mL/min foi usado e frações de 1,5 mL, coletadas em cada tudo, sendo que antes da coleta, foi adicionado ácido fórmico 1,5 M (20µL) para manter as amostras coletadas em pH 3,0. A amostra aplicada (500 µL de amostra) na coluna de gel-filtração foi o extrato enzimático obtido de intestinos, com e sem o conteúdo luminal. A atividade enzimática de cada fração coletada nas cromatografias foi monitorada usando-se L-BApNA como substrato. Para a calibração da Coluna Superose 12 HR10/30, utilizaram-se os seguintes padrões de massa molecular (Sigma-Aldrich®) “Blue Dextran” (2×10^6 Da), β-amilase (205.000 Da), álcool desidrogenase (150.000 Da), BSA (66.000 Da), ovalbumina (45.000 Da), β-quimotripsinogênio (25.000 Da), citocromo C (12.327 Da), aprotinina (6.500 Da), os quais foram aplicados na coluna; e o tempo de retenção e K_{av} obtidos para cada padrão aplicado, através desses dados, foi possível calcular as faixas de massas moleculares das amostras de interesse.

2.4.2. Cromatografia de troca iônica

As amostras após a cromatografia de gel-filtração foram dialisadas, em membranas com *cut off* de 12.000-14.000 Da, 150 vezes contra tampão 5m M Tris-HCl pH 7,5 e posteriormente aplicadas (10 mL por corrida) na coluna de troca iônica. A cromatografia de

troca iônica foi realizada em coluna Mono-Q HR 5/5 (5 mm x 5 cm) (Pharmacia[®]), em sistema de FPLC (Pharmacia[®]), equilibrada com 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 e eluída com um gradiente de NaCl. Um fluxo de 1 mL/min foi usado e frações de 1,5 mL coletadas; antes da coleta, em cada tudo foi adicionado ácido fórmico 1,5 M (20 µL), para manter as amostras coletadas em pH 3,0. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada usando-se L-BApNA como substrato.

2.4.3. Cromatografia de Afinidade

As amostras, após a cromatografia de gel-filtração ou troca iônica tiveram o pH acertado em 7,5 e foram aplicadas (5 mL) em cromatografia de afinidade. Essa cromatografia foi feita em coluna *p*-aminobenzamida (“pre-packed”/Sigma[®], 2,5 mL “bed volume”), equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e eluída com 10⁻³ M HCl. Um fluxo de 0,5 mL/min foi usado e frações de 1,5 mL, coletadas. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada, usando-se L-BApNA como substrato.

2.5. Atividade enzimática

A atividade amidásica foi realizada de acordo com o método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando-se 100 µL de amostra, 400 µL do substrato cromogênico L-BApNA na concentração final de 0,5 mM, e tampão 0,1M Tris-HCl, pH 8,2, para o volume final de 1 mL. A reação era paralisada com 100 µL de ácido acético 60% (v/v).

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, pela sua medida da absorvância a 410 nm em função do tempo, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹ x cm⁻¹ para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

2.6. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína total das amostras foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se solução de 0,2 mg/mL BSA para a obtenção de uma curva-padrão de 5 µg a 25 µg de proteína.

2.7. Ensaio antimicrobiano

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado em placas com culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Scotch a) e *Enterococcus faecalis* cultivadas em meio BHI (Difco®). Amostras do extrato enzimático (100 µg) e FII parcialmente purificadas (50 µg) foram aplicadas na superfície das placas e, posteriormente, incubadas em “overnight” a 37 °C.

2.8. SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada pelo método descrito por Laemmli (1970). Usando gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (0,1%), o experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 1h20, à temperatura ambiente. O gel foi corado pela coloração da prata (BLUM et al., 1987). O padrão de massa molecular utilizado foi adquirido da Invitrogen® (“Bench Mark™ Protein Ladder”).

2.9. Análise em Zimograma

O zimograma foi realizado utilizando SDS-PAGE 12,5% contendo 0,1% de gelatina co-polimerizada. A eletroforese ocorreu a 50 V a 4 °C, sendo posteriormente o gel incubado em 2,5% (v/v) de Triton X-100 por 1h, à temperatura ambiente e sob agitação, para remover o SDS. Após a incubação, os géis foram lavados e novamente incubados com tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, por 2h, a 37 °C. A atividade foi revelada pela coloração com “Coomassie Blue” R-250 (0,25%).

Os seguintes inibidores para caracterização das proteases foram utilizados: PMSF (5 mM), TLCK (1 mM) e benzamidina (1 mM). As amostras passaram por um período de pré-incubação (10 min) com os modificadores químicos PMSF e TLCK e, posteriormente foram aplicadas no gel. No teste com benzamidina, o gel foi incubado por 2h em tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, adicionado de benzamidina 1 mM por 2h, à 37 °C, sendo a atividade revelada como descrito anteriormente.

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio de estabilidade

A estabilidade da atividade amidásica de proteases tripsina-*like* do extrato enzimático durante a armazenagem a -18 °C foi avaliada em um período de 180 dias. Nesse tempo, observou-se que o extrato armazenado por um mês perde 14% de sua atividade. Aos três meses de armazenamento, a atividade cai 51,4% e aos seis meses há uma queda de aproximadamente 70% na atividade amidásica (Figura 1).

3.2. Calibração da coluna de gel-filtração Superose 12 HR 10/30

Através da cromatografia, obteve-se o tempo de retenção, e o K_{av} para cada padrão aplicado foi calculado sabendo-se que $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ em que, V_e = volume de retenção (do padrão “Blue Dextran”) x fluxo da coluna (0,5 mL/min), V_t = volume total da coluna (24 mL) e $V_o = V_e$ do “Blue Dextran” (7,35 mL). Assim obtiveram-se os seguintes resultados: “Blue Dextran” (tempo: 14,7 min), β -amilase (tempo: 20,03 min; K_{av} : 0,16), álcool desidrogenase (tempo: 21,07min; K_{av} : 0,19), BSA (tempo: 22,63 min; K_{av} : 0,24), ovalbumina (tempo: 23,93 min; K_{av} : 0,27), β -quimotripsinogênio (tempo: 27,67 min; K_{av} : 0,39), citocromo C (tempo: 30,60 min; K_{av} : 0,148), aprotinina (tempo: 36,45 min; K_{av} : 0,65).

Após a calibração com os resultados obtidos, calculou-se o K_{av} das frações pertencentes à FI (fração 7 - K_{av} : 0,23, fração 8 - K_{av} : 0,26 e fração 9 - K_{av} : 0,28) e das pertencentes à FII (fração 10 - K_{av} : 0,39 e fração 11 - K_{av} : 0,44); com esses dados, foi possível determinar as faixas de massa molecular aparente das amostras de interesse utilizando a equação da reta obtida na regressão linear do log da massa molecular dos padrões x K_{av} dos

padrões (Figura 2), as frações de FI estão na faixa de massa molecular entre 60 e 80 kDa e as frações de FII, na faixa entre 20 e 30kDa.

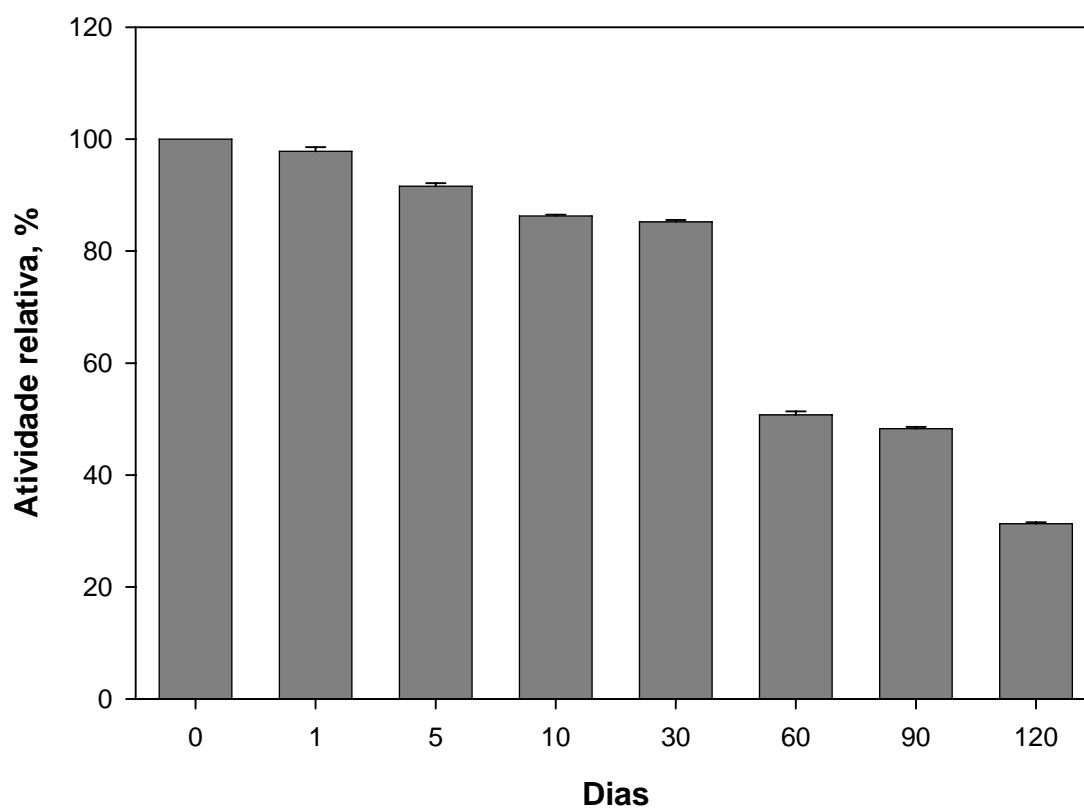


Figura 1 - Estabilidade da atividade amidásica de enzimas tripsinas-*like* presentes no extrato enzimático durante o armazenamento. A atividade amidásica das enzimas tripsinas-*like* do extrato enzimático, armazenado a -18°C , foi mensurada durante seis meses, sendo todo o ensaio realizado em triplicatas.

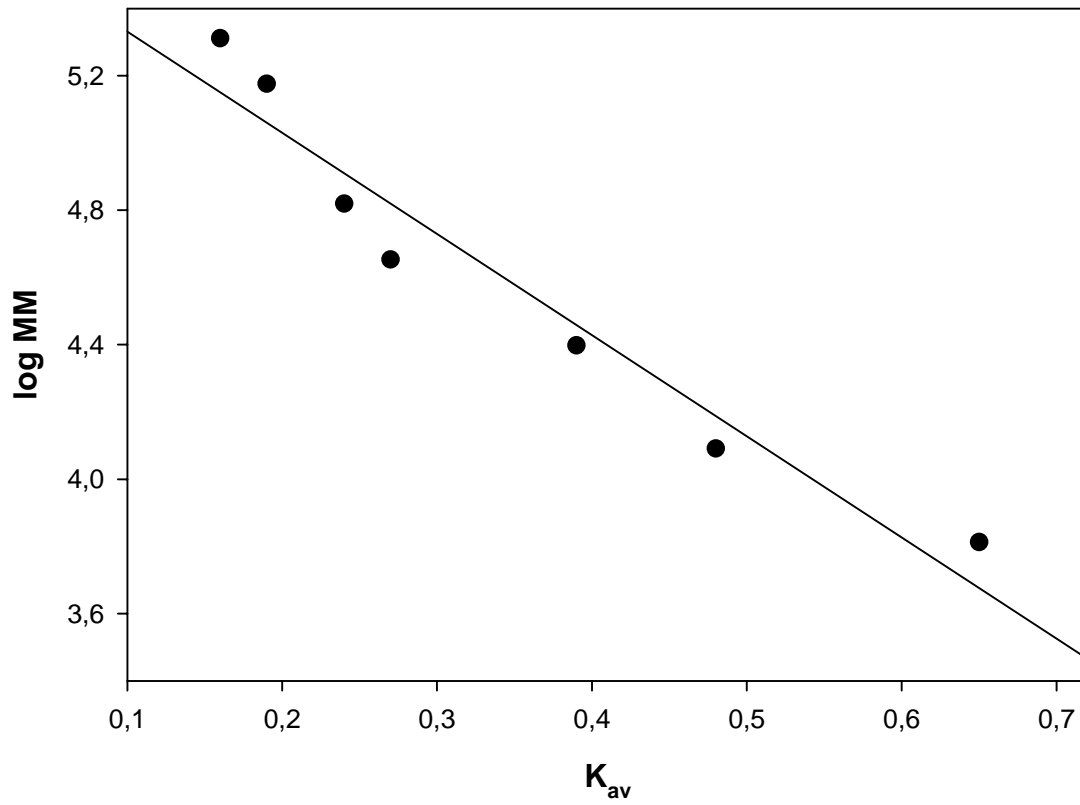


Figura 2 - Curva para calibração da coluna Superose 12 HR 10/30. Padrões utilizados: β -amilase (K_{av} : 0,16), álcool desidrogenase (K_{av} : 0,19), BSA (K_{av} : 0,24), ovalbumina (K_{av} : 0,27), β -quimotripsinogênio (K_{av} : 0,39), citocromo C (K_{av} : 0,148) e aprotinina (K_{av} : 0,65). Os pontos são experimentais, e a reta foi obtida através de pontos teóricos.

3.3. Testes de purificação

3.3.1. Gel-filtração e diálise

Os perfis cromatográficos do extrato enzimático obtido de intestino médio com e sem conteúdo, após a cromatografia de gel-filtração, não indicaram diferenças entre eles. Após a cromatografia de gel-filtração, verificaram-se duas frações com atividade amidásica (Figura 3), que foram agrupadas separadamente e chamadas de FI (frações 7, 8 e 9) e FII (frações 10 e 11). As amostras de interesse (FI e FII) passaram por uma diálise, e nessa etapa a amostra FI perdeu 30% de sua atividade e a amostra FII, perdeu 68%.

3.3.2. Purificação de FI

3.3.2.1. Gel-filtração, afinidade e troca iônica

A fração FI obtida na cromatografia de gel-filtração, sem passar por diálise, foi aplicada diretamente na coluna de afinidade *p*-aminobenzamidina-agarose. A coluna escolhida possuía um ligante a *p*-aminobenzamidina, um potente inibidor competitivo de tripsina-like, o qual ocupa o sítio S₁ do centro ativo da enzima (MARES-GUIA et al., 1981). O perfil cromatográfico de FI, após a afinidade, apresentou um único pico com atividade amidásica (Figura 4A). Em seguida, essas frações oriundas de FI com atividade amidásica foram agrupadas e aplicadas em coluna de troca iônica (troca aniônica). Neste terceiro passo de purificação, obtiveram-se três picos eluídos com atividade (FI-A, FI-B e FI-C) e um pico com menor atividade, que não se ligou na coluna FI D (Figura 5). Após essa etapa, a fração FI teve queda em sua atividade amidásica, não sendo mais possível acompanhar os passos seguintes de sua purificação através da atividade.

3.3.3. Purificação de FII

3.3.3.1. Gel filtração e Afinidade

A fração FII obtida na gel-filtração foi aplicada diretamente na coluna de afinidade *p*-aminobenzamidina-agarose sem ser dialisada (Figura 4B). As frações obtidas com atividade

amidásica, após a afinidade, foram agrupadas e apresentaram atividade específica de $5,6 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, fator de purificação de 52,7 vezes e 9% de rendimento (Quadro 1).

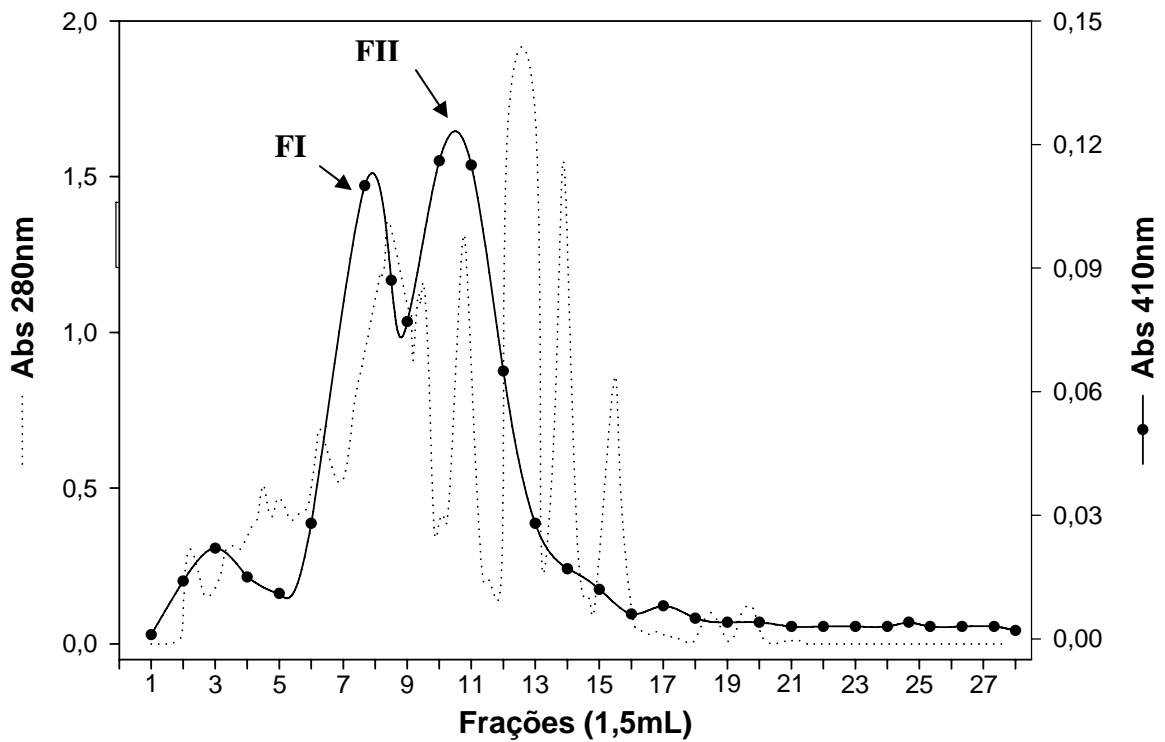


Figura 3 - Cromatografia de gel filtração. Cromatografia de gel-filtração em coluna Superose 12. A coluna foi equilibrada com 0,1 M Tris-HCl 0,15 M NaCl, pH 7,5. Aplicaram-se 500 μL de extrato enzimático solúvel do intestino médio de *A. gemmatalis*, e frações de 1,5 mL foram coletadas em um fluxo de 0,5 mL/min. A atividade enzimática (●—●) foi acompanhada utilizando como substrato L-BApNA e proteína a 280 nm (.....).

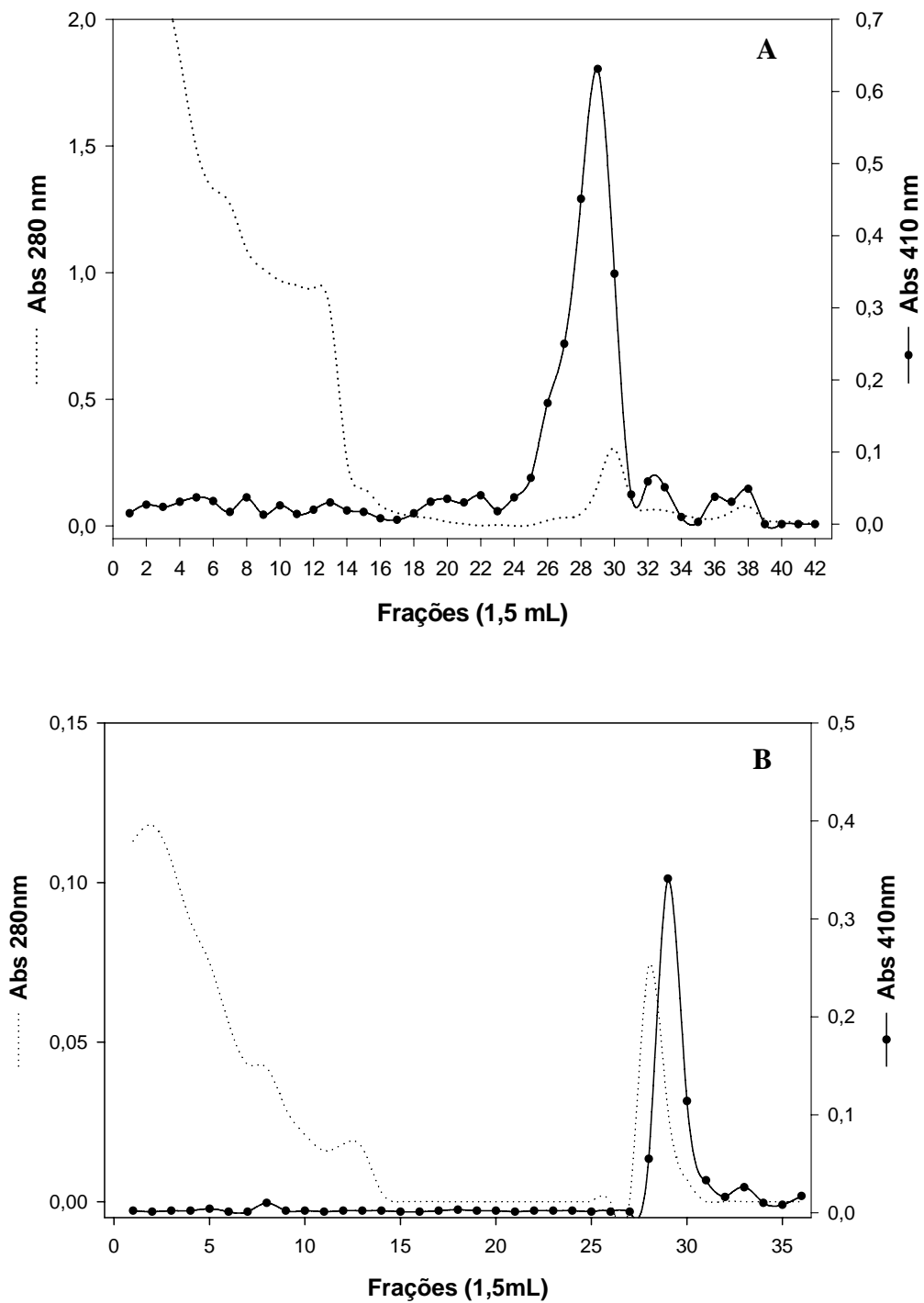


Figura 4 - Cromatografia de afinidade de FI (A) e FII (B). A cromatografia de afinidade foi feita em coluna *p*-aminobenzamidina agarose equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e eluída com 10^{-3} M HCl. Coletaram-se frações de 1,5 mL em um fluxo de 0,5 mL/min e a Atividade enzimática (●—●) foi acompanhada utilizando-se como substrato L- BApNA e proteína a 280 nm (.....).

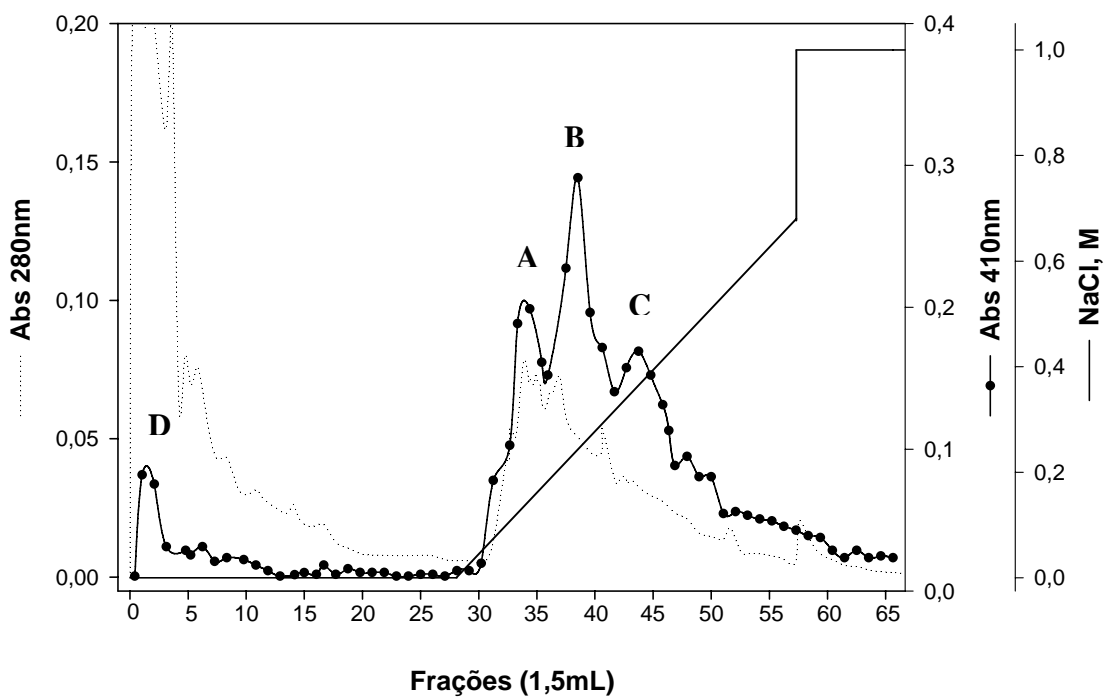


Figura 5 - Cromatografia de troca iônica. Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q da amostra FI, observando-se três picos principais com atividade amidásica (A, B, C). A coluna foi equilibrada com tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e as amostras, eluídas com um gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl (—) no mesmo tampão. Foram coletadas frações de 1,5 mL em um fluxo de 1,0 mL/min. A atividade enzimática (●—●) foi acompanhada utilizando-se como substrato L- BApNA e proteína a 280 nm (.....).

Quadro 1 - Purificação parcial de tripsinas-*like* provenientes de FI e FII

		Proteína total (mg)	Atividade total (nM.s⁻¹)	Atividade específica (nM.s⁻¹. mg⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
		42,1	4510,0	107,1	1	100
Ultracentrifugação						
Gel filtração	FI	3,7	2277,5	615,5	6,0	50,5
	FII	1,3	2231,6	1716,6	16,0	49,5
Afinidade	FI	1,1	1718,8	1562,5	14,6	38,1
	FII	0,072	406,8	5650,0	52,7	9,0
Troca Iônica	FI-A	–	75,6	–	–	1,7
	FI-B	–	92,3	–	–	2,0
	FI-C	–	73,5	–	–	1,6

3.4. SDS-PAGE e zimograma

As proteases parcialmente purificadas a partir de FI-A, FI-B e FI-C apresentaram bandas com massas moleculares de 17,1 kDa a 65,4 kDa, e as proteases purificadas a partir de FII exibiram duas bandas de 33,5 kDa e 31,3 kDa em análise por SDS-PAGE (Figura 6). As análises em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina e com os inibidores PMSF (inibidor irreversível de serino proteases), TLCK (inibidor irreversível de tripsina) e benzamidina (inibidor competitivo de tripsina) não apresentaram nenhuma banda negativa evidenciada pela coloração, confirmando que as proteases parcialmente purificadas FI e FII são serino proteases tripsina-*like* (Figura 7).

3.5. Ensaio de atividade antimicrobiana

A caracterização quanto à existência de atividade antimicrobiana no extrato enzimático e de proteases FII parcialmente purificadas por afinidade de *A. gemmatalis* foi realizada com culturas bacterianas crescidas em placas com meio BHI. O resultado positivo foi evidenciado pela formação de um halo claro em volta da amostra testada; esse halo indica que o crescimento das culturas foi inibido na presença da amostra testada. Um controle foi feito com tampão utilizado na afinidade e com a dieta artificial, em que se obteve resultado negativo. Utilizando as bactérias gram +, *S. aureus*, e gram -, *E. coli*, os resultados foram negativos – não houve formação de halo, enquanto na avaliação com *L. monocystogenes* (gram +) e *E. faecalis* (gram +) o resultado foi positivo, houve formação de halo (Quadro 2).

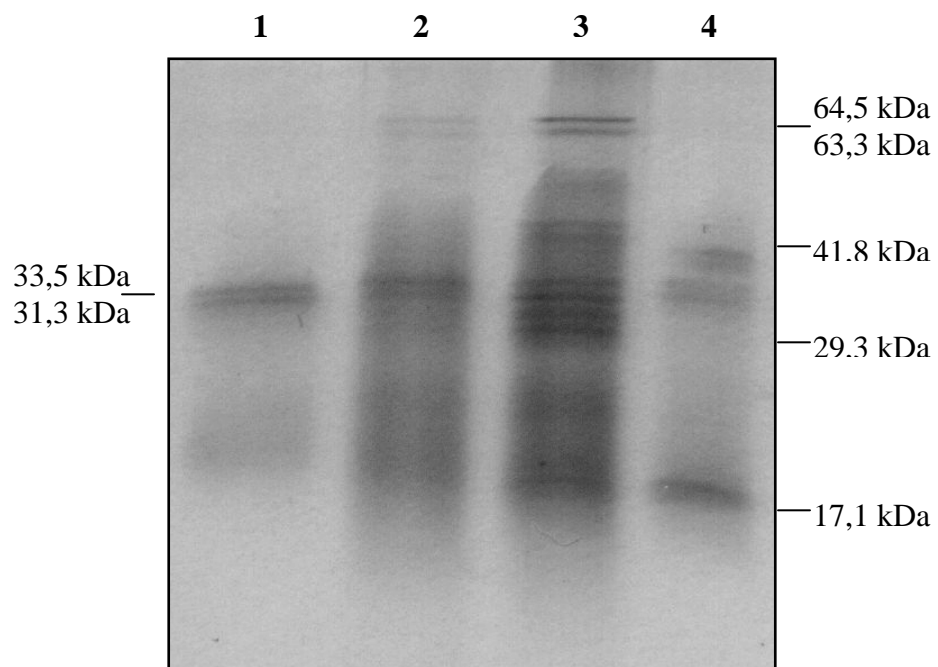


Figura 6 - SDS-PAGE 12,5% das proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. Linha 1 – proteases parcialmente purificada de FII. Linha 2 – amostra FI-A da troca iônica. Linha 3 – amostra FI-B da troca iônica. Linha 4 – amostra FI-C da troca iônica.

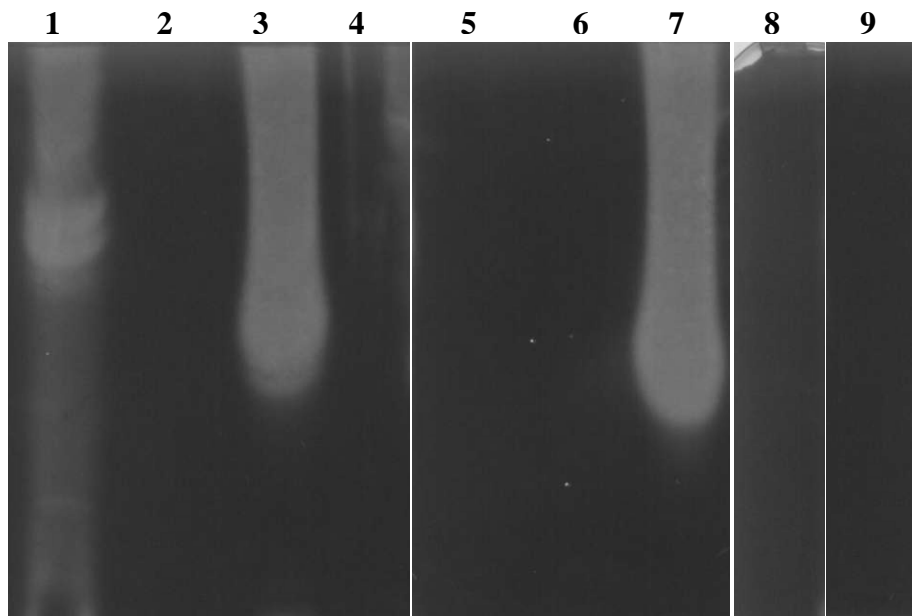


Figura 7 - Zimograma das proteases parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*. Linha 1 – controle positivo, 1 μ g de Tripsina bovina comercial. Linha 2 – 1 μ g de amostra FI testada com 1 mM TLCK. Linha 3 – 1 μ g de amostra FI. Linha 4 – 1 μ g de amostra FI testada com 5 mM PMSF. Linha 5 – 1 μ g de amostra FII testada com 1 mM TLCK. Linha 6 – 1 μ g de amostra FII testada com 5 mM PMSF. Linha 7 – 1 μ g de amostra FII. Linha 8 – 1 μ g de amostra FI testada com 1 mM benzamidina. Linha 9 – 1 μ g de amostra FII testada com 1 mM benzamidina. A amostra FI-b foi utilizada como representativa de FI no zimograma.

Quadro 2 - Ensaio antimicrobiano

Microrganismo	Atividade antimicrobiana	
	Extrato enzimático	FII
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Listeria monocystogenes</i> (Scoth a)	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-

O ensaio foi feito utilizando culturas bacterianas crescidas em meio BHI, 100 µg do extrato enzimático e 50 µg de amostra FII após a cromatografia de afinidade. (+) presença de halo de inibição de crescimento e (-) ausência de halo.

4. DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de estabilidade

O ensaio de estabilidade do extrato durante o armazenamento permitiu que se trabalhasse na faixa de tempo com maior atividade do extrato, entre o 1º e o 2º mês. A queda na atividade percebida ao longo do tempo de armazenamento pode ser devida à ação de diferentes enzimas proteolíticas existentes no extrato ou à ocorrência de autólise no extrato enzimático.

O fenômeno de autólise, autodegradação, é comum e descrito na literatura para várias enzimas tripsina-*like* de vertebrados e invertebrados. (VARALLYAY et al., 1998; LI et al., 1998; LOPES et al., 2006). É bem documentado que as tripsinas de mamíferos perdem a atividades devido à proteólise autocatalítica, que na ausência de Ca^{2+} a degradação autocatalítica é rápida, o cálcio em concentrações milimolares protege a enzima contra autólise (LI et al., 1988; VARALLYAI et al., 1998; PASTERNAK et al., 1999; SAHIN-TÓTH, 2000).

O maior sítio catalítico da tripsina, de acordo com a literatura, está presente no *loop* interdomínio que contém Arg 117 – Val 118; a clivagem dessa ligação peptídica leva à inativação da protease, dado esse particularmente interessante se analisado com a descoberta de que a mutação em Arg 117 para His em tripsina catiônica humana está associada com a pancreatite hereditária. Essa mutação abole claramente o maior sítio catalítico da tripsina, sendo possível especular que a autólise tem papel fisiológico crucial no pâncreas, podendo funcionar como um mecanismo seguro para eliminar a ativação

prematura de tripsinas no pâncreas (GRÁF & SZILÁGYI, 2003). A autólise de tripsinas de inseto difere tipicamente do que ocorre com as tripsinas de mamíferos. A estabilização das tripsinas de mamíferos depende de que o cálcio se ligue ao motivo de ligação em sua estrutura, e esse motivo não está presente nas seqüências das tripsinas de insetos. Os sítios autocatalíticos em tripsinas de mamíferos (Lys 61-Ser 62, Arg 117-Val 118 e Lys 145-Ser 146) não estão conservados nas tripsinas de insetos que podem possuir outros sítios de clivagem autocatalíticos; além disso, a autólise é menos freqüente em alguns insetos como *Perilaneta americana* e *Tenebrio molitor* (VARALLYAY et al., 1998; LOPES et al., 2006).

4.2. Purificação

A cromatografia de gel-filtração não se mostrou eficiente na separação das enzimas, mas possibilitou a separação dessas proteases das demais proteínas do extrato, mantendo ainda atividade amidásica. Na comparação entre os perfis cromatográficos de amostras obtidas de intestinos com e sem seu conteúdo, não se observaram diferenças. Portanto, os perfis são semelhantes e coincidentes. Assim, as amostras obtidas com o seu conteúdo intestinal foram utilizadas em todos os ensaios. Nesse passo de purificação, cromatografia de gel-filtração, separaram-se duas frações (FI e FII), que apresentaram atividade amidásica dentre as demais.

Com os resultados da calibração da coluna Superose 12 HR 10/30, foi possível calcular o K_{av} das frações pertencentes à FI (frações 7, 8 e 9) e a FII (10 e 11), e, através da equação da reta obtida pela curva-padrão, observou-se que a faixa massa molecular das frações de FI estava entre 60 a 80 kDa e das frações de FII, na faixa entre 20 e 30 kDa. Tais valores estão de acordo com o relatado na literatura para valores de massa molecular de tripsinas de inseto. Após gel-filtração, as frações de interesse foram dialisadas para seguirem para a coluna de troca iônica.

Durante o processo de diálise, a fração FI perdeu 30% de sua atividade e a FII, 68%, o que indica a ocorrência de degradação do material possivelmente por autólise.

Essa queda de atividade foi ponto decisivo da não-opção pelo processo da técnica de diálise para a preparação das amostras nos testes seguintes.

As frações FI e FII obtidas na gel-filtração foram aplicadas em cromatografia de afinidade em coluna de *p*-aminobenzamidina agarose. A benzamidina é uma amidina aromática e inibidor sintético competitivo de tripsina apresentando K_i de 1,0 mM (MARES-GUIA et al., 1981). Quando presente no meio de reação em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S_1 (SCHECHTER & BERGER, 1967), da tripsina onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interação eletrostática entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico presente na porção do fundo do bolso do sítio S_1 . (MARES-GUIA & SHAW, 1965, MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993). Xavier et al. (2005) e Oliveira et al. (2005) verificaram que as serino proteases tripsinas-like de *A. gemmatalis* tiveram acentuada redução na atividade enzimática quando ensaiadas com esse inibidor. A coluna de *p*-aminobenzamidina agarose é específica para a purificação ou remoção de tripsinas, enquanto a coluna aprotinina agarose é utilizada para purificação de serino proteases. A aprotinina, também conhecida como BPTI, é um peptídeo natural encontrado no pâncreas bovino, possui massa molecular de 6.500 Da e é conhecida por inibir proteases tripsinas-like (GEIGER & FRITZ, 1981). Ainda, é um inibidor protéico que ocupa todos os subsítios da região do centro ativo de serino proteases, devendo um melhor ajuste na formação do complexo enzima-aprotinina deve ocorrer naturalmente. Com todos os sítios de interação preenchidos, torna-se mais difícil observar efeitos interativos entre a enzima e o ligante, ou seja, é permitido observar no caso de inibidores sintéticos, como a benzamidina, que, por serem pequenos, não ocupam todos os sítios disponíveis da enzima para interação com peptídeos naturais grandes, como a aprotinina, o que proporciona perceber diferenças de afinidade com o ligante (OLIVEIRA et al., 1993).

Com base nesses dados, utilizou-se para a cromatografia de afinidade a coluna de *p*-aminobenzamidina agarose em vez da coluna de aprotinina agarose empregada na purificação de tripsinas-like de *A. gemmatalis* por Oliveira et al. (2005), bem como foram separadas duas frações no lugar de uma somente, podendo caracterizar isoformas tripsina-like.

A cromatografia de afinidade em coluna de *p*-aminobenzamidina agarose da amostra FI possibilitou a separação das proteases da amostra de outras proteínas presentes no extrato, mas não a separação entre as proteases de interesse. FI após afinidade (Figura 4A) foi aplicada na cromatografia de troca iônica. No perfil da troca iônica, obtiveram-se três picos eluídos (FI-A, FI-B e FI-C) com atividade amidásica e um que não se ligou à coluna aniônica (FI-D) (Figura 5). Esses dados apontam a existência de proteases tripsina-*like* com diferentes cargas líquidas e as proteases eluídas seriam aniônicas, pois se ligaram à coluna Mono-Q (de troca aniônica) e o pico que não se ligou à resina com atividade amidásica provavelmente constituído de proteases na forma catiônica nas condições experimentais.

Nesse trabalho, estudaram-se apenas as formas enzimáticas de FI que se ligaram à coluna de troca iônica Mono-Q, proteases com carga líquida aniônica. As frações FI-A, FI-B e FI-C tiveram queda na atividade amidásica após a troca iônica, e a concentração de proteína não foi detectada pelo método utilizado, não sendo possível, dessa forma, montar uma tabela de purificação (Quadro 3).

Na literatura existem vários dados sobre DNA ou seqüências de cDNA de tripsinas expressas no intestino médio (SASAKI et al., 1993; ZHU et al., 2000; MAZUMBAR-LEIGHTON et al., 2000; HEGEDUS et al., 2003). As proteases tripsinas-*like* purificadas com atividade são encontradas em várias isoformas, parte das tripsinas-*like* de insetos descritas foi purificada utilizando-se no processo cromatografias de troca aniônica (WARD, 1975; AHMAD et al., 1980; JONGSMA et al., 1996; LAM et al., 2000; LOPES & TERRA, 2003; TELANG et al., 2005) e troca catiônica (LEMOS & TERRA, 1992; LAM et al., 2000). Nesses trabalhos, são relatadas isoformas aniônicas e catiônicas, sendo que a grande maioria das isoformas é aniônica, o que corrobora com os resultados deste trabalho para as tripsinas do intestino médio de *A. gemmatalis*, onde também existem tripsinas aniônicas (FI-A, FI-B e FI-C) e catiônicas (FI-D).

No FII, o processo de purificação mostrou-se mais eficiente quando comparado com FI, pois foram obtidas apenas duas proteínas detectadas em SDS-PAGE (Figura 6, linha 1), que mantiveram a atividade. Os dados de rendimento (66,7%) e fator de purificação (107 vezes) de tripsinas-*like* solúveis purificadas de *A. gemmatalis* por Oliveira et al. (2005) diferem dos obtidos neste trabalho (Quadro 3). Oliveira et al. (2005)

caracterizaram um *pool* de tripsinas-*like* solúveis, podendo ser uma mistura de formas aniônicas e catiônicas, uma vez que o centro ativo da enzima é conservado. Nesta pesquisa duas frações, FI e FII, foram separadas e apenas caracterizadas tripsinas-*like* obtidas a partir de FII. Além disso, nos passos de purificação foram utilizadas etapas adicionais, o que favorece a autólise e a conseqüente queda de atividade dessas tripsinas, possivelmente acarretando o baixo rendimento encontrado (9%) e o menor fator de purificação (52,7 vezes) em comparação com o descrito por Oliveira et al. (2005).

A significância da existência de múltiplas tripsinas em invertebrados e vertebrados ainda não é bem compreendida, entretanto, como a expressão das tripsinas varia em resposta à presença ou ausência de inibidores na dieta, evidencia que a existência de múltiplos genes que codificam essas proteases se relaciona com a resposta à diversidade de inibidores presentes nas plantas (DÍAS-MENDOZA et al., 2005). Larvas de *Helicoverpa zea* expressam dois diferentes tipos de tripsinas, dependendo da dieta com ou sem inibidor, as quais diferem entre si em alguns resíduos que podem estar envolvidos na interação com inibidor (VOLPICELLA et al., 2003). Esses resíduos determinam as tripsinas sensíveis e insensíveis aos inibidores, sendo que essas mudanças na seqüência primária dessas proteases ocorreram durante a co-evolução de milhões de anos entre as tripsinas e os inibidores de plantas (LOPES et al., 2004). Essa convivência contribuiu para o sucesso evolutivo da classe, propiciando que os insetos desenvolvessem mecanismos de adaptação aos inibidores de proteases.

4.3. SDS-PAGE e Zimograma

As amostras parcialmente purificadas obtidas de FI, com atividade amidásica, mostraram em SDS-PAGE bandas com massas moleculares para FI-A de 31,3 kDa, 33,5 kDa, 63,3 kDa e 65,4 kDa; para FI-B bandas de 17,1 kDa a 65,4 kDa; e para FI-C bandas de 17,1 kDa, 31,3 kDa, 33,5 kDa e 41,8 kDa (Figura 6). A proteína encontrada com massa molecular de 17,1 kDa é, provavelmente, produto de autólise e as de massas de 63,3 kDa e 65,4 kDa produtos de agregação. A fração purificada a partir de FII mostrou apenas duas bandas de 33,5 kDa e 31,3 kDa (Figura 7), todas as três frações de FI

possuindo essas duas bandas mais evidentes. Em outra análise em SDS-PAGE 12,5%, a amostra purificada FII, após três meses de armazenamento, apresentou uma única banda de 65,4 kDa, reforçando a hipótese de ocorrência de processos de agregação nas amostras deste trabalho. Os valores de massa encontrados no SDS-PAGE estão de acordo com o visualizado na calibração da coluna de gel-filtração, onde frações pertencentes à FI estão na faixa de massa molecular entre 60 e 80 kDa, e as frações de FII estão na faixa entre 20 e 30 kDa. Tripsinas isoladas do intestino médio de vários insetos exibem tipicamente massa molecular entre 20 e 30 kDa para seus monômeros (TERRA & FERREIRA, 1994). Entretanto, tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como o apresentado por Wagner et al. (2002) em estudos com proteases tripsina-like de *Melolontha melolontha* com massas moleculares de 56 e 63 kDa e por Amad et al. (1980) em estudos com tripsinas com massa de 53 kDa de *Spodoptera litura*. Tripsinas com menor massa molecular também são relatadas na literatura, como o encontrado para uma tripsina do epitélio de *Bombix Mori*, 13 kDa, por Eguchi e Kuriyama (1985). Em adição, tripsinas de *H. virescens* podem formar oligômeros, e nesses insetos tratados com dieta com inibidores de proteases esses oligômeros se apresentam mais estáveis (BRITO et al., 2001), e os oligômeros ligam-se mais finamente ao substrato fluorogênico Z-FR-MCA (carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amino-4-methyl coumarin) do que os monômeros encontrados em insetos mantidos com dieta sem inibidores, o que indica que a formação de oligômeros é uma estratégia de adaptação a inibidores de protease, através de mudanças em suas propriedades físico-químicas (LOPES et al., 2004). Quando se analisam as amostras FI-A, FI-B e FI-C e FII com os inibidores PMSF (inibidor irreversível de serino proteases – FAHRNEY & GOLD, 1963; GOLD & FAHRNEY, 1964), TLCK (inibidor irreversível de tripsina – SHAW et al., 1965) e benzamidina (inibidor competitivo de tripsina – MARES-GUIA et al., 1981), em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina, confirma-se que as proteases parcialmente purificadas, tanto FI quanto FII, são serino proteases tripsina-like (Figura 6), como visto por Oliveira et al. (2005), com as proteases solúveis parcialmente purificadas de *A. gemmatalis*.

4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana

Várias espécies de insetos estão sendo alvo de estudos e bioprospecção de novos agentes antimicrobianos, como proteases e peptídeos, além de serem utilizadas em testes de patogenicidade (DIMARQ & HUNNEYBALL, 2003; KAVANAGH et al., 2004; GARCÍA-LARA et al., 2005). Moléculas derivadas de insetos com atividade antimicrobiana possuem grande potencial no tratamento de doenças humanas, enquanto várias serino proteases e proteínas estruturalmente relacionadas, de mamíferos e de artrópodes, descritas na literatura, possuem atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella typhimurium* e *L. monocystogenes*, dentre outros (GABAY et al., 1988; KAWABATA et al., 1996; NAKAJIMA et al., 1997; TSUJI et al., 1998; AGUILAR et al., 2005). Analisando esses dados da literatura e com a disponibilidade de alguns desses microrganismos em serem testados com as serino proteases de *A. gemmatilis*; os microrganismos patogênicos a humanos *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocystogenes* e *E. faecalis* foram escolhidos inicialmente para a realização do nosso ensaio.

Nos testes com *S. aureus* e *E. coli*, não se obteve resultado positivo (formação de halo) com as amostras testadas, entretanto esse resultado não define as amostras como não detentoras de atividade contra esses microrganismos, pois outras concentrações e diferentes meios devem ser testados para se concluir. Resultados negativos com *S. aureus* e *E. coli* também foram encontrados em testes de atividade antimicrobiana de uma proteína homóloga de serino protease de *Limulus* (KAWABATA et al., 1996) e de uma serino protease de *Sarcophaga peregrina* (NAKAJIMA et al., 1997; TSUJI et al., 1998) em que nas concentrações testadas essas bactérias se mostraram resistentes às amostras-teste.

No ensaio com *L. monocystogenes* e com *E. faecalis*, encontraram-se resultados positivos para o extrato enzimático apenas. *L. monocystogenes* é encontrado na água, solo e alimentos, sendo responsável pela listeriose, um grupo de desordens como septicemia, infecções cervicais e intra-uterinas na mulher grávida (resultando em aborto). *L. monocystogenes* é conhecido por desenvolver mecanismos de resistência a certos antimicrobianos (NAGHMOUCHI et al., 2006). *E. faecalis*, é habitante natural do trato

intestinal humano e genital feminino, sendo uma bactéria oportunista e problemática em infecções hospitalares; possui resistência a muitos antimicrobianos e grande capacidade de desenvolver resistência devido a suas características genéticas (PAULSEN et al., 2003). Dessa forma, podemos perceber que esses resultados positivos colocam *A. gemmatalis* como possível alvo para bioprospecção de antimicrobianos. Contudo, novos ensaios serão realizados para se encontrar qual a concentração mínima ideal de inibição, qual o componente ou o conjunto de componentes presentes no extrato enzimático que inibem o crescimento dessas bactérias ou se a ação antimicrobiana encontrada é resultado da própria microbiota residente do trato intestinal médio da larva no 5º ínstar. Os ensaios com amostras parcialmente purificadas não apresentaram resultados positivos, o que evidencia que as serino proteases purificadas não possuem atividade antimicrobiana.

5. CONCLUSÃO

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora problemática para cultivares de soja, tendo seu estudo importância econômica como interesse científico. O intestino e particularmente o intestino médio dos insetos são reconhecidos como um ponto potencial de ataque no controle de populações de insetos e, ou, controle na transmissão de doenças. O estudo da fisiologia e bioquímica dos insetos é um pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de controle que possam atuar via intestino (TERRA et al., 1996; FRANCO et al., 1999).

Neste trabalho, metodologias foram propostas para a purificação de enzimas tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis*. Os perfis encontrados durante os processos de purificação indicaram a existência de isoformas com carga líquida diferentes. As proteases isoladas foram caracterizadas como tripsinas-like em ensaio utilizando inibidores específicos de serino proteases: PMSF, benzamidina e TLCK, duas frações aniônicas (FI e FII), foram isoladas durante o processo de purificação. A fração FI, parcialmente purificada, mostrou em SDS-PAGE bandas com massas moleculares de 17,1 kDa a 65,4 kDa; a massa molecular de 17,1 kDa provavelmente seja produto de hidrólise e a massa molecular de 65,4 kDa produto de agregação; a fração FII exibiu duas bandas de 33,5 kDa e 31,3 kDa. No momento, as diferentes tripsinas aniônicas encontradas neste trabalho estão sendo estudadas e caracterizadas.

Em ensaios antimicrobianos com o extrato enzimático e FII parcialmente purificada, após a cromatografia de afinidade observou-se apenas a existência de atividade antimicrobiana no extrato enzimático do intestino médio contra as bactérias gram +, *E. faecalis* e *L. monocystogenes* (scotch a), resultado que encoraja futuros estudos

visando isolar os componentes presentes no extrato com atividade antimicrobiana e determinar suas estruturas e o modo de ação.

PARTE II

Purificação e Caracterização de Proteases Tripsina-*like* Catiônicas Obtidas
do Intestino Médio de *Anticarsia gemmatalis*, Lagarta da Soja

1. INTRODUÇÃO

Os insetos são uma das causas mais importantes da ocorrência de estresses bióticos na agricultura. Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, dos quais cerca de 13% seja devido aos insetos (GATEHOUSE et al., 1992).

Os insetos não apenas provocam perdas na produtividade diretamente devido ao ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (HILDER & BOULTER, 1999).

A organização do processo digestivo dos insetos depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo intestinal, que são responsáveis pela translocação das enzimas e produtos da digestão. As proteases digestivas catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos (TERRA et al., 1996a).

O intestino médio de Lepidoptera é alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, pois várias espécies dessa ordem são insetos de grande interesse econômico, pois atacam variedades comerciais, como cereais, algodão, leguminosas, dentre outros (SANTOS et al., 1986; TERRA et al., 1996, 1996a; LEHANE et al., 1996; OLIVEIRA et al., 2005 e XAVIER et al., 2005). No caso da soja, entre os insetos que trazem conseqüências econômicas mais significativas destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja (SILVA et al., 2002). As serino proteases, particularmente tripsina e quimotripsina, são as

principais proteases digestivas encontradas na maioria dos insetos, com exceção de alguns Hemiptera (HOUSEMAN et al., 1985; COLEBATCH et al., 2001) e espécies de Coleoptera (TERRA & FERREIRA, 1994; GIRARD et al., 1998; OPPERT et al., 2003), nos quais cisteína proteases e aspartil proteases são predominantes. As serino proteases participam de grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação no sistema imune de insetos (GORMAN et al., 2000 e 2000a; LEVY et al., 2004).

Tripsinas são caracterizadas pela tríade catalítica His 57, Asp 102, e Ser 195 (numeração da quimotripsina bovina), e cliva ligações peptídicas do lado carboxila de L-aminoácidos básicos, com preferência por Arg de 2 a 10 vezes a Lys (CRAIK et al., 1987; OLIVEIRA et al., 1993). A atividade digestiva de enzimas tripsina-like é encontrada na maioria das espécies de insetos estudados, e sua especificidade mostra-se similar às tripsinas de vertebrados (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA et al., 1996).

Similaridades entre as tripsinas de insetos e a tripsina bovina aparentemente estão relacionadas com o mecanismo catalítico e inibição por inibidores típicos de tripsina. Entretanto, comparação entre tripsinas de pâncreas bovino e tripsina de insetos tem mostrado diferença nos valores de pH ótimo, massa molecular (PURCELL et al., 1992) e em sua sensibilidade a inibidores de proteases de plantas (CHRISTELLER & SHAW, 1989).

Enzimas tripsina-like do intestino médio têm sido encontradas, estudadas e caracterizadas em várias espécies de Lepidoptera (AHMAD et al., 1980; JOHNSTON et al., 1991; LEE & ANSTEE, 1995; VALAITIS, 1995; NOVILLO et al., 1999; XAVIER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

A especificidade primária das tripsinas de todos os insetos é semelhante. Com exceção de Lepidoptera, essas enzimas hidrolisam mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P₁ (LOPES et al., 2004 e 2006). Tripsinas de Lepidoptera possuem maior especificidade para substratos que contenham Lys do que para aqueles que contenham Arg. Os inibidores de proteases produzidos pelas plantas apresentam uma região chamada de sítio reativo, o que interage com a sua enzima-alvo. A ligação do sítio reativo ocorre no sítio ativo da enzima. O alinhamento das seqüências

de vários inibidores de proteases de plantas indicou que os sítios reativos da maioria desses inibidores possuem um resíduo de Lys na posição P₁ (LOPES et al., 2004).

Uma das estratégias de controle de pragas é baseada no uso de inibidores de proteases. Para isso, é necessário o conhecimento da estrutura do centro ativo das enzimas digestivas presentes no intestino do inseto-alvo, bem como as propriedades bioquímico-cinéticas das proteases produzidas e sensibilidade a inibidores (OLIVEIRA et al., 2005, PILON et al., 2006). De posse dessas informações, inibidores mais potentes ou que sejam especificamente direcionados contra as enzimas insensíveis produzidas pelos insetos podem vir a ser projetados utilizando-se técnicas de análise proteômica (De LEO et al., 2001; VOLPICELLA et al., 2003).

No intuito de analisar as proteases de insetos e suas interações com inibidores, identificaram-se proteases de *Anticarsia gemmatalis*, que estão envolvidas no processo de interação planta-inseto (XAVIER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005, PILON et al., 2006). Nesta parte do trabalho, descreveram-se e compararam-se propriedades bioquímicas de proteases tripsina-*like* catiônicas isoladas do intestino médio de *A. gemmatalis*, a lagarta da soja.

2. METODOLOGIA

2.1. Insetos

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) foram cultivadas em laboratório, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil, sob temperatura (25 ± 5 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14h:10h – L/D) controlados.

2.1.1. Criação da lagarta da soja

A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas, e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 cm x 50 cm revestida internamente com folhas de papel-sulfite A4. Após quatro dias, os adultos emergiram e foram alimentados com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1.050 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície do papel que revestia internamente a gaiola. Essas folhas que revestiam internamente a gaiola foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500 mL) com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2cm, onde estava acoplada uma tela de filó. Esses copos foram, então,

transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. Após dois ou três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando se iniciou a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial baseada na metodologia de Hoffman-Campo et al. (1985), colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

2.1.2. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi composta de feijão (mulatinho), levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água, ingredientes que foram processados e misturados, nessa ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura era autoclavada por 1h, à pressão de $1,5 \text{ kgf/cm}^2$ e, em seguida, transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1 mg), pantoenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), água (1 L) até formar uma pasta homogênea, que era, então, transferida ainda quente para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta era resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a $\pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Obtenção do extrato do intestino médio

Larvas de *A. gemmatalis* de 5º ínstar foram lavadas em água, entorpecidas em gelo para imobilização e posterior dissecação. Os intestinos médios foram dissecados na presença da solução de 125 mM NaCl a 4 °C, agrupados na proporção de um intestino por 200 µL de solução de 125 mM NaCl e mantidos a 4 °C, para posterior obtenção do extrato bruto. Cinco ciclos de congelamento em $\text{N}_{2(\text{liq})}$ alternados com ciclos de descongelamento em banho a 37 °C foram utilizados para o rompimento das células do epitélio intestinal e a obtenção do extrato bruto, constituído do extravasamento celular do conteúdo do lúmen intestinal. Esse extrato bruto foi submetido a uma ultracentrifugação a

100.834 g por 1h10, a 4 °C, em ultracentrífuga Sorvall® ultra Pro80 e rotor T880, o sobrenadante obtido com aspecto límpido foi filtrado em filtros Millipore® com poros de 0,45 µm de diâmetro. O filtrado, agora denominado “extrato enzimático”, foi aliquoteado em frações de 1,5 mL e mantido a -20 °C, para análise posterior.

2.3. Purificação

As frações aliquoteadas do extrato enzimático foram diretamente aplicadas em cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade foi feita em coluna *p*-aminobenzamidina agarose (“pre-packed”/Sigma®, 2,5 mL “bed volume”), equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e eluída com 10⁻³ M HCl. Em cada cromatografia, 5 mL de extrato enzimático foi aplicado. Um fluxo de 0,75 mL/min foi usado e frações de 1,5 mL, coletadas. A atividade enzimática de cada fração foi monitorada usando-se L-BAPNA como substrato. Após a seleção das frações de interesse, estas foram aplicadas diretamente na troca iônica.

A cromatografia de troca iônica foi realizada em coluna Mono-S HR 5/5 (5 mm x 5 cm) (Pharmacia®), em sistema de FPLC (Pharmacia®), equilibrada com 20 mM acetato de sódio, pH 5,4 e eluída com um gradiente de 0 a 1 M de NaCl. Em cada cromatografia realizada foram aplicados 10 mL de amostra vinda da afinidade. Um fluxo de 1 mL/min foi usado e frações de 1,5 mL, coletadas em tubos contendo 20 µL de ácido fórmico 1,5 M. A atividade enzimática de cada fração da cromatografia foi monitorada usando-se L-BAPNA como substrato. As frações com atividade foram liofilizadas e aplicadas diretamente na fase reversa.

A cromatografia de fase reversa foi realizada em coluna C18 (4,6 mm x 25 cm) (Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu®), em sistema de HPLC (Shimadzu®), utilizando-se um gradiente linear de solução aquosa de acetonitrila de 0 a 80% e ácido trifluoracético 0,1% (v/v), em 50 min com um fluxo de 1 mL/min. Em cada cromatografia foram aplicados 100 µL de amostra obtidos na troca iônica. As frações com atividade amidásica coletadas foram selecionadas e analisadas em SDS-PAGE e espectrometria de massa (MALDI-TOF e ESI-TOF).

2.4. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína das amostras foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se solução de 0,2 mg/mL BSA para a obtenção de uma curva-padrão de 5 µg a 25 µg de proteína.

2.5. Atividade enzimática

A atividade amidásica foi realizada de acordo com o método descrito por Erlanger et al. (1961), utilizando 100 µL de amostra, 400 µL do substrato cromogênico L-BApNA na concentração final de 0,5 mM e tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 8,2 para o volume final de 1 mL. A reação era paralisada com 100 µL de ácido acético 60% (v/v).

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo, utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

2.6. SDS-PAGE, teste de glicosilação e análise em Zimograma

A eletroforese foi realizada utilizando-se o método descrito por Laemmli (1970) com gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (0,1%), o experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 1h20, à temperatura ambiente. O gel foi corado pela coloração da prata (BLUM, 1987). O padrão de massa molecular utilizado foi adquirido da Invitrogen[®] (“Bench Mark™ Protein Ladder”).

O teste de glicosilação foi realizado utilizando-se a coloração para géis de poliacrilamida, com ácido periódico de Schiff (PAS), de acordo com o descrito por FAIRBANKS et al. (1971).

O zimograma foi realizado utilizando-se SDS-PAGE 12,5% contendo 0,1% de gelatina co-polimerizada. A eletroforese ocorreu a 50 V a 4 °C, e posteriormente o gel foi

incubado em 2,5% (v/v) de Triton X-100 por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação para remover o SDS. Posteriormente, os géis foram lavados e incubados com tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, por 2 h a 37 °C. A atividade foi revelada pela coloração com “Coomassie Blue” R-250 (0,25%). Os seguintes inibidores para a caracterização das proteases foram utilizados: PMSF (5 mM), TLCK (1 mM) e TPCK (1 mM). As amostras passaram por um período de pré-incubação (10 min) com cada modificador químico e, posteriormente foram aplicadas no gel.

2.7. Determinação da constante cinética

A determinação cinética de K_M app e V_{max} app foi realizada a 30 °C, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, com o substrato L-BApNA na faixa de concentração de 0,038 a 2,4 mM. As velocidades iniciais foram determinadas a 410 nm para L-BApNA, em função do tempo (2,5 min) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar específico de 8.800 M⁻¹.cm⁻¹. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições cada. Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear.

2.8. Análise das amostras com PMSF em cromatografia de fase reversa

As frações aliqüotadas do extrato enzimático foram diretamente aplicadas em cromatografia de afinidade. Amostras após a cromatografia de afinidade foram separadas em duas frações distintas para seguirem para análise em cromatografia de fase reversa, a uma fração foi adicionada de 5 mM de PMSF e a outra fração serviu como controle, ou seja, não foi adicionada de 5 mM de PMSF, inibidor de serino proteases. Essas amostras passaram igualmente pelos processos de purificação, e os perfis cromatográficos obtidos na fase reversa foram comparados.

2.9. Espectrometria de massa

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes de amostras em íons gasosos (moléculas eletricamente carregadas) e mensura a sua massa. Os íons são separados com base na razão massa/carga (m/z). Em geral, na fonte de íons de um espectrômetro de massa ocorre a formação ou a desorção de íons. Moléculas neutras são convertidas em íons através da ionização por elétrons ou por ionização química. Após a ionização, um setor magnético separa os íons gasosos acelerando-os por campo elétrico e defletindo-os com valores diferentes de razão m/z em trajetórias distintas. Os íons, então, ao término da trajetória são detectados por um multiplicador de elétrons, que funciona de forma semelhante a uma fotomultiplicadora em um espectrofotômetro. O espectro de massa obtido é um gráfico da resposta do detector contra valores de m/z . A técnica de ESI-TOF é adequada para o estudo de macromoléculas carregadas, como as proteínas, e seu poder de resolução fica entre 1.000 e 25.000 Da, e a exatidão de m/z é 0,001, sendo muito utilizada como detector cromatográfico, pois permite a obtenção de informações tanto qualitativas quanto quantitativas. Na maioria das vezes, a técnica MALDI, método que produz vaporização e ionização de macromoléculas biológicas não-voláteis de uma fase de estado sólido diretamente em fase gasosa, é utilizada com espectrômetros de massa de tempo de voo, podendo medir valores de m/z até 10^6 , com poder de resolução é 10^3 - 10^4 e a exatidão na massa pode ser de 0,005% a 0,05% (WESTERMEIER & NAVEN, 2002; PALMA et al., 2003).

As amostras após fase a reversa, sem inibidor, foram analisadas por espectrometria de massa no Laboratório de Análise de Proteínas coordenado pelo Prof. Carlos Bloch Júnior, CENARGEN / EMBRAPA – Brasília, utilizando o sistema MALDI-TOF-TOF MS (Ultraflex II[®], Alemanha), de acordo com o protocolo usual desse laboratório.

A análise em ESI-TOF foi feita com amostras após a fase reversa, sem inibidor, em espectrômetro de massa do tipo *electrospray* com detector baseado em “tempo de voo” no modo de íons positivos (ESI-TOF+), no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas – ICB/UFMG – Minas Gerais, utilizando o sistema ESI-Q-TOF MS

(Micromass[®], Grã-Bretanha). A análise foi feita usando-se de 15 μ L das frações obtidas na fase reversa adicionada de 15 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v). As energias utilizadas no cone de ionização e no capilar foram, respectivamente, de 60 e 3.000 V.

3. RESULTADOS

3.1. Purificação

O sobrenadante do extrato enzimático, obtido por ultracentrifugação, após a filtração, foi aplicado diretamente na coluna de afinidade *p*-aminobenzamidina-agarose. O perfil cromatográfico observado apresentou um único pico eluído com atividade amidásica, detectada usando L-BApNA como substrato (Figura 1). Verificou-se que o perfil de proteína (Abs 280 nm) é semelhante e coincidente com o perfil de atividade (Abs 410 nm). As frações com atividade foram agrupadas e aplicadas em cromatografia de troca iônica.

Na cromatografia de troca iônica, as frações com maior atividade amidásica foram eluídas entre 20 e 50% de NaCl 1 M (Figura 2). No perfil cromatográfico observado tanto de análise de proteína quanto de atividade enzimática não foi possível separar picos bem definidos. O perfil da absorvância a 410 nm demonstrou pelo menos dois picos de maior atividade, os quais estavam sobrepostos (Figura 2). As frações com atividade amidásica foram agrupadas e aplicadas em cromatografia de fase reversa.

Na cromatografia de fase reversa foram eluídos cinco picos (picos 2, 3, 4, 5 e 6) com atividade amidásica (Figura 3), estas frações foram separadamente analisadas em SDS-PAGE e por espectrometria de massa em MALDI-TOF e ESI-TOF. As frações após a fase reversa não tiveram a concentração de proteína detectada pelo método de Bradford (1976) e em pouco tempo após a cromatografia perderam praticamente toda a atividade. Na elaboração da tabela de purificação, o cálculo de atividade específica ($13,2 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$), rendimento (64,5%) e fator de purificação (123,4 vezes) foi feito utilizando-se os dados das amostras obtidas na troca iônica (Quadro 1).

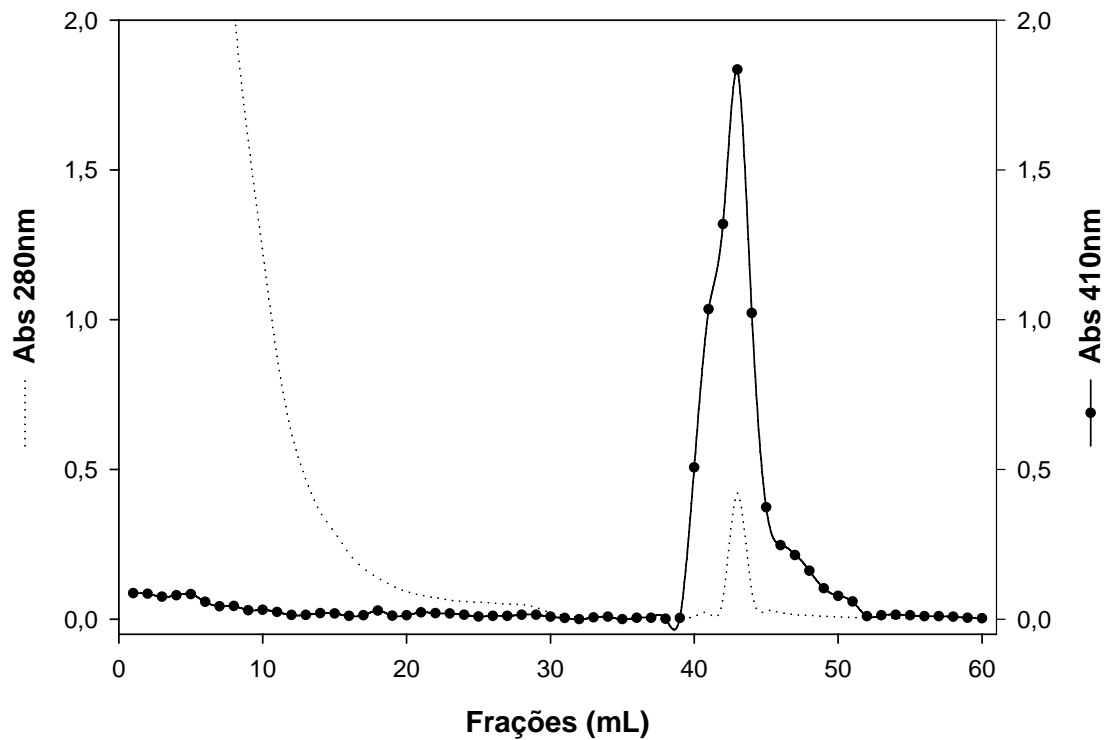


Figura 1 - Cromatografia de afinidade. A cromatografia de afinidade foi feita em coluna *p*-aminobenzamidina agarose equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 e eluída com 10^{-3} M HCl. Coletaram-se frações de 1,5 mL em um fluxo de 0,5 mL/min. A Atividade enzimática (●—●) foi acompanhada utilizando-se como substrato L- BapNA e proteína a 280 nm (.....).

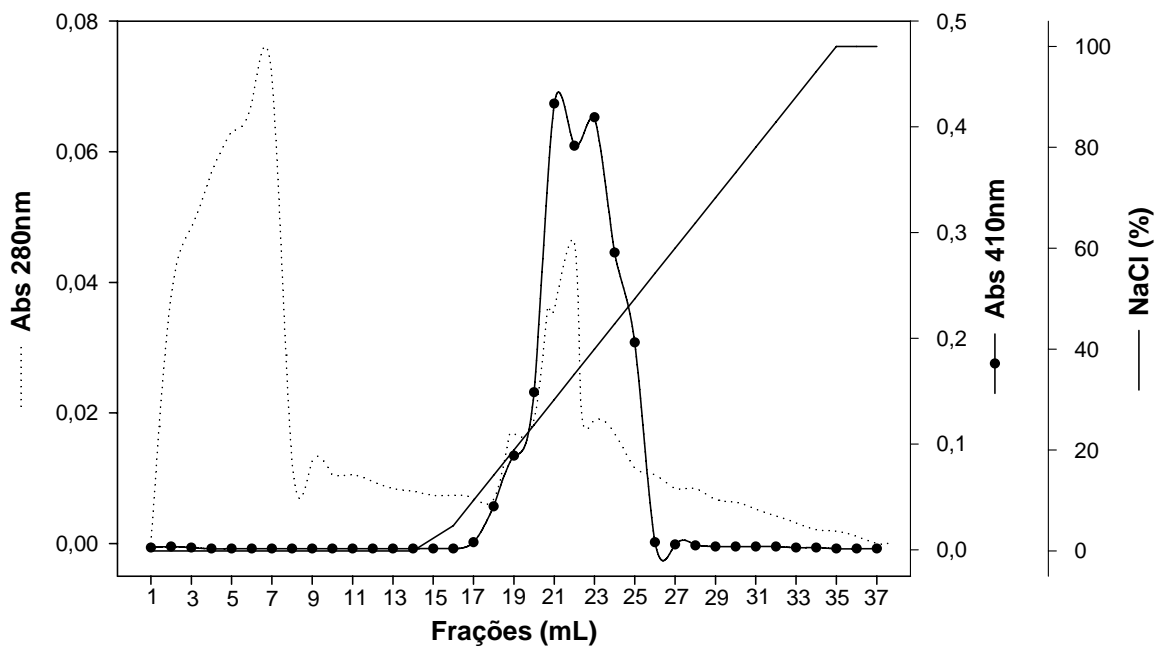


Figura 2 - Cromatografia de troca iônica. Cromatografia de troca catiônica em coluna Mono-S HR 5/5, em que a coluna foi equilibrada com tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, e as amostras eluídas com um gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl (—) no mesmo tampão. Coletaram-se frações de 1,5 mL em um fluxo de 1,0 mL/min. A Atividade enzimática (●—●) foi acompanhada utilizando como substrato L- BApNA e proteína a 280 nm (.....).

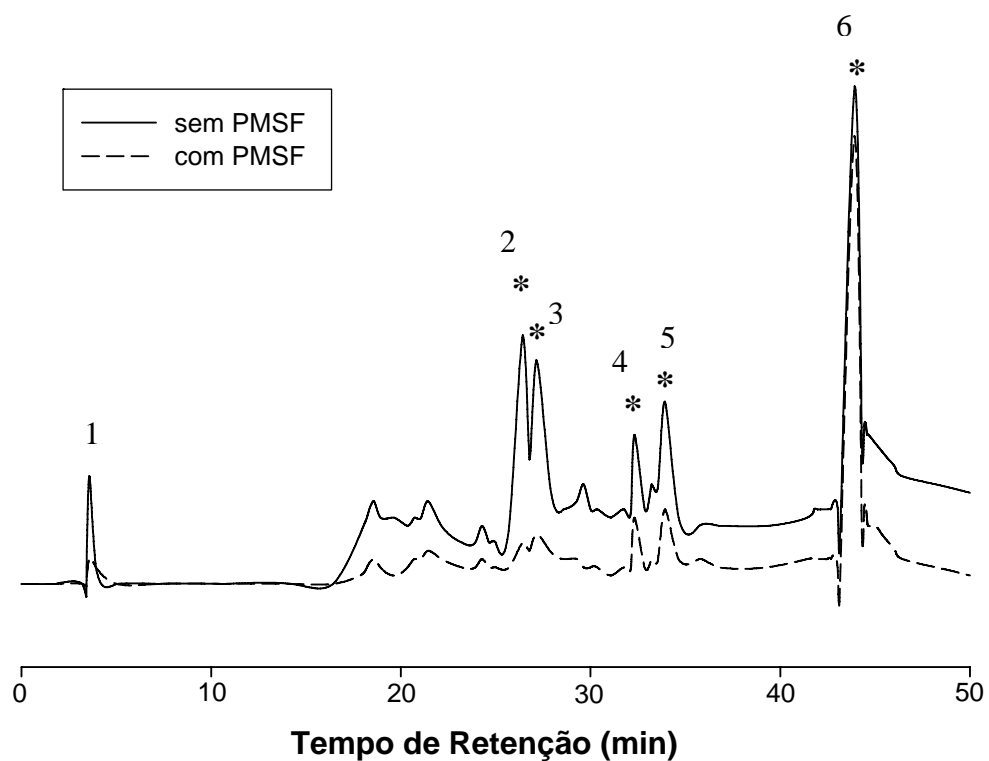


Figura 3 - Cromatografia de fase reversa. Realizada em sistema de HPLC em coluna C-18, em gradiente linear de acetonitrila de 0 a 80% em TFA 0,1%, por 50 min em fluxo de 1 mL/min. Amostra não tratada com inibidor (—) e amostra tratada com 5 mM de PMSF (- - -). Os asteriscos (*) indicam as frações sem inibidor que exibiram atividade amidásica. A detecção das amostras durante a cromatografia, nos dois tratamentos, foi obtida pela leitura a 280 nm.

Quadro 1 - Purificação de tripsina-like catiônica do intestino médio de *A. gemmatalis*

	Proteína (mg)	Atividade total (nM. s ⁻¹)	Atividade específica (nM. s ⁻¹ .mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Ultracentrifugação	13,77	1476,0	107,2	1	100
Afinidade	3,64	3900,0	1071,4	9,9	264,2
Troca catiônica	0,072	952,5	13229,2	123,4	64,5
Fase reversa-pico 4	—	12,2	—	—	0,83

3.2. SDS-PAGE, zimograma e teste de glicosilação

As proteases parcialmente purificadas em cromatografia de afinidade foram submetidas a SDS-PAGE 12,5% e a teste de glicosilação também em gel de poliacrilamida. Na análise por SDS-PAGE (Figura 4) observaram-se quatro bandas evidenciadas pela coloração da prata com 24,8 kDa, 26,3 kDa 30 kDa e 33,4 kDa. A análise em gel zimograma de amostras obtidas da afinidade apresentou quatro bandas evidentes após a coloração (Figura 5, linha 2); em amostra mais concentrada aplicada no zimograma, não há bandas diferenciadas, mas uma banda nítida abaixo de 10 kDa é encontrada. A análise com PMSF (inibidor irreversível de serino proteases – FAHRNEY & GOLD, 1963; GOLD & FAHRNEY, 1964) (Figura 5, linha 4), TLCK (inibidor irreversível de tripsina – SHAW et al. 1965) (Figura 5, linhas 5 e 6) e TPCK (inibidor irreversível de quimotripsina – SCHOELLMANN & SHAW, 1962) (Figura 5, linha 3), em SDS-PAGE co-polimerizado com gelatina, evidenciou que essas proteases, são serino proteases tripsina-like (Figura 5). Em teste de glicosilação, verificou-se que as proteases de 24,8 kDa e de 26,3 kDa são glicosiladas (Figura 6).

Três alíquotas das frações 21, 22 e 23 coletadas após a troca iônica correspondentes aos picos sobrepostos de atividade amidásica, antes de serem agrupadas, foram analisadas em SDS-PAGE 12,5% (Figura 7). No gel, pôde-se verificar a presença das quatro bandas, também observadas após a afinidade, sem maior separação dessas pela cromatografia de troca iônica.

Na análise por SDS-PAGE das amostras obtidas na cromatografia de fase reversa (sem PMSF), observou-se apenas uma única banda de 30 kDa correspondente ao pico 4 da fase reversa (Figura 8), os outros picos não foram detectados na coloração pela prata.

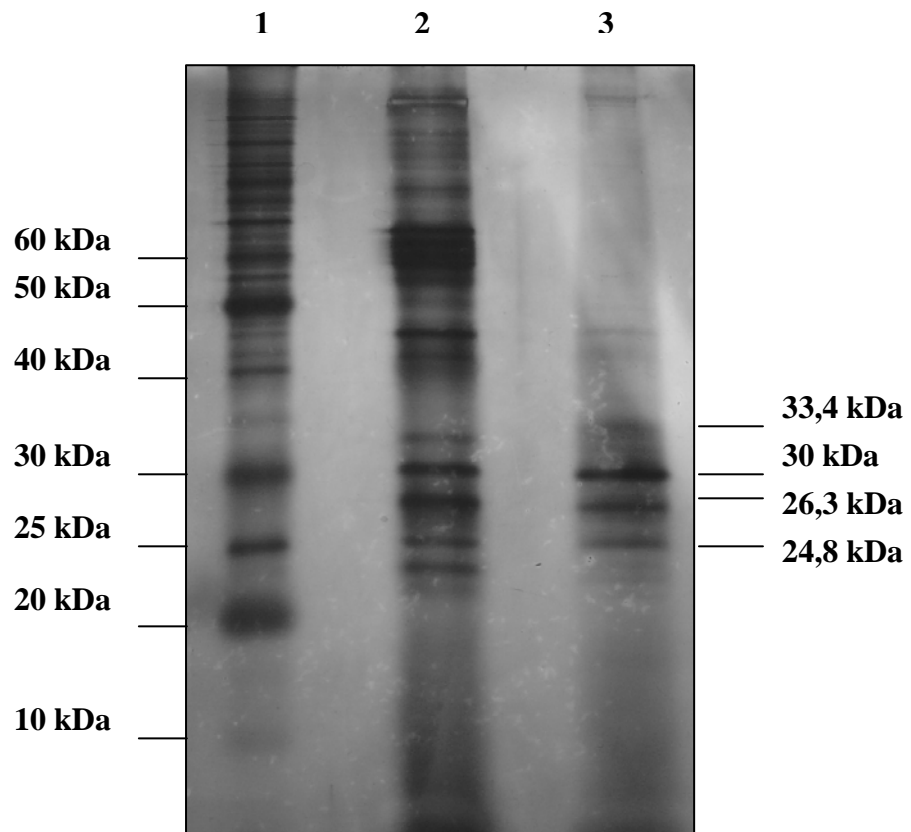


Figura 4 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina-*like* parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade de *A. gemmatalis*. Linha 1 – padrão de massa molecular; linha 2 – 1 µg do extrato enzimático, e linha 3 – 1 µg da fração obtida após a cromatografia de afinidade. Coloração pela prata.

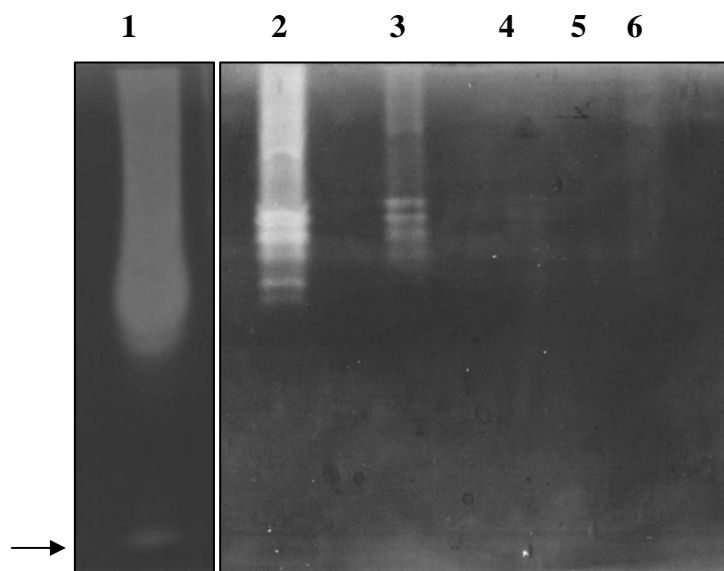


Figura 5 - Zimograma das proteases tripsina-like parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade de *A. gemmatalis*. Linha 1 – 1 μg de amostra após a cromatografia de afinidade; linha 2 – 0,1 μg de amostra após a afinidade; linha 3 – 0,01 μg de amostra após a afinidade com 1 mM de TPCK; linha 4 - 0,01 μg amostra após a afinidade com 5 mM PMSF; linha 5 - 0,01 μg de amostra após a afinidade com 1 mM de TLCK; linha 6 - 0,01 μg de amostra após afinidade com 1mM de TLCK. A seta indica uma banda de baixa massa molecular com atividade proteásica.

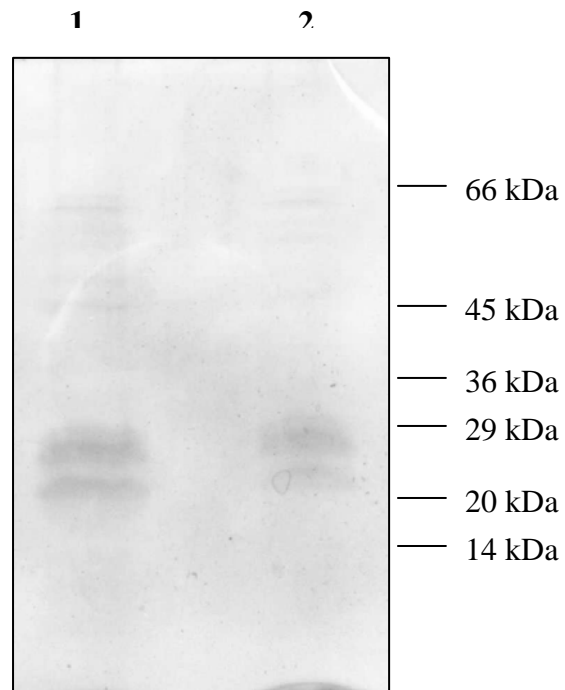


Figura 6 - Coloração PAS do SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina-like parcialmente purificadas por cromatografia de afinidade. Linha 1 – 10 µg de amostra após a afinidade e linha 2 – 6 µg de amostra após a afinidade.

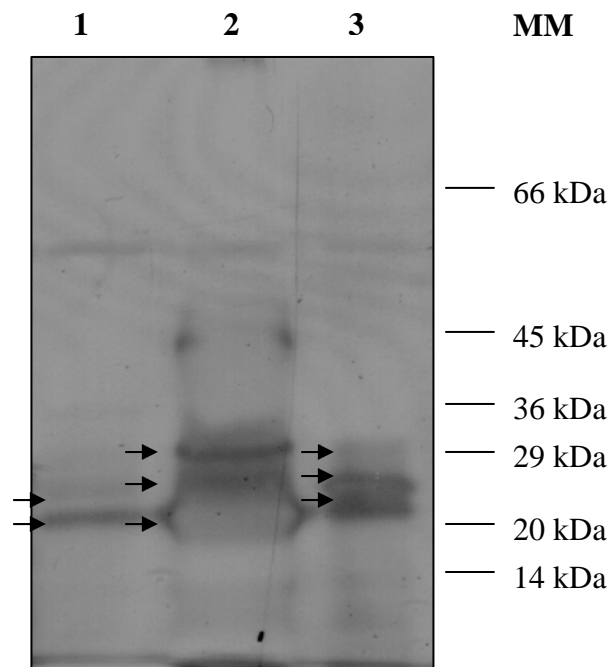


Figura 7 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina-*like* parcialmente purificadas por cromatografia de troca catiônica. Linha 1 – 1 μg da fração 21 da troca iônica; linha 2 – 1,5 μg da fração 22 da troca iônica, e Linha 3 – 1 μg da fração 23 da troca iônica. MM – padrão de massa molecular. Coloração pela prata.

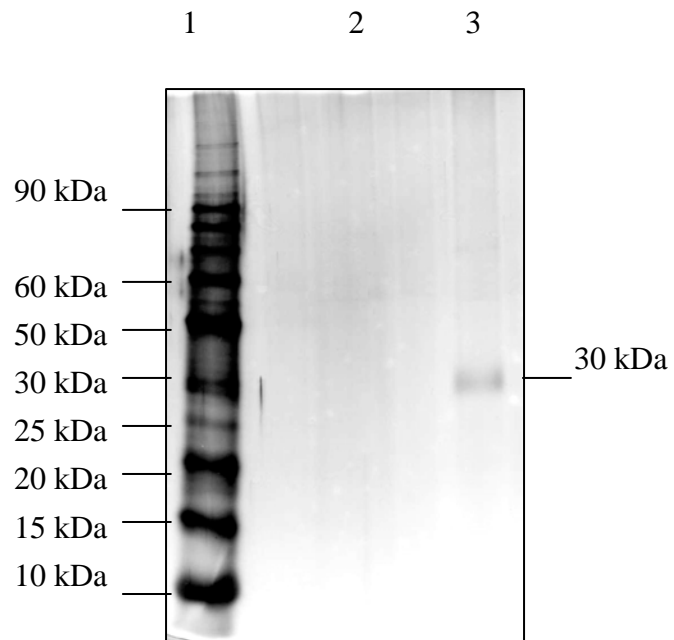


Figura 8 - SDS-PAGE 12,5% das proteases tripsina-*like* purificadas por cromatografia de fase reversa. Linha 1 – padrão de massa molecular; linha 2 – tampão da amostra, e linha 3 – pico 4 da fase reversa. Coloração pela prata.

3.3.Determinação da constante cinética

Os valores de $K_{M\text{ app}}$ de 0,46 mM e $V_{\text{max app}}$ de 0,26 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ (Quadro 2) foram obtidos através de regressão não-linear, no estado estacionário, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten. Na figura 9 temos o perfil da atividade enzimática do pool da troca iônica, sobre o substrato L-BApNA, apresentando o gráfico de Michaelis-Menten e na inserção gráfico de Lineweaver-Burk, para as concentrações utilizadas. O perfil de atividade enzimática não seguiu cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada, uma vez que seu gráfico de atividade não se adequou ao perfil de curvas hiperbólicas.

Quadro 2 - Caracterização cinética de proteases tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*

Estágio	Frações	Grau de purificação	$K_{M\text{ app}}$	$V_{\text{MAX app}}$	Referências
Larval	Solúvel	Parcial	0,32 mM	0,48 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	Oliveira et al., 2005
Larval	Membrana	Homogenato	0,23 mM	21,8 nM $\cdot\text{s}^{-1}$	Xavier et al., 2005
Larval	Catiônicas	Parcial	0,46 mM	0,26 $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$	Este trabalho

A equação de Michaelis-Menten foi utilizada para a obtenção dos valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{max app}}$.

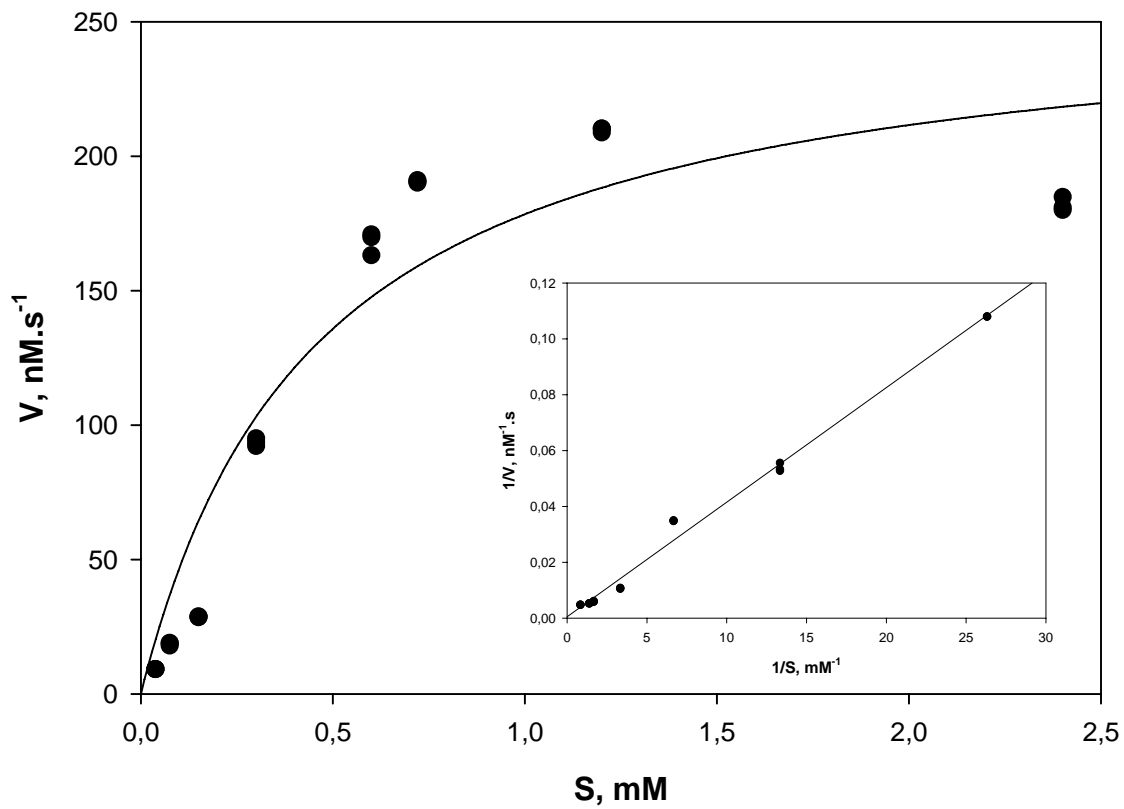


Figura 9 - Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de proteases tripsina-like do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis*. Inserção: Gráfico de Lineaweaver-Burk da atividade sobre L-BApNA. Os pontos são experimentais, em uma mesma concentração de substrato (S) indicam pontos da mesma triplicata e a linha contínua traçada foi baseada em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M\ app}$ e $V_{\max\ app}$.

3.4. Análise em fase reversa das amostras com PMSF

Os perfis cromatográficos, em coluna de fase reversa, obtidos das amostras com e sem 5 mM de PMSF foram comparados (Figura 3), observando-se que no perfil com PMSF houve redução da absorvância detectada em HPLC a 280 nm para os picos 1, 4 e 5, havendo também praticamente o desaparecimento dos picos 2 e 3 e sem maiores alterações observadas no pico 6.

3.5. Espectrometria de massa

A análise de espectrometria de massa do material purificado por cromatografia de fase reversa, sem inibidor, detectou apenas as massas de 1.750,8 Da (ESI-TOF+) para o pico 1 do perfil cromatográfico da figura 10, 23.324,74 Da (ESI-TOF+) para o pico 3 (Figura 11) e 7.997,23Da (MALDI-TOF) também para o pico 3 (Figura 12). Os picos 1, 2, 4, 5 e 6 não foram enviados para análise no MALDI-TOF; ao passo que os picos 2, 4, 5 e 6 foram analisados por ESI-TOF+, entretanto nenhuma massa foi observada na faixa esperada para tripsinas (20 a 35kDa) (Figura 13).

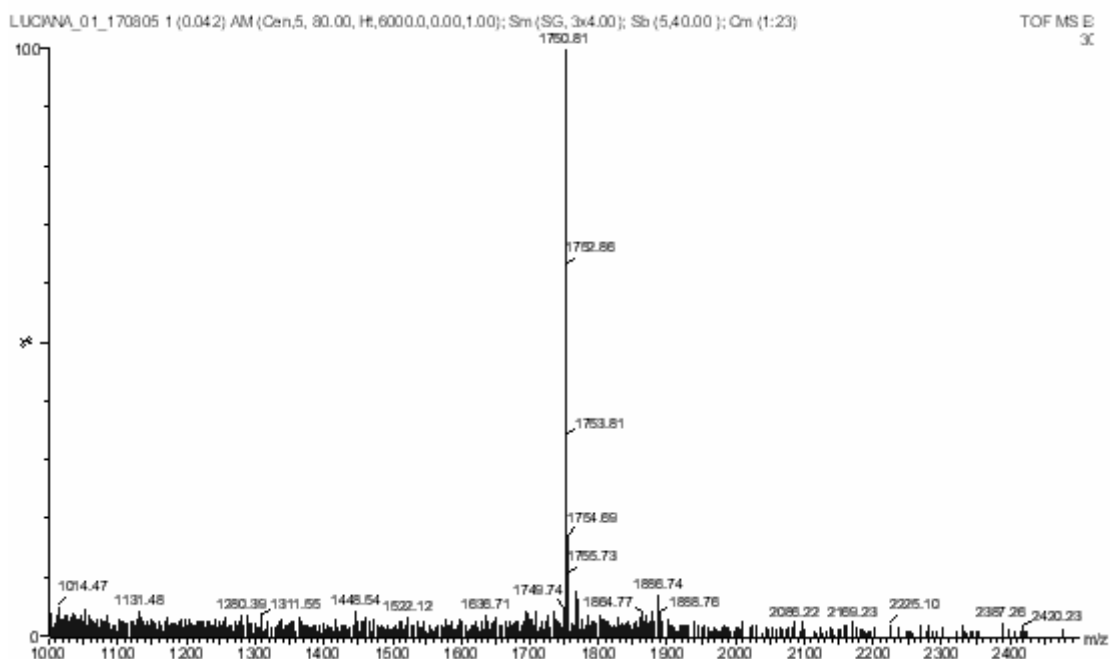


Figura 10 - Análise por espectrometria de massa em ESI-TOF de amostra do pico 1 obtido na fase reversa. A análise foi feita utilizando-se de 15 μ L do pico 1 obtido da fase reversa adicionado de 15 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v). As energias utilizadas no cone de ionização e no capilar foram, respectivamente, de 60 e 3.000 V.

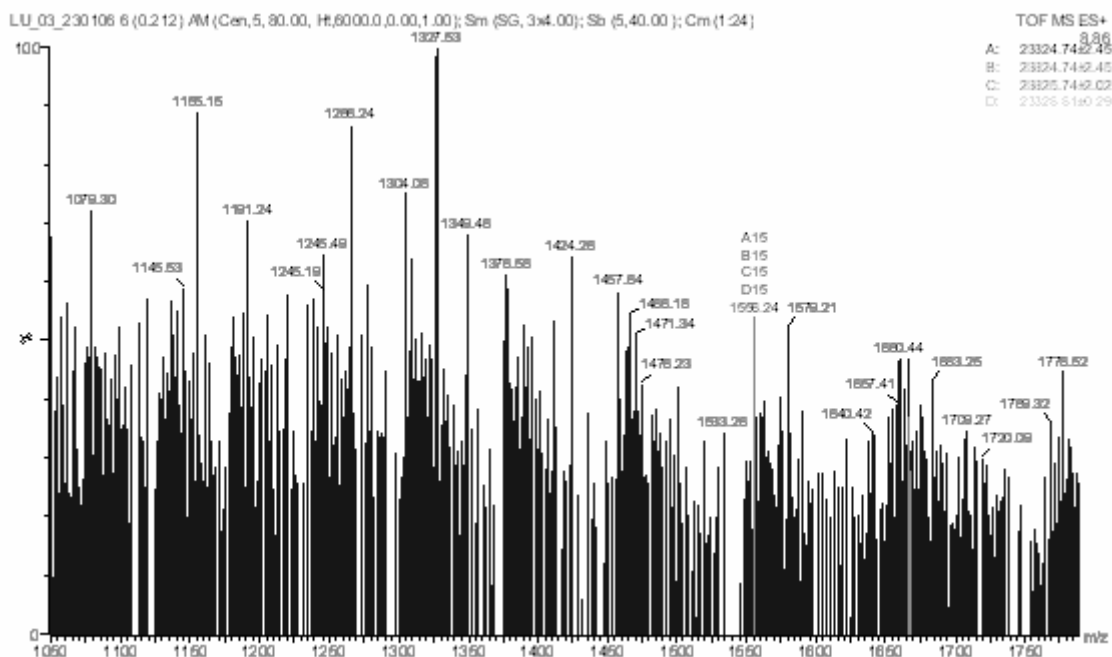


Figura 11 - Análise por espectrometria de massa em ESI-TOF de amostra do pico 3 obtido na fase reversa. A análise foi feita utilizando-se de 15 μ L do pico 3 obtido da fase reversa adicionado de 15 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v). As energias utilizadas no cone de ionização e no capilar foram, respectivamente, de 60 e 3.000 V.

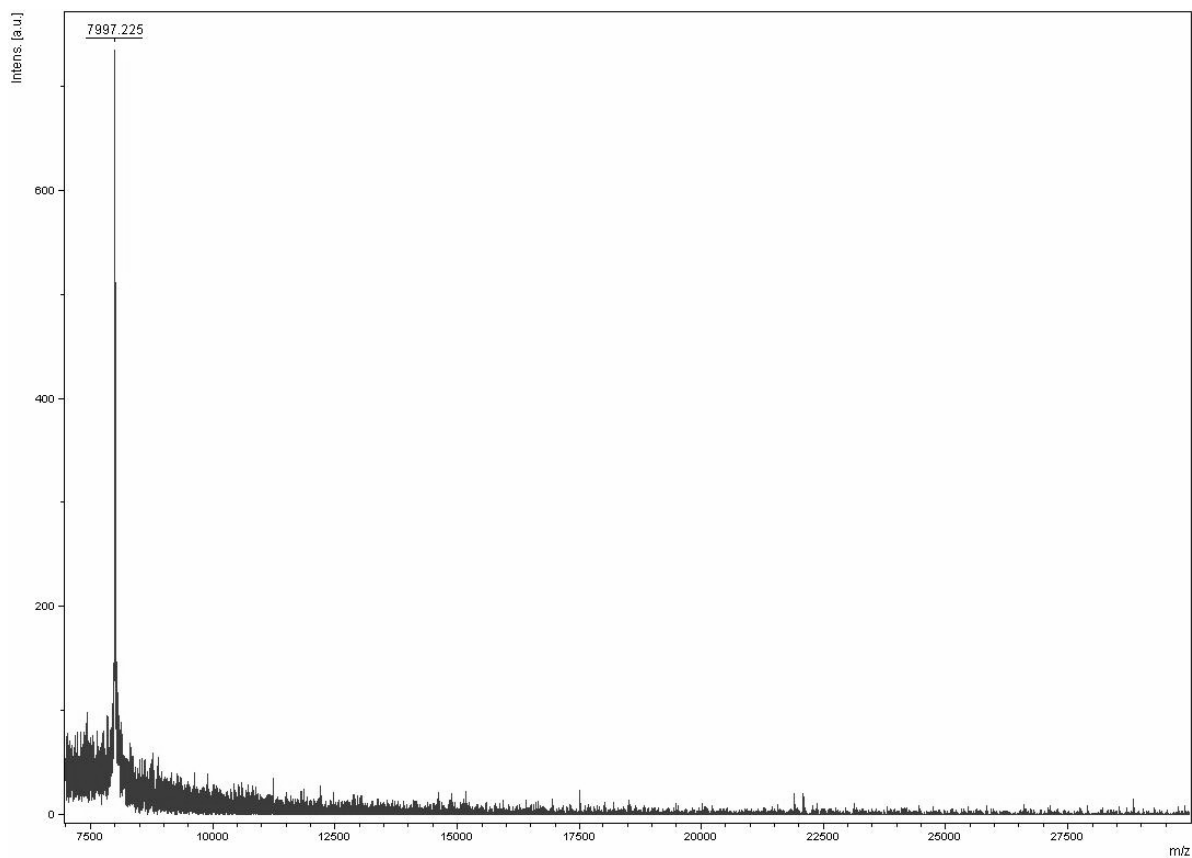


Figura 12 - Análise por espectrometria de massa em MALDI-TOF de amostra do pico 3 obtido na fase reversa. O espectro de massa foi obtido em MALDI-TOF de alíquotas do pico 3 (Figura 3) enviadas ao Laboratório de Análise de Proteínas (EMBRAPA-CENARGEN).

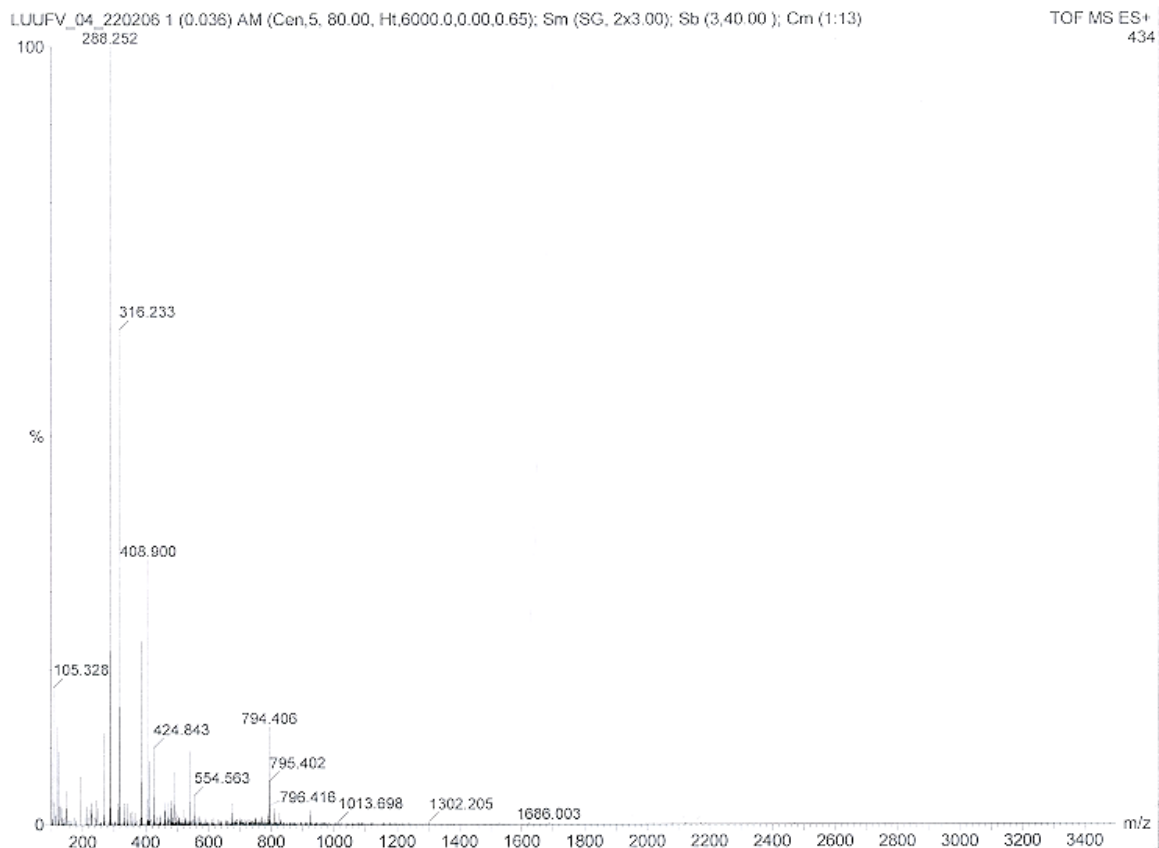


Figura 13 - Espectrograma de massa obtido em ESI-TOF representativo das amostras dos picos 2, 4, 5 e 6 obtidos na fase reversa. A análise foi feita utilizando-se de 15 μ L dos referidos picos 2, 4, 5 e 6 adicionados de 15 μ L de solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 0,1% (v/v). Nos espectros de massa, em cada pico analisado não se detectou valor de massa correspondente a tripsinas. As energias utilizadas no cone de ionização e no capilar foram, respectivamente, de 60 e 3.000 V.

4. DISCUSSÃO

As proteases tripsina-*like* do intestino médio de *A. gemmatalis* foram purificadas pela combinação de cromatografia de afinidade (coluna de *p*-aminobenzamidina), cromatografia de troca catiônica (coluna Mono-S HR 5/5) em sistema de FPLC e cromatografia de fase reversa (coluna de C-18) em sistema de HPLC (Quadro 1).

O perfil cromatográfico da afinidade apresentou um único pico eluído com atividade amidásica, detectada usando-se L-BApNA como substrato (Figura 1). As frações com atividade foram agrupadas e aplicadas em cromatografia de troca iônica. No perfil cromatográfico observado na troca iônica (Figura 2) não foi possível separar em picos bem definidos as frações correspondentes à detecção de proteína (Abs 280 nm) e a atividade amidásica (Abs 410 nm). O perfil da Absorvância a 410 nm demonstra, no mínimo, dois picos de maior atividade que estão sobrepostos (Figura 2). Portanto, as frações com atividade amidásica após a troca iônica foram agrupadas e aplicadas em cromatografia de fase reversa.

Na cromatografia de fase reversa, os cinco picos eluídos e um pico que não se ligou à coluna C-18 (Figura 3) foram analisados em SDS-PAGE e por espectrometria de massa. As frações após a fase reversa não tiveram a concentração de proteína detectada pelo método de Bradford (1976) e em pouco tempo após a cromatografia perderam praticamente toda a atividade. Portanto, na elaboração da tabela de purificação o cálculo de atividade específica ($13,2\mu\text{ M}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$) e de fator de purificação (123,4 vezes) foi feito utilizando-se os dados das amostras obtidas na troca iônica (Quadro 1). Com o intuito de verificar se as soluções utilizadas na cromatografia de fase reversa interferiram ou não na queda da atividade amidásica, essas soluções foram ensaiadas diretamente com o *pool* de amostras após troca iônica, considerando o controle do ensaio com atividade relativa de 100%, observou-se que as amostras testadas com acetonitrila ou TFA, nas mesmas concentrações utilizadas na

cromatografia de fase reversa, mantiveram de 95 a 98% da atividade relativa, ou seja, as soluções utilizadas não interferiram na atividade amidásica.

Análise com PMSF, inibidor clássico irreversível de enzimas da classe das serino proteases, reage com a hidroxila da Ser do sítio ativo (GOLD & FAHRNEY, 1964) (Figura 5, linha 4); TLCK, que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da tripsina exercendo, assim, efeito de inibidor irreversível sobre a enzima (SHAW et al., 1965) (Figura 5, linhas 5 e 6); e TPCK, que promove alquilação do resíduo de histidina da tríade catalítica da quimotripsina (SCHOELLMANN & SHAW, 1962) (Figura 5, linha 3), em SDS-PAGE copolimerizado com gelatina, mostrou que estas são serino proteases tripsina-like (Figura 5).

A determinação cinética também foi realizada utilizando-se a fração obtida na troca iônica com atividade amidásica. O valor de $K_{M\text{ app}}$ encontrado para as tripsinas-like catiônicas de *A. gemmatalis*, $K_{M\text{ app}}$ de 0,46 mM, foi semelhante aos dados da literatura já mostrados em Lepidoptera, utilizando-se como substrato L-BApNA. Johnston et al. (1991) encontraram para endoproteases de *Helicoverpa armigera*, um valor de $K_{M\text{ app}}$ de 0,257 mM, semelhante aos resultados deste trabalho. Lee & Anstee (1995) também encontraram para tripsina-like caracterizada do intestino médio de *S. littoralis* um $K_{M\text{ app}}$ de 0,257 mM. Novillo et al. (1999) encontraram valores K_M para duas tripsinas-like (I e II) purificadas e caracterizadas de *Sesamia nonagrioides*, de 0,22 mM e de 0,17 mM, respectivamente. Bernardi et al. (1996) purificando uma tripsina de *Ostrinia nubilalis*, e obtiveram um K_M de 0,41 mM. Em trabalhos anteriores, frações de membrana e solúvel parcialmente purificada de intestino médio de *A. gemmatalis* foram caracterizadas quanto ao valor de $K_{M\text{ app}}$, nas proteases da fração solúvel parcialmente purificadas o $K_{M\text{ app}}$ foi de 0,32 mM (OLIVEIRA et al., 2005) e o da fração de membrana que foi de 0,23mM (XAVIER et al., 2005) (Quadro 2). Entretanto, o perfil de atividade enzimática encontrado não seguiu a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada, uma vez que seu gráfico de atividade versus concentração de substrato não se adequou perfeitamente ao perfil de curvas hiperbólicas. Novas análises experimentais devem ser feitas para verificar esse resultado, bem como, outros modelos estatísticos aplicados.

O espectrômetro de massa é um instrumento analítico que converte componentes de amostras em íons gasosos (moléculas eletricamente carregadas) e mensura a sua massa. O espectrômetro de massa é sensível a pequenas quantidades de analito (na ordem de pMol/L) e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção. Através da

espectrometria de massa, é possível também determinar seqüências de DNA, de ácidos nucleicos, de aminoácidos em proteínas e de estruturas complexas de carboidratos. O poder de resolução de espectrômetro de massa é limitado pela variação da energia cinética dos íons que emergem da fonte de íons, normalmente 0,1%. Essa variação limita o poder de resolução do instrumento em ~ 1000 Da, correspondendo a uma resolução de 0,1 em $m/z = 100$ (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Na análise por espectrometria, encontrou-se a massa de 1.750,8 Da (ESI-TOF+) para o pico 1 da fase reversa sem inibidor (Figura 10). Esse pico não se liga à coluna C-18, cujo valor de massa molecular equivale a aproximadamente a um peptídeo com 16 resíduos de aminoácidos. Esse peptídeo deve ser analisado posteriormente com maior atenção, pois possui massa molecular similar à dos peptídeos descritos de ativação e sinal liberados durante a ativação dos tripsinogênios (LEHANE et al., 1998). O pico 3 da fase reversa apresentou a massa de 23.324,74 Da (ESI-TOF+) (Figura 11), foram observadas cinco séries moleculares que nos inferiram a esta massa, nenhum dos componentes que poderiam interferir na análise por ESI estavam presentes na amostra (sais, tampão não volátil, material polimérico), entretanto, o perfil do espectro de massa mostrou-se complexo, com a presença de vários “envelopes de massas moleculares” que podem ou não ser correspondentes à amostra deste estudo ou a ruídos que interferem na aquisição de dados, portanto, não se pode afirmar que a massa encontrada seja mesmo a de 23.324,74 Da. Em condições adversas e, ou, na presença de inibidores, como descrito na literatura, tripsinas de Lepidoptera podem oligomerizar, e um aumento de massa molecular acima de 30 kDa (faixa de aquisição máxima de massa do equipamento) prejudicaria a aquisição de dados, o que pôde ter ocorrido nesta análise.

Em uma segunda análise alguns dias depois, essa mesma amostra (pico 3) apresentou apenas a massa de 7.997,23 Da (MALDI-TOF) (Figura 12), o que evidencia fortemente a ocorrência de autólise, já que nenhum contaminante (Urea $>0,4M$; Guanidina-HCl $>0,4M$; Glicerol $>1\%$ v/v; sais de íons metálicos $> 0,1M$; Tampão Tris $> 0,05M$; $NH_4HCO_3 > 0,05M$; Tampão Fosfato $> 0,01M$; Detergentes (menos SDS) $>0,1\%$ m/v; SDS $> 0,01\%$ m/v) (WESTERMEIER & NAVEN, 2002; PALMA et al., 2003) que poderia interferir na aquisição de dados estava presente na amostra enviada, pois esta foi dessalinizada em fase reversa e estava apenas em solução de acetonitrila. Para se ter maior confiabilidade nessa massa obtida pelo MALDI, novos ensaios devem ser feitos escolhendo-se uma matriz diferente da que foi usada, já que a escolha foi realizada de acordo com o padronizado para tripsina bovina. Segundo a literatura, tripsinas de Lepidopteras são mais hidrofóbicas, fato que interferiria na análise no MALDI. Assim, a escolha de uma matriz para amostras hidrofóbicas seria mais

adequado, bem como a seleção de um solvente de volatilização mais lenta, pois volatilização rápida favorece a detecção de apenas componentes de baixa massa molecular, suprimindo o sinal da amostra real, além de escolher um solvente ideal para proteínas e peptídeos hidrofóbicos.

Os demais picos da fase reversa não foram detectados por ESI-TOF (Figura 13), uma possível causa é o fato de que as amostras aqui analisadas não ionizaram o suficiente para “voar” e atingir o detector do sistema; outra suposição é a de que, como algumas das proteases analisadas são glicosiladas (Figura 6), a glicosilação poderia estar interferindo na detecção dessas proteases; outra hipótese é a de que, como essas proteases podem se oligomerizar, como visto por BRITO et al. (2001), LOPES et al. (2004) e OLIVEIRA et al. (2005) e na primeira parte deste trabalho, a oligomerização impediria a detecção no ESI-TOF, e as massas formadas ultrapassariam a faixa ideal de detecção do aparelho (até ~30 kDa). Em análise por SDS-PAGE apenas o pico 4, obtido na fase reversa, apresentou uma única banda de 30 kDa, uma vez que os outros picos não foram corados pela prata devido à baixa concentração de proteína.

Inicialmente para confirmar a ocorrência de autólise nas amostras, realizou-se todo o procedimento de purificação, cromatografia de afinidade, troca iônica e fase reversa, nessa seqüência, na presença e ausência de 5 mM de PMSF. O perfil final deste ensaio pode ser visto no cromatograma da fase reversa (Figura 3).

De acordo com o cromatograma obtido, verificou-se que os picos 1 (que não se liga à coluna C18), 4 e 5 (que são eluídos), no perfil com PMSF, tiveram pequena redução na absorvância a 280 nm, em comparação com o perfil sem inibidor. Já os picos 2 e 3 (que também são eluídos), no perfil com PMSF, desapareceram quando comparados com perfil sem inibidor, entretanto o pico 6 praticamente manteve a mesma faixa de absorvância quando comparado com o perfil sem PMSF. O pico 2 (massa não determinada) e o pico 3 (23.324,74Da – ESI-TOF+) ao serem comparados com os seus correspondentes no perfil com PMSF, indicaram que provavelmente os picos 2 e 3 tenham sofrido hidrólise durante o processo de purificação sem o PMSF, inibidor clássico irreversível de enzimas da classe das serino proteases que inibe a atividade enzimática, por reagir com a hidroxila da Ser do sítio ativo da enzima (GOLD & FAHRNEY, 1964).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, uma serino protease tripsina-*like* catiônica com massa molecular de 30 kDa (SDS-PAGE) foi obtida do intestino médio de *A. gemmatalis*, praga agrícola de cultivares de soja, e purificada pela combinação de cromatografia de afinidade (coluna de *p*-aminobenzamidina agarose), cromatografia de troca catiônica (coluna Mono-S HR 5/5), em sistema de FPLC e cromatografia de fase reversa (coluna de C-18), em sistema de HPLC.

Para confirmar a ocorrência de autólise nas amostras aqui analisadas, realizamos todo o procedimento de purificação, cromatografia de afinidade, troca iônica e fase reversa, nessa seqüência, na presença e ausência de 5 mM de PMSF, e a análise desse resultado indica a ocorrência de hidrólise das amostras purificadas.

Em análise em SDS-PAGE das proteases parcialmente purificadas, observara-se proteases com massa molecular de 24,8 kDa, 26,3 kDa, 30 kDa, 33,4 kDa, e, em zimograma com PMSF, TLCK e TPCK, demonstrou-se que essas proteases são serino proteases tripsina-*like*. Em análise por SDS-PAGE de uma tripsina-*like* purificada, pico 4 obtido na fase reversa, ela apresentou uma única banda de 30 kDa, e os outros picos não foram corados pela prata devido à baixa concentração de proteína. Em teste de glicosilação com estas mesmas amostras, verificou-se que as proteases de 24,8 kDa e de 26,3 kDa são glicosiladas.

A determinação cinética também foi realizada utilizando-se a fração obtida na troca catiônica com atividade amidásica. O valor de K_M app encontrado para as tripsinas-*like* catiônicas de *A. gemmatalis*, K_M app de 0,46 mM, foi semelhante aos dados da literatura, já mostrados em Lepidopteras utilizando o substrato cromogênico L-BApNA. Entretanto, o perfil de atividade enzimática encontrado não seguiu a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada, uma vez que seu gráfico de atividade versus concentração de substrato não se adequou perfeitamente ao perfil de curvas hiperbólicas.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R, JEDLICKA, A.E., MINTZ, M., MAHAIRAKI, V., SCOTT, A.L., DIMOPOULOS. G., 2005. Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 709-719.
- AHMAD, Z., SALEEMUDDIN, M., SIDDI, M., 1980. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry* 10, 667–673.
- ASANO, T., ASHIDA, M., 2001. Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombix mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 11100-11112.
- ASHIDA, M., DOHKE, K., 1980. Activation of pro-phenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm, *Bombix mori*. *Insect Biochemistry* 10, 33-47.
- BERNADI, R., TEDESCHI, G., RONCHI, S., PALMIERI, S., 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like from larvae of european corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect of Biochemistry and Molecular Biology* 25, 883-889.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Eletrophoresis* 8, 93-99.

BOTOS, I., MEYER, E., NGUYEN, M., SWANSON, S.M., KOOMEN, J.M., RUSSEL, D.H., MEYER, E.F., 2000. The structure of an insect chymotrypsin. *Journal Molecular Biology* 298, 895-901.

BOWN, D.P., WILKINSON, H.S., GATEHOUSE, J.A., 1997. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 625–638.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

BRITO, L.O., LOPES, A.R., PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128B, 365-375.

BROADWAY, R.M., 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology* 41(2), 107-116.

BROADWAY, R.M., DUFFEY, S.S., 1986. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 32(10), 827-833.

BULET, P., HETRU, C., DIMARQ, J-L., HOFFMANN, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 329-344.

CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515-1539.

- CARTER, P., WELLS, J.A. 1998. Dissecting the catalytic triad of serine protease. *Nature* 332, 564-568.
- CHOUGULE, N.P, GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S., 2005. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 355-367.
- COLEBATCH, G., EAST, P., COOPER, P., 2001. Preliminary characterization of digestive proteases of the green mired, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 415-423.
- CRAIK, C.S., ROCZNIAK, S., LARGMAN, C., RUTTER, W.J., 1987. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. *Science* 237, 909-913.
- CRHISTELLER, J.T., SHAW, B.D., 1989. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. *Insect Biochemistry* 19, 233-241.
- DE ALMEIDA, R.W., TOVAR, F.J., FERREIRA, L.I., LEONCINI, O., 2003. Chymotrypsin genes in the malaria mosquitoes *Anopheles aquasalis* and *Anopheles darlingi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 307–315.
- DE LEO, F., BONADÉ-BOTTINO, M., CECI, L.R., GALLERANI, R., JOUANIN, L., 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 593-602.
- DÍAS-MENDOZA, M., ORTEGO, F., GARCÍA de LACOBÁ, M., MAGAÑA, C., DE LA POZA, M., FARINÓS, G.P., CASTAÑERA, P., HERNÁNDEZ-CRESPO, P., 2005. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1005-1020.

DIMARQ, J-L., HUNNEYBALL, I., 2003. Pharma-entomology: when bugs become drugs. *Drug Discovery Today* 8(3), 107-110.

DIMOPOULOS, G., MÜLLER, H-M, LEVASHINA, E.A., KAFATOS, F.C., 2001. Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Current Opinion in Immunology* 13, 79-88.

DODSON, G., WLODAWER, A., 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biological Science* 23, 347-352.

EGUCHI, M., KURIYAMA, K., 1985. Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from the midgut tissue of the silk-worm *Bombyx mori*. *Journal of Biochemistry* 97, 1437–1445.

ELPIDINA, E., VINOKUROV, K.S., GROMENKO, V.A., RUDENSKAYA. Y.A., DUNAEVSKY, Y.E., ZHUZHNIKOV, D.P., 2001. Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 206-216.

EMBRAPA – CNPSo, 1995. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. *Manejo de pragas da soja*. Circular Técnica da EMBRAPA – CNPSo, 5, 44p.

ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.

FAHRNEY, D.E., GOLD, A.M., 1963. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, alpha-chymotrypsin, and trypsin. *Journal of American Chemical Society* 85, 997-1000.

FAIRBANKS, G., STECK, T.L., WALLACH, D.F.H., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13), 2606-2617.

FASTREZ, J., FERSHT, A.R., 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry* 12, 2025-2034

FELTON, G.W., GATEHOUSE, J.A., 1996. Antinutritive plant defence mechanisms. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 373-416.

FOISSAC, X., EDWARDS, M., DU, J.P., GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE, J.A., 2002. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparva lugens*: Delphacidae) – identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 967-978.

FRANCO, O.L., MELO, F.R., SILVA, M.C.M., GROSSI de SÁ, M.F., 1999. Resistência de plantas a insetos: inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. *Biotechnologia – Ciência e Desenvolvimento* 11, 36-40.

GABAY, J.E., 1988. Microbicidal mechanisms of phagocytes. *Current Opinion in Immunology* 1, 36-40.

GARCÍA-LARA, J., NEEDHAM, A.J., FOSTER, S.J., 2005. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43, 311-323.

GATEHOUSE, A.M.R., BOULTER, D., HILDER, V.A., 1992. Biotechnology in agriculture, n° 7: Plant genetic manipulation for crop protection. *CAB International*, 155-181.

GATEHOUSE, L.N., SHANNON, A.L., BURGESS, E.P.J., CHRISTELLER, J.T., 1997. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 929-944.

GEIGER, R., FRITZ, H., 1981. Human urinary kallicrein. In: Loreland, L. (Ed). *Proteolytic Enzymes*, part C. Academic Press, New York, p. 466-492.

GIRARD, C., LE MÉTAYER, M., BONADÉ-BOTTINO, M., PHAM-DELÈGUE, M-H., JOUANIN, L., 1998. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 229–237.

GOLD, A.M., FAHRNEY, D., 1964. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin. *Biochemistry* 3, 783-791.

GORMAM, M.J., ANDREEVA, O.V., PASKEWITZ, S.M., 2000. Molecular characterization of five serine protease genes cloned from *Anopheles gambiae* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 35-46.

GORMAM, M.J., ANDREEVA, O.V., PASKEWITZ, S.M., 2000a. Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene* 251, 9-17.

GORMAM, M.J., PASKEWITZ, S.M., 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune response. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 257-262.

GRAF, R., RAIKHEL, A.S., BROWN, M.R., LEA, A.O., BRIEGEL, H., 1986. Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.). *Cell Tissue Research* 245(1), 19-27.

HARTMANN, T., THEURING, C., WITTE, L., SCHULZ, S., PASTEELS, J.M., 2003. Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 515-523.

HEDSTRON, L., SZILAZYI, L., RUTTER, W.J., 1992. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* 255, 1249-1253.

HEGEDUS, D.; BALDWIN, D.; O'GRADY, M.; BRAUN, L.; GLEDDIE, S.; SHARPE, A.; LYDIATE, D.; ERLANDSON, M., 2003. Midgut protease from *Mamestra conFigurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 53, 30-47.

HILDER, V.A., BOULTER, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. *Crop Protection* 18, 177-191.

HOFFMAN-CAMPO, C.B., OLIVEIRA, E.B., MOSCARDI, F., 1985. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, *EMBRAPA-CNPSO*, 10, Documentos, 23p.

HOFFMANN, J.A., 1995. Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology* 7, 4-10.

HOFFMANN, J.A., REICHHART, J-M., HETRU, C., 1996. Innate immunity in higher insects. *Current Opinion in Immunology* 8, 8-13.

HOUSEMAN, J.G., MORRISON, P.E., DOWNE, A.E.R., 1985. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* (Hemiptera: Phymatidae). *Canadian Journal of Zoology* 63, 1288-1291.

IBGE, 2004. Coordenação de Agropecuária. *Indicadores Agropecuários 1996-2003*. Estudos e Pesquisas. Informação Econômica n3, 68p.

IMLER, J-L, HOFFMANN, J.A., 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 16-22.

INAGAMI, T., 1972. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K., MURACHI, T.; NARITA, K., ed. *Proteins structure and Function*. Tokio, Kodanska, p. 1-83.

JIANG, H., KANOST, M.R., 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 95-105.

JONGSMA, M., BOLTER, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43(10), 885-895.

JONGSMA, M.A.; PETERS, J.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D., 1996. Characterization and partial purification of gut proteinases of *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(2), 185-193.

JOHNSTON, K.A., GATEHOUSE, J.A., ANSTEE, J.H., 1991. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry* 21, 389-397.

- JORDÃO, B.P., LEHANE, M.J., TERRA, W.R., RIBEIRO, A.F., FERREIRA, C., 1996. An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(5), 445-453.
- KALHOK, S.E., TABAK, L.M., PROSSER, D.E., BROOK, W., DOWNE, A.E.R., WHITE, B.N., 1993. Isolation, sequencing and characterization of two cDNA clones coding for trypsin-like enzymes from the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 2, 71-79.
- KAVANAGH, K., REEVES, E.P. 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 101-112.
- KAWABATA, S-I., TOKUNAGA, F., KUGI, Y., MOTOYAMA, S., MIURA, Y., HIRATA, M., IWANAGA, S., 1996. Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. *FEBS Letters* 398, 146-150.
- KOIWA, H., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2, 379-384.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C., 2000. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 85-94.
- LAMBERTY, M., ADES, S., UTTENWEILER-JOSEPH, S., BROOKHART, G., BUSHEY, D., HOFFMANN, J.A., BULET, P., 1999. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *The Journal Biological Chemistry* 274(14), 9320-9326.

LAVINE, M.D., STRAND, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295-1309.

LEE, M.J., ANSTEE, J.H., 1995. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* includes a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(1), 49-61.

LEHANE, M.J., MÜLLER, H.M., CRISANTI, A., 1996. Mechanisms controlling the synthesis and secretion of digestive enzymes in insects. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 206-235.

LEHANE, S.M., ASSINDER, S.J., LEHANE, M.J., 1998. Cloning, sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. *European Journal of Biochemistry* 254(2), 290-296.

LEMOS, J.A., TERRA, W.R., 1992. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22(7), 613-619.

LEHRER, R.I., GANZ, T., 1999. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinion in Immunology* 11, 23-27.

LEVY, F., RABEL, D., CHARLET, M., BULET, P., HOFFMANN, J.A., EHRER-SABATIER, L., 2004. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* 86, 607-616.

LI, H., OPPERT, B., HIGGINS, R.A., HUANG, F., BUSCHMAN L.L., GAO, J-R., ZHU, K.Y., 2005. Characterization of cDNAs encoding three trypsin-like proteinases and mRNA quantitative analysis in Bt-resistant and –susceptible strains of *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 847-860

LI, X-F., NIE, X., TANG, J-G., 1998. Anti-autolysis of trypsin by modification of autolytic site Arg 117. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250, 235-239.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., JULIANO, L., TERRA, W.R., 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 55, 140-152.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., MARANA, S.R., JULIANO, L., TERRA, W.R., 2006. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 130-140.

LOPES, A.R., TERRA, W.R., 2003. Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta Americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 407-415.

MA, C., KANOST, M.R., 2000. A β 1, 3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *The Journal of Biological Chemistry* 275(11), 7505-7514.

MARANA, S.R., LOPES, A.R., JULIANO, L., JULIANO, M.A., FERREIRA, C., TERRA, W.R., 2002. Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochemical and Biophysical Research* 290, 494-497.

MARCHETTI, S., CHIABA, C., CHIESA, F., BANDIERA, A., PITOTTI, 1998. A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28, 449–458.

MARES-GUIA, M., ROGANA, E., AMORIN, A.F., MAGALHÃES-ROCHA, N.M., 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 1661-1668.

MARES-GUIA, M., SHAW, 1965. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *The Journal of Biological Chemistry* 240, 1579-1585.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S., BABU, C.R., BENNETT, J., 2000. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insects pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 57-68.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S., BROADWAY, R.M., 2001. Identification of six chymotrypsin cDNA from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 633-644.

McMANUS, M.T., BURGESS, E.P.J., 1995. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology* 41(9), 731-738.

MICHAUD, D., 1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends in Biotechnology* 15, 4-6.

MOFFAT, M.R., BLAKEMORE, D., LEHANE, M.J., 1995. Studies and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110B, 291-300.

MOFFAT, M.R., LEHANE, M.J., 1990. Trypsin is stored as an inactive zymogen in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochemistry* 20, 719-723.

MUHARSINI, S., DALRYMPLE, B., VUOCOLO, T., HAMILTON, S., WILLADSEN, P., WIJFFELS, G., 2001. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae *Chrysomya bezziana*, the old Screwworm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 1029-1040.

MÜLLER, H.M., CRAMPTON, J.M., DELLA TORRE, A., SINDEN, R., CRISANTI, A., 1993. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *EMBO Journal* 12, 2891-2900.

NAGHMOUCHI, K., DRIDER, D., KHEADR, E., LACROIX, C., PRE´VOST, H., FLISS, I., 2006. Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology* 100, 29-39.

NAITZA, S., LIGOXYGAKIS, P., 2004. Antimicrobial defences in *Drosophila*: the story so far. *Molecular Immunology* 40, 887-896.

NAKAJIMA, Y., TSUJI, Y., HOMMA, K., NATORI, S., 1997. A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *The Journal of Biological Chemistry* 272(28), 23805-23810.

NATION, J.L.P., 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press LLC, London, p. 485.

NOVILLO, C., CASTAÑERA, P., ORTEGO, F., 1999. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 177-184.

OLIVEIRA, M.G.A., DE SIMONE, S.G., XAVIER, L.P., GUEDES, R.N.C., 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140B, 369-380.

OLIVEIRA, M.G.A., ROGANA, E., ROSA, J.C., REINHOLD, B.B., ANDRADE, M.H., GREENE, L.J., MARES-GUIA, M., 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. *The Journal of Biological Chemistry* 268(36), 26893-26903.

OLIVEIRA-NETO, O.B., BATISTA, J.A.N., RIGDEN, D.J., FRAGOSO, R.R., SILVA, R.O., GOMES, E.A., FRANCO, O.L., DIAS, S.C., CORDEIRO, C.M.T., MONNERAT, R.G., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2004. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 903–918.

OPPERT, B., MORGAN, T.D., HARLZEG, K., KRAMER, K.J., 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 140C, 53-58.

OPPERT, B., MORGAN, T.D., HARTZER, K., LENARCIC, B., GALESA, K., BRZIN, J., TURK, V., YOZA, K., OHTSUBO, K., KRAMER, K.J., 2003. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134C, 481-490.

PALMA, M.S., MENDE, M.A., SOUZA, B.M., MARQUES, M.R., 2003. *MALDI-ToF-MS: Theory and Practice*. Laboratory of structural biology and zoochemistry, UNESP, Rio Claro, SP-Brasil.

PASTERNAK, A., RINGE, D., HEDSTROM, L., 1999. Comparison of anionic and cationic trypsinogens: the anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Protein Science* 8(1), 253-258.

PATANKAR, A.G., GIRI, A.P., HARSULKAR, A.M., SAINANI, M.N., DESHPNDE, V.V., RANJEKAR, P.K., GUPTA, V.S., 2001. Complexity inspecificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 453-464.

PAULILLO, L.C.M.S., LOPES, A.R., CRISTOFOLETTI, P.T., PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M., 2000. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *Journal of Economic Entomology* 93(3), 892-896.

PAULSEN, I.T., BANERJEE, L., MYERS, G.S.A., NELSON, K.E., SESHADRI, R., READ, T.D., FOUTS, D.E., EISEN, J.A., GILL, S.R., HEIDELBERG, J.F., TETTELIN, H., DODSON, R.J., UYAM, L., BRINKAC, L., BEANAN, M., DAUGHERTY, S., DEBOY, R.T., DURKIN, S., KOLONAY, J., MADUPU, R., NELSON, W., VAMATHEVAN, J., TRAN, B., UPTON, J., HANSEN, T., SHETTY, J., KHOURI, H., UTTERBACK, T., RADUNE, D., KETCHUM, K.A., DOUGHERTY, B.A., FRASER, C.M., 2003. Role of mobile DNA in the evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.

PAULULAT, A., 1996. Try29F, a new member of the Drosophila trypsin-like protease gene family, is specifically expressed in the posterior embryonic midgut. *Gene* 172(2), 245-247.

PERONA, J.J., CRAIK, C.S., 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science* 4, 337-360.

PETERSON, A.M., BARILLAS-MURY, C.V., WELLS, M.A., 1994. Sequence of three cDNA encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24, 463-471.

PILON, A.M., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R.N.C., 2006. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology, In Press*.

PÓLGAR, L., HALÁSZ, P., 1982. Currents problems in mechanistic studies of serine and cisteyne proteases. *Biochemical Journal* 207, 1-10.

PURCELL, J.P., GREENPLATE, J.P., SAMMONS, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 41-47.

RAMALHO-ORTIGÃO, J.M., KAMHAVI, S., ROWTON, E.D., RIBEIRO, J.M.C., VALENZUELA, J.G., 2003. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 163–171.

RAO, M.B., APARNA, M.T., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 597-635.

RAWLING, N.D., BARRET, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 290(1), 205-218.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRETT, A.J., 2006. *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* 34, D270-D272.

ROSS, J., JIANG, H., KANOST, M.R.; WANG, Y., 2003. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene* 304, 117–131.

- RUSSEL, V., DUNN, P.E., 1996. Antibacterial proteins in the midgut trypsin from *Manduca sexta* during metamorphosis. *Journal of Insect Physiology* 42(1), 65-71.
- SAHIN-TÓTH, M., 2000. Human cationic trypsinogen. Role of asn-21 in zymogen activation and implications in hereditary pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry* 275(30), 22750-22755.
- SANTOS, C. D., RIBEIRO, A.F., TERRA W.R., 1986. Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. *Canadian Journal of Zoology* 64, 490-500.
- SASAKI, T.; HISHIDA, T.; ICHIKAWA, K.; ASARI, S., 1993. Amino acid sequence of alkaliphilic serine protease from silkworm, *Bombyx mori*, larval digestive juice. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)* 320, 35-37.
- SCHECHTER, I., BERGER, A., 1967. On the size of the active site in proteases. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 27, 157-162.
- SCHOELLMANN, G., SHAW, E., 1962. A new method for labelling the active center of chymotrypsin. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* 7, 36-40.
- SCHULER, T.H., POPPY, G.M., KERRY, B.R., DENHOLM, I., 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology* 16, 168-175.
- SHAW, E., MARES-GUIA, M., COHEN, W., 1965. Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from N α -tosyl-L-lisine. *Biochemistry* 4, 2219-2224.

SICHLERA, K., HOPFNER, K-P., KOPETZKI, E., HUBER, R., BODE, W., BRANDSTETTER, H., 2002. The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Letters* 530, 220-224.

SILVA, C.P., TERRA, W.R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI DE SÁ, M.F., ISEJIMA, E.M., DA MATTA, R.A., MIGUENS, F.C., BIFANO, T.D., 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 41-50.

SILVA, F.B., OLIVEIRA, M.G.A., BATISTA, R.B., PIRES, C.V., XAVIER, L.P., PIOVESAN, N.D., OLIVEIRA, J.A., JOSÉ, I.C., MOREIRA, M.A., 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico* 60(1), 67-74.

SILVA-FILHO, M.C., FALCO, M.C., 2000. Interação Planta-inseto – Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases Produzidas pelas Plantas. *Biotechnologia – Ciência e Desenvolvimento* 12, 38-42.

SIPOS, T., MERKEL, J. R., 1968. Temperature-dependent activation of trypsin by calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31(4), 522-527.

SIPOS, T., MERKEL, J. R., 1970. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* 9(14), 2766-2775.

STOTZ, U.H., KROYMANN, J., MITCHELL-OLDS, T., 1999. Plants-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 268-272.

TELANG, M.A.; GIRI, A.P; SAINAMI, M.N.; GUPTA, V.S., 2005. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 51, 513-522.

TERRA, W., FERREIRA, C., BAKER, J.E., 1996. Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 206-235.

TERRA, W., FERREIRA, C., JORDÃO, B.P., DILLON, R.J., 1996a. Digestive enzymes. In: LEHANE, M.J. & BILLINGSLEY, P.F. (ed). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 153-186.

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

TSUJI, Y., NAKAJIMA, Y., HOMMA, K., NATORI, S., 1998. Antibacterial activity of a novel 26 kDa serine protease in the yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) pupae. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS)* 425, 131-133.

VALAITIS, A.P., 1995. Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(1), 139-149.

VARALLYAY, E., PÁL, G., PATTHY, A., SZILÁGYI, L., GRÁF, L., 1998. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 243, 56-40.

VOLPICELLA, M., CECI, L., R., CORDEWENER, J., AMERICA, T. GALLERANI, R., BODE, W., JONGSMA, M.A., BEEKWILDER, J., 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 270, 10-19.

WAGNER, W., MÖHRLLEN, F., SCHNETTER, W., 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32(7), 803-814.

WANG, S., MAGOULAS, C., HICKEY, D.A., 1995. Isolation and characterization of a full-length trypsin-encoding cDNA clone from the Lepidopteran insect, *Choristoneura fumiferana*. *Gene* 136, 375-376.

WARD, C.W., 1975. Properties and specificity of the major anionic trypsin-like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochemica et Biophysica Acta* 391(1), 201-211.

WESTERMEIER, R., NAVEN, T. *Proteomics in Practice: A Laboratory manual of proteome analysis*. Wiley-vch verlag-gmbh, Weinheim, 2002.

XAVIER, L.P., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R.N.C., SANTOS, A.V., DE SIMONE, S.G., 2005. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology* 102, 147-153.

YAN, J., CHENG, Q., LI, C-B., 2001. Molecular characterization of two serine proteases expressed in gut tissue of the African trypanosome vector, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 10, 47-56.

YU, X-Q., JIANG, H., WANG, Y.M KANOST, M.R., 2003. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 197-208.

ZHENG, F., ZHU, Y., COHEN, A., 2002. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131B, 453-463.

ZHU, Y-C., BAKER, J.E., 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzyme and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 1053-1063.

ZHU, Y-C., KRAMER, K.J., DOWDY, A.K., BAKER, J.E., 2000. Trypsinogen-like cDNAs and quantitative analysis of mRNA levels from Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1027-1035.